

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA EN *E. COLI* AISLADOS EN HECES DE OVEJAS RASA ARAGONESA

Alcalá¹, B., González^{2,3}, J.M., Navarro³, T., Serrano⁴, M., Calvete¹, C., Marín¹, C.M. y Calvo^{1,5*}, J.H.

¹CITA-IA2. Av. Montañana 930, 50059, Zaragoza, España. ²Gabinete Técnico Veterinario S.L., Zaragoza, España. ³Universidad de Zaragoza-IA2. C. Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, España.

⁴INIA-CSIC. Ctra. de La Coruña km 7,5. 28040 Madrid, España.

⁵ARAID. Av. Ranillas I-D, 50018, Zaragoza, España

*jhcalvo@cita-aragon.es

INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana (RAM) en bacterias zoonóticas aisladas a partir de animales de abasto suele asociarse al uso de antibióticos en la práctica veterinaria. Así, por ejemplo, las RAMs a la ampicilina, el sulfametoxazol, el trimetoprim y la tetraciclina son habitualmente altas en bacterias indicadoras (*E. coli*) aisladas de aves, cerdos o bovinos, existiendo también niveles altos de RAM a las quinolonas (antibióticos críticos en humana), en cepas de *E. coli* aisladas en pollos (EFSA y ECDC, 2021). El objetivo de este trabajo fue identificar genes de resistencia a antibióticos, mediante técnicas de secuenciación masiva del ADN, en corderos sanos y con diarrea dentro de una misma explotación.

MATERIAL Y MÉTODOS

En total se tomaron muestras de heces del recto de 30 animales (30 días de edad) de una misma explotación: 15 animales presentaron diarrea y 15 eran aparentemente sanos. Se llevó a cabo cultivos microbiológicos en agar sangre y MacCONKEY, procediéndose a aislar e identificar las distintas colonias por métodos bacteriológicos y el equipo Vitek®2 Compact. Como se determinó como causante de la diarrea el excesivo número de *E. coli* en los animales con diarrea, se seleccionaron *E. coli* en todos los corderos (sanos y enfermos), analizándose su sensibilidad a antibióticos mediante la norma ISO 20776-1 de concentración mínima inhibitoria (MICs). Se procedió a la secuenciación masiva de nueva generación (NGS), que se llevó a cabo tras la construcción de librerías de fragmentos cortos de 150 pb y secuenciación con la tecnología Illumina; y por otro lado, librerías de fragmentos largos y secuenciación con tecnología de Nanoporos (ONT). Tras los respectivos controles de calidad, se llevó a cabo un ensamblado *de novo* híbrido usando las secuencias Illumina y de Nanoporos con el programa SPAdes. La identificación de genes de resistencia adquirida a los antibióticos y mutaciones en genes asociadas a las mismas, genes de virulencia y predicción de elementos genéticos móviles, y tipificación multilocus se realizó utilizando los programas ResFinder y MobileElementFinder en el servidor del "Center for Genomic Epidemiology" (CGE) (<https://www.genomicepidemiology.org/>) y el software ABRicate. Igualmente, se identificó la localización de estos elementos en plásmidos o en el cromosoma bacteriano, y se llevó a cabo un análisis filogenético utilizando CSIphylogeny (CGE) y MEGA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron 14, 12, 9, 12, 8 y 2 aislados con resistencias a aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, aminociclitol, beta-lactámicos y anfenicol, respectivamente, en el cromosoma bacteriano. En plásmidos, que tienen una mayor implicación epidemiológica, se encontraron genes de resistencia en 10, 9, 4, 4, 8, 2, 2 y 1 aislados con resistencias a aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, aminociclitol, beta-lactámicos, anfenicol, quinolonas, lincosamida y estreptogramina b, respectivamente. Es destacable que se encontraron multiresistencias. Teniendo en cuenta que la pauta de tratamiento habitual en animales con diarrea en esta explotación es con lincomicina y espectinomina, y que en el pasado también se emplearon quinolonas, es de remarcar que no se asoció la presencia de genes de resistencia frente a estos antibióticos a la presencia, o no, de diarrea. En los aislados analizados se encontró una elevada correlación (0,97) entre los resultados de las MICs y los genes de resistencia identificados. No se encontró ninguna asociación entre factores de virulencia, elementos móviles, o relación filogenética con la aparición, o no, de diarrea.

CONCLUSIÓN

Mediante la aplicación de técnicas de secuenciación masiva de aislados de *E. coli* en heces se encontró un elevado número de genes de resistencia, aunque estas resistencias no se asociaron a la presencia de diarreas o no.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EFSA, ECDC. 2021. EFSA Journal. 19(4): 6490.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado con fondos del Gobierno de Aragón. B. Alcalá recibe una ayuda del Programa investigo (Plan Nacional de Recuperación, Transformación y Resiliencia).