



## Identificación de genes de resistencia a antibióticos en heces de vacunos en pastoreo mediante secuenciación masiva de ADN bacteriano (metagenómica)

Rovira P.<sup>1\*</sup> y Feijoo M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 8 km 281, Treinta y Tres, Uruguay <sup>2</sup>Centro Universitario Regional del Este (CURE), Universidad de la República, Ruta 8 km 281, Treinta y Tres, Uruguay

[\\*provira@inia.org.uy](mailto:provira@inia.org.uy)

### Introducción y Objetivos

Una de las principales preocupaciones de los consumidores es el uso de antibióticos en animales y su asociación con genes de resistencia a antibióticos (ARG) en bacterias, que pueden ser transferidos al resto de la cadena cárnica (Lazarus et al., 2015). Es de esperar que los sistemas ganaderos en Uruguay, básicamente pastoriles y con uso restringido de antibióticos en animales, presenten una baja carga de ARG. Actualmente, el secuenciado masivo de ADN bacteriano (metagenómica) permite identificar reservorios de ARG en distintos nichos de producción y evaluar sus implicancias bajo el concepto de “Una Salud” (Noyes et al., 2016; Trinh et al., 2018). El objetivo del presente trabajo fue identificar ARG en las heces de novillos en pastoreo sin exposición directa a antibióticos mediante secuenciado masivo de ADN bacteriano (metagenómica).

### Materiales y Métodos

Se tomaron muestras de heces del recto de 18 vacunos sobreño provenientes de 3 grupos de animales (6 muestras por grupo) que se habían manejado por separado entre mayo y diciembre de 2019 en la Unidad Experimental Palo a Pique (INIA Treinta y Tres). Ningún grupo de animales había sido tratado con antibióticos. De cada muestra individual se extrajo ADN utilizando el kit QIAamp PowerFecal DNA kit (QIAGEN). Las 18 muestras de ADN fueron enviadas a Macrogen (Seúl, Corea del Sur), en donde se hicieron 2 muestras compuestas por grupo (3 submuestras por pool) para ser secuenciadas a través de metagenómica “shotgun” (100 bases por extremo pareado) en plataforma HiSeq 2500 (Illumina, Inc.). Las secuencias generadas fueron alineadas a la base de datos CARD (Alcock et al., 2020), con más de 3.000 ARG, y por homología de bases (>96%) se identificaron ARG con >80% de cobertura por las secuencias de las muestras.

### Resultados

Se generaron aproximadamente 72 millones de secuencias por muestra, a partir de las cuales se identificaron 6 ARG en las heces de vacuno en pastoreo (Cuadro 1). Cinco de ellos confieren resistencia a una clase de antibiótico (*tetQ*, *tet40*, *tetW*, *lnuC*, *mel*), mientras que el ARG restante confiere resistencia múltiple a 3 clases de antibióticos (*ErmG*). Tetraciclina fue la clase de antibiótico con mayor número de ARG, seguida por la resistencia a macrólidos. Proteínas de protección ribosomal fue el mecanismo de resistencia más común, observado en *tetQ*, *tetW*, y *mel*. Los 3 grupos de animales registraron presencia de ARG, totalizando 3 ARG en 2 grupos y 6 ARG en el grupo restante. La máxima presencia de ARG se observó en 2 muestras con 5 ARG por muestra, ambas provenientes del mismo grupo de animales, mientras que la mínima presencia fue de 1 ARG por muestra.

### Discusión

Genes de resistencia a tetraciclina fueron los más comunes encontrados en las heces de vacunos en pastoreo. Sin embargo, *mel* y *ErmG* son los de mayor preocupación ya que confieren resistencia a macrólidos, clase de antibiótico clasificada como críticamente importante en salud humana (WHO, 2017). Al respecto, no se encontraron ARG con resistencia a cefalosporinas, glicopéptidos, o quinolonas. Los ARG encontrados han sido localizados en elementos genéticos móviles en bacterias, como transposones conjugativos, lo que facilitaría su transmisión horizontal entre distintos grupos de bacterias (Wang et al., 2005; Ambrose et al., 2005). Los animales no habían sido tratados con antibióticos, lo que confirma que la presencia de ARG es algo natural en comunidades bacterianas (D’Costa et al., 2011). Comparado con estudios similares a nivel internacional (Vikram et al., 2017; Rovira et al., 2019), en donde se detectó resistencia a más del 10 clases de antibióticos en heces de novillos en

confinamiento, la carga y diversidad de ARG encontrada en el presente trabajo en heces de vacunos en pastoreo fue significativamente más baja.

Cuadro 1. Variantes de genes de resistencia encontradas en las heces de vacunos en pastoreo

Gen	Prevalencia <sup>1</sup>	Clase de antibiótico	Mecanismo de resistencia
<i>tetQ</i>	100%	Tetraciclina	Proteína de protección ribosomal
<i>lnuC</i>	83%	Lincosamida	Inactivación del antibiótico por medio de nucleotidiltransferasa
<i>tet40</i>	50%	Tetraciclina	Bomba de eflujo del antibiótico
<i>ErmG</i>	50%	Estreptogramina, macrólido, lincosamida	Alteración del objetivo del antibiótico por medio de 23S ribosomal ARN metiltransferasa
<i>tetW</i>	17%	Tetraciclina	Proteína de protección ribosomal resistente
<i>mel</i>	17%	Macrólido	Proteína de protección ribosómica del casete de unión a transportadores ABC

<sup>1</sup>Muestras positivas sobre el total de muestras analizadas

### Conclusiones

Mediante la aplicación de técnicas metagenómicas, se encontró una baja carga de ARG en heces de novillos en pastoreo en Uruguay confiriendo resistencia a tetraciclina, lincosamida, estreptogramina, y macrólidos.

**Palabras claves** resistencia a antibióticos, vacunos, metagenómica

### Literatura citada

- Alcock, B.P., Raphenya, A.R., Lau, T.T.Y., Tsang, K.K., Bouchard, M., Edalatmand, A. 2020. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research* 48: D517-D525.
- Ambrose, K.D., Nisbet, R., Stephens, D.S. 2005. Macrolide Efflux in *Streptococcus pneumoniae* Is Mediated by a Dual Efflux Pump (*mel* and *mef*) and Is Erythromycin Inducible. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(10): 4203-4209.
- D'Costa V. M., King C. E., Kalan L., Morar M., Sung W. W. L., Schwarz C., *et al.* 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477 457–461.
- Lazarus, B., Paterson, D.J., Mollinger, J.L., Rogers, B.A. 2015. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. *Clin. Infect. Dis.* 60 (3): 439-452.
- Noyes, N.R., Yang, L.M. Linke, R.J. Magnuson, A. Dettenwanger, S. Cook, R., *et al.* 2016. Characterization of the resistome in manure, soil and wastewater from dairy and beef production systems. *Sci. Rep.* 6: 24645.
- Rovira, P., McAllister, T., Lakin, S.M., Cook, S.R., Doster, E., Noyes, N.R., *et al.* 2019. Characterization of the Microbial Resistome in Conventional and “Raised Without Antibiotics” Beef and Dairy Production Systems. *Front. Microbiol.* 10: 1980.
- Trinh P, Zaneveld, J.R., Safranek, S., Rabinowitz, P.M. 2018. One Health Relationships Between Human, Animal, and Environmental Microbiomes: A Mini-Review. *Front. Public Health* 6:235.



## Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal

14-15 de Diciembre de 2021

Congreso virtual

- Vikram, A., Rovira, P., Agga, G.E., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M. Wheeler, T.L., Morley, P.S., Belk, K.E., Schmidt, J.W. 2017, Impact of “raised without antibiotics” beef cattle production practices on occurrences of antimicrobial resistance. Appl. Environm.. Microbiol. 83(22): e01682-17.
- Wang, Y., Wang, G.R., Shoemaker, N.B., Whitehead, T.R., Salyers, A.A. 2005. Distribution of the *ermG* Gene among Bacterial Isolates from Porcine Intestinal Contents. Appl. Environ. Microbiol. 71(8): 4930-4934.
- WHO (World Health Organization). 2017. WHO list of critically important antimicrobials for human medicine. Disponible en: <https://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017.pdf>