

Sensibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* en conejos frente a tiamulina, tilmicosina, enrofloxacina y tetraciclina.

Antimicrobial sensitivity of Staphylococcus aureus in rabbits against tiamulin, tilmicosin, enrofloxacin and tetracycline

Chacón G.^{1*}, Fraile L.², Marco M.³, Pueyo R.¹.

1 Exopol S.L. Pol. Río Gállego D-8. 50840. San Mateo de Gállego. Zaragoza. España.

2 Departament de Producció Animal, ETSEA, Universitat de Lleida. España

3 NANTA S.A. Ronda De Poniente, 9, 28760, Tres Cantos. Madrid

*gchacon@exopol.com

Resumen

Staphylococcus aureus es causa de infecciones bacterianas graves en cunicultura. El control de la estafilococia se realiza fundamentalmente mediante el tratamiento antibiótico, sin embargo su eficacia está limitada por la presencia de cepas resistentes y la falta en cunicultura de valores de referencia de pruebas de sensibilidad in vitro. En este estudio se evaluó la sensibilidad antibiótica in vitro a la tiamulina, tilmicosina, enrofloxacina y tetraciclina de cepas de *S. aureus* aisladas de procesos de estafilococia en conejos. Así mismo, se determinó las concentraciones de estos antibióticos alcanzadas en tejido tras tratamientos orales. Las concentraciones mínimas de tetraciclina, enrofloxacina y tilmicosina necesarias para inhibir el crecimiento de *S. aureus* (concentración mínima inhibitoria o CMI) fueron en todas las cepas testadas muy superiores a las concentraciones tisulares alcanzadas tras el tratamiento; lo que sugiere que estos antibióticos no son idóneos para el tratamiento de la estafilococia. En el caso de la tiamulina la concentración tisular fue $< 0,5 \mu\text{g/g}$ (límite de detección de la técnica). Siete de las trece cepas testadas tuvieron concentraciones de CMI $< 0,5 \mu\text{g/ml}$ mientras que las seis cepas restantes tuvieron valores de CMI $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$. Este resultado indica que el tratamiento de estafilococias en conejo con tiamulina sería viable, pero hay cepas resistentes en la población lo que hace necesario estudiar cada caso en particular y conocer con mayor precisión la concentración tisular de tiamulina alcanzada.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, sensibilidad antimicrobiana, conejo.

Abstract

Staphylococcus aureus is an important cause of bacterial infections in rabbit. *Staphylococcosis* control is mainly done by antibiotic treatment; however its effectiveness is limited by antibiotic resistant strains and the lack of reference values for in vitro sensitivity tests. In this study, in vitro antibiotic sensitivity to tiamulin, tilmicosin, tetracycline and enrofloxacin of *S. aureus* strains from staphylococcal process in rabbits was evaluated. Antibiotics concentrations obtained in tissue after oral treatments was also determined. All *S. aureus* strains tested have a minimum inhibitory concentration (MIC) of tetracycline, enrofloxacin and tilmicosin higher than the antibiotic tissue concentrations reached after treatment; suggesting that these antibiotics are not effective against rabbit staphylococcosis. After tiamulin treatment, the antibiotic concentration in tissue was $< 0.5 \mu\text{g/g}$. 7 of the 13 *S. aureus* strains tested had MIC $< 0.5 \mu\text{g/ml}$ while the other 6 strains had MIC $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$. This result indicates that tiamulin treatment to rabbit *S. aureus* infection could be feasible; but it is necessary to study antibiotic sensitivity of each case since there are tiamulin resistant strains in the population and it is also necessary to determinate the accurate tiamulin tissue level.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antimicrobial susceptibility, rabbit.

Introducción

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una de las causas más frecuentes de infecciones bacterianas graves tanto en humanos como en animales. Los problemas de estafilococia en conejos están asociados clínicamente a la aparición de pododermatitis, mamitis, abscesos subcutáneos y abscesos internos, pudiendo desencadenar retrasos en el crecimiento, infertilidad, agalaxia y muerte (Okerman y cols., 1984; Hermans y cols., 2001).

A día de hoy, el control de los casos de estafilococia se realiza fundamentalmente mediante el tratamiento antibiótico. Sin embargo, su uso está limitado por diferentes aspectos:

La aparición de resistencias antimicrobianas: un ejemplo claro son las cepas de *Staphylococcus aureus methicillin resistant (MRSA)*, cepas multirresistentes que impiden su control mediante tratamiento antibiótico (Pantosti y Vendetti 2009).

El desarrollo de multirresistencias se debe, en parte, al uso excesivo de antibióticos. En España se ha puesto en marcha el Plan Estratégico y de Acción para Reducir el Riesgo de Selección y Diseminación de Resistencias a los Antibióticos desarrollado por la Agencia Española del Medicamento. Es previsible que en un futuro se limite o restrinja el uso de antibióticos en animales de producción.

El uso de antibióticos produce **desequilibrios de la microbiota natural** causando problemas a corto-medio plazo. En cunicultura, se empieza a relacionar la enteropatía mucoide con disbiosis intestinal (Pérez de Rozas et al., 2014).

Limitaciones en el tratamiento antibiótico en cunicultura. Es escasa la variedad de antibióticos disponibles en cunicultura debido a la toxicidad de diferentes grupos de antibióticos (por ejemplo beta lactámicos) (Browning y Tune, 1983) y la falta de registros de productos medicamentosos para esta especie.

Además, antes de instaurar un tratamiento antibiótico, es necesario realizar pruebas de sensibilidad in vitro de las cepas presentes en la explotación para asegurar el uso del antibiótico efectivo a dosis apropiadas. Sin embargo, las pruebas de sensibilidad antibióticas no están estandarizadas en conejos, teniendo que utilizar valores de referencia de otras especies animales lo que puede conllevar a errores de interpretación (Vet 01-A4, CLSI, 2013).

El objetivo de este estudio fue valorar la sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus* frente a tiamulina, tilmicosina, enrofloxacina y tetraciclina; con el fin de disponer de datos objetivos para hacer un uso más racional de los antibióticos en procesos estafilocócicos en conejos.

Material y métodos

Se realizó el estudio de sensibilidad antibiótica frente a enrofloxacina y tetraciclina para 4 cepas de *S. aureus*. La sensibilidad frente a tiamulina y tilmicosina se testó sobre 9 cepas de *S. aureus*. Todas las cepas proceden de explotaciones diferentes con clínica de estafilococia.

El estudio de sensibilidad antibiótica se realizó mediante 3 técnicas distintas, siguiendo protocolos estandarizados (CLSI, 2013).

El **método Kirby-Bauer** (método con discos de difusión en agar). Se colocan discos de antibióticos con concentraciones normalizadas en placas de cultivo tapizadas con la bacteria. En función del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de la bacteria en torno al disco se clasifica como sensible o resistente al antibiótico utilizado. Esta clasificación se debería establecer teniendo en cuenta los niveles de corte de eficacia clínica (clinical “cut-off”) que no están disponibles para conejos.

Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI permite conocer la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Es el parámetro farmacodinámico por excelencia en antibioterapia.

La determinación de la CMI puede realizarse por diferentes métodos, en este caso se realizó:

- 1- Microdilución en caldo. Una concentración estándar de bacteria se enfrenta a diferentes concentraciones de antibiótico en medio líquido.
- 2- Sistema de tiras de celulosa. Tiras de celulosa con un gradiente de antibiótico se colocan en placas tapizadas con la bacteria, el valor de CMI es la concentración más baja donde se observa inhibición del crecimiento bacteriano.

Para la realización del estudio se utilizaron reactivos estandarizados: medios de cultivo (Oxoid), antibióticos (Sigma), discos normalizados (Oxoid y Neosensitab) y CMI en tiras de celulosas (Oxoid y Liofilchem)

Así mismo, se valoró la concentración tisular que alcanzan los antibióticos estudiados en la especie cunícola. Sería ideal poder realizar determinaciones en los órganos diana para los procesos estafilocócicos (piel, mamas y abscesos). Desafortunadamente, no se pudo realizar porque no está puesta a punto las técnicas analíticas para estos tejidos. Por esta razón, se escogió el músculo del animal como órgano diana ya que se puede considerar representativo del compartimento central y está disponible la técnica analítica para su determinación. Para ello, se realizaron tratamientos antibióticos a las dosis y vías de administración habitualmente utilizadas en esta especie (Tabla 3). Posteriormente, se procedió al sacrificio de uno o dos animales por tipo de tratamiento (Tabla 3) y a la determinación de la concentración de antibiótico en el músculo largo del dorso (*Longissimus dorsi*) mediante HPLC (técnicas validadas para estos antibióticos en músculo).

Resultados y discusión

En la Tabla 1 y 2 se muestran los resultados de sensibilidad antimicrobiana de los cuatro antibióticos testados frente a cepas de *S. aureus*.

Tabla 1. Resultados de sensibilidad antibiótica in vitro de cepas de Staphylococcus aureus frente a Tetraciclina y Enrofloxacina

	Tetraciclina			Enrofloxacina		
	CMI $\mu\text{g/ml}$	CMI $\mu\text{g/ml}$ Tira	Halo (mm) Disco 30 μg	CMI $\mu\text{g/ml}$	CMI $\mu\text{g/ml}$ Tira	Halo (mm) Disco 5 μg
Cepa 1	>16	32	5	>8	>32	0
Cepa 2	>16	16	6	6	8	9
Cepa 3	>16	32	5	>8	>32	0
Cepa 4	>16	>256	0	>8	>32	0

CMI: concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en placa. CMI tira: concentración mínima inhibitoria mediante tiras de celulosa. Halo: diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de discos impregnados con concentraciones estandarizadas de antibióticos.

Tabla 2. Resultados de sensibilidad antibiótica in vitro de cepas de Staphylococcus aureus frente a Tiamulina y Tilmicosina

	Tiamulina			Tilmicosina		
	CMI $\mu\text{g/ml}$	CMI $\mu\text{g/ml}$ Tira	Halo (mm) Disco 30 μg	CMI $\mu\text{g/ml}$	CMI $\mu\text{g/ml}$ Tira	Halo (mm) Disco 15 μg
Cepa 1	1	0,5	15	>64	>32	0
Cepa 2	>64	>32	0	>64	>32	0
Cepa 3	0,5	0,38	17	>64	>32	0
Cepa 4	0,5	0,5	16	>64	>32	0
Cepa 5	N.R.	0,5	30	N.R.	>32	0
Cepa 6	N.R.	>32	0	N.R.	>32	0
Cepa 7	N.R.	0,19	33	N.R.	>32	0
Cepa 8	N.R.	0,25	32	N.R.	>32	0
Cepa 9	N.R.	0,25	35	N.R.	>32	0
Cepa 10	N.R.	0,25	37	N.R.	>32	0
Cepa 11	N.R.	0,25	37	N.R.	>32	0
Cepa 12	N.R.	0,38	34	N.R.	>32	0
Cepa 13	N.R.	0,19	30	N.R.	>32	0

CMI: concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en placa. CMI tira: concentración mínima inhibitoria mediante tiras de celulosa. Halo: diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de discos impregnados con concentraciones estandarizadas de antibióticos.

Las 4 cepas testadas frente a tetraciclina tienen valores de CMI superiores a 16 $\mu\text{g/ml}$. Según los valores de referencia establecidos para las especies bovina y porcina, las cuatro cepas se consideran resistentes a la tetraciclina (Vet 01-A4, CLSI, 2013). Este resultado se confirma al comprobar que la concentración de tetraciclina alcanzada en musculo tras el tratamiento vía

oral es inferior a 0,5 $\mu\text{g/g}$ (Tabla 3), muy por debajo de los valores necesarios para inhibir el crecimiento bacteriano.

Resultados similares se han obtenido en el caso de la enrofloxacin y tilmicosina. Los valores de CMI son mayores a 8 y 32 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabla 1 y 2), cuando las concentraciones alcanzadas en musculo son de 0,160 $\mu\text{g/g}$ en caso de la enrofloxacin y menos de 0,5 $\mu\text{g/g}$ en caso de la tilmicosina (Tabla 3), lo que sugiere que ambos antibióticos no son idóneos para el tratamiento de esta infección.

Tabla 3. Determinación de concentración de antibiótico en músculo.

Antibiótico	Posología	Dosis	Tipo de animal	Ref. Animal	Concentración en músculo $\mu\text{g/g}$
Oxitetraciclina	Pienso medicado > 60 días	400 ppm	Conejas de reposición	4A	0,448
				4B	0,340
Enrofloxacin /Tiamulina (tratamiento combinado)	Enrofloxacin: en agua, 5 días Tiamulina: pienso medicado 15 días	Enrofloxacin: 0,2 cc/L Tiamulina: 70 ppm	Animales de Cebo	2A	Enro.: 0,159 Tiamulina: < 0,5
				2B	Enro.: 0,160 Tiamulina: < 0,5
Tiamulina	Pienso medicado 15 días	70 ppm	Animales de Cebo	3A	< 0,5
Tilmicosina	Pienso medicado > 30 días	200 ppm	Conejas de reposición	1A	< 0,5
				2A	< 0,5

Enro: enrofloxacin.

En el caso de la tiamulina la concentración detectada en musculo tras el tratamiento fue inferior a 0,5 $\mu\text{g/g}$ (Tabla 3). Siete de las trece cepas de *S. aureus* testadas tienen concentraciones de CMI inferiores a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 2), lo que significa que la administración de tiamulina podría ser eficaz para su tratamiento. Para confirmar estos resultados con mayor precisión sería necesario determinar la concentración exacta de tiamulina alcanzada en el órgano diana. Sin embargo, 2 cepas tienen valores de CMI >32 $\mu\text{g/ml}$, y 3 cepas valores de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ lo que indica que no se alcanzaría en el órgano diana la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de estas cepas de *S. aureus*. Por tanto, el tratamiento de estafilococis en conejo con tiamulina es viable en algunas explotaciones pero se debe estudiar cada caso en particular ya que hay cepas resistentes en la población. Es necesario también realizar más estudios sobre la dosis precisa a emplear y la vía de administración.

En conclusión, las cepas de *S. aureus* testadas son resistentes al tratamiento antibiótico con tetraciclina, enrofloxacin y tilmicosina, no siendo por tanto antibióticos de elección. La tiamulina puede resultar eficaz en control de la estafilococia, pero es necesario determinar la concentración mínima inhibitoria de las cepas presentes en la explotación así como conocer de manera precisa la concentración tisular alcanzada antes de instaurar el tratamiento

El alto grado de resistencia a antibióticos de las cepas de *S. aureus* obtenidas pone de relieve la necesidad de implantar programas preventivos específicos para cada explotación que eviten la aparición de brotes, así como ampliar el estudio de sensibilidad antimicrobiana a otros antibióticos utilizados en cunicultura para poder instaurar un tratamiento en casos clínicos.

Agradecimientos

A Laboratorios Elanco por su contribución económica en este proyecto y al equipo técnico de cunicultura de NANTA por la colaboración en el muestreo.

Bibliografía

Browning M.C., Tune B.M. 1983. Reactivity and binding of beta-lactam antibiotics in rabbit renal cortex. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*: 226: 640-644.

Hermans K., De Herdt P., Devriese L.A., Haesebrouck F. 2001. Secreted antigens as virulence-associated markers in *Staphylococcus aureus* strains from rabbits. *Veterinary Microbiology*, 81:345-352.

Okerman L., Devriese L.A., Maertens L., Okerman F., Godard C. 1984. Cutaneous staphylococcosis in rabbits. *Veterinary Record*, 114:313-315.

Pantosti A., Venditti M. 2009. What is MRSA? *European Respiratory J.*, 34: 1190- 1196.

Pérez de Rozas A., Aloy N., González J., Carabaño R., García J., Rosell J., Díaz J.V., Badiola I. 2014. ¿Qué hemos aprendido y cambiado en los últimos 15 años con la enteropatía?. *Boletín de cunicultura*, 171 39-49.

Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos. Elaborado por la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) y aprobado por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de la Salud en la sesión plenaria celebrada el 11 de junio de 2014.

VET01-A4: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard—Fourth Edition. Editado por Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.