

PATOLOGÍA

¿Por qué se está produciendo un incremento en la resistencia a antibióticos frente a *Staphylococcus aureus*? ¿Existen otras alternativas terapéuticas?



Figura 1: Preparación del medio de cultivo para *S. aureus*.

SELVA, L.¹; VIANA, D.¹; PENADÉS, J.R.² y CORPA, J.M.¹ (*)

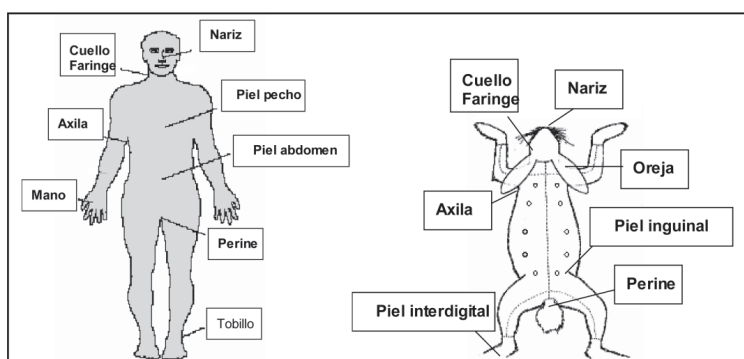
¹ Unidad de Histología y Anatomía Patológica. Departamento de Producción Animal, Sanidad Animal y Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad CEU-Cardenal Herrera. Avda. Seminario, s/n. 46113 Moncada, Valencia.

² Centro de Investigación y Tecnología Animal. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA). Apdo. 187. 12400 Segorbe (Castellón).

*jmcorma@uch.ceu.es

Introducción

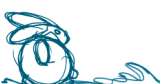
Los sistemas tradicionales de ganadería en España han sido sustituidos por sistemas intensivos caracterizados por la presencia de altas densidades animales, hecho que facilita la diseminación de los agentes infecciosos en las granjas (Hermans *et al.*, 2003). La pasteurellosis y la estafilococia son las enfermedades infecciosas, no digestivas, más frecuentes en explotaciones cunícolas (Flatt, 1974; Peeters, 1995; Coudert *et al.*, 1999). Ambas producen lesiones de tipo purulento, en diferentes localizaciones como tejido subcutáneo, glándula mamaria, útero, etc, que son causa de desveje y mortalidad en conejas adultas.



Un estudio realizado por nuestro grupo de investigación demostró que *Staphylococcus aureus* era el principal agente etiológico involucrado en mamitis, abscesos subcutáneos y pododermatitis, principales causas de eliminación de hembras reproductoras en las explotaciones cunícolas, mientras que *Pasteurella* se aisló principalmente en casos de neumonía e infecciones uterinas (Segura *et al.*, 2007). *S. aureus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, estando considerado un hospedador habitual de piel y mucosas en humanos y animales (Kloos and Schleifer, 1981; Dahme and Weiss, 1983). El principal nicho ecológico, descrito en humanos, lo constituyen los orificios nasales (Schaffer *et al.*, 2006). Adlam *et al.* (1976) en un estudio de mamitis realizado en conejas propuso

la presencia de portadores subclínicos como explicación a la persistencia de la enfermedad en comunidades aparentemente sanas. Por otro lado, Hermans *et al.* (2003) describieron múltiples sitios de colonización de *S. aureus* en conejos (Figura 2), con la consecuente dificultad para el control de la estafilococia debido al gran número de animales portadores.

Figura 2: Nichos ecológicos de *S. aureus* en humanos y conejos.



El control de *S. aureus* pasa por el uso de antimicrobianos, originando una medicación, en ocasiones excesiva, que ha dado lugar a la aparición de multitud de resistencias (Dancer, 2008). Dichas resistencias bacterianas al empleo de antibióticos han hecho que, desde hace unos años, se piense en el desarrollo de alternativas terapéuticas (O'Flaherty *et al.*, 2009).

■ Evolución de las resistencias a antibióticos

En primer lugar habría que recordar que los antibióticos son compuestos relativamente sencillos, producidos en la naturaleza por bacterias u hongos para eliminar específicamente a otras bacterias competidoras.

En un estudio sobre el nivel de resistencia bacteriana de *S. aureus* en granjas cunícolas, se evaluó la sensibilidad de este germen frente a 11 antibióticos durante un periodo de 7 años (2001-2007). Se recogieron un total de 128 aislados, procedentes de 38 granjas cunícolas industriales (Tabla 1). Se observó un incremento en la aparición de resistencias a lo largo del tiempo frente a la mayor parte de antibióticos analizados.

Se realizó una selección de antibióticos empleados con cierta frecuencia en cunicultura industrial (Tabla 2). La amoxicilina-ácido clavulánico es tóxica para la especie cunícola por lo que no se administra a estos animales. Por ello se incluyó como control en el estudio.

La pastaurelosis y la estafilococia son las enfermedades infecciosas, no digestivas, más frecuentes en explotaciones cunícolas



En el año 2001 todos los aislados analizados fueron resistentes a sulfadiazina, comenzando a aparecer resistencias frente a tetraciclinas. Estas resistencias se ven incrementadas al año siguiente, donde también aparecen cepas resistentes a penicilina, macrólidos y quinolonas. En 2003, aumentan las resistencias a penicilina, mientras que el resto de resistencias se mantienen, con variaciones. En el año 2005, sigue sin aparecer resistencias a gentamicina, neomicina y amoxicilina-ácido clavulánico. Disminuyen las resistencias a penicilina-G, mientras se mantienen los niveles de resistencia a sulfonamidas y tetraciclinas -aunque con una tendencia descendente-, aumentan las resistencias a macrólidos y aparecen frente a enrofloxacina. En 2006, sigue incrementándose la resistencia a eritromicina y espiramicina, al igual que a sulfametoxazol-trimetoprim y enrofloxacina. Hay un repunte en las resistencias frente a Penicilina y se mantienen el resto. Por último en 2007,

Tabla 1. Evolución de la resistencia a antibióticos en el transcurso de los años.

	2001		2002		2003		2005		2006		2007	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
GRANJAS AISLADOS	4		6		7		15		3		3	
RESISTENCIAS	8		11		19		51		24		15	
ERI	0	0	1	9	1	5,3	22	43	19	79	15	100
SPC	0	0	1	9	1	5,3	22	43	19	79	15	100
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PG	0	0	2	18,2	8	42	5	9,8	6	25	0	0
AMC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TET	1	12,5	5	45,5	7	37	18	32,3	8	33,3	9	60
D	1	12,5	5	45,5	7	37	18	32,3	5	20,8	9	60
SD	8	100	11	100	19	100	51	100	24	100	15	100
SXT	0	0	0	0	0	0	1	2	4	16,7	2	13,3
ENO	0	0	1	9	0	0	7	14	9	37,5	2	13,3

Tabla 2. Relación de antibióticos estudiados.

FAMILIA	ANTIBIÓTICOS
Macrólidos	Eritromicina (ERI), Espiramicina (SPC)
Aminoglucósidos	Gentamicina (G), Neomicina (N)
Betalactámicos	Penicilina-G (PG), Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC)
Tetraciclinas	Tetraciclina (TET), Doxiciclina (D)
Sulfonamidas	Sulfadiazina (SD), Sulfametoxazol-trimetoprim (SXT)
Quinolonas	Enrofloxacina (ENO)



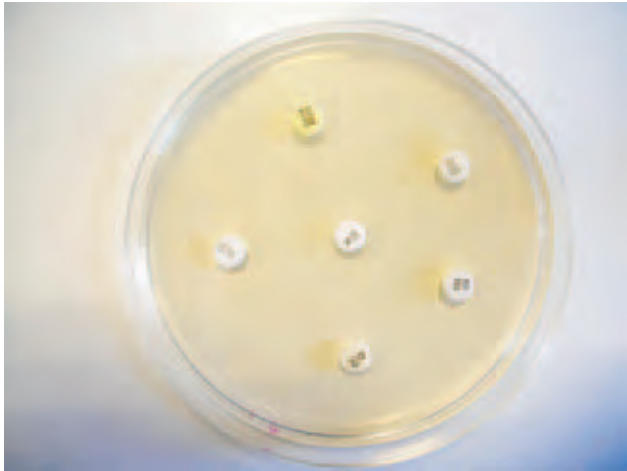


Figura 3: Medio de cultivo con los discos de medicamentos.

sigue el aumento de resistencias a eritromicina y espiramicina, hasta alcanzar el 100%. Aumenta también la resistencia a tetraciclina y doxiciclina y siguen las resistencias a sulfametoxazol-trimetoprim.

Valorando los resultados globalmente, se detectaron resistencias frente a sulfadiazina, en todas las granjas, durante todo el estudio. Por otro lado, se produjo un incremento de la resistencia a varios antibióticos a lo largo del tiempo -eritromicina, espiramicina, tetraciclina, doxiciclina, sulfametoxazol-trimetoprim y enrofloxacin-, destacando el caso de los macrólidos y tetraciclinas que pasaron de una resistencia del 0% y 12,5% en 2001 al 100% y 60% respectivamente en 2007. La adquisición de resistencias a tetraciclinas tiene lugar de forma lenta, progresiva y en múltiples escalones. Suele ser cruzada entre los distintos componentes de esta familia de antibióticos, aunque la doxiciclina por ejemplo puede seguir siendo activa, dado que al disponer de una mayor lipofilia puede penetrar en el interior de la bacteria sin requerir un sistema de transporte activo. El mecanismo responsable de la resistencia bacteriana a las tetraciclinas es la disminución o pérdida de la permeabilidad celular, por una alteración del sistema de transporte activo a lo que se suma un cierto bombeo del fármaco hacia el exterior (Escolar *et al.*, 1998). La espiramicina vía pienso ha disminuido su uso en cunicultura, pasándose a emplear macrólidos -tilosina y tilmicosina-, los cuales no han podido ser analizados debido a la falta de disponibilidad de discos comerciales. No se detectaron resistencias frente a gentamicina y neomicina. Estos antibióticos tienen muy poca acción sobre bacterias gram-positivas -como *S. aureus*-. Este hecho puede explicar la ausencia de resistencias frente a estos antibacterianos.

El control de *S. aureus* pasa por el uso de antimicrobianos, originando una medicación, en ocasiones excesiva, que ha dado lugar a la aparición de multitud de resistencias



En resumen, de los 11 antibióticos analizados en 2001, únicamente se observaron resistencias frente a 3 de ellos (27,3%), mientras que en 2007 las resistencias afectaron a 7 (63,6%) de los fármacos empleados, siendo además considerablemente más altas. Nuestros datos demuestran la inquietante aparición de resistencias frente a algunos de los antibióticos actualmente utilizados y confirma los fallos del empleo de los mismos en la lucha frente a *S. aureus*. Aunque todavía la situación no llega a ser dramática, es necesario un empleo racional de estos fármacos y se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas.

Mecanismo de la resistencia a antibióticos en *S. aureus*

Cuando hablamos de la aparición de resistencias de las bacterias frente a determinados antibióticos, no debemos pensar en una generación espontánea de las mismas tras un uso indebido de los antimicrobianos. La capacidad de sobrevivir a los antibióticos está codificada en determinados genes que se encontraban en la naturaleza mucho antes del uso generalizado de los antibióticos. Así, las proteínas que confieren resistencia a tetraciclina, por su expulsión activa del interior de la célula, tienen gran similitud con proteínas bacterianas implicadas en el transporte de otros compuestos (por ejemplo los azúcares) y probablemente han evolucionado a partir de éstas (Sheridan and Chopra, 1991). Los diversos genes bacterianos de resistencia a macrólidos-lincosamidas por modificación del lugar de acción, el ribosoma, codifican proteínas cuyas secuencias de aminoácidos están muy conservadas, lo que sugiere que en todos los casos conocidos provienen de un ancestro común, probablemente un gen albergado en bacterias productoras de este tipo de antibióticos (Arthur *et al.*, 1987).

En el caso de las quinolonas la explicación puede ser otra. Es probable que mutaciones en el gen *gyrA* -el principal responsable de la resistencia en aislados clínicos- ocurriesen de forma espontánea en las bacterias, originándose cepas poco numerosas con más o menos resistencia a quinolonas antes de existir estos compuestos. Los antibióticos actúan como «fuerza selectiva». Esto quiere decir que el uso de un determinado antibiótico, hace que bacterias que han sufrido esas mutaciones se seleccionen, por eliminación de sus compañeras sensibles al antibiótico.

Igualmente, se han señalado varios mecanismos que podrían explicar la aparición de resistencias de *S. aureus* frente a antibióticos. Ocasionalmente las bacterias pueden producir enzimas inactivadoras que les per-



Los datos demuestran la inquietante aparición de resistencias frente a algunos de los antibióticos actualmente utilizados y confirma los fallos del empleo de los mismos en la lucha frente a *S.aureus*



mitirían neutralizar los antibacterianos (Escolar et al., 1998). Así, por ejemplo, las primeras resistencias a penicilina en humanos derivaron de la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes al antibiótico, por producción de la enzima penicilinasas, que además se extendieron con enorme rapidez (Kirby, 1944). Dicha extensión se vio facilitada porque el gen de la β -lactamasa se encontraba en un elemento genético móvil, en este caso un plásmido (de Lencastre et al., 2007). Los mecanismos de resistencia pueden transferirse de una bacteria a otra a través de elementos genéticos móviles - transposones, plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad- (Hacker and Kaper, 2000). En el año 1959 se introdujo en medicina humana la meticilina, una penicilina antipenicilinasas diseñada para eliminar a *S. aureus* productor de esta enzima, aumentando así las posibilidades terapéuticas, pero al poco tiempo de su lanzamiento ya se detectaron cepas resistentes (Barber, 1961). El gen que codifica la resistencia a la meticilina, *mecA*, forma parte de un complejo móvil que reside dentro de una isla genómica, un elemento genético denominado Cassette Cromosómico Estafilocócico (SCC) en *S. aureus* (Hanssen et al., 2004), que codifica una proteína adicional de las llamadas PBP (penicillin binding proteins), la PBP2a, con baja afinidad por todos los antibióticos β -lactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes (Archer and Niemeyer, 1994).

Se ha postulado que las islas de patogenicidad pueden tener un importante papel en la evolución de los microorganismos al permitir la adquisición de grandes fragmentos genómicos por transferencia horizontal (Hacker and Kaper, 2000). La transmisión de genes de patogenicidad a cepas avirulentas de *S. aureus* a partir de cepas virulentas sometidas a una presión antibiótica, constituiría un ingenioso mecanismo de supervivencia del carácter patogénico de la cepa que justificaría la ineficacia de ciertos antibióticos y la resistencia de las bacterias a los mismos.

■ Posibles alternativas a la utilización de antibióticos

Para minimizar el riesgo de la aparición de resistencias en las granjas es muy importante el uso racional de los antibióticos, así como evitarlos en la medida de lo posible cuando su uso no es necesario. Seguir unas buenas prácticas de manejo es esencial: un buen diseño de instalaciones que minimice los cambios bruscos de temperatura, así como permita la correcta ven-

tilación de la nave. Otra medida profiláctica importante es controlar el origen de los animales de reposición. *S. aureus* es un patógeno habitual de piel y mucosas, por lo que un análisis de los animales antes de la entrada a la explotación nos certificará que están libres de *S. aureus*. Tan importante como la entrada de nuevos animales, son las instalaciones en las cuales los vamos a alojar. Una correcta limpieza y desinfección de las jaulas evitará la permanencia de *S. aureus* en las mismas. Así como es importante la eliminación de los animales sospechosos, pues pueden suponer un foco de diseminación de la bacteria en la granja.

Las medidas preventivas son importantes, pero pese a ello *S. aureus* sigue causando importantes pérdidas económicas en las explotaciones por lo que es necesario el desarrollo de herramientas alternativas a los antibióticos. Una de ellas podría pasar por el desarrollo de vacunas. En cunicultura está relativamente extendido el uso de autovacunas. Estas suponen una ayuda importante, pero no acaban de solucionar el problema. El genotipado de *S. aureus* constituye una herramienta muy útil para la identificación de las cepas circulantes por las granjas (Viana et al., 2007), ayudando al desarrollo de autovacunas y a su vez, a la identi-

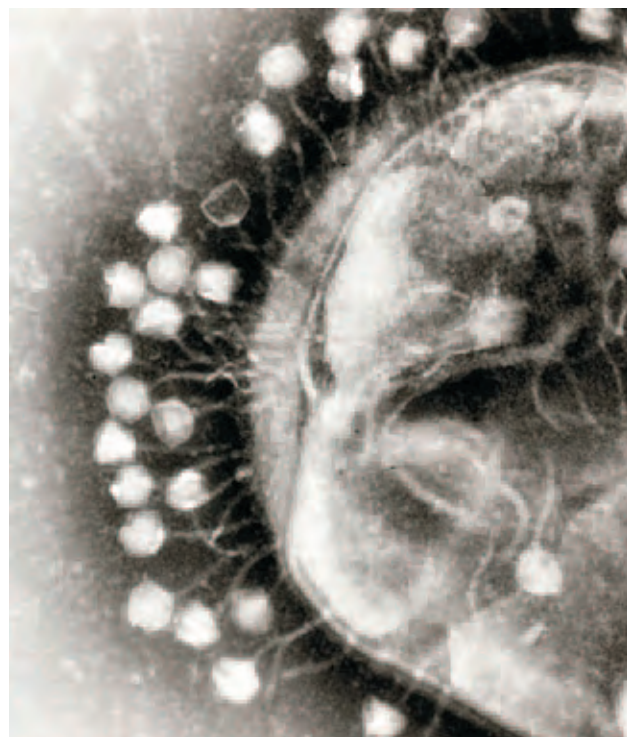


Figura 4: Fagos atacando una bacteria.

ficación de genes importantes para la patogenia de la bacteria. Así se ha visto que el gen *clfB*, que codifica para una proteína de superficie de *S. aureus* que se une al fibrinógeno y la queratina, interviene en la adherencia de la bacteria al epitelio nasal (O'Brien *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 2003). Este descubrimiento ha dado lugar a un estudio en profundidad de este gen con objeto del desarrollo de vacunas. Así se ha visto que ratones inmunizados con una vacuna recombinante compuesta por el dominio A de ClfB mostraron bajos niveles de colonización nasal por *S. aureus*, por lo que esta proteína es atractiva para su inclusión en vacunas reduciendo la colonización nasal y, en último término, el riesgo de infección (Schaffer *et al.*, 2006).

Otra terapia que va tomando fuerza en los últimos años es la utilización de probióticos -microorganismos vivos capaces de ejercer un papel inhibitor frente a ciertos patógenos-, aunque este terreno está prácticamente inexplorado en patología cunícola. Se ha visto que *Lactobacillus fermentum* ejerce un efecto protector al secretar una proteína que impide la unión de *S. aureus* a sus células diana. Así una experiencia realizada en ratones mostró que la adición de *Lactobacillus* redujo las infecciones por *S. aureus* en catéteres (Strauss, 2000). Otra bacteria que compite con *S. aureus* es *Streptococcus pneumoniae*. La producción de agua oxigenada -H₂O₂- por *St. pneumoniae* da lugar a la lisis de *S. aureus*, gracias a la inducción de fagos residentes (Selva *et al.*, 2009). Estas dos bacterias conviven a nivel de la nasofaringe humana y se ha visto que la vacunación masiva en niños frente a *St. pneumoniae* ha dado lugar a un incremento de las infecciones por *S. aureus* (Bogaert *et al.*, 2004). Del mismo modo, *Lactobacillus gasseri* desplaza a *S. aureus* de la vagina de terneras (Otero and Nader-Macias, 2006). En humanos se están aplicando probióticos en vagina para evitar infecciones en mujeres, no sería descabellado su uso en conejas con el fin de evitar las estafilococias en gazapos tras el parto.

Por último, existe una terapia -la fagoterapia- que quedo relegada prácticamente al olvido tras el descubrimiento de la penicilina en la primera mitad del siglo XX. La fagoterapia consiste en el empleo de virus bacteriófagos para el tratamiento y curación de enfermedades bacterianas. Se conoce como bacteriófagos o fagos a los virus que infectan a las bacterias. Estos virus son

capaces de introducirse en su interior y multiplicar su ADN o ARN, para producir nueva descendencia fágica que finaliza con la destrucción de la bacteria. Los virus bacteriófagos fueron descubiertos hace casi un siglo y desde un principio se vislumbraron como instrumentos para combatir ciertas enfermedades.

El preocupante y creciente desarrollo de resistencias bacterianas a los antibióticos ha hecho que, desde hace unos años, se piense de nuevo en los fagos como una alternativa terapéutica. Varios investigadores polacos del Instituto Hirschfeld, fundado en 1953, han proporcionado datos convincentes sobre el tratamiento de 550 casos de infecciones bacterianas supurativas -enfisemas, peritonitis, osteomielitis y otras- en humanos. Se trataba en su mayor parte de

casos crónicos y estaban implicadas bacterias resistentes a casi todo el arsenal de antibióticos disponible. Entre estos microorganismos se encontraba *S. aureus*. Se han documentado curaciones en un 90% de los casos, cesando la supuración y cerrándose heridas y fístulas. Los fagos se administraron vía oral previo tratamiento de los pacientes con antiácidos, para así proteger a los fagos de la acidez gástrica, comprobando posteriormente su llegada al torrente sanguíneo. Recientemente Wills *et al.* (2005) han demostrado la eficacia del uso de bacteriófagos en un modelo experimental en conejos. Estos autores inyectaron subcutáneamente 2×10^9 uff¹ con objeto de prevenir la formación de abscesos cuando introducían simultáneamente *S. aureus* (8×10^7 ufc¹).

No obstante, la fagoterapia también presenta inconvenientes, como el posible desarrollo de resistencias a fagos, la inactivación de las partículas fágicas a su paso por el bazo o incluso la posibilidad de recombinación y transducción de genes de virulencia entre cepas de estafilococos. La solución a estos problemas, pasaría por la ingeniería genética. En lugar de la utilización de fagos, podrían emplearse únicamente las enzimas que utiliza el virus para la lisis de la bacteria, la holina y la lisina. Son necesarios estudios más profundos sobre el empleo terapéutico de los fagos y de sus enzimas, para que se pueda proponer un uso más generalizado y seguro. En la actualidad nuestro grupo se encuentra trabajando en el desarrollo de estas herramientas para su posible aplicación en cunicultura industrial.

Para minimizar el riesgo de la aparición de resistencias en las granjas es muy importante el uso racional de los antibióticos, así como evitarlos en la medida de lo posible cuando su uso no es necesario



Una medida profiláctica importante es controlar el origen de los animales de reposición

Bibliografía

Se enviará por email a quién la solicite

NOTA DE EDITORIAL: ufc: unidades formadoras de colonia.
uff: unidades formadoras de fagos.

