

Comunicación corta

**ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD *in vitro* FRENTE A DIFERENTES
ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *S. suis* ASOCIADOS A NEUMONÍA
PORCINA**

M. Baez, Ivette Espinosa, J. Vichi, Siomara Martínez

Dirección de Microbiología, Grupo Biología Molecular, Laboratorio de Bacteriología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico : michel@censa.edu.cu

RESUMEN: Se realizó el aislamiento de *Streptococcus suis* a partir de pulmones de cerdos con lesiones neumónicas. Los aislados se identificaron mediante técnicas convencionales y pruebas bioquímicas. Se determinó la sensibilidad *in vitro* de 16 aislados de *S. suis* frente a 10 antimicrobianos por el método de difusión en agar con discos. Se evidenciaron significativamente ($P > 0,05$) mayores patrones de resistencia en los aislados más recientes (periodo 2008-2010) con respecto a años anteriores (2002-2004). Las frecuencias más altas de resistencia se observaron para oxitetraciclina 68,75% y spectinomicina 93,75%. Los antimicrobianos que mostraron mayor eficacia *in vitro* fueron los betalactámicos, sulfametoxazol /trimetoprim y cloranfenicol, todos por encima del 65% de sensibilidad.

(Palabras clave: ***Streptococcus suis***; cerdos; betalactámicos; antimicrobianos; resistencia)

**STUDY OF *in vitro* SENSITIVITY AGAINST DIFFERENT ANTIMICROBIAL IN *S. suis*
STRAINS ASSOCIATED TO PORCINE PNEUMONIA**

ABSTRACT: *Streptococcus suis* isolation was carried out from lungs with pneumonic lesions on pigs. Isolates were identified by conventional and biochemical tests. The *in vitro* sensitivity was determined in sixteen isolates of *Streptococcus suis* against 10 antimicrobials by the diffusion method in disk agar. There were significant resistance pattern ($P > 0,05$) higher than those reported (2008-2010) in the previous period (2002-2004). The highest frequencies of resistance were observed for oxytetracycline 68.75% and spectinomycin 93.75%. The most effective *in vitro* antimicrobials were betalactamic, sulfamethoxazole/ trimethoprim and chloramphenicol, all above the 65% sensitivity.

(Key words: ***Streptococcus suis***; pigs; betalactamic; antimicrobials; resistance).

Streptococcus suis constituye uno de los problemas bacteriológicos más importantes de los últimos 15 años en la producción porcina intensiva. Este agente es uno de los patógenos que causa mayor porcentaje de muertes en lechones de todo el mundo y pérdidas económicas por costos en tratamiento y profilaxis con antibióticos. Las cepas virulentas de *S. suis* pueden afectar a todas las categorías porcinas. Los

signos clínicos más frecuentes son: meningitis, septicemia, muerte súbita por shock séptico, neumonía, artritis, endocarditis en crías y abortos en las reproductoras (1).

El cerdo es el principal reservorio de esta bacteria, sin embargo otras especies animales pueden resultar infectadas (2, 3, 4). *S. suis* está ampliamente reconocido como un patógeno altamente virulento en seres

humanos (4, 5, 6). Las personas afectadas generalmente trabajan en contacto directo con cerdos, por lo que se considera una enfermedad profesional.

Un gran número de antimicrobianos han sido utilizados en el tratamiento de esta entidad en granjas de todo el mundo. En los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a los fármacos más comúnmente usados. Esto ha hecho difícil poder instaurar una terapia antimicrobiana eficaz sin antes realizar la prueba de sensibilidad. El fenómeno de la resistencia a los antimicrobianos por parte de los agentes causales de enfermedades infecciosas en los animales incide directamente en la salud humana (7). Una respuesta a dicho fenómeno ha sido la profundización en el estudio de la biología bacteriana, nuevas formas de crecimiento y su interacción con los antimicrobianos en diferentes ecosistemas (8).

La detección precoz del agente causal y el estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos son las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Esta información permite orientar la terapéutica una vez que el microorganismo es conocido, generar bases de datos que permitan seleccionar los antibióticos a utilizar en un tratamiento empírico, desarrollar políticas de uso de antimicrobianos, impedir la diseminación epidémica de una cepa virulenta y vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia (9). Por lo antes mencionado se hace imprescindible una estrecha relación entre la visión de los veterinarios que afrontan diariamente las infecciones causadas por *S. suis* en la producción y la información actual generada por diferentes laboratorios, con el propósito de destinar estos conocimientos a optimizar el control de las infecciones causadas por este importante patógeno. El objetivo del presente estudio es evaluar la sensibilidad *in vitro* de cepas de *S. suis* asociadas a neumonía frente a 10 antimicrobianos.

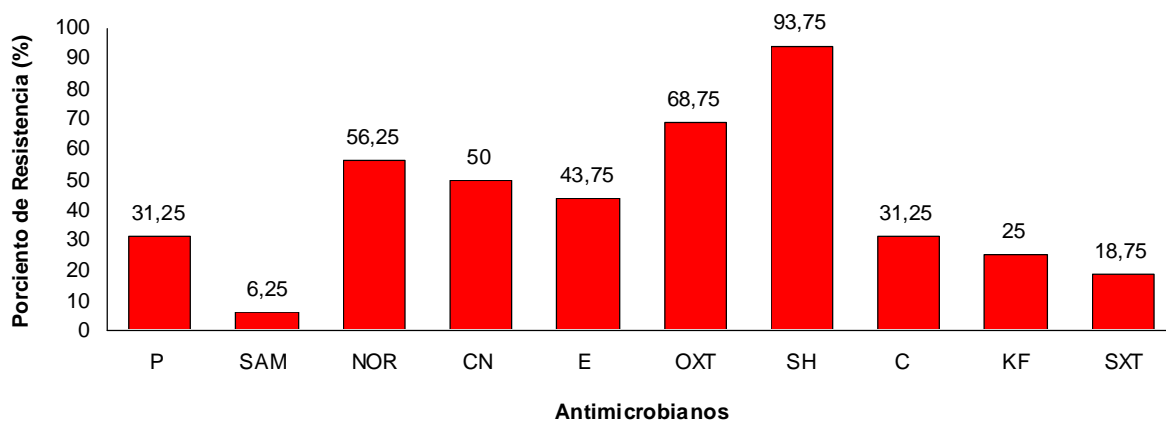
Para la colección e identificación de los aislados de *S. suis* se realizó el cultivo a partir de muestras de pulmones de cerdos afectados con neumonía durante los períodos 2002-2004 y 2008-2010. Las muestras se sembraron en el medio agar sangre Columbia (Oxoid) suplementado con sangre de ovino al 5%. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las colonias presuntivas del género *Streptococcus* sp. Se identificaron según los siguientes criterios: presencia de colonias pequeñas con hemólisis alfa, cocos positivos en la tinción de gran con agrupaciones en cadena. Todos los aislamientos se clonaron en el medio Agar Columbia y después de tres pases sucesivos se tipificaron por pruebas bioquímicas mediante Api 20 strep Biomeriux, France. Posteriormente se conservaron por liofilización con suero equino al 10%.

La sensibilidad se determinó por el método descrito por el Comité Nacional para la Estandarización de los Laboratorios Clínicos (NCCLS) 2002 (10). Se inoculó cada aislado en tubos con 5 mL de Caldo Muller Hinton y se crecieron a 37°C en condiciones estáticas hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland. Se esparcieron 100 uL de dicha suspensión en placas de Agar Muller Hinton por duplicado. A continuación se aplicaron discos de antibióticos (Oxoid) con las siguientes concentraciones: penicilina G 10UI; ampicillin/sulbactam (20ug); norfloxacin (10ug); gentamicina (10ug); eritromicina (15ug); oxitetraciclina (30ug); spectinomycin (10ug); cloranfenicol (30ug); cefalotina (30ug) y sulfametoxazol/trimetoprim (25ug). Las placas se incubaron a 37°C y se realizó la lectura a las 48 horas. Para la clasificación de los aislados en sensible, sensibilidad intermedia y resistente se utilizó el criterio de las tablas establecidas por NCCLS, 2005 (11).

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante cálculos porcentuales (Figura 1). También se realizó un análisis de varianza entre los aislados obtenidos desde el año 2002-2004 y los correspondientes a los años 2008-2010. El paquete estadístico utilizado fue el InfoStat 2.1 (12).

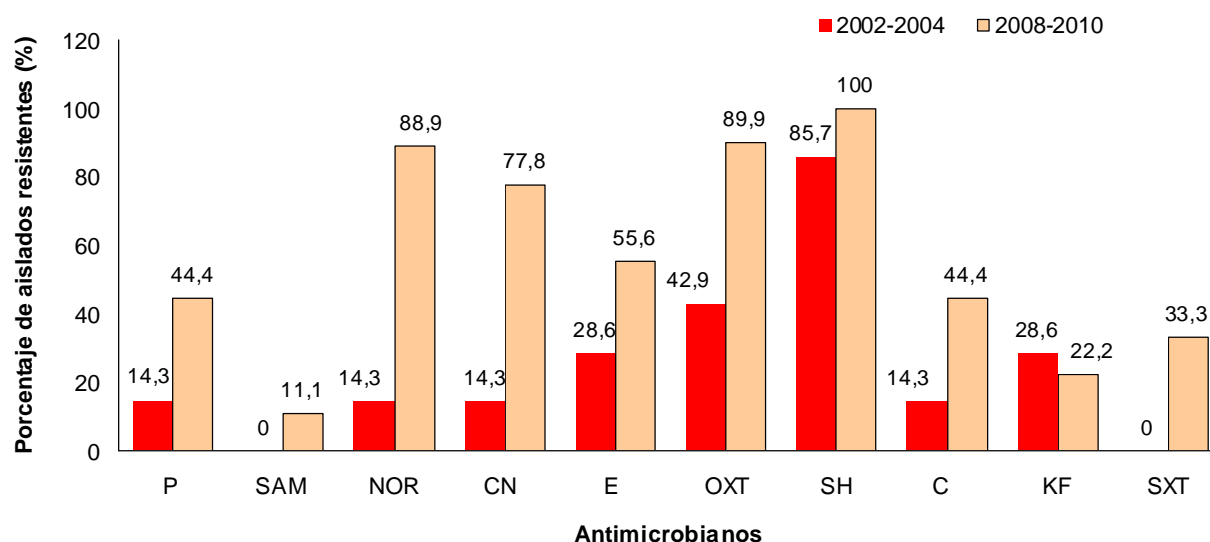
El 68,75% de los aislados de *S. suis* mostraron resistencia múltiple a los antimicrobianos evaluados. Se presentaron valores de resistencia entre 25 y 90% para P, NOR, CN, E, OXT, SH, C, KF. Se observaron valores de resistencia entre 1 y 24% para SAM, SXT y no se encontró 100% de sensibilidad ante ninguno de los antimicrobianos evaluados. Varios autores han reportado una alta proporción de cepas resistentes tanto en cerdos como en humanos (13, 14). Los aislados más recientes mostraron mayor resistencia a los fármacos probados (Figura 2). Resultados similares fueron obtenidos por Aarestrup *et al* y Hoa *et al*. (7, 15) quienes también observaron aumento de la resistencia en el tiempo, en casos de cerdos y humanos respectivamente, para macrólidos y tetraciclinas.

Entre un 65 y un 90% de los aislados resultaron sensibles a la cefalotina, ampicilina/sulbactam y penicilina. En general, los betalactámicos muestran eficacia *in vitro* frente a *S. suis*, incluso se describe que la resistencia a las penicilinas en cepas del mismo no es frecuente (16). Nuestros resultados evidencian un valor superior (31.25%) de resistencia con respecto a los datos publicados por Zhang *et al*. (17) quienes señalan un 9,5% de cepas resistentes a dicho fármaco y proponen su uso como la principal elección en el tratamiento de estos microorganismos. La emergencia de cepas resistentes indica que los regímenes terapéuticos y la susceptibilidad a esta droga, deben ser estimados con anterioridad al tratamiento.



P: penicilina; *SAM*: ampicillin/sulbactam; *NOR*: norfloxacin; *CN*: gentamicina; *E*: eritromicina; *OXT*: oxitetraciclina; *SH*: spectinomocina; *C*: cloranfenicol; *KF*: cefalotina; *SXT*: sulfametoxazol/trimetoprim.

FIGURA 1. Porcentaje de resistencia de 16 aislamientos de *S. suis* asociados a neumonías en cerdos frente a diez antimicrobianos./ *Resistance percentage of 16 S. suis isolates to pneumonias in pigs against 10 antimicrobials.*



P: penicilina; *SAM*: ampicillin/sulbactam; *NOR*: norfloxacin; *CN*: gentamicina; *E*: eritromicina; *OXT*: oxitetraciclina; *SH*: spectinomocina; *C*: cloranfenicol; *KF*: cefalotina; *SXT*: sulfametoxazol/trimetoprim.

FIGURA 2. Porcentaje de resistencia de los aislamientos de *S. suis* en cerdos en los períodos 2002-2004 y 2008-2010 frente a diez antimicrobianos./ *Resistance percentage of S. suis isolates in pigs in the period 2002-2004 and 2008-2010 against 10 antimicrobials.*

El mecanismo común de resistencia en géneros bacterianos afines, específicamente entre los enterococos, se debe a la producción de lactamasas (14). Aunque los mecanismos de resistencia en cepas de *S. suis* aun no están bien dilucidados y hasta ahora, no existen evidencias de producción de estas enzimas en cepas de *S. suis*, algunos estudios afirman que las modificaciones en las proteínas de unión a la penicilina como alteración del peso molecular o disminución de la afinidad a este antibiótico están

involucrados en el su mecanismo de resistencia (18). Del total de aislados el 81,25% mostraron sensibilidad frente a sulfametoxazol/trimetoprim. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zielinski *et al.* (19) sin embargo, otros autores como Tarradas *et al.* (20) describen un 100% de susceptibilidad de las cepas. Las sulfonamidas fueron diseñadas en un principio para las infecciones del tacto urinario. La combinación de estas con el trimetoprim las hizo mucho más versátiles por la reacción sinérgica que estas drogas causan.

Sus mecanismos de acción consisten en inhibir la síntesis enzimática de manera secuencial del ácido fólico, precursor de la timina, imprescindible en la formación del ácido nucleico bacteriano.

De los aislados de *S. suis* estudiados, el 43,75% mostró sensibilidad frente a la norfloxacina, sin embargo Zielinski *et al.* (19) encontraron una sensibilidad superior (93%). Escudero *et al.* (21) determinaron que la resistencia en cepas de *S. suis* a las quinolonas está relacionada con mutaciones puntuales en los fragmentos que codifican para las topoisomerasa IV. Por otra parte plantean que la resistencia se adquiere en dependencia de la fluoroquinolona que se haya usado con anterioridad. Ellos estiman que sus aislados fueron seleccionados a partir de casos previamente tratados con enrofloxacin, quinolona de segunda generación similar a la utilizada en nuestro estudio, para la cual se encontraron altos valores de resistencia. Esto podría significar un grave problema para la salud humana, pues al infectar al humano pudiera verse limitado el tratamiento con dichos fármacos frente a cepas resistentes seleccionadas previamente en cerdos tratados con estos compuestos.

La sensibilidad a la gentamicina fue de un 50% y para la spectinomina de 10%. Estos fármacos del grupo de los aminoglucósidos tienen gran actividad frente a bacterias Gram negativas y más reducido efecto frente a las bacterias Gram positivas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Tarradas *et al.* (20). En un estudio realizado en Argentina con cepas de *S. suis* aisladas en cerdos correspondientes a los años 1995-2006 evidencian una sensibilidad del 100% frente a la gentamicina y una sensibilidad inferior a la spectinomina (19).

De los antimicrobianos evaluados, la oxitetraciclina mostró mayores índices de resistencia *in vitro*. Gottschalk *et al.* (22) señala que la tendencia debe ser evitar el uso de las tetraciclinas debido al incremento en la resistencia observado en los últimos años fundamentalmente en cepas del serotipo 2. Martel *et al.* (23) demostraron la transferencia horizontal de genes *erm* (B) de resistencia a las tetraciclinas. Secuencias idénticas estaban presentes en aislados de *S. suis* de cerdos y estreptococos humanos. Ye *et al.* (24) plantean que la difusión en su país de cepas *S. suis* ST7-tetM (resistentes a las tetraciclinas) representa un modelo de la presión selectiva que puede conducir a la aparición de bacterias como patógenos virulentos en humanos. El caso de *S. suis* es un signo indicativo que patógenos presentes en los animales pueden resultar importantes problemas de salud pública, si no se adoptan las medidas pertinentes para evitar el uso indiscriminado de antimicrobianos en la alimentación animal.

El porcentaje de sensibilidad a la eritromicina fue de un 56,25%, por encima de los resultados obtenidos por diferentes autores (20, 22), quienes no recomiendan el uso de macrólidos en el tratamiento de este tipo de agente por los efectos discretos obtenidos. Por otra parte esta familia de antibióticos parece inhibir la síntesis de polisacáridos y de esta manera, degradarían la protección de la superficie de formaciones de biopelículas. Estos antimicrobianos podrían tener un efecto inmunomodulador logrando impedir señales bacterianas (7).

En el estudio se incluyó el cloranfenicol, fármaco del grupo de los fenicoles. Esta droga tiene buena actividad frente a microorganismos Gram positivos, además es capaz de alcanzar concentraciones altas en líquido cefalorraquídeo, por lo que se usa en el tratamiento de meningitis asociada a cepas altamente virulentas del serotipo 2. En nuestro trabajo se observó un 68,75% de sensibilidad en los aislados estudiados, similar a los obtenidos por Tarradas *et al.* (20). Sin embargo, dentro de este grupo de antimicrobianos se recomienda el fluorfenicol, una variante farmacológica reciente que no tiene los efectos adversos del cloranfenicol asociadas a anemia. En numerosos estudios, aislados de *S. suis* han mostrado alta sensibilidad frente a esta novedosa variante (14, 17, 19). Sería conveniente evaluar la sensibilidad de este compuesto para nuestros aislados.

El uso de los antibióticos es irremplazable en la terapéutica de las enfermedades producidas por *S. suis* y su forma de administración depende de la epidemiología de la infección. Los antimicrobianos más usados en las raciones son las tetraciclinas y tylosina como promotores del crecimiento y terapéuticos en producciones de cerdos (25), los cuales no son los recomendables en las infecciones por *S. suis* como muestran nuestros resultados y otros autores Martel *et al.* (23); Ye *et al.* (24) y Gottschalk *et al.* (26). La resistencia de nuestros aislados a las fluoroquinolonas y otros fármacos, así como la variedad de patrones de resistencia identificados, corroboran la emergencia de esta problemática, lo cual es de gran impacto para la salud animal y humana considerando el potencial zoonótico de esta entidad.

REFERENCIAS

1. Higgins R, Gottschalk M. Streptococcal Diseases. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, & Taylor D, (Eds). Diseases of swine. Ames: Iowa State University, 2005; pp.769-783.

2. Espinosa I, Martínez S. *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Streptococcus suis* en el complejo respiratorio porcino. *Rev Salud Anim.* 2008;30(3):137-145.
3. Devriese LA, Haesebrouck F, de Herdt P, Dom P, Ducatelle R, Desmidt M, et al. Streptococcus suis infections in birds', *Avian Pathology.* 1994;23(4):721-724.
4. Riquelme E, Escribano E, Blanch JJ, Crespo MD. Meningitis aguda por *Streptococcus suis* en una carnífera. *Enferm infecc Microbiol Clin.* 2008;26(4): 256-257.
5. Aspiroz C, Vela AI, Pascual MS, Aldea MJ. Endocarditis causada por *Streptococcus suis*. En: Casos de Microbiología Clínica. Cason.º 412. Ed. Francisco Soria Melguizo, Madrid. Febrero de 2008.
6. Yu H, Jing H, Chen Z, et al. Streptococcus suis study groups. Human Streptococcus suis outbreak, Sichuan, China. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:914-920.
7. Aarestrup FM, Duran CO, David G, Burch S. Antimicrobial resistance in swine production. *Animal Health Research Reviews.* 2008;9(2):135-148.
8. Post J, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich G. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12:185-190.
9. Robino L, García V, Bado I, Cordeiro N, Seija V, Taroco R, et al. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In: (Org.). *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* Montevideo, Oficina del Libro FEFMUR, 2008, p. 765-773.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA 2005.
12. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
13. Lun ZR, Wang QP, Chen XG, Li AX, Zhu XQ. Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:201-209.
14. Wisselink HJ, Veldman KT, Van Den Eede C, Salmon LSA, Mevius DJ. Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2006;113:73-82.
15. Hoa NT, Chieu TT, Nghia HD, Mai NT, Anh PH, Wolbers M, et al. The antimicrobial resistance patterns and associated determinants in *Streptococcus suis* isolated from humans in southern Vietnam, 1997-2008. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:6.
16. Fontana RP, Canepari MM, Lleo GS. Mechanisms of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990;9:103-105.
17. Zhang C, Ning Y, Zhang Z, Song L, Qiu H, Gao H. In vitro antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from clinically healthy sows in China. *Vet Microbiol.* 2008;131(3-4):386-392.
18. Dean C, Malouin F, Dargis M, Harel J, Gottschalk M. Alterations in penicillin-binding proteins in strains of *Streptococcus suis* possessing moderate and high levels of resistance to penicillin. 1995. *FEMS Microbiology Letters* Volume 130, Issues 2-3, Pages 121-127.
19. Zielinski CG. Enfermedades Re-Emergentes: Infecciones por *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis*. Vº Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Río Cuarto. Med. Vet., PhD. Sanidad Animal, INTA EEA Marcos Juárez; Fac. de Cs. Vet., 2006 UNR. <http://www.produccion-animal.com.ar>
20. Tarradas MC, Arenas A, Maldonado A, Vicente S, Miranda A, Perea A. Susceptibility of *Streptococcus suis* to Various Antimicrobial Agents. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 1994. Volume 41, Issue 1-10, pages 685-688.

21. Escudero JA, Millan A, Catalan A, Adela G, et al. First Characterization of Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus suis*. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 2007, Vol. 51, No. 2. p. 777-782.
22. Gottschalk MR, Higgins R, Jacques M. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. J. Clin. Microbiol, 1991;29:2590- 2594.
23. Martel A, Decostere A, Leener ED, Marien M, Graef ED, Heyndrickx M, Goossens H, Lammens C, Devriese LA, Haesebrouck F. Comparison and transferability of the erm (B) genes between human and farm animal streptococci. Microb Drug Resist. 2005;11(3):295-302.
24. Ye C, Bai X, Zhang J, Jing H, Zheng H, Du H, et al. Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China. Emerg Infect Dis. 2008 May;14(5):787-91.
25. Aarestrup FM, Rasmussen SR, Artursson K, Jensen NE. Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. Vet. Microbiol. 1998;63:71-80.
26. Gottschalk M. Review on *Streptococcus suis* infection in pigs and the importance of the agent as a cause of human infection. Acta Scientiae Veterinariae. 2009;37(Supl 1): s73-s79.

(Recibido 20-10-2011; Aceptado 5-12-2011)