



Universidad
Zaragoza



exopol

Trabajo Fin de Grado

Evolución de la resistencia antibiótica de *Actinobacillus pleuropneumoniae*: estudio retrospectivo durante un periodo de tres años

//

Evolution of antibiotic resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a three-year retrospective study

Autora

Ángela Pradilla Dieste

Directora

Gema Chacón Pérez

Ponente

José Antonio Aínsa Claver

Grado en Biotecnología – Curso 2020/2021

Trabajo realizado en EXOPOL. Autovacunas y diagnóstico S.L.

ÍNDICE

1. <u>Resumen/Abstract</u>	1
2. <u>Antecedentes</u>	2
2.1. Resistencia antibiótica	2
2.1.1. Problemática	3
2.2. Pruebas de sensibilidad antibiótica	3
2.2.1. Método de difusión en disco en agar	4
2.2.2. Métodos cuantitativos	4
2.2.3. Métodos moleculares	4
2.3. Pleuroneumonía porcina	5
2.3.1. Agente etiológico	5
2.3.2. Agentes predisponentes	5
2.3.3. Formas clínicas	6
2.3.4. Diagnóstico y serotipificación	6
2.3.5. Control y prevención	7
2.3.6. Tratamiento y resistencia antibiótica	7
3. <u>Objetivos</u>	7
4. <u>Materiales y métodos</u>	8
4.1. Procesamiento de muestras	8
4.2. Aislamiento microbiológico e identificación	8
4.3. Pruebas de sensibilidad antibiótica	9
4.3.1. Antibiogramas	9
4.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria por microdilución y E-test	10
4.4. Determinación de la producción <i>in vitro</i> de biofilm	11
4.5. Análisis estadístico	12
5. <u>Resultados y discusión</u>	13
5.1. Frecuencia de detección de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	13
5.2. Estudio de sensibilidad antibiótica	13
5.2.1. Antibiogramas	13
5.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria	15
5.2.3. Multirresistencia	18
5.3. Estudio de producción <i>in vitro</i> de biofilm	18
6. <u>Conclusiones/Conclusions</u>	20
7. <u>Bibliografía</u>	21
8. <u>Anexos</u>	24
8.1. Clasificación de los antibióticos registrados para el tratamiento de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	24
8.2. Puntos de corte clínicos de los antibióticos registrados para el tratamiento de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	25

ABREVIATURAS

AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
App	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
BHI	Infusión de cerebro y corazón
CMI / MIC	Concentración Mínima Inhibitoria / Minimum Inhibitory Concentration
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
LPS	Lipopolisacáridos
MALDI-TOF	Ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PRAN	Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
UE	Unión Europea
ufc	Unidades formadoras de colonias
V-AST	Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos Veterinarios

1. RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) es el agente causal de la pleuroneumonía porcina, una enfermedad infecciosa del tracto respiratorio que causa considerables pérdidas económicas a la industria porcina a nivel mundial.

En el presente trabajo se ha estudiado la evolución de la resistencia antibiótica de App entre 2018 y 2020 a partir de muestras porcinas respiratorias de diferentes regiones de España. Para ello se han realizado pruebas de sensibilidad antibiótica, como la técnica de Kirby-Bauer, Concentración Mínima Inhibitoria por microdilución y E-test, que nos permiten determinar la resistencia o sensibilidad de la bacteria *in vitro* a los diferentes antibióticos testados. Además, se ha llevado a cabo un ensayo para evaluar la relación entre la producción de biofilm *in vitro* por parte de App y la resistencia antibiótica, ya que *in vivo* se ha demostrado que incrementan la resistencia a los antibióticos e interfieren con los mecanismos de defensa inmunológica del hospedador.

Los resultados no mostraron diferencias significativas de sensibilidad antibiótica respecto a la situación geográfica y la edad, pero sí a lo largo del tiempo para determinados antibióticos. En general, App muestra alta sensibilidad a anfenicoles, betalactámicos de la clase cefalosporina, macrólidos, pleuromutilinas, quinolonas y sulfonamidas. Por el contrario, presenta sensibilidad reducida a betalactámicos de la clase penicilina, aminoglucósidos y tetraciclinas. Asimismo, no se detectó asociación entre la producción de biofilm y la resistencia antibiótica *in vitro*.

En definitiva, a día de hoy las pruebas de sensibilidad antibiótica son imprescindibles para seleccionar una terapia antimicrobiana efectiva y disminuir el riesgo de desarrollo de resistencias antibióticas. También es necesario evaluar la formación de biofilm para el tratamiento de infecciones en las que esté implicado, ya que puede afectar a la efectividad del mismo.

ABSTRACT

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) is the causative agent of swine pleuropneumonia, an infectious disease of the respiratory tract that causes considerable economic losses to the swine industry worldwide.

In the present work, the evolution of the antibiotic resistance of App between 2018 and 2020 has been studied from respiratory swine samples from different regions of Spain. To do so, antibiotic susceptibility tests have been carried out, such as the Kirby-Bauer technique, Minimum Inhibitory Concentration by microdilution and E-test, which allow us to determine the resistance or susceptibility of the bacteria *in vitro* to the different antibiotics tested. In addition, a trial has been carried out to evaluate the relationship between the production of biofilm *in vitro* by App and antibiotic resistance, since it has been shown *in vivo* that they increase the antibiotic resistance and interfere with host's immune defense mechanisms.

The results did not show significant differences in antibiotic susceptibility with respect to geographic location and age, but did show significant differences over time for certain antibiotics. In general, App shows high susceptibility to amphenicols, beta-lactams of the cephalosporin class, macrolides, pleuromutilins, quinolones and sulfonamides. In contrast, it has reduced susceptibility to beta-lactams of the penicillin class, aminoglycosides and tetracyclines. Likewise, no association was detected between biofilm production and *in vitro* antibiotic resistance.

To summarize, today antibiotic susceptibility tests are essential to select an effective antimicrobial therapy and reduce the risk of developing antibiotic resistance. It is also necessary to evaluate the biofilm formation for the treatment of infections in which it is involved, since it can affect its effectiveness.

2. ANTECEDENTES

2.1. Resistencia antibiótica

Los **antibióticos** son compuestos químicos naturales, sintéticos o semisintéticos con efecto bacteriostático o bactericida que se utilizan para el tratamiento de infecciones bacterianas. Se pueden clasificar en diferentes familias según su diana o mecanismo de acción (1).

Las bacterias poseen una gran plasticidad genética que les permite adaptarse a las distintas condiciones medioambientales, incluida la presencia de antibióticos (2). La **resistencia bacteriana a los antibióticos** se define como la capacidad de una bacteria de sobrevivir y crecer en presencia de uno o más antibióticos.

Diferenciamos dos tipos de resistencia antibiótica: natural y adquirida. La **resistencia natural**, también denominada intrínseca o innata, está codificada en el cromosoma bacteriano y presente en todas las cepas pertenecientes a la misma especie. Este tipo de resistencia no se puede transferir a otras bacterias y no se asocia al uso de antibióticos. En cambio, la **resistencia adquirida** únicamente aparece en algunas cepas de la especie y se puede producir por mutación o por la adquisición de nuevos genes mediante transferencia genética horizontal a través de los procesos de transformación, transducción o conjugación. Se trata de la forma más habitual de resistencia, se ve favorecida por el uso incorrecto de antibióticos y puede propagarse entre las personas, los animales y el medioambiente (2–4).

Generalmente, la resistencia a una familia de antibióticos se puede lograr a través de diferentes vías bioquímicas, y una misma bacteria puede ser capaz de utilizar un conjunto de mecanismos de resistencia para sobrevivir al efecto del antibiótico. En base a esto, podemos clasificar los mecanismos de resistencia antibiótica en tres grupos (*Tabla 1*) (2).

Tabla 1. Clasificación de los mecanismos de resistencia a antibióticos (2).

Dificultad del antibiótico para acceder a la diana de acción	<ul style="list-style-type: none"> – Disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática – Expulsión del antibiótico mediante bombas de eflujo
Inactivación del antibiótico	<ul style="list-style-type: none"> – Enzimas hidrolizantes que pueden degradar el antibiótico – Enzimas modificantes que pueden alterar la estructura del antibiótico
Cambios en la diana de acción del antibiótico	<ul style="list-style-type: none"> – Protección de la diana mediante proteínas – Producción de una diana alternativa (by-pass) – Insensibilización de la diana al antibiótico – Alteraciones enzimáticas del sitio de unión del antibiótico en la diana

Además, se puede producir **multirresistencia antibiótica**, que aunque no se han establecido criterios universales, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) la define como: “la ausencia de sensibilidad a al menos un antibiótico de tres o más familias consideradas de utilidad para el tratamiento de las infecciones producidas por la especie o especies bacterianas consideradas” (5).

2.1.1. Problemática

En la actualidad, una de las mayores amenazas globales para la salud humana y animal es el creciente desarrollo de resistencias antibióticas, ya que ponen en riesgo la capacidad de tratamiento de enfermedades infecciosas comunes (6). Es por ello que distintos organismos internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), han manifestado la urgente necesidad de llevar a cabo una estrategia común a nivel europeo para intentar solventar este problema (7).

En el caso concreto de España, se ha impulsado la creación de un plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia antibiótica desde la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (6). Por ende, se ha desarrollado el **Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN)**, en el que su primera línea estratégica se basa en la vigilancia del consumo y de la resistencia a los antibióticos. En el ámbito veterinario, un ejemplo de acción del PRAN es el **Programa REDUCE Colistina** en el sector porcino, que entre los años 2015 y 2017 consiguió mitigar el consumo de colistina en un 82,37% (6,7). Se trata de un avance muy importante debido a que la colistina se utiliza como tratamiento crítico de ciertas infecciones bacterianas en humanos, y previamente se había observado la transferencia zoonótica de genes de resistencia a este antibiótico en bacterias presentes en animales destinados al consumo y pacientes hospitalizados (8).

Para reducir el riesgo de que las bacterias se vuelvan resistentes es necesario un uso prudente y responsable de los antibióticos tanto en personas como animales, teniendo especial importancia los que se utilizan en ambas poblaciones. Por ello, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha clasificado los **antibióticos aplicados en medicina veterinaria** en cuatro categorías (*Tabla 2*), según si hay que evitarlos (categoría A), limitarlos (categoría B), utilizarlos con cautela (categoría C) o utilizarlos con prudencia (categoría D), atendiendo al impacto potencial que pueden tener en la salud humana. Esto, tras realizar el diagnóstico microbiológico y el perfil de sensibilidad, ayuda al veterinario en la toma de decisiones a la hora de elegir el antibiótico a utilizar en el tratamiento, siempre evitando un uso innecesario, períodos de tratamiento excesivamente largos y dosis subterapéuticas (3,9).

Tabla 2. Clasificación de la EMA de los antibióticos aplicados en medicina veterinaria (3,9).

Categoría A: evitar	– Antibióticos no autorizados en medicina veterinaria en la UE
Categoría B: limitar	– Antibióticos cuyo uso debe restringirse con el objetivo de mitigar el riesgo para la salud humana
Categoría C: precaución	– Antibióticos que solo deben usarse cuando no haya opciones efectivas en la categoría D
Categoría D: prudencia	– Antibióticos que pueden utilizarse de manera prudente, evitando su uso innecesario, en tratamientos largos y/o grupales

2.2. Pruebas de sensibilidad antibiótica

Las pruebas de sensibilidad antibiótica permiten determinar aquellos antibióticos para los que las bacterias patógenas muestran resistencia o sensibilidad reducida bajo las condiciones de cultivo *in vitro*. Actualmente, son imprescindibles para seleccionar una terapia antimicrobiana efectiva, tanto en animales como humanos (10).

Se basan en una metodología estandarizada y reproducible, así como en pautas de control de calidad para asegurar una buena forma de proceder inter e intralaboratorio. Inicialmente se utilizaban los mismos criterios de interpretación para patógenos humanos y veterinarios, pero concluyeron que no predecían los resultados clínicos cuando se aplicaban a estos últimos. Por ello, en 1993, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) creó el Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos Veterinarios (V-AST) para desarrollar estándares específicos y puntos de corte clínicos para medicina veterinaria de las pruebas de sensibilidad antibiótica (11).

Entre las pruebas de sensibilidad antibiótica están los **métodos fenotípicos**, como el método de difusión en disco en agar y los métodos cuantitativos de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), y los **métodos genotípicos**, que son métodos moleculares (12).

2.2.1. Método de difusión en disco en agar

Los métodos de difusión en disco, también conocidos como antibiogramas o método Kirby-Bauer, son los más simples y económicos. Consisten en sembrar placas de agar con un cultivo bacteriano puro y colocar discos de antibióticos a concentraciones estandarizadas sobre él. Tras un periodo de incubación y siguiendo los puntos de corte de organismos oficiales, las bacterias se clasifican de forma cualitativa en sensibles/susceptibles, intermedias o resistentes en función del diámetro del halo circular de inhibición de crecimiento bacteriano formado alrededor del disco de antibiótico (11,13).

2.2.2. Métodos cuantitativos

Los métodos cuantitativos nos permiten determinar la CMI, que se define como la menor concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano. Tienen un coste mayor, pero son más precisos, exactos y aportan más información que los métodos de difusión en disco (13).

Dentro de los métodos cuantitativos se engloban los métodos basados en diluciones y el E-test.

Todos los **métodos basados en diluciones** se basan en hacer diferentes diluciones del antibiótico en placas de agar, tubos con medio o placas de 96 pocillos, atendiendo a si se trata de dilución, macrodilución o microdilución, respectivamente. La dilución más alta de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano corresponde a la CMI (10,13). Cabe comentar que la macrodilución y microdilución en placa son los métodos basados en diluciones más utilizados.

Por otra parte, el **E-test** consiste en sembrar placas de agar con un cultivo bacteriano puro y colocar sobre él tiras de celulosa con un gradiente de concentración de antibiótico exponencial. Tras un periodo de incubación, se forman halos elípticos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de la tira. El punto de corte de la elipse con la tira de celulosa indica la CMI (10,13).

2.2.3. Métodos moleculares

Los métodos moleculares se fundamentan en la detección directa de genes o mutaciones asociadas a mecanismos de resistencia a antibióticos mediante PCR, PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), microarrays, hibridación, secuenciación, detección de polimorfismos, etc. (12,13).

Frente a los métodos fenotípicos, los métodos genotípicos tienen la ventaja de que no es preciso el crecimiento bacteriano, pero sí la amplificación de su material genético, por lo que son más rápidos. Sin embargo, son más caros y complejos (12).

2.3. Pleuroneumonía porcina

La pleuroneumonía porcina es una enfermedad infecciosa del tracto respiratorio, causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), que ocasiona grandes pérdidas económicas a la industria porcina a nivel mundial (14–16). No obstante, en humanos no supone un riesgo para la salud pública al no ser una zoonosis (14).

El **desarrollo de la enfermedad** se da en tres etapas: colonización, evasión de los mecanismos de eliminación del hospedador y daño a los tejidos (17). En primer lugar, la bacteria accede por la vía oronasal, siendo el principal mecanismo de transmisión el contacto directo nariz con nariz. Posteriormente, cuando llega a las vías respiratorias bajas, se adhiere a los neumocitos a través de los lipopolisacáridos (LPS) de membrana y proteínas bacterianas, y coloniza el pulmón. En el transcurso de la infección se produce un gran daño tisular debido a las toxinas secretadas por la bacteria, que participan en el desarrollo de las lesiones típicas de la enfermedad y en la muerte súbita por shock endotóxico (15,17).

2.3.1. Agente etiológico

App es una bacteria Gram negativa de morfología cocobacilar, anaerobia facultativa, inmóvil y encapsulada que no forma esporas (14,15). Pertenece a la clase de las γ -proteobacterias y a la familia *Pasteurellaceae* (18).

Se han descrito **2 biotipos** en función de su dependencia a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), también conocida como factor V de la coagulación sanguínea, siendo el biotipo I dependiente y el biotipo II no dependiente, lo que influye en las condiciones de cultivo necesarias para su crecimiento (14–16). En caso de requerir NAD, la bacteria se cultiva en placas con medio agar sangre con una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, que produce β -hemolisinas que lisan los glóbulos rojos presentes en el medio, liberando el factor V, aunque también es posible su cultivo en medio de infusión de cerebro y corazón (BHI) suplementado con el factor V. Por otra parte, en caso de no requerir NAD, el aislamiento se realiza en placas con medio agar sangre sin ser necesaria la cepa nodriza (19).

Se conocen **19 serotipos** según la composición de polisacáridos capsulares, que frecuentemente se asocian con los LPS de membrana (16). La composición de serotipos más prevalentes varía según la región geográfica, pero es dinámica y puede cambiar a lo largo del tiempo (15). Por ejemplo, en España destaca el serotipo 13 y, en menor medida, el 2, 4 y 9/11 (16).

Entre los **factores de virulencia** de la bacteria destacan las toxinas ApXI, ApXII, ApXIII y ApXIV. Esta última es específica de App y común a todos los serotipos (14–16).

No existe una correlación universal entre el biotipo, el serotipo y las toxinas en App (16).

2.3.2. Agentes predisponentes

Los **estreses ambientales** como cambios de temperatura bruscos, altos niveles de humedad o ventilación deficiente pueden aumentar las tasas de mortalidad y morbilidad de los animales (15,16). Además, en respuesta a estos factores estresantes y bajo condiciones específicas de crecimiento, App es capaz de formar biofilm (20).

Un **biofilm** es una comunidad microbiana embebida en una matriz polimérica, producida por los propios microorganismos, que les permite adherirse a superficies bióticas y abióticas (20,21). Entre estos microorganismos podemos encontrar diferentes patógenos que se comunican, compiten o cooperan para incrementar su propagación y supervivencia (22).

2.3.3. Formas clínicas

La pleuroneumonía porcina puede afectar a cerdos de todas las edades, aunque es más frecuente en animales a partir de los tres meses de vida (15).

Esta patología puede presentarse en la **forma hiperaguda, aguda o crónica**, en cada una de las cuales se dan una serie de cuadros clínicos y lesiones características (*Tabla 3*). En el caso de una infección causada por cepas de baja virulencia y en ausencia de factores predisponentes, puede cursarse de **forma asintomática** (14,15).

Tabla 3. Cuadros clínicos y lesiones características de la pleuroneumonía porcina en su forma hiperaguda, aguda y crónica (14,15,17).

Forma hiperaguda	Forma aguda	Forma crónica
– Fiebre alta	– Fiebre alta	– Fiebre alta
– Hipotermia	– Apatía manifiesta	– Ataques espontáneos de tos
– Apatía manifiesta	– Anorexia	– Disnea
– Anorexia	– Disnea	– Apetito reducido
– Disnea y cianosis	– Enrojecimiento de piel	– Retraso en el crecimiento
– Taquicardia	– Tos productiva	– Pleuritis fibrosa
– Espuma sanguinolenta en boca y fosas nasales	– Áreas neumónicas y necróticas en pulmones	– Secuestro pulmonar
– Muerte		

2.3.4. Diagnóstico y serotipificación

El **diagnóstico de App** se puede llevar a cabo mediante detección de anticuerpos anti-ApxIV en sueros con un inmunoensayo tipo ELISA, detección del gen que codifica la toxina ApxIV con una PCR o qRT-PCR, o aislamiento por cultivo microbiológico e identificación por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (14–16).

La espectrometría de masas tipo MALDI-TOF permite la identificación bacteriana en función de género y especie. Esta técnica se basa en irradiar con un láser el cristal formado por una colonia bacteriana y una matriz, de manera que se volatiliza e ioniza por la interacción con los fotones del láser. Posteriormente, las moléculas ionizadas se aceleran por aplicación de un campo magnético y se separan en función de su masa y carga. Según el tiempo que tardan las moléculas ionizadas en llegar al detector, se obtiene un espectro en el que se representa la abundancia relativa (eje y) respecto a la relación de masas (eje x). El conjunto de los picos de masas constituye el espectro de la bacteria, que se considera su perfil proteico (23,24).

En cuanto a la **serotipificación de App**, se puede hacer con un inmunoensayo tipo ELISA mediante anticuerpos dirigidos contra los LPS de membrana o por RT-PCR amplificando las secuencias específicas de serotipo que se encuentran en los genes de biosíntesis de la cápsula. Ambas técnicas permiten la detección simultánea de diferentes serotipos (16,25).

2.3.5. Control y prevención

App es sensible a los **desinfectantes** utilizados normalmente en granjas de cerdos, por lo que se puede inactivar con protocolos de desinfección adecuados y rutinarios (15).

Otra medida de prevención muy efectiva son las **vacunas**. En el mercado existen distintos tipos de vacunas comerciales, que se clasifican en vacunas bacterianas inactivadas o bacterinas y vacunas de toxoides purificados. Las bacterinas contienen una suspensión de bacterias inactivadas y confieren una protección serotipo-específica. En cambio, las vacunas de toxoides purificados contienen las toxinas Ap₁, Ap₂ y Ap₃ atenuadas y la protección que confieren abarca todos los serotipos, ya que todas las cepas de App producen al menos una de las toxinas incluidas (26).

En caso de no poder utilizar una vacuna comercial se administran las **autovacunas**, que suelen ser de tipo bacterinas. Según la AEMPS, las autovacunas de uso veterinario son medicamentos veterinarios inmunológicos individualizados, elaborados a partir de organismos patógenos y antígenos no virales, obtenidos de animales de una misma explotación, inactivados y destinados para el tratamiento de dicha explotación (27). Cada autovacuna se produce de forma individual en base al diagnóstico previo y permite la combinación de distintos serotipos, que pueden ir modificándose conforme evolucionan los patógenos (28).

2.3.6. Tratamiento y resistencia antibiótica

El **tratamiento de animales enfermos** se debe hacer por vía parenteral con los antibióticos seleccionados tras el diagnóstico y combinarlos con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Además, hay que incorporar el tratamiento en el agua de bebida de todo el grupo de riesgo debido a la rápida difusión de la bacteria y a su capacidad de producción de biofilm (15,20).

La **sensibilidad antibiótica de App** varía atendiendo a las distintas familias de antibióticos. En general, se ha observado una alta sensibilidad a la mayoría de antibióticos registrados para el tratamiento de las infecciones causadas por App, a excepción de la gentamicina, penicilina y tetraciclina (15,29). Sin embargo, es preciso comentar que la formación de biofilm en superficies bióticas, como los pulmones, o abióticas, como el agua de bebida, puede contribuir a una mayor resistencia a los antibióticos e interferir con los mecanismos inmunológicos porcinos (20,22).

3. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo consiste en determinar la evolución de la sensibilidad antibiótica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) a partir de muestras respiratorias recibidas en Exopol entre 2018 y 2020 de diferentes explotaciones porcinas de España.

Asimismo, como **objetivos parciales** aparecen:

- Establecer la frecuencia de detección de App en relación al total de muestras respiratorias porcinas recibidas.
- Evaluar la sensibilidad antibiótica de App en función del tiempo, región y edad.
- Determinar la presencia de cepas de App multirresistentes.
- Estimar la posible relación entre la resistencia antibiótica y la formación de biofilm *in vitro* por parte de App.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Procesamiento de muestras

En casos de procesos respiratorios, las muestras de análisis más habituales son pulmones, raspados traqueobronquiales e hisopados nasales, que se procesan en el laboratorio en condiciones asépticas con material estéril. Por ejemplo, para pulmones se hacen improntas de la zona lesionada en agar sangre y agar MacConkey (Oxoid), con un asa estéril se realiza una siembra por agotamiento y, posteriormente, se incluyen estrías de una cepa nodriza de *S. aureus* en la placa de agar sangre. Las placas se incuban en estufa a 37°C con un 5% de CO₂ durante 18-24 horas.

4.2. Aislamiento microbiológico e identificación

En la placa con medio agar sangre, las colonias de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) dependientes de NAD crecen como satélites alrededor de la cepa nodriza de *S. aureus* asociadas a la zona de hemólisis. En cambio, las colonias de App independientes de NAD crecen por toda la placa no asociadas a la zona de hemólisis.

En caso de haber sospecha de App, se resiembran colonias compatibles morfológicamente en agar sangre (cepas NAD independientes) o en medio BHI suplementado con factor V libre (cepas NAD dependientes). Tras ello, se incuba en estufa a 37°C con un 5% de CO₂ durante 18-24 horas. Una vez se tiene un cultivo puro y masivo procedente de una única colonia (*Imagen 1*), se procede a la identificación mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF y a la realización de pruebas de sensibilidad antibiótica.



Imagen 1. App dependiente de NAD en medio agar sangre con estrías de S. aureus (izquierda), App dependiente de NAD en medio BHI suplementado con factor V (centro) y App independiente de NAD en medio agar sangre (derecha).

Para la identificación por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF, se deposita una colonia de App procedente de un cultivo de 24 horas en un pocillo de la tarjeta MALDI-TOF con ayuda de un asa de siembra estéril y se deja secar a temperatura ambiente. Tras el secado, se añade 1 µL de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) sobre cada pocillo con una micropipeta y se deja secar de nuevo a temperatura ambiente. Posteriormente, se coloca la tarjeta en el espectrómetro y se realiza la lectura. El espectro generado (*Imagen 2*) se compara con los perfiles proteicos almacenados en la base de datos del equipo para distintos microorganismos, lo que permite identificar la bacteria a nivel de género y especie.

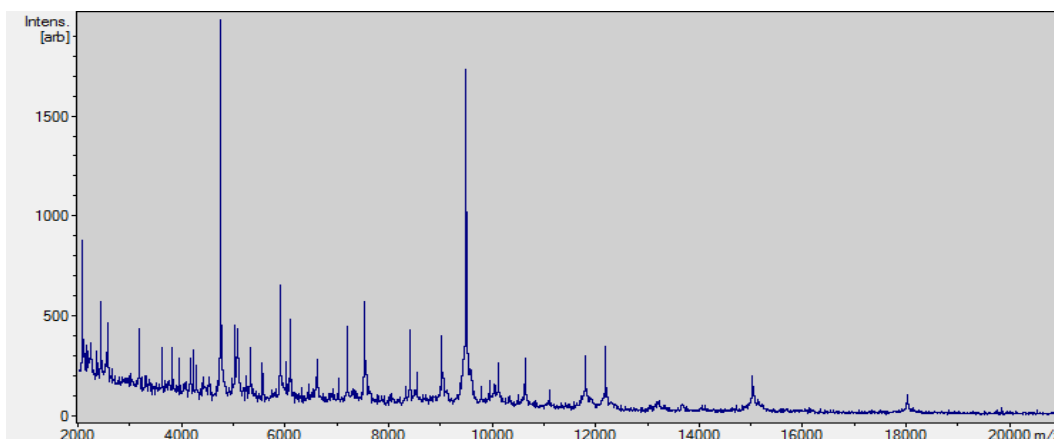


Imagen 2. Perfil proteico de App obtenido en el espectrómetro de masas.

4.3. Pruebas de sensibilidad antibiótica

4.3.1. Antibiogramas

En primer lugar, se debe llevar a cabo la preparación del inóculo. Para ello, se toman con un asa de siembra 2-3 colonias de App de un cultivo puro y se resuspenden en solución salina. Posteriormente, se agita la suspensión con el vórtex y se ajusta en el nefelómetro a una turbidez de 0,5 unidades McFarland, lo que equivale a unas 10^8 ufc/mL.

Seguidamente, se procede a la siembra de las placas, que consiste en impregnar el hisopo de algodón estéril en la suspensión bacteriana y extenderla en la placa de medio BHI suplementado con factor V libre (cepas NAD dependientes) o Mueller Hinton sangre (cepas NAD independiente). Este proceso se repite dos veces más girando la placa 60° entre cada siembra.

Por último, se procede a la colocación de los discos de antibiótico (*Tabla 4*) mediante dispensadores automáticos en las placas sembradas y se incuban a 37°C con 5% de CO_2 durante 18-24 horas.

Tabla 4. Antibióticos, siglas y cantidad de principio activo utilizados en la técnica de Kirby-Bauer.

Antibiótico	Cantidad de principio activo en el disco (μg)	Antibiótico	Cantidad de principio activo en el disco (μg)
Amoxicilina	25	Marbofloxacin	5
Ampicilina	10	Penicilina	10
Cefquinoma	30	Tetraciclina	30
Ceftiofur	30	Tiamulina	30
Enrofloxacin	5	Tianfenicol	30
Florfenicol	30	Tilmicosina	15
Gamitromicina	15	Trimetoprim-Sulfametoxazol	1,25-23,7
Gentamicina	10		

Tras el periodo de incubación, se lleva la placa con los discos de antibiótico al lector Scan-500, que nos permite medir el diámetro del halo circular de inhibición del crecimiento formado en torno al disco de antibiótico (*Imagen 3*). Los valores obtenidos en el lector se comparan en base a puntos de corte establecidos (*Anexo 8.2, Tabla 1*) para clasificar a las bacterias como sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia a los distintos antibióticos testados.

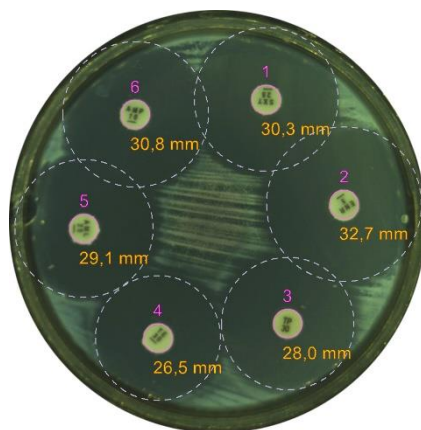


Imagen 3. Ejemplo de antibiograma con el diámetro del halo de inhibición del crecimiento formado en torno a diferentes discos de antibiótico.

4.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria por microdilución y E-test

El estudio de CMI se llevó a cabo en 57 cepas de App a las que previamente se había realizado un antibiograma. Las cepas se eligieron siguiendo una selección de muestra aleatoria estratificada proporcional por provincia española.

La preparación del inóculo en el **método de CMI por microdilución** se ejecuta de la misma manera que para los antibiogramas. Tras ajustar la turbidez a 0,5 unidades McFarland, se pipetea 50 μL de la suspensión en 11 mL de medio BHI suplementado con factor V libre, se homogeniza con el vórtex y se inoculan 100 μL en cada pocillo de la placa Sensititre BOPO7F (Oxoid) con una pipeta multicanal.

La placa Sensititre BOPO7F (Oxoid) es una placa comercial de la empresa Thermo Fisher Scientific que contiene en los pocillos una serie de antibióticos en un rango de concentraciones de principio activo determinado (Tabla 5), además de unos pocillos sin antibiótico como control positivo de crecimiento.

Pasadas 18-24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO_2 , se comprueba el crecimiento óptimo en los pocillos de control de crecimiento sin antibiótico y se lleva la placa al Sensititre Manual Viewer para su interpretación. La CMI corresponde con la concentración de antibiótico del primer pocillo en el que no se observa crecimiento para cada uno de los antibióticos testados (Imagen 4).

Tabla 5. Antibióticos y rango de concentraciones de principio activo en la placa Sensititre BOPO7F (Oxoid). Los antibióticos sombreadas no están registrados para el tratamiento de App.

Antibiótico	Rango de concentraciones de principio activo ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Antibiótico	Rango de concentraciones de principio activo ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ampicilina	0,125-8	Penicilina	0,06-4
Ceftiofur	0,125-4	Sulfadimetoxina	128
Clindamicina	0,125-8	Tetraciclina	0,25-4
Danofloxacina	0,06-0,5	Tiamulina	0,25-16
Enrofloxacina	0,06-1	Tildipirosina	0,5-8
Espectinomomicina	4-32	Tilmicosina	1-8
Florfenicol	0,125-4	Tilosina tartrato	0,125-16
Gamitromicina	0,5-4	Trimetoprim-Sulfametoxazol	1/16
Gentamicina	0,5-8	Tulatromicina	0,06-4
Neomicina	2-16		

De forma complementaria al método de microdilución se testa la sensibilidad de App a los antibióticos amoxicilina y marbofloxacin mediante **E-test**. Para ello, se impregna un hisopo de algodón estéril en el inóculo preparado inicialmente y se extiende por la placa con medio BHI suplementado con factor V libre. Este proceso se repite dos veces más girando la placa 60° entre cada siembra. Seguidamente, con ayuda de una pinza estéril, se colocan las tiras de celulosa con el gradiente exponencial de concentración de antibiótico (*Tabla 6*). Por último, se incuban las placas en estufa a 37°C con un 5% de CO₂ durante 18-24 horas.

En este caso, el valor de CMI se lee visualmente y corresponde al punto de intersección que se forma entre la tira de celulosa y el extremo de inhibición de la elipse (*Imagen 4*).

Tabla 6. Antibióticos y rango de concentraciones de principio activo presentes en la tira de E-test.

Antibiótico	Rango de concentraciones de principio activo (µg/mL)	Antibiótico	Rango de concentraciones de principio activo (µg/mL)
Amoxicilina	0,016-256	Marbofloxacin	0,002-32

Los valores de CMI obtenidos con ambos métodos se comparan en base a puntos de corte establecidos (*Anexo 8.2, Tabla 2*) para poder clasificar a las bacterias como sensibles o resistentes a los diferentes antibióticos testados.

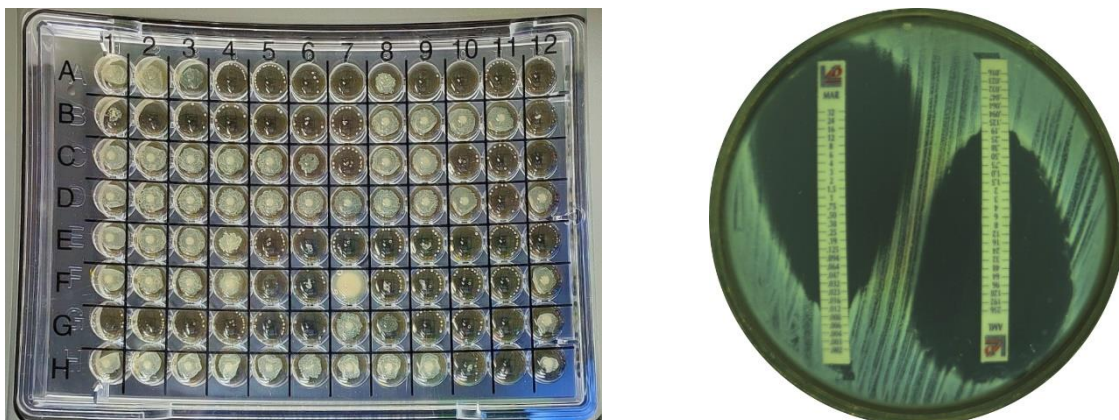


Imagen 4. Ejemplo de CMI por microdilución en la placa Sensititre BOPO7F (Oxoid) (izquierda) y de E-test para amoxicilina y marbofloxacin (derecha).

A partir de los valores de CMI obtenidos mediante el método de CMI por microdilución y el E-test se calcula la CMI₅₀ y CMI₉₀, que corresponden a la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento del 50% y 90% de la población bacteriana, respectivamente.

4.4. Determinación de la producción *in vitro* de biofilm

La determinación de la producción *in vitro* de biofilm se lleva a cabo en cuatro pasos: cultivo de las cepas a testar, tinción del biofilm formado, solubilización y cuantificación en el espectrofotómetro (30). En este caso, las cepas de App consideradas para el estudio de biofilm son las mismas 57 cepas que se consideraron para el estudio de CMI. Cada una de ellas se determina por cuadruplicado en la placa y cada placa se testa por triplicado en días diferentes.

La preparación del inóculo se realiza de la misma manera que para los antibiogramas y las CMI por el método de microdilución hasta llegar a una suspensión con una turbidez de 0,5 unidades McFarland.

Posteriormente, se hace una dilución 1:100 en un tubo eppendorf en campana de flujo laminar y se pipetea 100 μ L de este cultivo diluido en 4 de los pocillos de la placa microtiter de 96 pocillos con fondo en U. El proceso se repite con cada una de las muestras, a excepción de una columna en la que se pipetea 100 μ L de medio BHI suplementado con factor V libre como control negativo. Finalmente, se incuba la placa en estufa a 37°C con un 5% de CO₂ durante 18-24 horas.

Una vez transcurridas las horas de incubación, se invierte la placa sobre un contenedor para eliminar las células planctónicas, que son células de libre flotación. Seguidamente, se sumerge la placa en un contenedor con agua para aclararla y se retira el agua residual con un papel absorbente. Tras ello, se pipetea 125 μ L de cristal violeta 0,1% a cada pocillo y, pasados 10 minutos, se invierte y sacude suavemente la placa sobre un contenedor. Al igual que en el caso anterior, la placa se sumerge en un contenedor con agua para aclararla y retirar los restos de cristal violeta que no hayan teñido el pocillo. Se retira el agua residual con un papel absorbente y se deja secar durante 3-4 horas.

Para solubilizar el biofilm teñido y seco, se pipetea 150 μ L de ácido acético glacial 30% a cada pocillo de la placa y, pasados 10 minutos, se resuspende con la micropipeta para asegurar la completa solubilización. A continuación, se transfieren 125 μ L de cada muestra a una placa microtiter de 96 pocillos con fondo plano (*Imagen 5*) y se mide la densidad óptica a 595 nm en un espectrofotómetro.

Una vez obtenidas las lecturas, se resta la absorbancia del control negativo al resto de absorbancias. La absorbancia medida será directamente proporcional al biofilm formado, es decir, cuanta mayor absorbancia, mayor producción de biofilm.

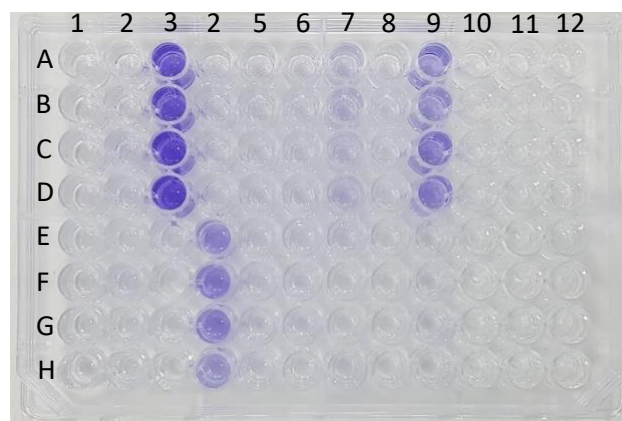


Imagen 5. Ejemplo de una placa de fondo plano con el biofilm teñido y solubilizado. En los pocillos 3 A-D se muestra una cepa con una alta producción de biofilm, en los pocillos 4 E-H y 9 A-D se muestran cepas con una producción de biofilm intermedia y en los pocillos 7 A-D se muestra una cepa con una baja producción de biofilm. En los pocillos 11 A-H se encuentra el control negativo.

4.5. Análisis estadístico

Para determinar la existencia o no de independencia entre las variables sensibilidad antibiótica y tiempo, región o edad se ha aplicado la **prueba de Chi-cuadrado** para cada antibiótico mediante el software SPSS. Por otra parte, para conocer si existe relación entre la producción de biofilm y la resistencia antibiótica se ha aplicado la **prueba de normalidad de Anderson-Darling** y la **prueba no paramétrica U de Mann-Whitney** mediante el software R-Studio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Frecuencia de detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

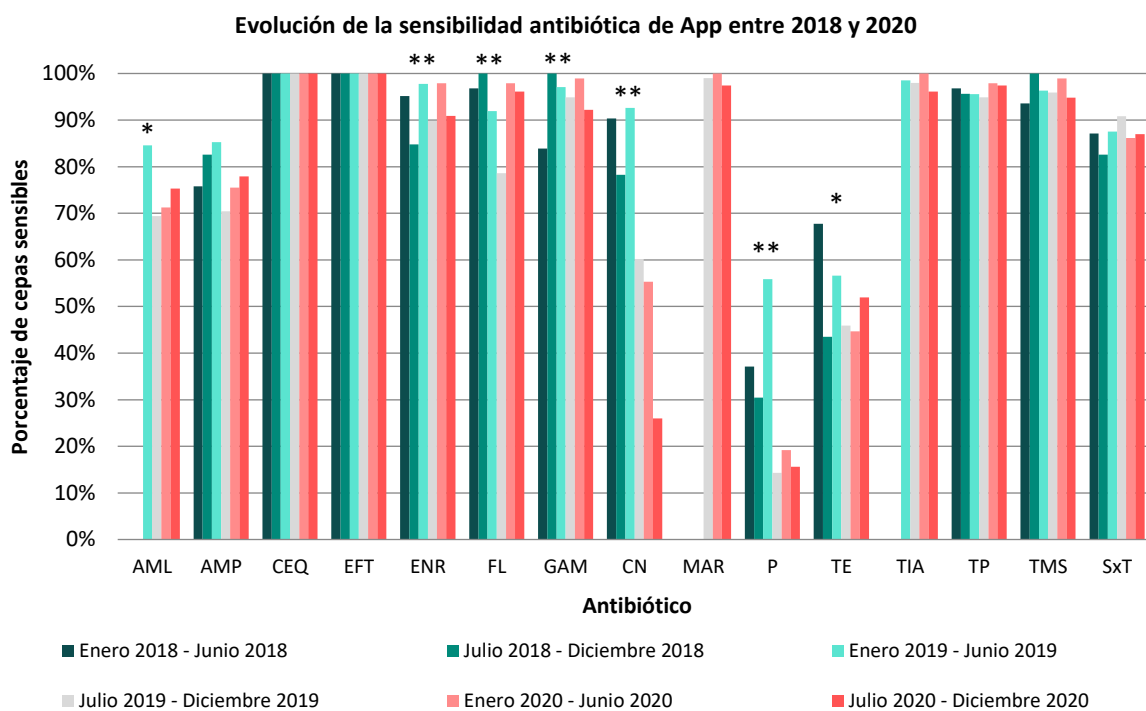
La frecuencia de detección de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) en muestras respiratorias porcinas recibidas en Exopol entre 2018 y 2020 fue del 14%, ya que se detectó en 1082 de las 7708 muestras. Debemos hablar de frecuencia de detección y no de prevalencia, puesto que son muestras sesgadas de cerdos con sintomatología respiratoria.

A partir de dichas muestras clínicas se realizaron 513 antibiogramas y 57 CMI para llevar a cabo los estudios de sensibilidad antibiótica.

5.2. Estudio de sensibilidad antibiótica

5.2.1. Antibiogramas

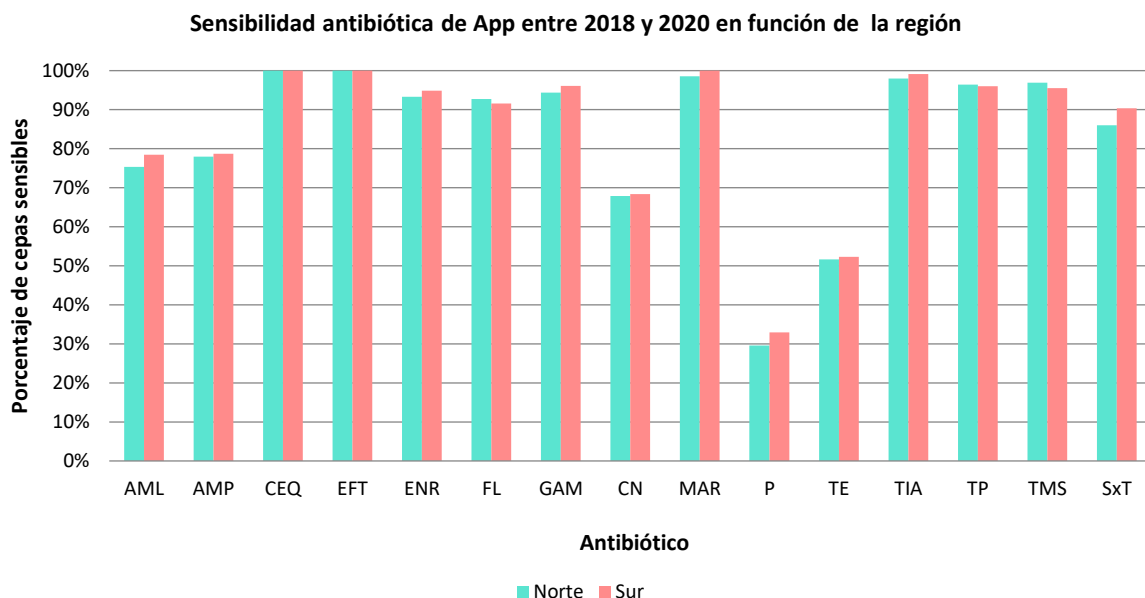
Para ilustrar cómo varió la sensibilidad de App a los diferentes antibióticos testados *in vitro* entre 2018 y 2020 se muestra el porcentaje de cepas sensibles frente al tiempo para cada antibiótico (*Gráfica 1*). La falta de datos de sensibilidad a amoxicilina, marbofloxacina y tiamulina en determinados semestres es debido a que no se testaban durante ese periodo de tiempo.



Gráfica 1. Porcentaje de cepas de App sensibles *in vitro* a los antibióticos testados mediante la técnica de Kirby-Bauer en función del tiempo: AML (N=408), AMP (N=513), CEQ (N=513), EFT (N=513), ENR (N=513), FL (N=513), GAM (N=513), CN (N=513), MAR (N=269), P (N=513), TE (N=513), TIA (N=408), TP (N=513), TMS (N=513) y SxT (N=513). Se ha considerado que las variables tiempo y sensibilidad antibiótica son dependientes si p -valor $<0,05$ (*) o p -valor $<0,01$ (**). Las siglas de los antibióticos se muestran en el Anexo 8.2, Tabla 1.

Atendiendo a los resultados obtenidos en la prueba de Chi-Cuadrado, no se detectaron diferencias significativas de sensibilidad antibiótica respecto al factor tiempo en el caso de la ampicilina, cefquinoma, ceftiofur, marbofloxacina, tiamulina, tianfenicol, tilmicosina y trimetoprim-sulfametoxazol. En cambio, con un nivel de confianza del 99% se observó una relación significativa entre la sensibilidad y el tiempo para la enrofloxacina, florfenicol, gamitromicina, gentamicina y penicilina; así como para la amoxicilina y tetraciclina con un nivel de confianza del 95%. No obstante, solo se observa un patrón en la evolución de la sensibilidad para la gentamicina, penicilina y tetraciclina, correspondiendo en estos casos a una disminución.

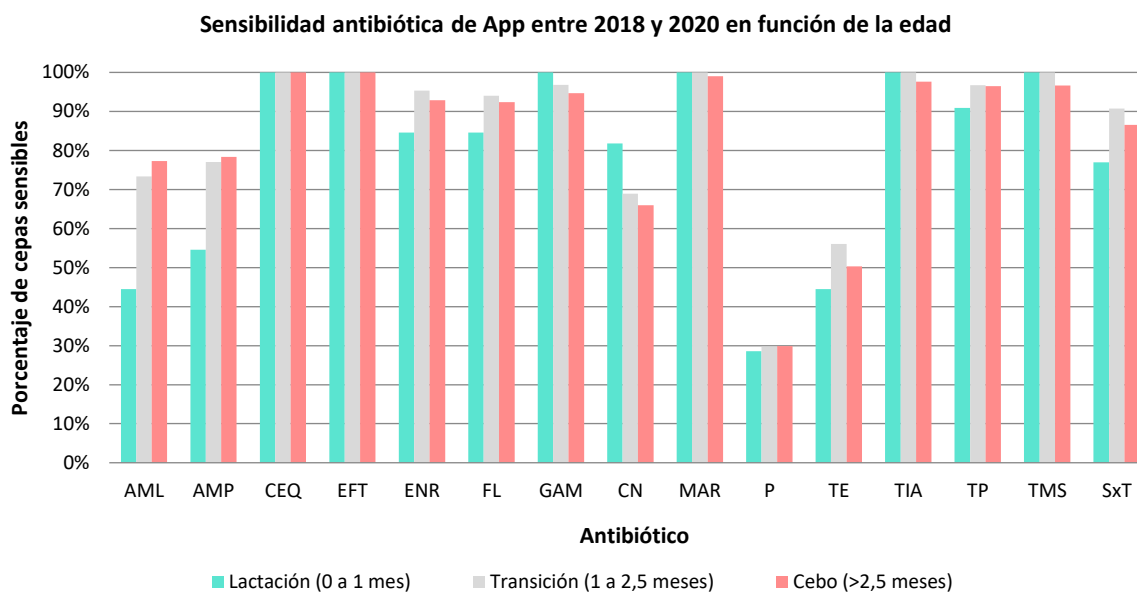
En cuanto a la sensibilidad antibiótica de App en función de la región española (*Gráfica 2*), no se mostró evidencia suficiente para concluir que la situación geográfica tenga influencia en la sensibilidad a los antibióticos testados según la prueba de Chi-Cuadrado. Destacar que el número de cepas consideradas de la región Norte (N=358) es superior al de la región Sur (N=155), ya que buena parte de la producción porcina se concentra en el Noreste peninsular, especialmente en las zonas de Aragón y Cataluña (31).



Gráfica 2. Porcentaje de cepas de App sensibles in vitro a los antibióticos testados mediante la técnica de Kirby-Bauer en función de la región española: Norte (N=358) y Sur (N=155). Las siglas de los antibióticos se muestran en el Anexo 8.2, Tabla 1.

Por último, respecto a la sensibilidad antibiótica de App en función de la edad (*Gráfica 3*), según la prueba de Chi-Cuadrado tampoco se vio evidencia suficiente para concluir que la edad tenga influencia en la sensibilidad a los antibióticos testados. Al igual que en el caso anterior, el número de muestras varía en los diferentes grupos: cerdos en fase de cebo (N=359), cerdos en fase de transición (N=65) y cerdos en fase de lactación (N=11). Esto se debe a que la pleuroneumonía porcina es una enfermedad infecciosa que suele afectar principalmente a cerdos en la fase de cebo, que corresponden a animales con un tiempo de vida superior a dos meses y medio, como consecuencia de la decaída de la inmunidad materna aportada durante la fase de lactación (32).

Debido al alto coste que suponen las infecciones causadas por App en las explotaciones porcinas, con el fin de que disminuya la mortalidad y la gravedad de las lesiones pulmonares podría resultar interesante un plan de vacunación enfocado a cerdos en fase de cebo para adquirir inmunidad frente a la bacteria cuando desaparece la inmunidad materna.



Gráfica 3. Porcentaje de cepas de App sensibles in vitro a los antibióticos testados mediante la técnica de Kirby-Bauer en función de la edad: cerdos en fase de lactación (N=11), cerdos en fase de transición (N=65) y cerdos en fase de cebo (N=359). Las siglas de los antibióticos se muestran en el Anexo 8.2, Tabla 1.

5.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria

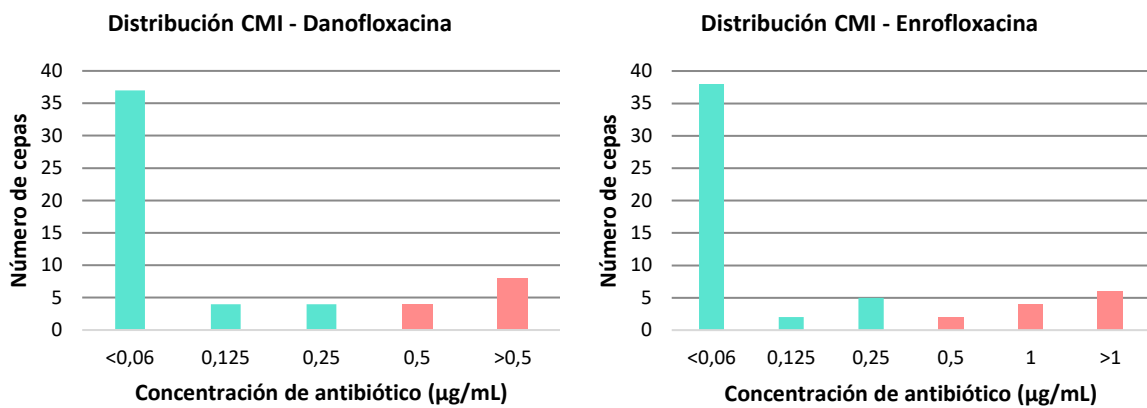
En base a los datos analizados con el estudio de CMI por microdilución y el E-test se obtuvo la CMI₅₀ y CMI₉₀ (Tabla 7).

Tabla 7. CMI₅₀ y CMI₉₀ de los antibióticos testados en base a las muestras analizadas. En el Anexo 8.2, Tabla 2 se muestra el organismo oficial del que se obtuvo el punto de corte clínico.

Antibiótico	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)	Punto de corte clínico (µg/mL)	Muestras analizadas
Amoxicilina	0,19	4	4	57
Ampicilina	0,25	>8	0,5	57
Ceftiofur	≤0,125	1	2	57
Danofloxacina	≤0,06	>0,5	0,25	57
Enrofloxacina	≤0,06	>1	0,25	57
Florfenicol	0,5	>4	2	57
Gamitromicina	2	2	4	38
Gentamicina	8	>8	2	57
Marbofloxacina	0,016	0,125	1	57
Penicilina	0,5	>4	0,25	57
Tetraciclina	4	4	0,5	57
Tiamulina	8	>16	16	57
Tildipirosina	1	1	16	38
Tilmicosina	4	>8	16	57
Trimetoprim-Sulfametoxazol	≤1	>1	2	57
Tulatromicina	≤4	32	64	57

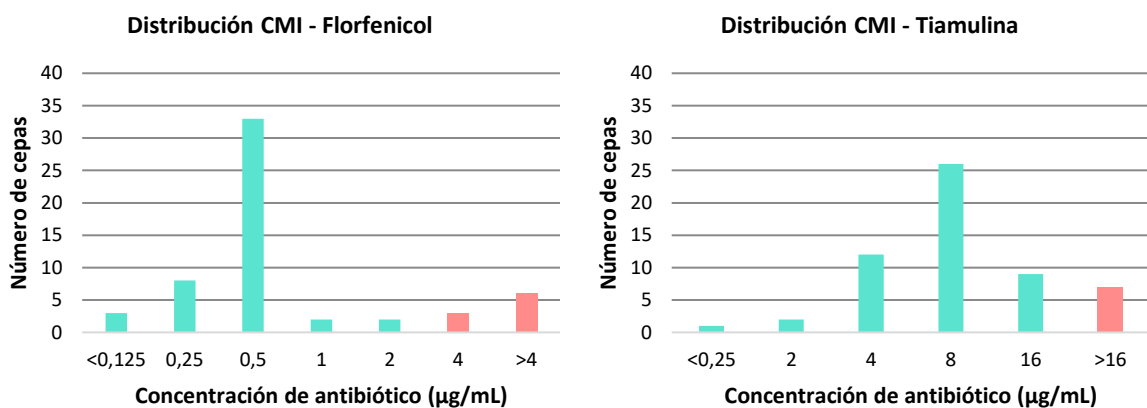
Con la mayoría de los antibióticos testados, a excepción de la gentamicina, penicilina y tetraciclina, se observó que se consigue inhibir el crecimiento del 50% de la población bacteriana con una concentración inferior al punto de corte clínico. Sin embargo, únicamente se puede inhibir el crecimiento del 90% de la población con una concentración de antibiótico inferior a dicho punto de corte clínico con la amoxicilina, ceftiofur, gamitromicina, marbofloxacina, tildipirosina y tulatromicina.

Para los antibióticos en los que aparece sensibilidad en la CMI₅₀ y resistencia en la CMI₉₀ resulta interesante conocer la distribución de las cepas de App en función del valor de CMI. En el caso de la danofloxacina y la enrofloxacina se observó una proporción muy alta de cepas sensibles con valores de CMI bajos, pero también cepas con valores de CMI más altos (Gráfica 4), teniendo un porcentaje de cepas resistentes del 21% para ambos antibióticos.



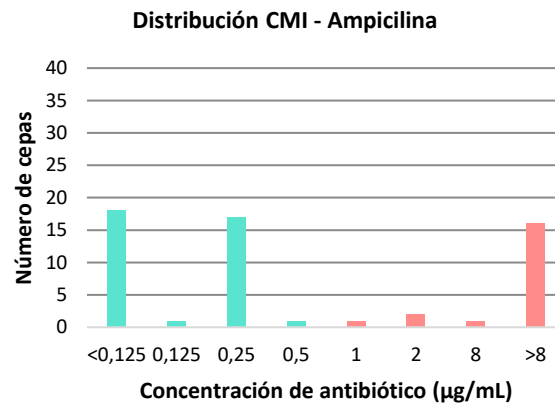
Gráfica 4. Distribución de los valores de CMI obtenidos para la danofloxacina (izquierda) y la enrofloxacina (derecha). En color cian se muestran las cepas sensibles y en color salmón las cepas resistentes.

Asimismo, se mostró una distribución normal para el florfenicol y la tiamulina (Gráfica 5), con un porcentaje de cepas resistentes del 16% y 21%, respectivamente. Para estos antibióticos se vio una alta proporción de cepas sensibles con valores de CMI intermedios.



Gráfica 5. Distribución de los valores de CMI obtenidos para el florfenicol (izquierda) y la tiamulina (derecha). En color cian se muestran las cepas sensibles y en color salmón las cepas resistentes.

El caso de la ampicilina resultó el más relevante, ya que se obtuvieron dos poblaciones de cepas muy sensibles y una población de cepas muy resistentes (*Gráfica 6*), siendo el porcentaje total de cepas resistentes del 35%. Estos resultados sugieren que para la ampicilina es especialmente importante realizar pruebas de sensibilidad antibiótica para poder seleccionar el tratamiento del animal con un porcentaje de éxito mayor, aunque en todos los casos sería conveniente llevarlas a cabo.



Gráfica 6. Distribución de los valores de CMI obtenidos para la ampicilina. En color cian se muestran las cepas sensibles y en color salmón las cepas resistentes.

Como se indica en la *Gráfica 1* y la *Tabla 7*, App muestra una alta sensibilidad a anfenícolos (florfenicol y tianfenicol), betalactámicos de la clase cefalosporina (cefquinoma y ceftiofur), macrólidos (gamitromicina, tildipirosina, tilmicosina y tulatromicina), pleuromutilinas (tiamulina), quinolonas (danofloxacina, enrofloxacina y marbofloxacina) y sulfonamidas (trimetoprim-sulfametoxazol). Por el contrario, presenta una menor sensibilidad a aminoglucósidos (gentamicina), betalactámicos de la clase penicilina (amoxicilina, ampicilina y penicilina) y tetraciclinas, lo que diversos estudios han explicado por la presencia de genes *aac*, genes *bla* y genes *tet* que confieren resistencia a los distintos antibióticos respectivamente (29,33,34).

El patrón de susceptibilidad antibiótica de App descrito se asemeja al patrón obtenido en estudios previos llevados a cabo en España con cepas de App aisladas en 1997-2004 y 2017-2019, destacando especialmente el incremento de resistencia a tetraciclina (35,36). Asimismo, en otro estudio realizado con muestras de App de diferentes países europeos en 2002-2004 se ha visto un aumento de resistencia a tetraciclina y, a diferencia de España, a trimetoprim-sulfametoxazol en Inglaterra (37,38).

A la vista de los resultados recabados mediante la técnica de Kirby-Bauer, CMI por microdilución y E-test, no estaría recomendado el uso de gentamicina, penicilina y tetraciclina para el tratamiento de las infecciones causadas por App. Por contra, se podría administrar ceftiofur, marbofloxacina, tianfenicol o tilmicosina, atendiendo siempre a la forma clínica (hiperaguda, aguda o crónica) en la que se presenta la pleuroneumonía, las recomendaciones de la EMA (*Tabla 2*), y las características farmacodinámicas y farmacocinéticas. No obstante, para cada explotación habría que determinar la sensibilidad de App a los diferentes antibióticos para que el veterinario pueda seleccionar el tratamiento más efectivo.

En referencia a la clasificación de la EMA, hay que tener en cuenta que los antibióticos de clase D (*Anexo 8.1*) deben ser utilizados como tratamiento de primera línea siempre que sea posible. Aunque como se ha comentado, el incremento de la resistencia a la mayoría de antibióticos de clase D insta a tener que usar antibióticos de clase C o B, los cuales suponen mayor riesgo para la salud humana (3,38).

5.2.3. Multirresistencia

Atendiendo a los antibióticos registrados para el tratamiento de las infecciones causadas por App, las familias que se consideraron para el estudio fueron aminoglucósidos, anfenicoles, betalactámicos, macrólidos, pleuromutilinas, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas (*Anexo 8.1*). Se calculó el porcentaje de cepas resistentes a cada familia de antibióticos (*Tabla 8*).

Tabla 8. Cepas de App resistentes a las diferentes familias de antibióticos en base a los resultados obtenidos con los 513 antibiogramas analizados.

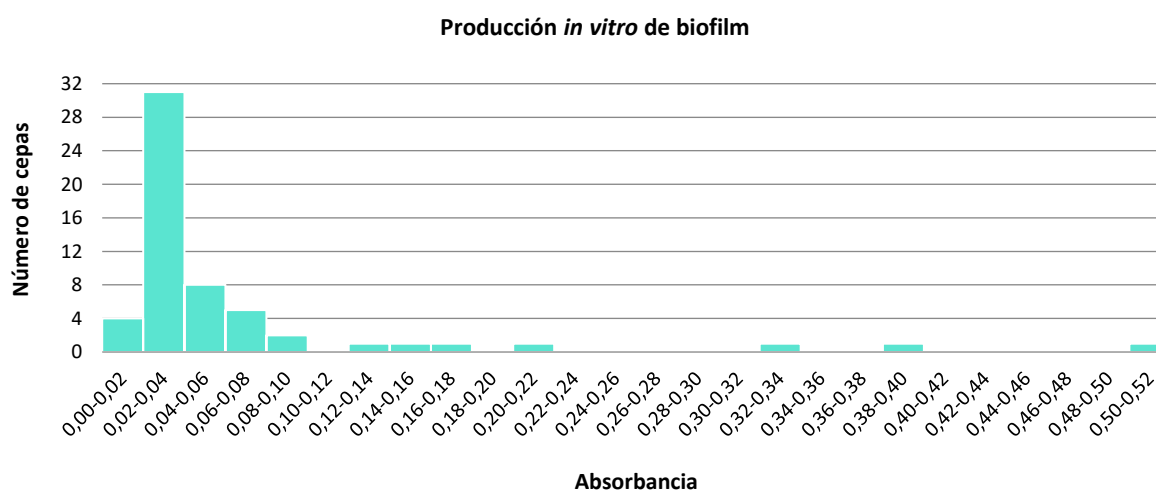
Familia de antibióticos	Número de cepas resistentes	Porcentaje de cepas resistentes
Aminoglucósidos	164	32%
Anfenicoles	45	9%
Beta-lactámicos	363	71%
Macrólidos	33	6%
Pleuromutilinas	7	1%
Quinolonas	32	6%
Sulfonamidas	65	13%
Tetraciclinas	247	48%

De acuerdo a esto y tomando como referencia la definición de multirresistencia propuesta por la SEIMC, de las 513 cepas de App que fueron analizadas, 144 correspondieron a cepas multirresistentes y 369 a cepas no multirresistentes. Es decir, el 28% de las cepas de App testadas presentan multirresistencia antibiótica.

Varios trabajos han confirmado en App la presencia de diferentes plásmidos que contienen genes de resistencia a múltiples antibióticos, entre los que se encuentran los genes *aac*, *bla* y *tet* mencionados anteriormente (33,39). Por ello, en un futuro, sería interesante continuar este trabajo mediante la detección de genes de resistencia en cepas de App multirresistentes, mediante PCR u otras técnicas.

5.3. Estudio de producción *in vitro* de biofilm

La producción de biofilm en términos de absorbancia para las 57 cepas se muestra en la *Gráfica 7*.

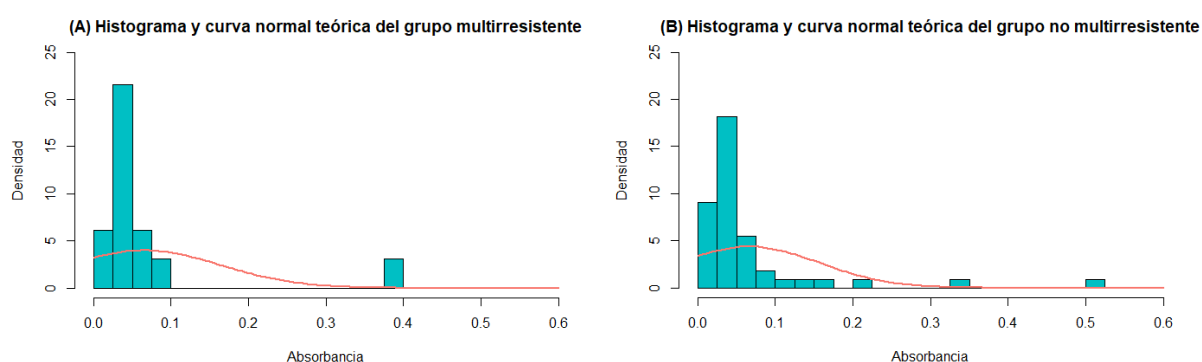


Gráfica 7. Distribución de las cepas de App en función de la absorbancia medida, que está directamente relacionada con el biofilm producido in vitro.

Se observaron 3 grupos de cepas en función de la producción de biofilm (*Gráfica 7*): 50 de las 57 cepas consideradas produjeron una concentración baja de biofilm (absorbancia de 0,00-0,10), 4 cepas una concentración intermedia (absorbancia de 0,12-0,22) y 3 cepas una concentración alta (absorbancia de 0,32-0,52).

A partir de la absorbancia medida en el ensayo de biofilm *in vitro* y de la clasificación en cepas multirresistentes o no multirresistentes obtenida en el ensayo de multirresistencia, se evaluó la relación entre la producción de biofilm y la resistencia antibiótica.

Al aplicar la prueba de normalidad de Anderson-Darling se obtuvo que la absorbancia y la multirresistencia no seguían una distribución normal (*Gráfica 8*), lo que se explica por la presencia de datos atípicos a absorbancias más altas y al bajo número de muestras, especialmente en el grupo de cepas no multirresistentes (*Tabla 9*). En consecuencia, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.



Gráfica 8. Histograma y curva normal teórica del grupo multirresistente (A) y no multirresistente (B). Figura obtenida en R-Studio.

La prueba U de Mann-Whitney mostró con un nivel de confianza del 95% que no hay diferencias significativas entre las medianas de los dos grupos (*Tabla 9*), por lo que no se detectó asociación entre la multirresistencia y la producción de biofilm.

Tabla 9. Estadísticos descriptivos de las cepas multirresistentes y no multirresistentes.

	Absorbancia					
	Número de cepas	Media	Desviación estándar	Mediana	Mínimo	Máximo
Cepas no multirresistentes	44	0,066	0,091	0,037	0,009	0,515
Cepas multirresistentes	13	0,064	0,099	0,028	0,019	0,391

A pesar de no haber encontrado una relación entre la formación de biofilm *in vitro* y los niveles de resistencia antibiótica de App en este trabajo, es necesario seguir haciendo estudios para conocer cómo afecta la formación de biofilm al tratamiento de la pleuroneumonía porcina. Diversos autores sugieren combinar los antibióticos con moléculas anti-biofilm para el desarrollo de nuevas estrategias efectivas de tratamiento (40).

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados expuestos en este trabajo y teniendo en cuenta las valoraciones anteriores, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) muestra una baja sensibilidad a la gentamicina, penicilina y tetraciclina, por lo que no estarían recomendados para el tratamiento de la pleuroneumonía porcina sin hacer una prueba de sensibilidad antibiótica previa. Sin embargo, App muestra una alta sensibilidad al ceftiofur, marbofloxacin, tiamfenicol y tilmicosina, lo que indica que podrían valorarse como tratamiento de primera elección de esta patología.
- Para determinados antibióticos se ha observado influencia del factor tiempo en la sensibilidad de App, mostrando un patrón de disminución de la sensibilidad en el caso de la gentamicina, penicilina y tetraciclina. Por otra parte, se ha visto que la situación geográfica y la edad no tienen influencia en la sensibilidad de App a los antibióticos testados.
- Es fundamental realizar pruebas de sensibilidad antibiótica para App debido a la diversa distribución de los valores de CMI obtenidos para los antibióticos testados. Esto es primordial cuando aparecen poblaciones de cepas sensibles y resistentes muy diferenciadas, como en el caso de la ampicilina.
- El 28% de las cepas de App testadas presentan multiresistencia antibiótica, lo que puede suponer una dificultad añadida a la hora de encontrar un tratamiento antibiótico efectivo.
- No se ha encontrado relación entre la producción de biofilm y la resistencia antibiótica *in vitro* por parte de App. Sería interesante seguir estudiando cómo afecta la producción de biofilm al tratamiento de la pleuroneumonía porcina.

CONCLUSIONS

Based on the results presented in this work and taking into account the previous assessments, we can conclude that:

- *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) shows a low susceptibility to gentamicin, penicillin and tetracycline, so they would not be recommended for the treatment of swine pleuropneumonia without doing a previous antibiotic susceptibility test. However, App shows a high susceptibility to ceftiofur, marbofloxacin, thiamphenicol and tilmicosin, which indicates that they could be valued as the first-line treatment of this pathology.
- For certain antibiotics, the influence of the time factor on App susceptibility has been observed, showing a pattern of decreased susceptibility in the case of gentamicin, penicillin and tetracycline. On the other hand, it has been seen that geographic location and age have no influence on the susceptibility of App to the antibiotics tested.
- It is essential to perform antibiotic susceptibility tests for App due to the diverse distribution of MIC values obtained for the antibiotics tested. This is essential when highly differentiated populations of susceptible and resistant strains appear, as in the case of ampicillin.
- 28% of the App strains tested have antibiotic multi-resistance, which can be an added difficulty in finding an effective antibiotic treatment.
- No relationship has been found between biofilm production and *in vitro* antibiotic resistance by App. It would be interesting to continue studying how biofilm production affects the treatment of porcine pleuropneumonia.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*. 2018;4(3):482–501.
2. Hoffman SB. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 2001;23(5):464–72.
3. EMA (European Medicines Agency). Clasificación de los antibióticos para uso en animales [Internet]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_es.pdf
4. Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Nov 30;9.
5. Cercenado E, Rafael C. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) [Internet]. Bou G, Chaves F, Oliver A, Oteo J, editores. 2015. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia55.pdf>
6. AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/plan-estrategico-antibioticos/v2/docs/plan-estrategico-antimicrobianos-AEMPS.pdf>
7. PRAN (Plan Nacional Resistencia Antibióticos). Primer informe del Programa Reduce Colistina en porcino [Internet]. 2017. Disponible en: <https://resistenciaantibioticos.es/es/noticias/el-programa-reduce-colistina-en-porcino-publica-su-primer-informe-de-resultados>
8. OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud). Resistencia Antimicrobiana en Producción Animal [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal>
9. López A, Muñoz C, Aguilera C, Alonso M, Bueno R, Sacristán S, et al. Informe anual 2019-2020 PRAN (Plan Nacional Resistencia Antibióticos). 2020. Disponible en: <https://www.resistenciaantibioticos.es/es/publicaciones/informe-anual-2019-2020-plan-nacional-frente-la-resistencia-los-antibioticos>
10. Rubin JE. Antimicrobial Susceptibility Testing Methods and Interpretation of Results. Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editores. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Quinta. WILEY Blackwell; 2013. p. 11–20.
11. Watts JL, Sweeney MT, Lubbers B v. Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria of Veterinary Origin. Schwarz S, Cavaco LM, Shen J, editores. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*. American Society for Microbiology Press; 2018. p. 17–32.
12. Louie M, Cockerill FR. Susceptibility testing: Phenotypic and genotypic tests for bacteria and mycobacteria. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2001 Dec 1;15(4):1205–26.

13. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Antimicrobial agents. *Clinical Veterinary Microbiology*. Second. Elsevier; 2013. p. 79–102.
14. Broes A, Gottschalk M. Actinobacillosis. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J, editores. *Diseases of swine*. Undécima. WILEY Blackwell; 2019. p. 749–66.
15. Prieto C, Martínez FJ, Segalés J, Carvajal AM. Pleuroneumonía porcina. *Enfermedades infecciosas del ganado porcino*. Servet; 2017. p. 93–101.
16. Arnal JL, Benito AÁ, Fernández A, Martín D. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: diversidad epidemiológica en España. *Suis*. 2020;166.
17. Bossé JT, Janson H, Sheehan BJ, Beddek AJ, Rycroft AN, Simon Kroll J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Pathobiology and pathogenesis of infection. Vol. 4, *Microbes and Infection*. 2002. p. 225–35.
18. NCBI (National Center for Biotechnology Information). Taxonomy browser (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=715>
19. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. *Actinobacillus* species. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2013. p. 297–305.
20. Sassu EL, Bossé JT, Tobias TJ, Gottschalk M, Langford PR, Hennig-Pauka I. Update on *Actinobacillus pleuropneumoniae*-knowledge, gaps and challenges. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018 May 1;65:72–90.
21. Tremblay YDN, Labrie J, Chénier S, Jacques M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* grows as aggregates in the lung of pigs: is it time to refine our *in vitro* biofilm assays? *Microbial Biotechnology*. 2017;10(4):756–60. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27790837/>
22. Loera A, Jacques M, Avelar FJ, Labrie J, Tremblay YDN, Oropeza R, et al. Auxotrophic *Actinobacillus pleuropneumoniae* grows in multispecies biofilms without the need for nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) supplementation. *BMC Microbiology*. 2016;16(1).
23. García M, Oviaño M, Belén G, Sánchez R, de Dios J, Pérez C, et al. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. 2019.
24. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. Vol. 6, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation; 2015.
25. Bossé J, Li Y, Stringer O, Langford P. Serotipado de aislados de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* mediante PCR [Internet]. 2019. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/serotipado-de-aislados-de-campo-de-actinobacillus-pleuropneumoniae-mediante-pcr_41173/
26. Gottschalk M. Prevención de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcino [Internet]. 2017. Disponible en: https://www.3tres3.com/articulos/prevencion-de-actinobacillus-pleuropneumoniae-en-porcino_37546/

27. BOE (Boletín Oficial del Estado). Real Decreto 1470/2001 de 27 de diciembre, por el que se modifica el RD 109/1995 de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. 2001.
28. Fernández Ros AB. Autovacunas para ganadería: cuándo, cómo y porqué [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.nutricionsostenible.com/testimonio/autovacunas-para-ganaderia-cuando-como-y-porque/>
29. Michael GB, Bossé JT, Schwarz S. Antimicrobial Resistance in *Pasteurellaceae* of Veterinary Origin. In: Schwarz S, Cavaco LM, Shen J, editores. Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals. American Society for Microbiology Press; 2018. p. 331–63.
30. Coffey BM, Anderson GG. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1149:631–41.
31. Ministerio de Agricultura P y A. Producción y mercados ganaderos. 2020. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/13informesectorial_ote_porcino_tcm30-540409.pdf
32. Espigares D, Garza L, Oliver S, Cárceles S. Importancia de la inmunidad maternal en el control de la Pleuroneumonía Porcina [Internet]. 2019. Disponible en: <https://porcino.info/importancia-inmunidad-maternal-control-pleuroneumonia-porcina/>
33. Kang M, Zhou R, Liu L, Langford PR, Chen H. Analysis of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* multi-resistance plasmid, pHB0503. *Plasmid*. 2009 Mar;61(2):135–9.
34. Vanni M, Merenda M, Barigazzi G, Garbarino C, Luppi A, Tognetti R, et al. Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine. *Veterinary Microbiology*. 2012;156(1–2):172–7.
35. Gutiérrez-Martín CB, Blanco NG del, Blanco M, Navas J, Rodríguez-Ferri EF. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. *Veterinary Microbiology*. 2006;115(1–3):218–22.
36. Vilaró A, Novell E, Enrique-Tarancón V, Balielles J, Vilalta C, Martínez S, et al. Antimicrobial susceptibility pattern of porcine respiratory bacteria in Spain. *Antibiotics*.
37. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Jouy E, Butaye P, et al. Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 - 2004: The ARBAO-II study. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2008;50(1).
38. Holmer I, Salomonsen CM, Jorsal SE, Astrup LB, Jensen VF, Høg BB, et al. Antibiotic resistance in porcine pathogenic bacteria and relation to antibiotic usage. *BMC Veterinary Research*. 2019.
39. Li Y, da Silva GC, Li Y, Rossi CC, Crespo RF, Williamson SM, et al. Evidence of illegitimate recombination between two Pasteurellaceae plasmids resulting in a novel multi-resistance replicon, pM3362MDR, in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9.
40. Hathroubi S, Loera-Muro A, Guerrero-Barrera AL, Tremblay YDN, Jacques M. *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms: Role in pathogenicity and potential impact for vaccination development. Vol. 19, *Animal Health Research Reviews*. Cambridge University Press; 2018. p. 17–30.

8. ANEXOS

8.1. Clasificación de los antibióticos registrados para el tratamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos testados atendiendo a las recomendaciones de la EMA y según la familia y clase a la que pertenecen.

Antibiótico	Clasificación EMA	Familia	Clase
Amoxicilina	D	Betalactámico	Aminopenicilina
Ampicilina	D	Betalactámico	Aminopenicilina
Cefquinoma	B	Betalactámico	Cefalosporina
Ceftiofur	B	Betalactámico	Cefalosporina
Danofloxacina	B	Quinolona	Fluoroquinolona
Enrofloxacina	B	Quinolona	Fluoroquinolona
Florfenicol	C	Anfenicol	Anfenicol
Gamitromicina	C	Macrólido	Macrólido
Gentamicina	C	Aminoglucósido	Aminoglucósido
Marbofloxacina	B	Quinolona	Fluoroquinolona
Penicilina	D	Betalactámico	Penicilina
Tetraciclina	D	Tetraciclina	Tetraciclina
Tiamulina	C	Pleuromutilina	Pleuromutilina
Tianfenicol	C	Anfenicol	Anfenicol
Tildipirosina	C	Macrólido	Macrólido
Tilmicosina	C	Macrólido	Macrólido
Trimetoprim-Sulfametoxazol	D	Sulfonamida	Sulfonamida
Tulatromicina	C	Macrólido	Macrólido

8.2. Puntos de corte clínicos de los antibióticos registrados para el tratamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Tabla 1. Punto de corte clínico de los antibióticos registrados para el tratamiento de App que han sido testados mediante la técnica de Kirby-Bauer. Se muestra el organismo oficial del que se han extraído dichos puntos de corte clínicos.

Antibiótico	Siglas	Punto de corte 1 (mm)	Punto de corte 2 (mm)	Organismo oficial
Amoxicilina	AML	14	21	Sociedad Francesa de Microbiología (VET-2019)
Ampicilina	AMP	16	17	CLSI (VET-08)
Cefquinoma	CEQ	18	22	CLSI (M37-A2)
Ceftiofur	EFT	17	21	CLSI (VET01-S2)
Enrofloxacin	ENR	18	23	CLSI (VET-08)
Florfenicol	FL	18	22	CLSI (VET01-S2)
Gamitromicina	GAM	11	15	CLSI (VET-08)
Gentamicina	CN	12	16	CLSI (VET-08)
Marbofloxacin	MAR	14	20	CLSI (VET01-S2)
Penicilina	P	29	29	CLSI (VET-008)
Tetraciclina	TE	18	23	CLSI (VET-08)
Tiamulina	TIA	9	9	CLSI (VET01-S2)
Tianfenicol	TP	12	18	Fatro (laboratorio farmacéutico veterinario)
Tilmicosina	TMS	11	11	CLSI (VET01-S2)
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SxT	10	16	CLSI (VET-08)

Interpretación:

- **Sensible:** diámetro de halo mayor o igual al punto de corte 2.
- **Sensibilidad intermedia:** diámetro de halo entre el punto de corte 1 y el punto de corte 2.
- **Resistente:** diámetro de halo menor o igual al punto de corte 1.

Tabla 2. Punto de corte clínico de los antibióticos registrados para el tratamiento de App que han sido testados mediante la técnica de CMI por microdilución y el E-test. Se muestra el organismo oficial del que se han extraído dichos puntos de corte clínicos.

Antibiótico	Punto de corte (µg/mL)	Organismo oficial
Amoxicilina	4	Sociedad Francesa de Microbiología (VET-2019)
Ampicilina	0,5	CLSI (VET-2018)
Ceftiofur	2	CLSI (VET-2018)
Danofloxacina	0,25	CLSI (VET-2018)
Enrofloxacina	0,25	CLSI (VET-2018)
Florfenicol	2	CLSI (VET-2018)
Gamitromicina	4	CLSI (VET-2018)
Gentamicina	2	CLSI (VET-2018)
Marbofloxacina	1	CLSI (VET-2018)
Penicilina	0,25	CLSI (VET-2018)
Tetraciclina	0,5	CLSI (VET-2018)
Tiamulina	16	CLSI (VET-2018)
Tildipirosina	16	CLSI (VET-2018)
Tilmicosina	16	CLSI (VET-2018)
Trimetoprim-Sulfametoxazol	2	CLSI (VET-2018)
Tulatromicina	64	CLSI (VET-2018)

Interpretación:

- **Sensible:** CMI menor o igual al punto de corte.
- **Resistente:** CMI mayor al punto de corte.