

Sensibilidad de *Pseudomonas spp.* frente a las quinolonas en infecciones óticas y cutáneas en el perro y el gato

Se estudió, mediante el método de Kirby-Bauer o de difusión en agar, la sensibilidad *in vitro* de 135 cepas de *Pseudomonas spp.*, procedentes de infecciones óticas y cutáneas de perros y gatos, frente a tres antibióticos quinolónicos: enrofloxacin, ciprofloxacina y marbofloxacina. El antibiótico frente al que se observaron mayores porcentajes de sensibilidad *in vitro* fue la ciprofloxacina para ambos grupos de cepas (óticas y cutáneas). Los aislamientos procedentes de otitis, fueron marcadamente más resistentes que los cutáneos para todos los antibióticos testados.

Palabras clave: *Pseudomonas spp.* Quinolonas. Resistencia fenotípica.
Clin. Vet. Peq. Anim., 29 (4): 203-207, 2009

C. Escribano¹, L. Ordeix^{1,3},
G. Pol¹, A. Puigdemont²,
P. Brazis¹

¹Univet S.L. Servicio de Diagnóstico Veterinario
Parque Científico UAB
Facultad de Medicina
Campus de Bellaterra
²Dpto. de Farmacología
Facultad de Veterinaria
UAB.

³Ars Veterinaria, Servei de Dermatologia
c/ Cardedeu 3
Barcelona.

Introducción

Pseudomonas spp. es un género de microorganismos asociados a infecciones óticas y, menos frecuentemente cutáneas, en animales de compañía. Kowalski y colaboradores (1988)¹ observaron, a partir de muestras procedentes de otitis externas en perros y gatos, que *Pseudomonas spp.* y *Proteus spp.* eran las bacterias Gram negativas aisladas más frecuentemente. Otras publicaciones corroboran la implicación de *Pseudomonas spp.* en las otitis en animales de compañía, mostrando porcentajes de aislamiento que varían desde un 12% hasta un 38%, según otros estudios más recientes^{2,3}.

Pseudomonas spp., debido a su pared celular Gram negativa altamente impermeable, presenta una resistencia intrínseca a muchos grupos de antibióticos. Además, la antibioterapia indiscriminada selecciona las bacterias resistentes, o con los mecanismos genéticos necesarios para adquirir esa resistencia⁴.

Los mecanismos moleculares responsables del desarrollo de la resistencia fenotípica en *Pseudomonas spp.* están ampliamente estudiados⁵, y se basan en la mutación del gen *gyr A*, que controla el correcto enrollamiento de la doble hélice de ADN, y la sobre-expresión de sistemas proteicos denominados bombas de reflujo (*efflux pumps*).

Estos mecanismos pueden ser adquiridos por la bacteria (inducidos por una antibioterapia errónea o insuficiente), o bien ser intrínsecos, propios del microorganismo. En el caso de la resistencia adquirida, los microorganismos captan los genes que la codifican, a través de algún mecanismo de intercambio "sexual". La resistencia intrínseca, por otra parte, puede deberse a mutaciones inducidas en el material genético propio del microorganismo, o a la sobre-expresión de estructuras bacterianas que pueden reutilizarse para impedir la entrada de antibióticos a la célula. En este sentido, es muy importante el papel que desempeñan los sistemas proteicos de reflujo (*efflux pumps*), que se encuentran en el espacio periplasmático de la pared celular, anclados entre la membrana externa y la membrana citoplasmática de la célula, y que son los encargados del reconocimiento del antibiótico y su expulsión.

Estudios realizados en el año 2000 en España, ya apuntaban hacia un incremento de las resistencias de *Pseudomonas spp.* aisladas a partir de infecciones óticas, sobre todo



frente a enrofloxacin, probablemente debido a su uso indiscriminado⁶.

Wildermuth y colaboradores⁷ (2007) evaluaron la efectividad *in vitro* de diferentes antibióticos frente a *Pseudomonas spp* aisladas en USA, demostrando que las quinolonas, a pesar de ser uno de los grupos antibióticos más utilizados, presentaban una elevada efectividad.

Actualmente, no existen datos similares en España, relativos a las frecuencias de aislamiento de *Pseudomonas spp.* a partir de muestras óticas y cutáneas en animales de compañía. Tampoco se conoce el estado real de los perfiles de resistencia de este tipo de aislamientos frente a los antibióticos más frecuentemente utilizados en clínica y en nuestra área geográfica, como son las quinolonas.

El objetivo del estudio fue observar el estado actual de resistencia fenotípica que presentaban 135 cepas de *Pseudomonas spp.*, aisladas clínicamente de procesos infecciosos de oído y piel en el perro y el gato, frente a las diferentes quinolonas testadas: la enrofloxacin, la ciprofloxacina, y la marbofloxacina.

Material y métodos

El estudio se realizó a partir de 135 aislamientos de *Pseudomonas spp.* de muestras recibidas en nuestro laboratorio durante el periodo comprendido entre julio y diciembre de 2008, procedentes de perros y gatos que presentaban infecciones de piel y del conducto auditivo externo. Para la recogida de las muestras se utilizaron hisopos con medio de cultivo Stuart- Amies (OXOID), aplicados sobre la superficie cutánea o del interior del conducto auditivo. En los casos de infecciones cutáneas profundas, las muestras se recogieron mediante biopsia y en condiciones de esterilidad.

No se descartaron los animales que habían sido tratados con algún tipo de antibiótico, ni aquellos con infecciones crónicas o recurrentes, ya que el objetivo principal del estudio era observar el estado de distribución real de resistencias en ese período concreto.

El envío de las muestras, desde los centros veterinarios hasta el laboratorio de Microbiología de Univet, se realizó en menos de 24h y a temperatura ambiente.

Las muestras fueron procesadas para el aislamiento e identificación de las cepas de *Pseudomonas spp.* Para ello, se sembraron en medios de cultivo ricos, específicos y diferenciales: Agar sangre, Agar Cetrimide (Fig. 1) y Agar McConkey (OXOID).

Las colonias compatibles con *Pseudomonas spp.*, fueron identificadas utilizando galerías comerciales de identificación específicas para bacilos Gram negativos, no enterobacterias: API 20 NE (OXOID). (Fig. 2).

Una vez realizadas las identificaciones a nivel de género,

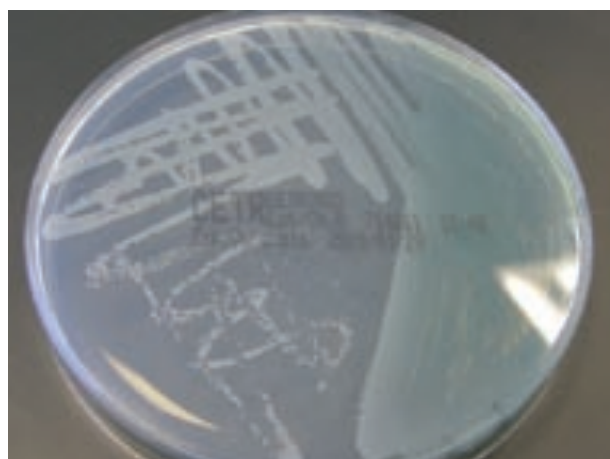


Figura 1. Agotamiento en medio selectivo Agar Cetrimide de una cepa de *Pseudomonas spp.*



Figura 2. Identificación de una cepa de *Pseudomonas spp.* mediante la galería comercial API NE (Oxoid)

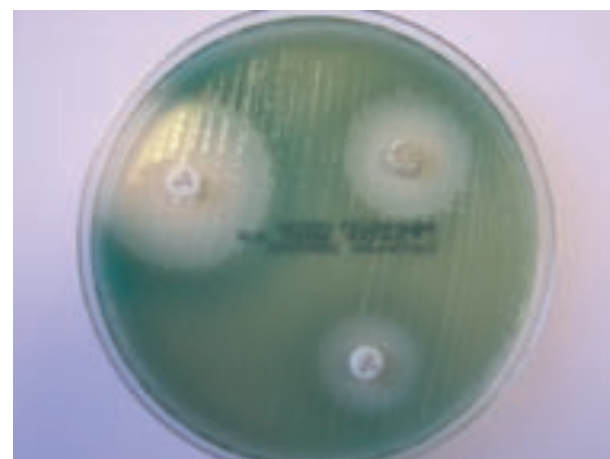


Figura 3. Antibiograma en MH Agar de una cepa de *Pseudomonas spp.* estudiada.

se llevaron a cabo las pruebas de sensibilidad de las 135 cepas patógenas frente a las siguientes quinolonas: marbofloxacina, enrofloxacin y ciprofloxacina. Para ello, se utilizó el método

de difusión en Agar o semi-cuantitativo de Kirby-Bauer, siguiendo a tal efecto la normativa marcada por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

Para cada aislamiento de *Pseudomonas spp.*, se midió el diámetro del halo de inhibición de cada uno de los antibióticos testados (Fig. 3), y se contrastó con los valores de referencia para *Pseudomonas spp.* del NCCLS, a fin de determinar la sensibilidad o resistencia del microorganismo⁸.

Resultados

En la Tabla 1 se describen los resultados de sensibilidad para los diferentes grupos de cepas de *Pseudomonas spp.* aisladas.

Del total de 135 aislamientos estudiados, 99 procedían de infecciones óticas (98 en perro y 1 en gato) y 36 de infecciones cutáneas (29 en perro y 7 en gato).

De los 99 aislamientos óticos, 16 (16,1%) fueron sensibles a los tres antibióticos testados, mientras que 23 (23,2%) mostraron resistencia a todos ellos. Sin embargo, de los 36 aislamientos cutáneos, 14 (39%) fueron sensibles a los tres antibióticos de forma simultánea, mientras que sólo 3 (8,3%) fueron resistentes a los tres (datos no mostrados en la tabla).

El antibiótico más efectivo *in vitro*, frente a *Pseudomonas spp.* procedentes de infecciones óticas, fue la ciprofloxacina (76% de cepas sensibles), seguida de la marbofloxacina (65%). Sin embargo, tan sólo un 16% de las *Pseudomonas spp.* se mostraron sensibles a la enrofloxacin. Para cepas procedentes de muestras cutáneas, el antibiótico con mayor porcentaje de efectividad *in vitro* fue la marbofloxacina (78% de cepas sensibles), con un valor muy similar al de la ciprofloxacina (75%). Entre las cepas de *Pseudomonas spp.* cutáneas, la sensibilidad frente a la enrofloxacin, fue de un 47%.

Pudo observarse además, que, tanto para muestras procedentes de piel como de oído, las *Pseudomonas spp.* aisladas sensibles a enrofloxacin lo fueron también a su metabolito activo, la ciprofloxacina. Por el contrario, 63 aislamientos de diferente origen, sensibles a ciprofloxacina,

mostraron resistencia frente a la enrofloxacin (resultados no mostrados en la tabla).

Discusión

El presente estudio muestra como las cepas de *Pseudomonas spp.*, aisladas a partir de infecciones óticas (en muchos casos crónicas), son más resistentes a todos los antibióticos estudiados que las cepas obtenidas a partir de infecciones de piel.

Este resultado es similar a los obtenidos por otros autores en áreas geográficas distintas. Wildermuth y colaboradores⁷, compararon las sensibilidades de diversos aislamientos de *Pseudomonas spp.* procedentes de muestras de piel y de oído de perro, frente a las quinolonas: enrofloxacin, marbofloxacina y ciprofloxacina. Observaron como los aislamientos de infecciones óticas, eran marcadamente menos sensibles que los procedentes de muestras de piel, siendo el antibiótico más efectivo la ciprofloxacina, en todos los casos.

Esta diferencia, en cuanto a los patrones de sensibilidad, puede estar en parte justificada por la aparición de resistencias en aquellas cepas sometidas de forma continua a tratamientos empíricos con antibióticos fluoroquinolónicos de eficacia inferior a la esperada. Ello se observa con especial relevancia para la enrofloxacin, antibiótico frecuentemente utilizado para combatir infecciones óticas en animales de compañía.

La resistencia frente a la enrofloxacin fue estudiada por Brothers y colaboradores⁹, demostrando la aparición de *Pseudomonas spp.* mutantes, resistentes *in vitro* frente a la exposición a concentraciones sub-letales de enrofloxacin, después de 5 resiembras seriadas. Los resultados concluyeron que *Pseudomonas spp.*, conjuntamente con *Enterococcus spp.*, eran los microorganismos que más rápidamente desarrollaban esa resistencia.

Las diferencias entre la sensibilidad de los aislamientos óticos y cutáneos podrían deberse a factores como la duración del tratamiento o la diferente disponibilidad del antibiótico *in vivo* en función de la localización de la infección.

	Enrofloxacin (%)	Marbofloxacina (%)	Ciprofloxacina (%)
Óticas n= 99			
Sensibles	16 (16%)	64 (65%)	72 (76%)
Resistentes	83 (84%)	35 (35%)	27 (27%)
Cutáneas n= 36			
Sensibles	17 (47%)	28 (78%)	27 (75%)
Resistentes	19 (53%)	8 (22%)	9 (25%)

n= Número total de cepas aisladas

Los aislamientos con resistencia intermedia fueron interpretados como resistentes

Tabla 1. Sensibilidad observada para las cepas de *Pseudomonas spp.* procedentes de oído y piel, frente a las quinolonas estudiadas.

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos afirmar que la ciprofloxacina es el antibiótico testado que presenta mejores resultados de eficacia *in vitro* frente a *Pseudomonas spp.* (tanto para cepas procedentes de infecciones óticas como cutáneas). Sería, por lo tanto, y en función de los resultados para las pruebas de sensibilidad y para la mayor parte de las cepas estudiadas, el antibiótico de elección para llevar a cabo un tratamiento eficaz. En 2008, Rubin y colaboradores¹⁰ mostraron, a partir de 106 cepas de *Pseudomonas spp.* procedentes de muestras de infecciones óticas y cutáneas en el perro y en el gato, que con la ciprofloxacina se obtenían los mejores resultados de sensibilidad *in vitro* (16% de las cepas resistentes), seguida por la levofloxacina (21%), gatifloxacina (23%), y marbofloxacina (27%). Sin embargo, la frecuencia de resistencia a la enrofloxacin (31%) era mucho menor a la hallada en nuestro estudio, lo que podría explicarse por las diferencias en cuanto a pautas de tratamiento y uso de antibióticos de elección entre las distintas áreas geográficas.

Un estudio realizado por McKay L. y colaboradores¹¹, a partir de 110 aislamientos de *Pseudomonas spp.*, procedentes de otitis caninas, en el que se comparaban los resultados de sensibilidad obtenidos frente a tres quinolonas (utilizando dos métodos, el de disco difusión y el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias), demostraba que el antibiótico más efectivo *in vitro* era la marbofloxacina. Además, para ésta, así como para la orbifloxacina, existía buena correlación de resultados mediante ambos métodos de estudio (87% y 74% respectivamente), mientras que para la enrofloxacin, observaron que el método de disco-difusión, tendía a sobreestimar los resultados de sensibilidad. Éstos resultados indican que el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias permite estimar mejor la sensibilidad real de los microorganismos. En futuros estudios sería interesante corroborar estos resultados para antibióticos como la ciprofloxacina, uno de los más utilizados en clínica.

Finalmente, el hecho de que todas las cepas sensibles *in vitro* a enrofloxacin lo fueran también a ciprofloxacina (su metabolito activo) y no al revés, podría deberse al mayor uso clínico de la enrofloxacin respecto a la ciprofloxacina para tratar este tipo de infecciones. Teniendo en cuenta, además, que sólo aproximadamente el 40% de la enrofloxacin sería metabolizada a ciprofloxacina *in vivo*¹², los tratamientos con ésta última tendrían un mayor éxito.

En definitiva, los resultados obtenidos en el presente estudio permiten concluir que la ciprofloxacina es el antibiótico con mejores resultados de sensibilidad *in vitro* frente a *Pseudomonas spp.*, y por lo tanto, sería el antibiótico de elección para un posible tratamiento farmacológico frente a la mayoría de las cepas estudiadas. Por otro lado, se observa una clara diferencia respecto al patrón de sensibilidad frente a quinolónicos entre cepas de *Pseudomonas spp.* obtenidas a partir de infecciones óticas y cutáneas en perro y gato. Así, las cepas aisladas procedentes de infecciones óticas, tratadas en muchos casos de forma crónica o mediante antibioterapia errónea o incompleta, son más resistentes a todos los antibióticos que las aisladas a partir de la piel, haciendo especial énfasis en la enrofloxacin (muy utilizada desde hace años para el tratamiento de infecciones óticas).

Por tanto, debido a la elevada frecuencia de resistencias es recomendable basar el tratamiento antibiótico sistémico de las infecciones por *Pseudomonas spp.* en el estudio de un test de sensibilidad previo. Además, es necesaria la realización correcta de los tratamientos, para al menos desacelerar la rápida e imparable capacidad de los microorganismos de adaptación al ambiente y generación de resistencias.

Agradecimientos

Este estudio ha sido parcialmente financiado con una ayuda del Programa Torres Quevedo (PTQ06-02).

Title

***Pseudomonas spp.* susceptibility to quinolones in otic and cutaneous infections in dogs and cats**

Summary

The objective of this study was to evaluate the susceptibility of 135 *Pseudomonas spp.* strains against the most common quinolones used in veterinary practice: enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. Single cultures of *Pseudomonas* were isolated from samples obtained from otic and cutaneous infections in dogs and cats. For the susceptibility test, the Kirby-Bauer method was used. The most effective antibiotic *in vitro*, was found to be ciprofloxacin for both groups of isolates (otic and cutaneous). About 84% of the otic strains and 53% of the cutaneous isolates were resistant to enrofloxacin, however, for ciprofloxacin and marbofloxacin the percentage of resistance shown by *Pseudomonas spp.* was lower (30%). Moreover, otic isolates were found to be significantly less susceptible than cutaneous isolates to all the tested quinolones. This could indicate an increase in the appearance of resistances due to inadequate antibiotic therapy protocols, or to antibiotic treatments not based on microbiologic cultures and susceptibility tests.

Key words: *Pseudomonas spp.* Quinolone. Phenotypic resistance.

Bibliografía

1. Kowalski JJ: The microbial environment of the ear canal in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1988; 18(4):743-54.
2. Bornand V: Bacteriology and mycology of otitis externa in dogs. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 1992; 134(7):341-8.
3. Arshad M, Khan NU, Ali N, Afridi NM: Sensitivity and spectrum of bacterial isolates in infectious otitis externa. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2004; 14(3):146-9. Erratum in: *J Coll Physicians Surg Pak.* 2004; 14(9):582
4. Petersen AD, Walker RD, Bowman MM, Schott HC 2nd, Rosser EJ Jr: Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2002; 38(5):407-13.
5. Teresa Tejedor M, Martín JL, Navia M, Freixes J, Vila J: Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Vet Microbiol.* 2003; 94(4):295-301.
6. Martín Barrasa JL, Lupiola Gómez P, González Lama Z, Tejedor Junco MT: Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2000; 47(3):191-6.
7. Wildermuth BE, Griffin CE, Rosenkrantz WS, Boord MJ: Susceptibility of *Pseudomonas* isolates from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2007; 43(6):337-41.
8. National Committee of Clinical Laboratory Science. NCCLS. *Guidelines for susceptibility testing by disk diffusion.* 2000;20:M7-A5.
9. Brothers AM, Gibbs PS, Wooley RE: Development of resistant bacteria isolated from dogs with otitis externa or urinary tract infections after exposure to enrofloxacin in vitro. *Vet Ther.* 2002; 3(4):493-500.
10. Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, Bodeis-Jones S, Zhao S: Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet Microbiol.* 2008. 18; 131(1-2):164-72.
11. McKay L, Rose CD, Matousek JL, Schmeitzel LS, Gibson NM, Gaskin JM: Antimicrobial testing of selected fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2007; 43(6):307-12.
12. Seol B, Nagli T, Madi J, Bedekovi M: In vitro antimicrobial susceptibility of 183 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2002; 49(4):188-92.



Servicio integral de imagen para tu clínica

web, newsletters, cartelería, papelería, señalética interior y decoración



**EMPRESA ESPECIALIZADA EN
COMUNICACIÓN VETERINARIA**

Mejía Lequerica n12 5^º - 4^ª 08028 Barcelona
info@icesaludvet.com | telf.: 93 409 41 85