

## SELECCIÓN *IN VITRO* DE RESISTENCIAS A LA FLUOROQUINOLAS EN *MYCOPLASMA AGALACTIAE*

Para este estudio se seleccionaron cepas de *Mycoplasma agalactiae* resistentes a las fluoroquinolonas con 3 fluoroquinolonas distintas. Se observó un incremento gradual en la resistencia al agente selector, así como resistencia cruzada a otras fluoroquinolonas. Además de esto, descubrimos alteraciones en las sensibilidades de agentes antimicrobianos no relacionados.

Nuno T. Antunes  
 Maria del Mar Tavío  
 Patrícia Assunção  
 Ruben Rosales  
 Christian de la Fé  
 José B. Poveda

*Mycoplasma agalactiae* resistant strains to fluoroquinolones were selected with 3 different fluoroquinolones. A gradual increase in their resistance to the selective agent was seen, as well as cross resistance to the other fluoroquinolones. Changes on the susceptibilities to other unrelated antimicrobial compounds were also seen.

### INTRODUCCIÓN

*Mycoplasma agalactiae* es considerado el agente etiológico clásico de la agalaxia contagiosa, aunque otros micoplasmas, como *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens* también puedan ser responsables de esta enfermedad. Este síndrome se encuentra distribuido por todo el mundo y es responsable de graves pérdidas económicas (Bergonier y cols., 1997).

Es un síndrome que afecta a los pequeños rumiantes, con especial incidencia en cabras. Generalmente se manifiesta en el momento del parto o durante la lactación, afectando sobre todo al tejido mamario, a las articulaciones y a los ojos, pudiendo causar neumonía (Bergonier y cols., 1997).

Su control por medio de vacunas no se ha demostrado totalmente eficaz, puesto que las vacunas inactivadas no garantizan una buena inmunidad y las atenuadas están prohibidas en muchos países. Así, la quimioterapia es, en muchas ocasiones, el recurso utilizado para su control (Bergonier y cols., 1997).

La ausencia de pared celular en los micoplasmas puede disminuir el número de agentes que pueden ser

utilizados, puesto que son intrínsecamente resistentes a las penicilinas y beta-lactámicos. Así, se eligen otras clases de antimicrobianos con distintas dianas. Las quinolonas, que interfieren con la replicación y reparación del ADN, y las tetraciclinas, macrólidos y lincosamidas que actúan a distintos niveles para bloquear la síntesis proteica, son los principales agentes utilizados para el control de afecciones por micoplasmas.

En este estudio se pretende la selección de células de *Mycoplasma agalactiae* con la susceptibilidad a diversas fluoroquinolonas disminuida para su posterior caracterización.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos cepas sensibles a quinolonas de *Mycoplasma agalactiae* aisladas de casos clínicos en nuestra unidad. Las quinolonas utilizadas para la selección de mutantes fueron el norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin, obtenidos de Sigma. También se utilizó oxitetraciclina, cloranfenicol y tilosina para la realización de los antibiogramas, estos últimos obtenidos de SERVA.

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron determinadas como se ha descrito anteriormente (Hannan, 2000).

Generalmente se manifiesta en el momento del parto o durante la lactación, afectando sobre todo al tejido mamario, a las articulaciones y a los ojos, pudiendo causar neumonía

Las vacunas inactivadas no garantizan una buena inmunidad y las atenuadas están prohibidas en muchos países





Cepa	Agente selector	Escalón selectivo	CMI (µg/ ml)						
			Nor	Cip	Enr	Oxy	Tyl	Chl	
5		Original	1	0.0625	0.625	0.250	0.06	4	
	Nor	5	8	1	<1	0.5	0.125	4	
		7	8	2	1	0.5	0.06	4	
		10	128	32	8	0.5	0.250	4	
	Cip	5	-	-	-	-	-	-	
		7	-	-	-	-	-	-	
		10	-	-	-	-	-	-	
	Enr	5	32	16	16	0.5	0.06	4	
		7	64	16	32	0.5	0.06	4	
		10	64	16	32	0.5	0.06	4	
	7		Original	1	0.06	0.06	0.250	0.06	2
		Nor	5	32	16	16	0.250	0.125	2
7			32	16	16	0.5	0.125	4	
10			128	32	16	0.5	0.250	4	
Cip		5	32	16	16	0.5	0.06	4	
		7	64	32	16	0.5	0.06	4	
		10	<64	32	16	0.5	0.06	4	
Enr		5	32	16	32	0.5	0.06	4	
		7	32	16	32	0.5	0.06	4	
		10	32	16	64	0.5	0.06	4	

Tabla 1. CMIs de varios agentes antimicrobianos sobre la cepa original y diversos escalones selectivos seleccionados con las distintas fluoroquinolonas (Nor- Norfloxacin, Cip- ciprofloxacino, Enr- Enrofloxacin, Oxy- Oxitetraciclina, Tyl- Tilosina, Chl- cloranfenicol)

En la tabla 1. se observa la CMI de diversos agentes antimicrobianos sobre la cepa original y los escalones selectivos 5, 7 y 10 de los mutantes seleccionados con norfloxacin, ciprofloxacino y enrofloxacin.

Independientemente de la fluoroquinolona utilizada como agente selector, es evidente el incremento de la CMI del antimicrobiano utilizado como agente selector además de con las restantes fluoroquinolonas utilizadas en este estudio.

En las resistencias seleccionadas con norfloxacinó se observa un incremento en la CMI de la oxitetraciclina y tilosina en las dos cepas utilizadas, mientras solamente se observa un incremento en la CMI del cloranfenicol en la cepa 7.

En la selecci3n de resistencias con ciprofloxacino en la cepa 7 se observ3 un incremento de la resistencia a la oxitetraciclina y cloranfenicol, pero un incremento en la susceptibilidad de la misma a la tilosina.

Cuando se utiliz3 el enrofloxacinó como agente selector se observ3 una disminuci3n en la susceptibilidad a la oxitetraciclina en ambas cepas y al cloranfenicol en la cepa 7. No se observaron cambios en la susceptibilidad a la tilosina.

## DISCUSI3N Y CONCLUSI3N

Los mutantes seleccionados fueron obtenidos m3s r3pidamente con norfloxacinó que con ciprofloxacino y enrofloxacinó, probablemente debido a una mayor frecuencia de selecci3n, lo que puede ser reflejo de distintos mecanismos de acci3n.

El incremento simult3neo de la resistencia a las diversas fluoroquinolonas se puede explicar en parte por su mecanismo de acci3n. Las quinolonas actúan por inhibici3n de las topoisomerasas bacterianas, con las cuales interactúan (Drlica y cols., 1997; Sanders, 2001). Aunque su apetencia por la topoisomerasa II y IV dependa no s3lo de si es una bacteria grampositiva o gramnegativa y de cada quinolona en particular, la disminuci3n de la sensibilidad a una de ellas generalmente implica disminuci3n de la sensibilidad a otras, en mayor o menor grado, lo que se denomina resistencia cruzada (Sanders, 2001).

Esta disminuci3n de susceptibilidad, observada en los mutantes seleccionados puede ser debida a mutaciones en los genes de las topoisomerasas, a un incremento en la expresi3n

de sistemas de eflujo tal como se ha descrito en previos trabajos (Raheison y cols., 2002; Gruson y cols., 2005). Estos mecanismos pueden ser únicos en una c3lula o actuar sinérgicamente incrementando aún m3s el nivel de resistencia (Van Bambeke y cols., 2005).

Dependiendo del mecanismo de resistencia, las CMIs de otros antimicrobianos no relacionados con las quinolonas se pueden ver afectadas, debido a la acci3n de sistemas de eflujo que bombean hacia el exterior del citoplasma bacteriano mol3culas de diferentes antimicrobianos (Van Bambeke y cols., 2005). La disminuci3n de la susceptibilidad de algunos de los mutantes seleccionados a agentes no relacionados con las fluoroquinolonas como pueden ser el cloranfenicol, la oxitetraciclina y la tilosina puede ser debida al aumento de la expresi3n de sistemas de eflujo, cuya caracterizaci3n desarrollaremos en trabajos posteriores.

En conclusi3n, el crecimiento de *Mycoplasma agalactiae* en concentraciones subinhibitorias de diversas fluoroquinolonas selecciona c3lulas gradualmente m3s resistentes a las mismas. Los mutantes seleccionados son resistentes a todas las fluoroquinolonas testadas, adem3s de observarse la disminuci3n simult3nea de su susceptibilidad a otros antimicrobianos como en algunos de los mutantes. La evaluaci3n de mutaciones en las topoisomerasas así como el estudio de la presencia o ausencia de sistemas de eflujo podr3 ayudar a comprender los mecanismos de resistencia involucrados en la resistencia adquirida a las fluoroquinolonas en los mutantes desarrollados en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

B3b3ear, C.M., Bove, J.M., B3b3ear, C., Renaudin, J., 1997. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoro-

**Esta disminuci3n de susceptibilidad, observada en los mutantes seleccionados puede ser debida a mutaciones en los genes de las topoisomerasas, a un incremento en la expresi3n de sistemas de eflujo**

**Dependiendo del mecanismo de resistencia, las CMIs de otros antimicrobianos no relacionados con las quinolonas se pueden ver afectadas, debido a la acci3n de sistemas de eflujo que bombean hacia el exterior del citoplasma bacteriano mol3culas de diferentes antimicrobianos**

quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 269-73.

Bergonier, D., Berthelot X., Poumarat, F., 1997. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev. Sci. Tech. 16, 848-873.

Drlica, K., Zhao, X., 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 377-92.

Gruson, D., Pereyre, S., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M., 2005. In vitro development of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis* respectively. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 1190-1193

Hannan, P. C., 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. Vet. Res. 31, 373-395.

Kirchhoff, H., Rosengarten, R., 1984. Isolation of a motile mycoplasma from fish. J. Gen. Microbiol. 130, 2439-2445.

Raherison, S., Gonzalez, P., Renaudin, H., Charron, A., Bébéar, C., Bébéar, C.M., 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by My-

coplasma hominis. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 672-679

Sanders, C.C., 2001. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. Clin. Infect. Dis. 32 Suppl 1:S1-8.

Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J., Tulkens, P.M., 2005. Quinolones in 2005: an update. Clin. Microbiol. Infect. 11(4):256-80.

## BIOGRAFÍA

### NUNO T. ANTUNES

Licenciado en Medicina Veterinaria por la Universidad de Trás-os-Montes e Alto Douro (Portugal). Doctorado en Sanidad Animal por el Instituto Universitario de Sanidad Animal de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Profesor Auxiliar de enfermedades parasitarias en la Escuela Universitaria Vasco da Gama, Coimbra, Portugal. Investigador del Centro de Estudios y Recursos Naturales, Ambiente y Sociedad (CERNAS).

Email: [nuno.giao101@doctorandos.ulpgc.es](mailto:nuno.giao101@doctorandos.ulpgc.es)

Patrocinador de esta investigación:

**COMPAÑÍA CANARIA DE  
PIENSOS S.A. (CAPISA)**