

SENSIBILIDAD DE *Brachyspira hyodysenteriae* Y DE *Campylobacter* spp. A MOLECÚLAS DERIVADAS DEL AJO

Álvaro Hidalgo¹, Ana Carvajal¹, Pedro Rubio¹

¹Enfermedades Infecciosas y Epidemiología. Facultad de Veterinaria de León.
alvaro.hidalgo@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos se han utilizado para tratar las enfermedades digestivas de etiología bacteriana durante décadas, tanto en humanos como en animales. Sin embargo, la detección de aislados de bacterias patógenas digestivas resistentes a uno o varios grupos de antibióticos es un hallazgo cada vez más frecuente (CMVP, 2010), disminuyendo, por lo tanto, las opciones para tratar eficazmente las enfermedades que causan. Este hecho destaca la necesidad de contar con nuevas alternativas que nos ayuden a combatir y controlar las enfermedades digestivas. Entre dichas alternativas destaca la inclusión de probióticos, sustancias acidificantes o extractos de plantas en las dietas de los animales. Estos últimos poseen un gran potencial, resultando en la actualidad una opción cada vez más atractiva.

En Europa, las especies bacterianas del género *Campylobacter* son la causa más importante de gastroenteritis bacterianas en humanos, habiendo sido responsables de más de 200.000 casos en el año 2007 (EFSA, 2009). Si bien *Campylobacter jejuni* es la especie que se aísla con más frecuencia en estos casos, otras especies como *C. lari* o *C. upsaliensis* también se asocian con enfermedad (Tauxe, 1992).

La disentería porcina, producida por *Brachyspira hyodysenteriae*, es una de las principales enfermedades digestivas del ganado porcino. En España, su tratamiento y control están basados principalmente en la utilización de antibióticos, ya que no hay ninguna vacuna comercial disponible en la actualidad. Sin embargo, cada vez es más frecuente el aislamiento de cepas de *B. hyodysenteriae* resistentes a los principales antibióticos usados en el tratamiento de esta enfermedad (Hidalgo et al., 2009).

Las propiedades beneficiosas del ajo (*Allium sativum*) son conocidas desde la antigüedad, destacando entre ellas su poder antimicrobiano. Recientemente, se ha conseguido obtener un extracto purificado de dos moléculas de *Allium sativum* (DMC Research Center SL, Granada, España). Estos derivados son el propil propil tiosulfonato (PTS) y el propil propil tiosulfonato (PTSO).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad in vitro del PTS y el PTSO y de su combinación en un producto comercial (Garlicon®) frente a *B. hyodysenteriae*, *Campylobacter jejuni* y *C. upsaliensis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento de *Brachyspira hyodysenteriae* : En este estudio se utilizaron un total de cuarenta y siete aislados de *B. hyodysenteriae* de la colección de bacterias de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epizootología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Los aislados bacterianos fueron obtenidos a partir de muestras de heces de cerdos con diarrea enviadas por veterinarios clínicos para el diagnóstico de laboratorio durante los años 2001-2009.

Los aislados de *B. hyodysenteriae* se cultivaron en agar sangre, incubándose en condiciones de anaerobiosis (80% nitrógeno, 10% dióxido de carbono y 10% hidrógeno) a 39°C.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento de *Campylobacter* spp.:

Un total de doce aislados de *Campylobacter* spp., incluyendo ocho aislados de *Campylobacter jejuni* y cuatro de *C. upsaliensis*, fueron utilizados en este estudio.

Los aislados de *Campylobacter* spp. se incubaron en condiciones de microaerofilia a 42°C.

Determinación de la sensibilidad al PTS y al PTSO:

Se diseñó un antibiograma utilizando placas de 48 pocillos para determinar la sensibilidad de las bacterias estudiadas al PTS, al PTSO y a una combinación de ambos que denominamos PTS+PTSO (17,5% de PTS y 82,5% de PTSO) [DMC Research Center SL, Granada, España] mediante dilución en medio líquido. Para ello se dispuso de diluciones dobles seriadas de PTS, PTSO y PTS+PTSO en un rango de concentraciones que fue desde 6,25 a 400 $\mu\text{g/ml}$.

La sensibilidad de *Campylobacter jejuni* y *C. upsaliensis* al PTS, PTSO y PTS+PTSO se determinó siguiendo la técnica descrita por McDermott et al. (2005). La sensibilidad de *B. hyodysenteriae* a estas moléculas se comprobó mediante una técnica de dilución en medio líquido descrita por Karlsson et al. (2003). En ambos casos se calculó la concentración mínima de cada compuesto que inhibió el crecimiento bacteriano (CMI). Además, se calculó la concentración de PTS y PTSO que inhibió el crecimiento del 90% (CMI₉₀) de los aislados de *B. hyodysenteriae* y *Campylobacter* spp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las pruebas de sensibilidad al PTS, PTSO y PTS+PTSO de *B. hyodysenteriae* y de *Campylobacter* spp. se muestran en la figura 1 y 2, respectivamente.

Este estudio muestra que tanto el PTS como el PTSO son moléculas con actividad antimicrobiana in vitro frente a aislados de *B. hyodysenteriae* y de *Campylobacter* spp. Además, el PTS es más activo frente a *B. hyodysenteriae* que el PTSO [CMI₉₀ (PTS y PTSO) = 100 y >400 $\mu\text{g/ml}$], llegando a inhibir el crecimiento de todos los aislados en el rango de concentraciones probadas. Del mismo modo, se requirió una menor concentración de PTS que de PTSO para inhibir el crecimiento de los aislados de *Campylobacter* spp. [CMI₉₀ (PTS y PTSO) = 50 y 200 $\mu\text{g/ml}$]. En este caso, la diferencia fue de dos diluciones dobles. La combinación de PTS y PTSO mostró una actividad menor que el PTS, pero mayor que el PTSO frente a los dos patógenos. Además, es de destacar que los aislados de *Campylobacter* spp. presentaron CMI más bajas que las halladas por Ross et al. (2001) al determinar la sensibilidad de estas bacterias al aceite de ajo.

La actividad antibacteriana mostrada por las moléculas de PTS y PTSO frente a *B. hyodysenteriae* y *Campylobacter* spp. en las pruebas de sensibilidad in vitro indican que estos compuestos pueden presentar cierto interés en el tratamiento y control de las enfermedades que causan, siendo necesarios estudios clínicos que lo confirmen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•CMVP (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use), 2010. Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. •EFSA (European Food Safety Authority), 2009. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. •Hidalgo, A., Carvajal, A., García-Feliz, C., Osorio, J., Rubio, P. 2009. Res Vet Sci. 87, 7-12. •Karlsson M, Fellström C, Gunnarsson A, Landén A, Franklin A. 2003. J. Clin. Microbiol. 41, 2596-604. •McDermott PF, Bodeis-Jones SM, Fritsche TR, Jones RN, Walker RD. 2005. J. Clin. Microbiol. 43, 6136-8. •Ross, Z.M., O'Gara, E.A., Hill, D.J., Sleightholme, H.V., Maslin, D.J. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67, 475-80. •Tauxe, R.V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrial nations. in: Current Status and Future Trends. I. Nachamkin, M. J. Blaser, and L. S. Tompkins, eds. American Association of Microbiologists, Washington, DC.

Agradecimientos: Los autores agradecen a Anselmo Perea y Antonio Arenas, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba la cesión de las cepas de *Campylobacter* spp. empleadas en este estudio.

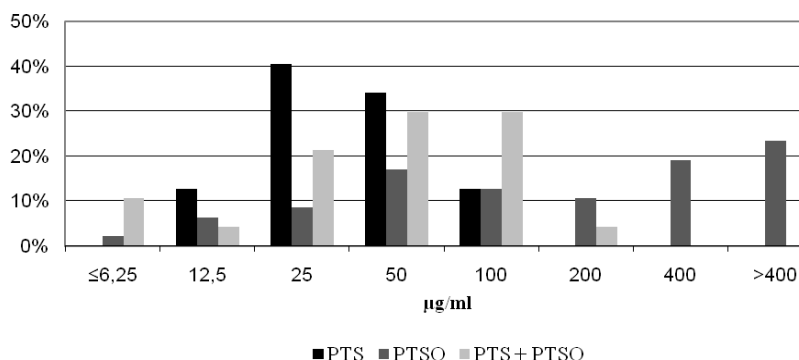


Figura 1 .Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias de PTS, PTSO y PTS+PTSO para 47 aislados españoles de *B. hyodysenteriae*.

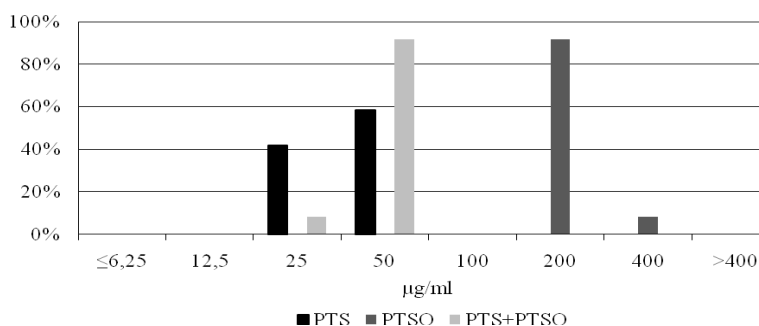


Figura 2 .Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias de PTS, PTSO y PTS+PTSO para 12 aislados de *Campylobacter* spp.

SUSCEPTIBILITY OF *Brachyspira hyodysenteriae* AND *Campylobacter* spp. TO GARLIC DERIVATIVES

ABSTRACT: During the last years, antimicrobial resistance among enteric pathogens has been an increasing finding in developed countries. As a consequence, the number of available antimicrobials to treating and controlling diseases caused by these bacteria has decreased alarmingly. Therefore, new options such as probiotics or plant extracts are highly desirable to assisting in the treatment of enteric diseases with a bacterial etiology. This study aimed to investigate the activity of two garlic derivatives, propyl propyl thiosulfinate (PTS) and propyl propyl thiosulfonate (PTSO), against isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Campylobacter* spp. Susceptibility test were performed following micro broth dilution methods and minimum inhibitory concentrations were calculated for each substance. Our results indicated that both derivatives, PTS and PTSO, have antimicrobial activity against *B. hyodysenteriae* [MIC_{90} (PTS and PTSO)= 100 and >400 µg/ml] and *Campylobacter* spp. [MIC_{90} (PTS and PTSO)= 50 and 200 µg/ml]. The results of the in vitro susceptibility testing suggest that clinical trials should be performed to evaluate the in vivo activity of PTS and PTSO against these enteric pathogens.

Keywords : *Brachyspira hyodysenteriae*, *Campylobacter* spp., MIC, garlic derivatives.