

## Susceptibilidad antibiótica de estafilococos aislados de muestras de leche provenientes de mastitis bovina

Antibiotic susceptibility of staphylococci isolated from bovine mastitis milk samples

SREDNIK, M.E.<sup>1</sup>; ABATE, S.<sup>2</sup> Y GENTILINI, E.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (C1427CWO) Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Actividad privada.

### RESUMEN

La mastitis es una enfermedad que afecta la salud de los bovinos y produce grandes pérdidas económicas. Los microorganismos de mayor prevalencia en la Argentina pertenecen al género *Staphylococcus*, siendo el patógeno principal *S. aureus*, aunque los estafilococos coagulasa negativos (ECN) han adquirido importancia por la capacidad de expresar factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos. El objetivo de este estudio fue determinar *in vitro* la concentración inhibitoria mínima (CIM) de betalactámicos y macrólidos-lincosamidas frente a estafilococos aislados de leche de vacas con mastitis. Se estudiaron (n=162) aislamientos, (n=65) *S. aureus* y (n=97) ECN. El 33,8% (22/65) de *S. aureus* presentó resistencia a penicilina, siendo la CIM<sub>90</sub>: 0,5 µg/ml, el 7,7% (5/65) a eritromicina con una CIM<sub>90</sub>: 1 µg/ml y el 6,1% (4/65) a clindamicina con una CIM<sub>90</sub>: 0,1 µg/ml. El 30,9% (30/97) de los ECN fueron resistentes a penicilina siendo la CIM<sub>90</sub>: 0,25 µg/ml, el 7,2% (7/97) a eritromicina con una CIM<sub>90</sub>: 0,5 µg/ml, el 4,1% (4/97) a clindamicina con una CIM<sub>90</sub>: 0,12 µg/ml y el 3,1% (3/97) a oxacilina siendo la CIM<sub>90</sub>: 0,38 µg/ml. No se observó meticilino resistencia en *S. aureus*. El diagnóstico bacteriológico y la determinación de susceptibilidad junto con el manejo adecuado del rodeo lechero, son fundamentales para el control de la enfermedad.

Palabras clave: (concentración inhibitoria mínima), (mastitis bovina), (resistencia), (*Staphylococcus spp*).

Correspondencia e-mail: Élida Gentilini [egenti@fvvet.uba.ar](mailto:egenti@fvvet.uba.ar)

Recibido: 07/09/2015

Aceptado: 19/05/2016

## SUMMARY

Mastitis is a disease that affects the health of cattle and causes great economic losses. The most prevalent microorganisms in Argentina belong to the genus *Staphylococcus*, being the main pathogen *S. aureus*, though coagulase-negative Staphylococci (CNS) have gained importance for the ability to express virulence factors and antimicrobial resistance. The aim of this study was to determine phenotypically *in vitro* minimum inhibitory concentrations of betalactams and macrolide-lincosamide against staphylococci isolated from mastitic milk. We studied (n=162) isolates, (n=65) *S. aureus* and (n=97) CNS. The 33,8% (22/65) of *S. aureus* presented resistance to penicillin, being the MIC<sub>90</sub>: 0,5 µg/ml, the 7,7% (5/65) to erythromycin with a MIC<sub>90</sub>: 1 µg/ml and 6,1% (4/65) to clindamycin with a MIC<sub>90</sub>: 0,1 µg/ml. The 30,9% (30/97) of CNS were resistant to penicillin being the MIC<sub>90</sub>: 0,25 µg/ml, the 7,2% (7/97) to erythromycin with a MIC<sub>90</sub>: 0,5 µg/ml, the 4,2% (4/97) to clindamycin with a MIC<sub>90</sub>: 0,12 µg/ml and 3,1% (3/97) to oxacillin being the MIC<sub>90</sub>: 0,38 µg/ml. Methicillin-resistance was not observed in *S. aureus*. Bacteriological diagnosis and susceptibility determination with proper management of dairy herd are essential for disease control.

Key words: (bovine mastitis), (minimum inhibitory concentration), (resistance), (*Staphylococcus spp*).

## INTRODUCCION

La mastitis afecta la salud de los animales con disminución de la producción, calidad de leche y de los subproductos, con consecuencias económicas negativas.

Entre las bacterias que aparecen como potenciales patógenos, los estafilococos, estreptococos y bacilos gram negativos son los microorganismos más frecuentemente involucrados como agentes etiológicos de esta enfermedad. Dentro del Género *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* es considerado el patógeno mayor de la glándula mamaria. Los ECN constituyen un grupo bacteriano con alta frecuencia de aislamientos y tradicionalmente fueron considerados patógenos menores comparándolos con *S. aureus*. Su participación en las mastitis era debatida, actualmente se sabe que son capaces de persistir en la glándula mamaria y causar un moderado incremento en el recuento de células somáticas en leche. Responden mejor al tratamiento antibiótico que *S. aureus*, aunque la resistencia (R) en los ECN es más común que en *S. aureus*<sup>17,13</sup>.

La identificación bacteriana y la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos (ATB), nos permite inferir sobre la virulencia del aislamiento y la elección de la antibióticoterapia adecuada.

Es sabido que los ECN son reservorios de genes de resistencia a antimicrobianos (ATM)<sup>2,7,16</sup>, por lo que el monitoreo continuo de la resistencia de estos microorganismos frente a los antibióticos permitirán el manejo más racional de los mismos con el consiguiente beneficio para el animal, el productor y la salud pública. Recientes estudios han demostrado que humanos y ganado bovino comparten *S. epidermidis*, aunque es difícil demostrar la dirección de la transmisión interespecie, pero se sugiere que sería desde el humano al ganado<sup>16</sup>.

El objetivo de este estudio fue determinar *in vitro*, la susceptibilidad de estafilococos aislados de leche de bovinos con mastitis, frente a penicilina, oxacilina/cefotaxima, macrolidos-lincosamida, ATB de uso convencional en la práctica clínica para el control de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Aislamientos:* (n=162) obtenidos a partir de muestras de leche de vacas y vaquillonas con mastitis provenientes de diferentes establecimientos de la Provincia de Bs. As., Córdoba, Entre Ríos y Santa Fe. Todos los estafilococos fueron aislados en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UBA, entre los años 2007 y 2010. El aislamiento e identificación bacteriana se realizaron según los procedimientos estándares descriptos en el National Mastitis Council<sup>10</sup> y fueron mantenidos a -20°C en caldo tripteína soja (Britania S.A.) con glicerol al 10%. Se estudiaron (n=97) ECN y (n=65) *Staphylococcus aureus*.

*Metodología:* Las soluciones madres de cada ATB: penicilina (PEN), eritromicina (ERI), clindamicina (CLI) y oxacilina (OXA), de droga pura y potencia conocida donados por el ANMAT, se prepararon según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>3</sup> y se conservaron a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas. Cada ATB se incorporó en agar Mueller Hinton, realizando diluciones seriadas en base 2 (1, 2, 4, 8, 16 µg/ml, etc.). La densidad del inóculo correspondió a una turbidez equivalente al patrón 0,5 del nefelómetro de Mc Farland. Los ensayos se realizaron utilizando el multi-inoculador de Steers. La suspensión bacteriana para la siembra se diluyó 1/10 en caldo estéril o solución fisiológica para lograr una concentración de 10<sup>7</sup> UFC/ml en cada pocillo de la placa de teflón. El inóculo final sobre el agar fue de 10<sup>4</sup> UFC (2µl). Se inoculó una placa control de agar sin ATB (control de viabilidad) y luego se inocularon las que contienen las distintas concentraciones del ATB comenzando por la de menor concentración. Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 29213. Las lecturas se realizaron después de incubar toda una noche a 35 +/- 2 °C. Los puntos de corte para determinar la resistencia fueron: para PEN (≥0,25 µg/ml), OXA (≥4 µg/ml, en *S. aureus* y ≥0,5 µg/ml en ECN), para ERI (≥8 µg/ml), según las recomendaciones del CLSI<sup>3</sup>. El punto

de corte de CLI (≥4 µg/ml), se utilizó para detectar R a lincomicina. La CIM se registró como el valor de la menor dilución que inhibió completamente el desarrollo bacteriano. No se consideró el desarrollo de una simple colonia o la presencia de una tenue película causada por el depósito del inóculo. En los ECN que resultaron con CIMs de OXA ≥0,5 µg/ml, se evaluó la resistencia a la meticilina, con antibiograma por difusión con discos (BBL®) de cefoxitina de 30 µg (FOX). Los aislamientos resistentes a FOX (24 mm, CIM no definida) indica la presencia del gen *mecA* y en consecuencia la resistencia a todos los betalactámicos (CLSI)<sup>3</sup>.

## RESULTADOS

Del total de los estafilococos estudiados, el 35,2 % (n=57) mostró R a los ATB probados, correspondiendo a *S. aureus* el 15,43% (n=25) y a los ECN el 19,75% (n=32).

De los 65 *S. aureus*, 25 (38,5%) fueron R, 20 de estos aislamientos (30,77%) presentaron R a un ATB y 5 aislamientos (7,69%) a 2 o más ATB.

La actividad *in vitro* de cada uno de los agentes antimicrobianos ensayados para *S. aureus* están presentados en la **Tabla 1**.

De los 97 ECN, 32 (31,04 %) fueron R a uno o más ATB. La resistencia a un ATB se halló en 26 estafilococos (26,80%). La resistencia a 2 o más ATB se halló en 6 estafilococos (6,32%).

La actividad *in vitro* de cada uno de los agentes antimicrobianos ensayados para ECN están presentados en la **Tabla 2**.

## DISCUSION

Los valores de R de ECN frente a PEN, en nuestro país, son similares a los obtenidos en Netherlands<sup>16</sup>, quienes informaron un 25,88%, pero un valor de R a OXA más elevado (21,76%), la R a un ATB fue de 30% coincidiendo con nuestros resultados, y la R a uno o más ATB fue de 21%, un poco más elevado que nuestros resultados. Los valores de R de ECN frente a PEN son menores que los informados en Finlandia (32%)<sup>11</sup>, en Dinamarca (36,1%)<sup>1</sup>, y en Estados Unidos (42,7%)<sup>12</sup>. Los

resultados obtenidos para los ECN frente a ERI y CLI coinciden con lo informado por Lüthje y Schwartz<sup>9</sup>. La R frente a ERI es un poco mayor que la informada por Sampimon (1,76%)<sup>16</sup>.

Los valores de R de *S. aureus* frente a PEN son menores que los obtenidos en Finlandia (52%)<sup>11</sup>, y mucho más bajos en comparación a los reportados en Brasil (75%)<sup>4</sup>.

Antibióticos	*CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	Rango (µg/ml)	Punto de corte <sup>3</sup> (µg/ml)	**R (%)
Penicilina	0,06	0,5	(0,03-1)	0,25	22/65 (33,85)
Eritromicina	0,25	1	(0,12-128)	8	5/65 (7,69)
Clindamicina	0,12	0,1	(0,03-8)	4	4/65 (6,15)
Oxacilina	0,25	0,50	(0,06-1)	4	0/65

\*CIM: Concentración inhibitoria mínima

\*\* R: resistencia

**Tabla 1.** Susceptibilidad *in vitro* de (n= 65) *S. aureus* frente a 4 antimicrobianos.

Antibiótico	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)	CIM <sub>90</sub> (µg/ml)	Rango (µg/ml)	Punto de corte <sup>3</sup> (µg/ml)	**R (%)
Penicilina	0,06	0,25	(0,03-64)	0,25	30/97 (30,92)
Eritromicina	0,25	0,5	(0,12-128)	8	7/97 (7,22)
Clindamicina	0,06	0,12	(0,03-8)	4	4/97 (4,12)
Oxacilina	0,25	0,38	(0,06-64)	0,5	3/97 (3,09)

\*CIM: Concentración inhibitoria mínima

\*\* R: resistencia

**Tabla 2.** Susceptibilidad *in vitro* de (n=97) ECN frente a 4 antimicrobianos.

Ningún aislamiento de *S. aureus* presentó resistencia frente a OXA, esto coincide con estudios realizados en nuestro país<sup>7,15</sup>.

Todos los estafilococos resistentes a ERI fueron resistentes a clindamicina. Los macrólidos-lincosamidas (ML) inhiben la síntesis proteica al unirse al sitio ribosómico 50S. En general existe resistencia cruzada completa entre lincomicina y clindamicina y también con los macrólidos y grupo B de las estreptograminas (fenotipo de resistencia MLS). Clindamicina es más activa que lincomicina frente a *S. aureus* y ECN<sup>6,7</sup>.

Los valores de R de *S. aureus* frente a ERI y CLI son mucho menores que las obtenidas en China (93, 1% y 36,1% respectivamente)<sup>18</sup>. Muchas veces la R a ML no puede detectarse en

los test iniciales de susceptibilidad y por lo tanto debe ser inducida. En Reino Unido, Rich y col.<sup>14</sup> informaron un fenotipo de resistencia inducible (iML) del 71, 8% en cepas de *S. aureus* aisladas de animales, mientras que en China, Wang y col. informaron un 52,8% de *S. aureus* iML aislados de mastitis bovina<sup>18</sup>. Esto demuestra un riesgo potencial de falla en la terapéutica para el tratamiento de mastitis clínicas en bovinos infectados con estas cepas con R inducible. Por ello es necesario un monitoreo de rutina de R inducible para *S. aureus* aislados de leches de vacas con mastitis.

El tipo de resistencia MLS en ECN aislados de bovinos no es un problema terapéutico<sup>9</sup>. Sin embargo, debido al potencial de diseminación de resistencia a través de patógenos y diferentes

especies hospedadoras, el monitoreo de resistencia ML entre ECN aislados de bovinos es importante<sup>16</sup>. Nuestro grupo de trabajo<sup>5</sup> viene realizando un monitoreo constante de la R en cocos gran positivos, y ha observado variaciones dependientes de múltiples factores de acuerdo a distintas situaciones (económico-social del país, climáticas, entre otras). Con respecto a informes previos durante la última década<sup>5</sup>, nuestros resultados muestran un incremento de R para PEN, pero la R para ERI y CLI se mantiene en valores bajos.

Del estudio de susceptibilidad de los estafilococos frente a los ATM, resulta que el porcentaje de resistencia es bajo y coincide con lo informado por otros autores<sup>7,15,16</sup>.

El conocimiento del perfil de susceptibilidad de los estafilococos permitiría un manejo efectivo de los ATM para controlar las infecciones de la glándula mamaria.

Con el uso racional y selectivo de los ATM, el control de las mastitis producidas por los estafilococos responderá a las mejores prácticas de manejo en la rutina de ordeño.

La mastitis es la enfermedad más costosa de la producción lechera, debido al refugio de animales de buena genética y en edad de alta producción, y el dinero gastado en medicamento y servicio veterinario, además de sus implicancias en la salud pública por el riesgo de la presencia en leche y subproductos lácteos de residuos de antimicrobianos así como bacterias que podrían poseer genes de virulencia y resistencia a ATM.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por UBACyT W766. Mastitis Bovina: Atributos de Patogenicidad.

## REFERENCIAS

1. Aarestrup, F.M.; Wegener, H.C.; Rosdahl, V.T.; Jensen, N.E. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. *Acta. Vet. Scand.* 1995; 36(4): 475–87.
2. Brakstad, O.G.; Maeland, J.A. Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococci. *APMIS.* 1997; 105(4):264-76.
3. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Vol. 28. N. 8. 3rd. Ed. Approved standard, M31-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2008.
4. Costa, E.O.; Benites, N.R.; Guerra, J.L.; Melville, P.A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* isolated from mammary parenchyma of slaughtered dairy cows. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2000; 47(2):99- 103.
5. Denamiel, G.; Carloni, G.; Llorente, P.; Gentilini, E. Mastitis Bovina: Prevalencia microbiana y el perfil de resistencia en los cocos gran positivos. *Rev. Med. Vet.* 2006; 87(6):223-6.
6. Gentilini, E.; Denamiel, G.; Llorente, P.; Godaly, S.; Rebuelto, M.; De Gregorio, O. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 2000; 83(6):1224-27.
7. Gentilini, E.; Denamiel, G.; Bentancor, A.; Rebuelto, M.; Rodríguez Fermepin, M.; A. de Torres, R. Coagulase-Negative Staphylococci and Mastitis. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 2002; 85(8):1913-17.
8. Kloos, W.E.; Bannerman, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol Rev.* 1994; 7(1):117-40.
9. Luthje, P.; Schwarz, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57(5):966–9.
10. National Mastitis Council. Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. Natl. Mastitis Council, Inc., Arlington, VA, 1987.

11. Myllys, V.; Asplund, K.; Brofeldt, E. *et al.* Bovine Mastitis in Finland in 1988 and 1995 - Changes in Prevalence and Antimicrobial Resistance. *Acta Vet. Scand.* 1998; 39(1):119-26.
12. Owens, W.E.; Ray, C.H.; Watts, J.L.; Yancey, R.J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility test for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 1997. 80(2):313-7.
13. Pyörälä, S.; Taponen, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009; 134(1-2):3–8.
14. Rich, M.; Deighton, L.; Roberts, L. Clindamicin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet. Microbiol.* 2005; 111:237-40.
15. Russi, N.B.; Bantar, C.; Calvino, L.F. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Rev Argent Microbiol.* 2008; 40(2):116-9.
16. Sampimom, O.C.; Lam, T.J.G.M.; Mevius, D.J.; Schukken, Y.H.; Zadoks, R.N. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol.* 2011; 150(1-2):173-9.
17. Taponen, S.; Simojoki, H.; Haveri, M.; Larsen, H.D.; Pyörälä, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 2006; 115(1-3):199–207.
18. Wang, Y.; Wu, C. M., Lu, L. M.; Ren, G. W.; Cao, X. Y. ; Shen, J. Z. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 2007; 130:118-25.