

## Resistencia de *Streptococcus bovis* aislados de mastitis bovina frente a penicilina y macrólidos-lincosamidas

Resistance of *Streptococcus bovis* isolated from bovine mastitis to penicillin and macrolides-lincosamides

DENAMIEL, G.<sup>1</sup>; PUIGDEVALL, T.<sup>1</sup>; TESTORELLI, F.<sup>1</sup>; ALBARELLOS, G.<sup>2</sup>; GENTILINI, E.<sup>1</sup>

Cátedras de <sup>1</sup>Microbiología y <sup>2</sup>Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1426). CABA.

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar los perfiles de resistencia en *Streptococcus bovis* aislados de mastitis bovina frente a penicilina y macrólidos-lincosamidas, antibióticos de relevancia en la práctica clínica diaria. Se determinó el porcentaje de resistencia y las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub>), en 39 aislamientos identificados por métodos fenotípicos. La resistencia para penicilina fue del 67,6%, la CIM<sub>50</sub> 0,5 µg/ml, CIM<sub>90</sub> 16 µg/ml y el rango 0,007 y 32 µg/ml. Para eritromicina, fue 41,2%, CIM<sub>50</sub> 0,125 µg/ml, CIM<sub>90</sub> 8 µg/ml y el rango 0,015 y 256 µg/ml. Para lincomicina, 64,8% y ambas CIMs 4 µg/ml, con un rango entre 0,062 – 32 µg/ml. La identificación de cada especie y el estudio de su susceptibilidad son necesarios para decidir las prácticas de manejo apropiadas para controlar la enfermedad. Hasta el momento es escasa la información sobre resistencia a antibióticos de *Streptococcus bovis* aislados de mastitis bovina.

Palabras clave: (*Streptococcus bovis*), (mastitis bovina), (resistencia), (antibióticos).

## SUMMARY

The aim of this study was to determine the resistance profile of relevant therapeutic antibiotics penicillin, erythromycin and lincosamides of bovine mastitis isolated *Streptococcus bovis*. The resistance percentage and minimum inhibitory concentrations (MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>) of 39 phenotypically identified strains were determined. For penicillin, the resistance percentage was 67.6%, the CIM<sub>50</sub> 0.5 µg/mL, CIM<sub>90</sub> 16 µg/mL and the range 0.007 to 32 µg/mL. In the case of erythromycin resistance obtained was 41.2% MIC<sub>50</sub> 0.125 µg/mL and MIC<sub>90</sub> 8 µg/mL and a range of 0.015-256 µg/mL. For lincomycin, resistance obtained was 64.8%, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> 4 µg/mL and a range of 0.0625- 32 µg/mL. The identification and antibiotic susceptibility profile of streptococci species provide relevant data for the correct management and control of this mammary disease. Up to now there is few information regarding antibiotic resistance of *Streptococcus bovis* isolated to bovine mastitis.

Key words: (*Streptococcus bovis*), (bovine mastitis), (resistance), (antibiotics).

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias relacionadas con las infecciones intramamarias (IIM) de bovinos lecheros varían en su prevalencia de acuerdo a las prácticas de manejo utilizadas en el establecimiento productivo. Es por ello que desde hace unos años los patógenos ambientales, microorganismos que cohabitan con el animal en el tambo, cobraron protagonismo como agentes productores de mastitis<sup>6, 7, 14</sup>. Entre ellos, encontramos a varios integrantes del género *Streptococcus* que tiene más de 65 especies validadas y que taxonómicamente están distribuidas dentro del Grupo piogénico y el Grupo *viridans*. A su vez, dentro de este último se encuentra el Grupo *S. bovis* / *S. equinus*, cuyas especies antiguamente se conocían como *Streptococcus bovis*<sup>2, 18, 19</sup>. Estos cocos no hemolíticos pertenecen a la microbiota intestinal de los animales y el hombre y su taxonomía se encuentra sujeta a permanentes modificaciones<sup>8, 11, 18</sup>. Entre sus características se encuentra la habilidad para actuar como parásitos intracelulares facultativos y multiplicarse en el interior de los macrófagos. Es conocido que los estreptococos no hemolíticos pueden ser reservorios de genes de resistencia (R) a antimicrobianos (ATM) y tener la capacidad de transferirlos a través de algún mecanismo de intercambio genético, a

otras especies bacterianas<sup>1, 10</sup>. Esta habilidad, en parte podría explicar su potencial patogenicidad en la mastitis y también la posible dificultad para elegir el ATM apropiado para el tratamiento. En veterinaria hasta el presente estos aislamientos no se consideran relevantes como patógenos de los animales y es por ello que la información es escasa<sup>2</sup>. Sin embargo, en el hombre es reconocida su importancia médica porque tiene una estrecha relación con la endocarditis infecciosa y el carcinoma de colon<sup>17, 19</sup>.

El objetivo de este trabajo fue determinar la resistencia de *Streptococcus bovis* frente a penicilina y macrólidos-lincosamidas (ML), antibióticos de uso convencional en el tratamiento de las mastitis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Bacterias:** se utilizaron 39 aislamientos de *Streptococcus bovis* pertenecientes al cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, obtenidos entre los años 2009 y 2012 de muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis clínica y/o subclínica de establecimientos de la provincia de Buenos Aires. La identificación como especie se realizó mediante las pruebas de: catalasa, bilis-esculina, Vogues Proskauer, pirrolidoniil arilamidasa y/o desarrollo en caldo cerebro corazón con el

agregado de 6,5% de cloruro de sodio (Britania S.A. Argentina) y con API® 20 Strep (bio Mérieux. Marcy-l'Étoile. Francia).

**Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM):** se ensayaron drogas de patrones de potencia conocida: penicilina (PEN-1582 UI/mg, Richet), eritromicina (ERI-898 µg/mg, ANMAT). De las lincosamidas se ensayó lincomicina (LIN 898 µg/mg, Frademicina. Janssen Cilag), determinando CIM por el método de macrodilución en tubo. El punto de corte de resistencia (R) para PEN fue  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  y para ERI  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ , según Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) documento M31-A3 (2008)<sup>3</sup>. El punto de corte para clindamicina (CLI) fue  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$  y se utilizó para testear la R de lincomicina, según CLSI, documento M100-S22. (2010)<sup>4</sup>.

**Cepa control:** *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619.

## RESULTADOS

Los valores de CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub>, rango y porcentaje de R para cada antibiótico se observan en la Tabla 1.

## DISCUSIÓN

En este estudio *Streptococcus bovis* mostró altos niveles de R para los tres ATM ensayados. Las concentraciones incluidas en el rango indican la presencia de aislamientos sensibles, aunque el dato poblacional CIM<sub>90</sub> fue superior al punto de corte de R para las tres drogas. Además, todos los aislamientos resistentes, fueron a su vez, multirresistentes. Esta información, no se pudo comparar con otros estudios similares, por la escasa información en veterinaria. Sin embargo, un trabajo realizado en Corea donde determinan la susceptibilidad antibiótica con el método de difusión en agar, se incluyen datos sobre *Streptococcus bovis* que arrojaron los siguientes porcentajes de R: 4,2% para PEN, 12,5% ERI, 33,3% LIN y observando que el 16,6% del total de aislamientos de *S. bovis* eran multirresistentes<sup>14</sup>. Si bien este estudio describe R en *S. bovis*, los porcentajes resultaron inferiores a los hallados en nuestro trabajo. Esta diferencia podría explicarse en parte a que, la metodología utilizada fue diferente y si bien el método de antibiograma por difusión es la técnica más difundida en el mundo, no siempre guarda

**Tabla 1.** Concentración Inhibitoria Mínima y porcentaje de resistencia a penicilina, eritromicina y lincomicina de *Streptococcus bovis*.

Antimicrobianos	Concentración Inhibitoria Mínima			% de Resistencia
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Rango	
Penicilina	0,5 µg/ml	16 µg/ml	0,007-32 µg/ml	67,6
Eritromicina	0,125 µg/ml	8 µg/ml	0,015-256 µg/ml	41,2
Lincomicina	4 µg/ml	4 µg/ml	0,062-32 µg/ml	64,8

CIM<sub>50</sub>: concentración inhibitoria mínima del 50% de la población

CIM<sub>90</sub>: concentración inhibitoria mínima del 90% de la población

buena correlación con el valor de CIM, método que se considera como la prueba de oro para testear a los ATM en el laboratorio<sup>3,4,12</sup>.

La bibliografía sobre R a ATM de estreptococos productores de IIM brinda datos de las especies más estudiadas en la mastitis, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* y sus porcentajes de R varían según las regiones del mundo que hasta hace unos años, ninguna de ellas era resistente. Retrospectivamente, Giannonechini *et al.*<sup>9</sup> informó el 100% de sensibilidad a PEN y ERI en estas tres especies. Denamiel *et al.*<sup>5</sup> coincidió con que no había R a PEN aunque en *S. agalactiae* encuentra 27,6% de R a ERI, presentando una CIM<sub>90</sub> de 8 µg/ml. A su vez, Pitkälä *et al.*<sup>16</sup> describe en *S. uberis* el mismo comportamiento para PEN y observa un 15,6% de R a ERI registrando una CIM<sub>90</sub> de 2 µg/ml. Recientemente, Kalmus *et al.*<sup>12</sup> detecta cambios respecto a la R a PEN, observando un 0,4 % de R en *S. uberis*, aunque *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae* seguían siendo sensibles y respecto a ERI los porcentajes de R fueron 1,3% en *S. agalactiae*, 6,7% en *S. dysgalactiae* y 8,2% en *S. uberis*. En este mismo estudio para valorar las lincosamidas ensayaron CLI y encontraron 6,2% de R en *S. agalactiae*, 7,8% en *S. dysgalactiae* y 6,6% en *S. uberis*. Petrovski *et al.*<sup>15</sup> afirmó que *S. uberis* presenta una R <10 % para la mayoría de los ATM, salvo para LIN cuya R era del 18,3%. Minst *et al.*<sup>13</sup> no encontró R antibiótica en *S. agalactiae* pero del total de las otras especies el 13% fueron multirresistentes, siendo *S. uberis* la que expresó mayor multirresistencia seguido por *S. dysgalactiae*. Del análisis de estos trabajos, se puede observar cierta variabilidad en los datos, tomados como porcentajes de R o valor de CIM y se puede apreciar un incremento progresivo de la R en los estreptococos ambientales además de la aparición de cepas resistentes a ERI para *S. agalactiae*, información que permite inferir R cruzada para las otras drogas incluidas entre los ML<sup>3</sup>. Es importante considerar frente a la información sobre R antibiótica si los datos se expresan como género microbiano o como especie de estreptococo y además, si las técnicas utilizadas para la determinación de susceptibilidad son

las mismas, pues de lo contrario los resultados obtenidos pueden no ser comparables<sup>16</sup>.

## CONCLUSIÓN

Ante el progresivo aumento de la R antibiótica de los estreptococos ambientales, es necesario profundizar la identificación de los mismos para estudiar su comportamiento y evolución de la R ya que tienen la posibilidad de transmitir a otras especies e incluso a algunas con mayor patogenicidad esos genes de R a los ATM.

## AGRADECIMIENTO

Trabajo realizado con subcidio UBACyT 20020100100766 Mastitis bovina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bryskier, A. Viridians group streptococci: a reservoir of resistant bacteria in oral cavities. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8: 65-69.
2. Chadfield, M.S.; Christensen, J.P.; Decostere, A.; Christensen, H.; Bisgaard, M. Geno-and Phenotypic Diversity Avian Isolates of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis*) and Associated Diagnostic problems. *J Clin Microb.* 2007; 45:822-27.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 2008. Document M31-A3.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement. 2010. Document M100-S22
5. Denamiel, G.; Llorente, P.; Carabella, M.; Rebuelto, M.; Gentilini, E. Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus* spp. Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J Vet Med* 2005; B.52: 125-28.
6. Denamiel, G.; Carloni, C.; Llorente, P.; Gentilini, E. Mastitis Bovina: prevalencia microbiana y el perfil de resistencia en los cocos Gram positivos. *Rev Med Vet* 2006; 87:233-35.

7. Ebrahimi, A.; Nikookhad, F.; Nikpour, S.; Majidian, F.; Gholami, M. Isolation of Streptococci from milk samples of normal, acute and subclinical mastitis cows and determination of their antibiotic susceptibility patterns. *Pak J Biol Sci.* 2008; 11:148-50.
8. Euzeby 2013. <http://www.bacterio.cict.fr/>
9. Giannechini, R., E.; Concha, C.; and Franklin, A. Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens Isolated from Dairy Herds in the West Littoral Region of Uruguay *Acta Vet Scand.* 2002; 43(1): 31-41.
10. Håvarstein, L.; Hakenbeck, R.; Gaustad, P. Natural Competence in the Genus *Streptococcus*: Evidence that Streptococci Can Change Phenotype by Interspecies Recombinational Exchanges. *J Bacteriol* 1997; 179:6589-94.
11. Herrera, P.; Kwon, Y.M.; Ricke, S.C. Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*. *Anaerobe* 2009; 15: 44-54.
12. Kalmus, P.; Aasmäe, B.; Kärssin, A.; Orro, T.; Kask, K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand.* 2011; 53:4.
13. Minst, K.; Märtlbauer, E.; Miller, T.; Meyer, C. Short communication: Streptococcus species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *J Dairy Sci.* 2012; pii: S0022-0302(12)00702-3.
14. Nam, H.M.; Lim, S.K.; Kang, H.M.; Kim, J.M.; Moon, J.S. *et al.* Antimicrobial resistance of streptococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. *J Vet Diag Invest.* 2009; 21:698-701.
15. Petrovski, K.R.; Laven, R.A.; Lopez-Villalobos, N. A descriptive analysis of the antimicrobial susceptibility of mastitis-causing bacteria isolated from samples submitted to commercial diagnostic laboratories in New Zealand (2003-2006). *N Z Vet J.* 2011. 59(2):59-66.
16. Pitkälä, A.; Koort, J.; Björkroth, J. Identification and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* Isolated from Bovine Milk Samples *J Dairy Sci.* 2008; 91: 4075-81.
17. Rusniok, C.; Couve, E.; Da Cunha, V.; El Gana, R.; Zidane, N. *et al.* Genome Sequence of *Streptococcus galloyticus*: Insights into Its Adaptation to the Bovine Rumen and Its Ability To Cause Endocarditis. *J Bacteriol.* 2010; 192: 2266-76.
18. Schlegel, L.; Grimont, F.; Ageron, E.; Grimont, P.A.D; Bouvet, A. Reappraisal of the taxonomy of the "*Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*" complex and related species: description of *Streptococcus galloyticus* subsp. *galloyticus* subsp. nov., *S. galloyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. galloyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 631- 45.
19. Simmon, K.E.; Hall, L.; Woods, C.W.; Marco, F.; Miro, J.M. *et al.* Phylogenetic analysis of *viridans* Group streptococci causing endocarditis. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:3087-90.

