

ARTICULO ORIGINAL

Perfil de resistencia *in vitro* a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción***In vitro* antimicrobial resistance profile of mastitis-causing strains isolated from raw bovine milk in dairy farms of small and medium production**

Florentín Aponte CC

SENACSA (Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal), Asunción-Paraguay

RESUMEN

La resistencia y multiresistencia a antibióticos constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes considerando su transmisión genética entre microorganismos y también a las personas a través de alimentos de origen animal. El objetivo de este trabajo es determinar la frecuencia de patógenos aislados, el perfil de resistencia y multiresistencia a los antimicrobianos utilizados contra los principales agentes etiológicos aislados en muestras de leche bovina con sospecha de mastitis. Se procesaron 371 muestras de leche bovina cruda en los laboratorios del SENACSA entre enero del 2000 y marzo del 2006. Fueron analizados los microorganismos aislados, resistencia y multiresistencia a antimicrobianos. En la determinación de sensibilidad a través de prueba de difusión por discos se ensayaron como: ampicilina, penicilina, gentamicina, neomicina, kanamicina, estreptomycin, tetraciclina, sulfatrimetoprim y nitrofurantoina. Estos datos fueron analizados por estadística descriptiva en el programa Epiinfo 6,0. Se encontró *Staphylococcus* sp (46,4%, 172/371); *Corynebacterium* sp (18,3%, 68/371); *Streptococcus* sp (18,5%, 69/371); *Klebsiella* sp (12,93%, 48/371); *Escherichia coli* (3,77%, 14/371). *Staphylococcus* coagulasa negativos resistente entre 70%(120/172) y 80%(137/172) a neomicina y penicilina; mientras que los coagulasa positivos lo fueron a la penicilina y estreptomycin. *Corynebacterium* sp 90%(61/68) resistente a neomicina, *Streptococcus agalactiae* (48%, 33/69) con 73% (24/33) de resistencia a penicilina y *Klebsiella* sp con 100% a penicilinas y *Escherichia coli* con 100% a la estreptomycin. Sólo *Staphylococcus* coagulasa negativo no mostro multiresistencia. La resistencia y la multiresistencia observadas son elevadas, estos resultados permiten disponer de información actualizada para orientar el uso racional de los antimicrobianos.

Palabras claves: Resistencia, multiresistencia, antimicrobianos, leche cruda bovina.

ABSTRACT

The antibiotic resistance and multiresistance constitute one of the most important problems of public health considering their genetic transmission among microorganisms and also to people through food of animal-origin. The objective of this work is to determine the frequency of isolated pathogens, the resistance and multiresistance profile to antimicrobials used against the main etiological agents isolated from samples of bovine milk with mastitis suspicion. Three hundred seventy one samples of raw bovine milk were processed in the laboratories of SENACSA between January 2000 and March 2006. The isolated microorganisms as well as the antimicrobial resistance and multiresistance were analyzed. In the sensitivity determination by disk diffusion test, ampicillin, penicillin, gentamicin, neomycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, sulfatrimethoprim and nitrofurantoin were assayed. These data were analyzed by descriptive statistics using Epiinfo 6,0. *Staphylococcus* sp. (46,4%, 172/371), *Corynebacterium* sp. (18,3%, 68/371), *Streptococcus* sp. (18,5%, 69/371), *Klebsiella* sp. (12,93%, 48/371) and *Escherichia coli* (3,77%, 14/371) were identified. Neomycin and penicillin-resistant coagulase-negative staphylococci were between 70% (120/172) and 80% (137/172) respectively while coagulase-positive ones were penicillin and streptomycin-resistant. *Corynebacterium* sp. was neomycin-resistant (90 %, 61/68). *Streptococcus agalactiae* (48%, 33/69) was penicillin-resistant (73%, 24/33); *Klebsiella* sp. was 100% penicillin-resistant and *Escherichia coli* was 100% streptomycin-resistant. Only coagulase-negative staphylococci did not show multiresistance. These resistance and multiresistance rates are high and allow the availability of updated information to guide a rational use of antimicrobials.

Keywords: Resistance, multiresistance, antimicrobials, bovine raw milk.

*Autor Correspondiente: **Dra. Celeste Carolina Florentin**
SENACSA (Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal), Asunción-Paraguay
Email: cecaflora@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino de leche es la mastitis, cuya importancia se debe no sólo a las pérdidas económicas que produce, sino también, a la transmisión de la resistencia a antimicrobianos debida al consumo de leche como alimento^{1,3-7}

Según diversos estudios realizados en países del centro y sur de nuestro continente, la prevalencia de esta patología se encuentra entre 20% y 23%, siendo en algunas regiones de Venezuela incluso del 52%⁷. Existe predominancia de *Staphylococcus* sp en la flora bacteriana de la leche cruda, siendo *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) prevalentes del 17 al 38%⁴ e incluso 64% en un estudio realizado en Brasil⁵; *Staphylococcus* coagulasa positivo (SCP) de 8,5% al 17%^{4,6-7}; *Streptococcus* sp con 7,9 al 19%^{4-5,7}. Otros gérmenes aislados como *Escherichia coli* se reportan con una prevalencia muy variable entre el 2,84% y 41%⁷; *Corynebacterium* sp del 2 al 4%^{4,7} y *Klebsiella pneumoniae* 1,56%⁷

En relación al comportamiento frente a los antimicrobianos de las cepas bacterianas aisladas de leche cruda, estudios realizados en la región norte de Paraná, Brasil muestra 100% de susceptibilidad a cefalotina, eritromicina, gentamicina, norfloxacin y oxacilina; alrededor del 91% a tetraciclina y tilosina; 65% a ampicilina y penicilina; y cerca de 99% a neomicina^{5,6}. Otros estudios realizados en Argentina y Venezuela revelan respecto a *Staphylococcus* coagulasa negativo una resistencia de entre 27 y 30% a ampicilina y penicilina, respectivamente; alrededor del 15% para estreptomomicina y gentamicina., siendo los resultados para los coagulasa positivos entre el 23 al 52% a la ampicilina; del 26 al 50% a penicilina y cercano al 45% a estreptomomicina⁷

Existen también publicaciones en el ámbito de la producción que señalan la existencia de multiresistencia bacteriana, donde se indica que no sólo se adquiere resistencia a antimicrobianos de la misma familia, sino también a drogas con diferentes mecanismos de acción y estructuras químicas; lo cual se agrava al considerar un menor número de barreras para la transferencia de genes de resistencia entre microorganismos así como también horizontalmente entre los animales y el hombre, dejando claro que el uso inapropiado de antimicrobianos constituye un riesgo emergente en la salud pública¹⁻⁴

En el Paraguay, no existen estudios recientes de prevalencia de mastitis y los únicos datos actualizados sobre la producción lechera hablan de la cantidad de ganado lechero en las pequeñas y medianas fincas, el cual es en promedio 18,8 y 36,6 cabezas por establecimiento, respectivamente. El Departamento Central se destaca en cuanto a la cantidad de ganado en ordeño con el 36,2%^{8,9} y oficialmente se encuentran registradas en la Sub-secretaría de Estado de Ganadería, dependiente del Ministerio de Agricultura y Ganadería, 61 plantas lácteas. No se dispone de reglamentaciones específicas para los niveles permisibles de antimicrobianos en leche, tampoco se aplican programas de control y en muchos casos, no se realiza en la práctica común el retiro de la leche proveniente de animales que se encuentran bajo tratamiento, siendo por tanto probable que una parte importante de la leche cruda producida en el país se encuentre contaminada con residuos de antimicrobianos, los cuales podrían estar ejerciendo una presión selectiva hacia la presencia de bacterias patógenas antibiótico-resistentes⁹

Considerando los antecedentes planteados, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil de resistencia y multiresistencia a los antimicrobianos utilizados frente a los principales agentes etiológicos aislados en muestras de leche bovina cruda provenientes de animales con sospecha de mastitis. Los resultados obtenidos aportará información actualizada sobre resistencia bacteriana para orientar el uso racional de los antimicrobianos en la terapia de mastitis bovina.

MATERIALES Y METODOS

Al Laboratorio de Bacteriología y Micología dependiente de la Dirección General de Laboratorios del Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal SENACSA (Servicio Veterinario Oficial en Paraguay) fueron remitidas muestras de leche cruda con sospecha clínica de mastitis proveniente de establecimientos privados de pequeños y grandes productores ubicados en diferentes departamentos de la Región Oriental del Paraguay. Llegan anualmente un promedio de 83 muestras de leche bovina por año, y en base a los datos disponibles en el servicio se realizó un estudio descriptivo transversal retrospectivo.

Las muestras de leche cruda fueron extraídas por el veterinario responsable del estado sanitario del establecimiento, el propietario o el personal de campo y enviadas con fines de diagnóstico; así como también para verificar la eficacia del tratamiento y en la menor parte de los casos antes de instaurarlo. Para la extracción se realizaron los procedimientos de limpieza, secado, desinfección de la ubre, eliminación de los primeros chorros; recolección en frascos estériles con tapa a rosca, remitiéndose en su estado crudo y refrigeradas al laboratorio.

Las variables analizadas fueron: tipo de microorganismos aislados, resistencia a antimicrobianos, y presencia de multirresistencia.

Estudios microbiológicos: las muestras de leche fueron sembradas en placas de agar sangre, MacConkey, Edward's y Manitol (OXOID- UK); los cuales fueron incubados a 37°C por espacio de 24 a 48 horas en condiciones aeróbicas. En caso de crecimiento de múltiples tipos de colonias fueron aisladas en nuevos cultivos en agar sangre o nutriente (OXOID-UK) de manera a obtener colonias puras. La identificación de los microorganismos fue realizada según las características culturales, morfológicas, tintoriales y bioquímicas en todos los casos a más de la prueba de coagulasa para los *Staphylococcus* sp y la prueba de Camp para los *Streptococcus* sp²

Evaluación de la sensibilidad bacteriana: Para la determinación de la sensibilidad se utilizó la prueba de difusión por discos; donde cada cepa bacteriana ya identificada se sembró en caldo nutritivo e incubó a 37 °C por 24 horas. La suspensión de las colonias puras en solución salina estéril fue ajustada al 0,5 del nefelómetro de Mc Farland por medio de un ajuste visual. Se sembró el inóculo ajustado en placas de Muller Hinton(OXOID) donde se aplicaron los discos de antibióticos. Estas placas se incubaron invertidas a 35°C por 16 a 20 horas, luego de lo cual se procedió a la medición de las zonas de inhibición de crecimiento².

Los antimicrobianos ensayados corresponden a aquellos probados de rutina en la institución para las diferentes enfermedades de hatos lecheros: ampicilina(10 µg), penicilina(10 µg), gentamicina(10 µg), neomicina(30 µg), kanamicina(30 µg), estreptomycin(10 µg), tetraciclina (30µg), trimetoprima + sulfa (25 µg) y nirofurantoína (OXOID-UK).

Para la asignación de categorías; sensible o resistente, se consideró los puntos de corte recomendados en las normas del National Comitee for Clinical Laboratory Standard 11, donde las cepas con sensibilidad intermedia fueron incluidas en la categoría de resistentes y considerada como resistencia elevada esta característica a partir del 50% en relación al total de muestras de leche cruda testada.

La multirresistencia fue definida como la resistencia elevada de una cepa determinada a tres o más antibióticos.

Asuntos estadísticos: Sobre la base de 590 registros de muestras de leche bovina cruda remitidas al laboratorio entre los meses de enero del 2000 y marzo del 2006; fue determinado el tamaño de muestra.

Con nivel de confianza del 95% se utilizó como base para el cálculo la frecuencia de aislamientos en infecciones de glándula mamaria por *Staphylococcus* sp de 35%⁴ estimándose como número mínimo 298 muestras con ancho de intervalo de confianza de 20% .¹¹

Se incluyeron para el estudio todas aquellas muestras en las cuales se observó crecimiento bacteriano a más de contener resultados del estudio de sensibilidad antimicrobiana(ATB); las mismas totalizaron 371 muestras (63%).

Los datos obtenidos fueron cargados en una planilla electrónica Excell y luego analizados por Epiinfo 6.0. Se aplicó estadística descriptiva para la distribución de los gérmenes aislados y la distribución de las cepas resistentes frente a cada antimicrobiano.

Aspectos éticos: los datos del propietario y la procedencia del establecimiento se mantuvieron en el anonimato para la realización de este trabajo. Estos datos no fueron proveídos por ser considerados de confidencialidad entre el propietario del establecimiento y la institución, pero vale acotar de su existencia en los archivos de la institución.

RESULTADOS

Durante los 63 meses que abarcó el estudio fueron procesadas en los laboratorios del SENACSA 590 muestras de leche cruda bovina procedente de diversas regiones del país, de las cuales 371(63%) registros fueron incluidos en el estudio y se aislaron seis géneros bacterianos. Destaca por su predominio en la flora microbiana de la leche cruda *Staphylococcus* sp con el 46,4% del total de aislamientos, seguido de *Streptococcus* sp con el 18, 6% y luego *Corynebacterium* sp con el 18,3%, *Klebsiella* sp con 12,9% y *Escherichia coli* con 3,8% (ver tabla 1).

Tabla 1: Frecuencia de microorganismos aislados de leche cruda bovina entre enero del 2000 y marzo 2003.

MICROORGANISMO	FRECUENCIA	PORCENTAJE	IC 95%
<i>Corynebacterium sp</i>	68	18,3	15 - 23
<i>Escherichia coli</i>	14	3,8	2-6
Staphylococcus coagulasa negativa	95	25,6	21-30
Staphylococcus coagulasa positiva	77	20,8	17-25
<i>Streptococcus agalactiae</i>	33	8,9	6-12
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3	0,8	0-2,5
<i>Streptococcus sp</i>	25	6,7	4,5- 9;9
<i>Streptococcus uberis</i>	8	2,2	1-4
<i>Klebsiella sp</i>	48	12,9	0,8-16,9

Respecto a la resistencia de los microorganismos aislados, *Staphylococcus coagulasa* negativo mostró resistencia en un 77% a la neomicina, 70% a penicilina, 47% a ampicilina y 41% a nitrofurantoina, mientras que la resistencia a los demás antimicrobianos oscila entre el 19 y 35% (ver figura 1).

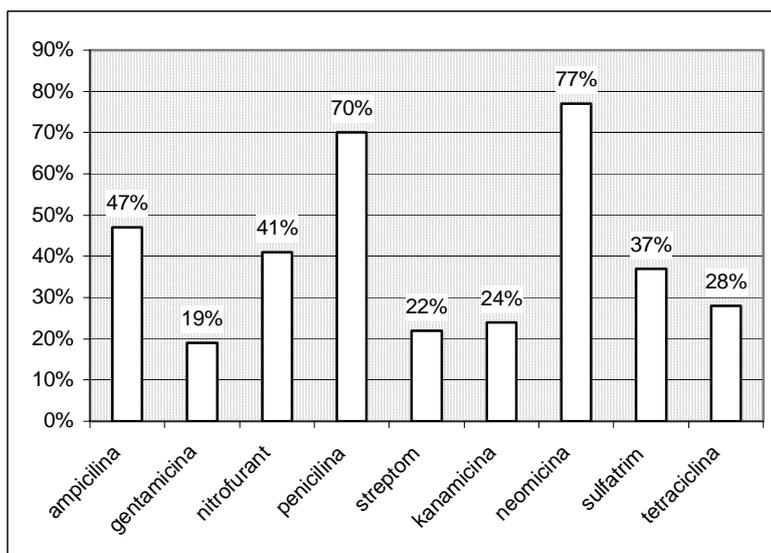


Figura 1. Resistencia de *Staphylococcus coagulasa* negativo a los antimicrobianos(n=95)

En cuanto a *Staphylococcus coagulasa* positivos se pudo observar un 83% de resistencia a penicilinas, 70% a estreptomina, 64% a ampicilina, 50% a neomicina, y por debajo del 49% para los demás antibióticos. Figura 2

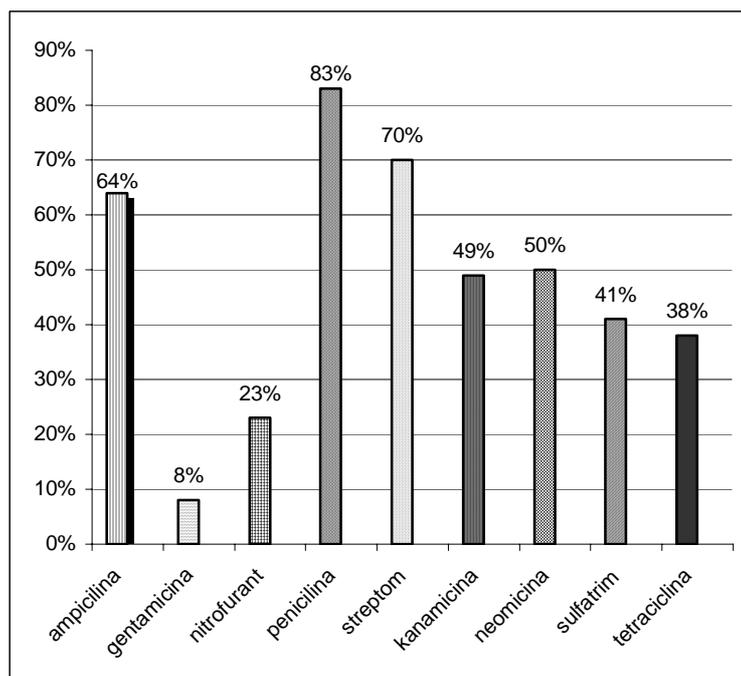


Figura 2. Resistencia de *Staphylococcus coagulasa positiva* antimicrobianos(n=77)

Para *Corynebacterium sp*, la resistencia fue del 94% a neomicina, 69% a penicilina, 66% a sulfatrimetoprim, igual al 50% para ampicilina y por debajo de este los restantes (figura 3)

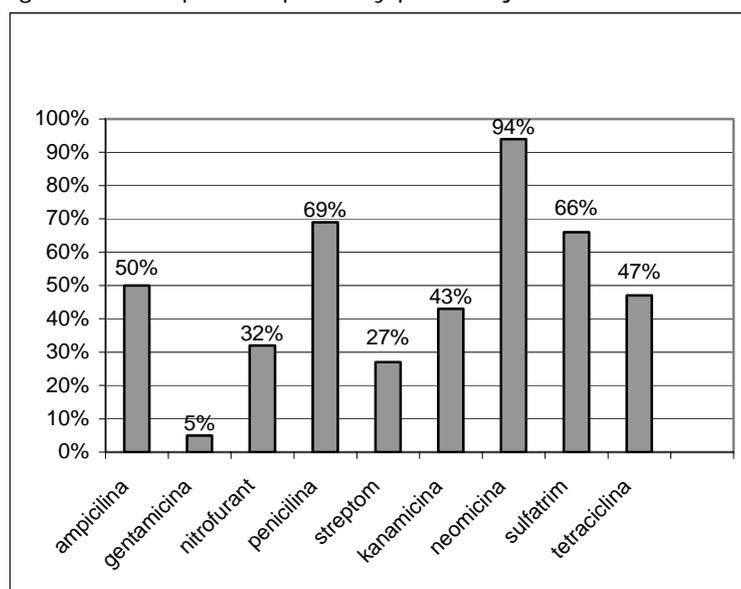


Figura 3. Resistencia de *Corynebacterium sp* a antimicrobianos(n=69)

Podemos observar en la tabla 2 que *Klebsiella sp* presentó 100% de resistencia a la penicilina al igual que *E. coli* a la streptomocina y ambos reflejaron valores de 85 y 86% de esa misma característica para la ampicilina. Entre los aislamientos de *Streptococcus* identificados, destaca *S. agalactiae* con 73% de resistencia a penicilina y 66% a ampicilina.

Tabla 2. Porcentaje de muestras con resistencia a los antimicrobianos (%)

Antibiótico	<i>E. Coli</i> n=14	<i>Klebsiella</i> n=48	<i>S.agalactiae</i> n=33	<i>S.disgalactie</i> n=3	<i>S. uberis</i> n=8	<i>streptococcus sp</i> n=25
Ampicilina	86%	85%	66%	0%	75%	56%
Gentamicina	7%	29%	3%	0%	13%	20%
Nitrofurantoina	7%	35%	15%	0%	0%	41%
Penicilina	7%	100%	73%	0%	88%	64%
Estreptomina	100%	37%	58%	100%	13%	36%
Kanamicina	57%	31%	42%	0%	13%	38%
Neomicina	7%	58%	42%	100%	50%	88%
Sulfatrimet	14%	17%	48%	68%	0%	36%
Tetraciclina	50%	30%	15%	100%	75%	44%

Considerando la definición de multirresistencia aplicada al estudio, los microorganismos demuestran los siguientes resultados: *Corynebacterium* sp, *Staphylococcus coagulasa* positivo, y *E. coli* multirresistentes con cuatro antibióticos, luego *Klebsiella* sp y *Streptococcus agalactiae* con tres antibióticos, mientras los *Staphylococcus coagulasa* negativo contabilizaron dos.

DISCUSION

En el presente estudio se han aislado muestras de leche bovina, gérmenes Gram positivos y Gram negativos destacándose entre los primeros *Staphylococcus* sp, *Corynebacterium* sp, *Streptococcus* sp y *Escherichia coli*, *Klebsiellas* sp entre los segundos.

Los hallazgos del estudio guardan concordancia con la literatura en cuanto a predominio de *Staphylococcus* sp frente a los demás grupos; sin embargo existe hasta 10% más de *Staphylococcus* sp que en cualquier otro.⁴⁻⁷

Se observan resultados dispares⁴⁻⁷ en lo referente a predominancia de los SCP frente a los SCN, arrojando como resultado de este estudio un claro predominio de los segundos sobre los primeros. *E. coli* reflejó un bajo número de aislamientos; lo que podría atribuirse al hecho de que en muchos casos fueron considerados como contaminantes al provenir del tracto intestinal del hombre y los animales¹².

Referente a *Corynebacterium* sp se encontró en muy elevada proporción en relación a otros estudios y *Streptococcus* sp fue clasificado en tres especies de entre las que se destaca en cantidad respecto a las demás del mismo género *S. agalactiae*, lo que coincide con otro estudio⁷. Estos resultados podrían deberse a que al ser estos son microorganismos habitantes normales de piel y mucosas actúen bajo ciertas condiciones como oportunistas en tejidos con heridas y abrasiones de la piel¹².

Al seleccionar un antimicrobiano, el médico veterinario no sólo necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también la sensibilidad a los antimicrobianos disponibles en el mercado. Dentro de los más utilizados en la mastitis clínica en nuestro país están los testados en el estudio; sin embargo, el inapropiado uso de estos fármacos a través de los años ha inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes^{1,3}, tal como se observó en el estudio donde resultaron multirresistentes gran parte de los microorganismos aislados.

Los antibióticos que generaron mayor resistencia en los microorganismos estudiados fueron la penicilina, ampicilina, neomicina y estreptomina, lo cual podría deberse al expendio libre de estos fármacos y al uso inapropiado de los mismos.

Al igual que en estudios realizados en Chile⁷, existen indicadores que muestran alarmantes niveles de resistencia de SCN y SCP a betalactámicos; de igual modo para los demás grupos de antimicrobianos, lo cual coincide con otras investigaciones^{5,6}. *Corynebacterium* y *Staphylococcus coagulasa* positiva reflejaron una resistencia superior al 50% a cuatro de los antibióticos probados y el primero conserva aún una elevada sensibilidad a gentamicina. La totalidad de los microorganismos aislados mostró una resistencia superior al 50% a la penicilina y ninguna fue sensible a la totalidad de los antimicrobianos a los que fueron probados. En lo referente a *E. coli* al igual que en un estudio chileno se observa una elevada sensibilidad a la sulfa y neomicina e incluso de acuerdo al presente estudio también a la gentamicina, nitrofurantoina y penicilina⁷.

En futuras investigaciones deberán ensayarse un mayor número de antimicrobianos considerando un representante por cada grupo con el objeto de proporcionar un mayor espectro de informaciones e incluso observar la existencia de reacciones cruzadas dentro de los miembros de una misma familia de bacterias.

Debido a la escasa información a este respecto, el presente estudio servirá como orientación sobre el perfil de resistencia a antimicrobianos, problemática considerada por la OMS como mundial debido al uso indiscriminado de los antibióticos y las consecuencias de esta sobre la salud pública.

La resistencia bacteriana y la multiresistencia observadas en este estudio resultan elevadas, lo que refleja el uso indiscriminado de antimicrobianos en nuestro medio y coincidente con otros países en cuanto al escaso o nulo control en lo referente a esta problemática. Los resultados del presente estudio permitirán disponer de información actualizada sobre el tema en nuestro medio y orientar el uso racional de los antimicrobianos a través de la concienciación de la problemática en un primer momento y tal vez en el futuro a través de legislaciones como las que ya existe en otros países.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a antimicrobianos. Ginebra : OMS, 2001.
2. Organización Mundial de la Sanidad Animal. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Oficina Internacional de Epizootias. Francia : La Organización, 2000.
3. San Martín B, Cañon H. Antimicrobianos en medicina veterinaria: ¿Cómo se puede evitar la resistencia bacteriana?. Arch. med. vet [revista en Internet] 1999 [acceso 2007 enero 10]; 5(2). Disponible en: http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnonet_articulo/0,1409.html
4. Faria Reyes J, García Urdaneta A, Izquierdo Corser P. Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos. ALAN. [revista en Internet] 2002 mar. [citado 2007 Feb. 05]; 52(1) 68-73. Disponible En: World Wide Web: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-0622.
5. Pardo PE, Mettifogo E, Eckehardt Müller E; Rosendo Do Nascimento E, Buzinhani M, Yamagutti M, et al. Etiología das infeções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto, Brasil. Pesq. Vet. Bras. [revista en Internet] 1998 [citado 2007-02-05]; 18(3-4)115-18. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X
6. Brito MAVP, Brit JRF, Silva MAS, Carm RA. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de Staphylococcus aureus aisladas de infecção intramamária bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [revista en Internet] 2001 [citado 2007-02-05]; 53(5) 531-37. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-0935.html
7. San Martín B, Kruze J, Morales MA, Agüero H, León B, Espinoza S, et al. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Metropolitana y X Región, Chile. Arch. med. Vet. [revista en Internet] 2002 [citado 2007-02-05]; 34(2) 221-34. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X
8. Dirección de Investigación y Producción Animal. Proyecto de desarrollo Lechero para pequeños y medianos productores. (Asunción): JICA. MAG; 2004.
9. Dirección de Investigación y Producción Animal. Proyecto de mejoramiento de la administración de la finca lechera a pequeña y mediana escala. (Asunción): JICA. MAG; 2004.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100-S12. PA, USA: Wayne; 2002.
11. Hulley S, Cummings S. Diseño de la investigación clínica. Barcelona: Doyma; 1993.
12. Nicolet J. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Zaragoza, Acribia; 1999.