

SUSCEPTIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS EN LECHE DE BOVINOS CON MASTITIS SUBCLÍNICA Y LECHE DE TANQUE

Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Subclinical Bovine Mastitis Milk and Bulk Tank Milk

Kutchynskaya Valero-Leal^{1*}, Yamelys Olivares², Armino Perozo¹, Emiro Valbuena³, Leonardo Boscán⁴, Gladis Colina¹ y Wilfido Briñez³

¹ Departamento de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. ² Maestrante en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería. ³ Unidad de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias. ⁴ Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. kutchynskaya@gmail.com

RESUMEN

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos bacterianos de mastitis bovina en el estado Zulia - Venezuela. El objetivo del presente estudio fue determinar la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de cuartos mamarios con mastitis subclínica y leche de tanque en tres fincas del estado Zulia. Un total de 88 cepas fueron analizadas, de estos aislamientos 81 fueron aislados de leche de cuartos mamarios y 7 de leche de tanque. A las cepas se le determinó la sensibilidad a los agentes antimicrobianos por el método de difusión del disco en agar, correspondientes a: vancomicina (Va), estreptomycin (S), clindamicina (Cc), eritromicina (E), tetraciclina (Te), penicilina (Pe), ciprofloxacina (Cip), cefoxitina (Fox), cloranfenicol (C), enrofloxacin (Enr), rifampicina (Rif), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), oxacilina (Ox) y gentamicina (G). La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó a Pe, Va, Ox, y E. Las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de cuartos mamarios fueron resistentes a Pe (12,3%), Enr (8,6%), Cip, S (4,9%, respectivamente), E (3,7%), Cc, y Rif (2,5%, respectivamente). Las cepas aisladas de leche de tanque fueron resistentes a Pe y Te (28,6%) y Cc (14, 3%). Los resultados indican que los aislamientos de *S. aureus* provenientes de leche de cuartos mamarios con mastitis subclínica fueron más susceptibles a todos los agentes antimicrobianos (70%) en comparación con las cepas procedentes de la leche de tanque (57%).

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, antimicrobianos, resistencia, mastitis subclínica, leche cruda.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the main bacterial pathogens involved in bovine mastitis in Zulia State-Venezuela. The objective of this research was to determine the susceptibility to antimicrobial agents of *Staphylococcus aureus* isolated from the mammary quarter milk of subclinical mastitis cows and from bulk tank milk in three dairy farms of Zulia State. A total of 88 strains were analyzed, of these isolates 81 were isolated from quarter milk and 7 from bulk tank milk. The susceptibility to antimicrobial agents of those strains was determined by agar disk diffusion test. The antibiotics tested were: vancomycin (Va), streptomycin (S), clindamycin (Cc), erythromycin (E), tetracycline (Te), penicillin (Pe), ciprofloxacin (Cip), cefoxitin (Fox), chloramfenicol (C), enrofloxacin (Enr), rifampicin (Rif), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), oxacillin (Ox) and gentamicin. (G). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for Pe, Va, Ox and E was determined. *S. aureus* strains isolated from quarter milk were resistant to Pe (12.3%), Enr (8.6%), Cip, S (4.9%, respectively), E (3.7%), Cc, and Rif (2.5%, respectively). Strains isolated from bulk tank milk were resistant to Pe and Te (28.6%, respectively) and Cc (14.3%). The results indicate that isolates of *S. aureus* from mammary quarter milk of subclinical mastitis were more susceptible to all antimicrobial agents (70%) compared with strains from the bulk tank milk (57%).

Key words: *Staphylococcus aureus*, antimicrobials, resistance, mastitis subclinical, raw milk.

INTRODUCCIÓN

Un pre requisito para producir leche higiénica y de buena calidad es, que sea proveniente de una glándula mamaria

sana, sin embargo, con frecuencia es producido en un cuarto mamario afectado por mastitis [5]. La mastitis o inflamación de la glándula mamaria se produce principalmente, en respuesta a la presencia de un microorganismo infeccioso. Esta enfermedad infecciosa es la de mayor prevalencia en el ganado lechero y la responsable de grandes pérdidas económicas para los productores a nivel mundial [43].

Aunque las pérdidas económicas debido a la mastitis se producen, tanto en los animales que presentan la enfermedad clínica como la subclínica, en el caso de la mastitis subclínica, las pérdidas económicas son más importantes porque la reducción en la producción de la leche tiende a persistir por un largo período y el número de animales afectados por unidad de producción es mayor [39]. El problema de la mastitis subclínica es atribuido principalmente a la falta de programas de detección y control en la mayoría de las fincas, así como también, a deficientes condiciones higiénico-sanitarias del ordeño [18].

En Venezuela, la prevalencia de mastitis subclínica bovina (*Bos taurus-indicus*) es considerada elevada y los estudios realizados han reportado una incidencia entre 36 y el 60% [3, 18]. La situación en el estado Zulia no difiere de lo observado a nivel nacional [3, 17] y *S. aureus* es uno de los patógenos aislados con mayor frecuencia en los casos de mastitis subclínica en dicha región [3, 17].

El uso indiscriminado de antibióticos en algunos países ha conllevado a un aumento en el porcentaje de especies bacterianas resistentes a diversos agentes antimicrobianos, las cuales han sido aisladas de leche procedente de glándulas mamarias con mastitis [19, 24, 30]. Esta resistencia trae como consecuencia dos aspectos importantes: el primero, una disminución en la respuesta al tratamiento en caso de mastitis clínica y el segundo, la transmisión de bacterias resistentes a los consumidores a través de la cadena alimentaria, más aún cuando se consumen productos elaborados a partir de leche cruda [51].

En los países donde no existe programa de control de mastitis ni el pago de incentivo por producir leche de calidad se ha reportado el aislamiento de bacterias resistentes a más de un agente antimicrobiano [6, 17, 40, 42, 52]. El problema del incremento en la resistencia bacteriana en estos casos es debido a varias razones que incluyen: el uso indiscriminado de antibióticos en forma empírica por personal no calificado, la libre venta de los antimicrobianos sin la exigencia de la presentación del recípe expedido por el Médico Veterinario y finalmente, la aplicación incompleta del tratamiento. Todos estos factores favorecen el desarrollo de la resistencia [42].

A nivel mundial se han realizado numerosos estudios sobre la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de *S. aureus*, aisladas de leche de cuartos mamarios de animales con mastitis clínica o subclínica, mientras que, son pocos los estudios realizados a partir de aislamientos en leche de tanque. Los resultados de estas investigaciones destacan las diferencias existentes entre países y regiones, en cuanto a los patrones de resistencia de *S. aureus* a los agentes antimicrobianos, lo que indica la necesidad de monitorear la resistencia bacteriana. En Venezuela, específicamente en el estado Zulia se han realizado algunas investigaciones que han revelado la presencia de bacterias resistentes a antibióticos, así como también, la existencia de residuos de antibióticos en leche cruda [16, 17, 37].

Por lo antes expuesto, se planteó la presente investigación con el fin de determinar la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de *S. aureus* aislados de leche de cuartos mamarios con mastitis subclínica y leche de tanque en tres fincas del estado Zulia-Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Staphylococcus aureus*

La investigación se realizó en tres fincas ubicadas en los municipios Santa Rita (Finca A), Cañada de Urdaneta (Finca B) y Mara (Finca C) del estado Zulia, donde se investigó la presencia de *S. aureus* en la leche de cuartos mamarios de vacas con mastitis subclínica y leche del tanque de enfriamiento. Para determinar mastitis subclínica en los cuartos mamarios, durante el ordeño vespertino en cada finca se realizó la prueba de California para Mastitis (CMT) a todas las vacas en producción de acuerdo a la metodología descrita por Schalm y Noorlander [45].

Un total de 88 cepas de *Staphylococcus aureus* fueron aisladas en el estudio. Ochenta y un cepas se aislaron en leche de cuartos mamarios, de las cuales 50 cepas fueron aisladas en la Finca A, 27 cepas de la Finca B y cuatro cepas de la Finca C. Las siete cepas restantes incluidas en el estudio fueron aisladas de leche del tanque de enfriamiento de las Fincas A y B. Todos los aislamientos fueron obtenidos entre los meses de mayo 2006 a enero 2007. Las cepas fueron identificadas por procedimientos estándares en base a la morfología colonial en el medio de agar sangre, tinción de Gram, reacción a las pruebas de: catalasa, oxidación y fermentación de la glucosa (OF-glucosa), coagulasa, DNAsa, fermentación del manitol y Voges-Proskauer [25].

Determinación de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus*

La sensibilidad y la resistencia se determinó por el método de difusión del disco en agar de Bauer-Kirby siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) [11], utilizando en este caso 14 agentes antimicrobianos recomendados por el CLSI [12]. El inóculo se preparó por el método de suspensión directa de colonias en solución fisiológica estéril ajustándose la turbidez al patrón 0,5 de Mac Farland. El inóculo estandarizado se sembró en placas de agar Mueller Hinton en forma homogénea sobre toda la superficie del agar, donde posteriormente se colocaron los discos impregnados con los agentes antimicrobianos. Posterior al tiempo de incubación (37°C por 24 horas), se procedió a medir

en milímetros los halos formados alrededor de cada disco impregnado con antibiótico. Como control se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Los agentes antimicrobianos y sus concentraciones fueron los siguientes: penicilina (10 UI, OXOID), vancomicina (30 µg, OXOID), gentamicina (10 µg, BBL), eritromicina (15 µg, BBL), tetraciclina (30 µg, BBL), ciprofloxacina (5 µg, BBL), clindamicina (2 µg, BBL), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25 µg /29,75 µg BBL), cloranfenicol (30 µg, BBL), rifampicina (5 µg, BBL), para detectar cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina se utilizaron discos de oxacilina (1 µg, OXOID) y de cefoxitin (30 µg, BBL). Aunque solo había disponibilidad para realizar 35 determinaciones con el disco de enrofloxacin (5 µg, OXOID) se incluyó junto con el disco de estreptomycin (10 µg, BBL) por ser antibióticos de uso en medicina veterinaria. El criterio de sensibilidad o resistencia a cada agente se determinó según las especificaciones del CLSI [12].

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La CIM es la mínima concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, se realizó la CIM por el método de dilución en agar de acuerdo a las pautas recomendadas por el CLSI [12] a: penicilina, oxacilina, vancomicina y eritromicina. Los rangos probados fueron: penicilina 0,00753 a 4,0 µg/mL, vancomicina 0,0312 a 8,0 µg/mL, eritromicina de 0,125 a 16,0 µg/mL y oxacilina de 0,0625 a 16,0 µg/mL. Para la interpretación de los resultados se siguieron los lineamientos del CLSI [12], donde se sugiere los puntos de cortes que se describen en la TABLA I. Se calculó además la CIM₉₀ y CIM₅₀, éstas se definen como la mínima concentración del antibiótico que inhibe el 90 y 50%, respectivamente, del crecimiento bacteriano [19].

TABLA I
ESTANDARES DE INTERPRETACIÓN DE CIM PARA
Staphylococcus spp/ MIC INTERPRETIVE STANDARD
FOR *Staphylococcus spp*

Antibióticos	Sensibilidad	Intermedio (µg/mL)	Resistente
Penicilina	≤ 0,12	-	≥ 0,25
Oxacilina	≤ 2	-	≥ 4
Vancomicina	≤ 2	4 - 8	≥ 16
Eritromicina	≤ 0,5	1 - 4	≥ 8

Detección de la producción de β-lactamasa

Las cepas fueron probadas para la detección de β-lactamasa por el método cefalosporina cromogénica nitrocefina (Oxoid, UK) [50]. La determinación se realizó con previa inducción, de manera que la barra de nitrocefina se rotó sobre la superficie de la colonia a partir de crecimiento fresco de 24 horas en presencia de un antibiótico β-lactámico. Una reacción positiva se evidenció por la aparición de un color rojo en el extremo impregnado con nitrocefina en un tiempo no mayor de cinco minutos.

Análisis estadístico

Se utilizó el PROC MEANS para calcular el diámetro medio y el rango de la zona de inhibición del crecimiento en milímetros, para los 14 antibióticos para cada una de las tres fincas. A fin de comparar los diámetros medios entre fincas se aplicó un análisis de varianza en un diseño completamente al azar utilizando el PROC GIM realizando la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey. Para realizar los análisis se utilizó la versión 9,1 del SAS [48].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de *S. aureus* aisladas en leche con mastitis subclínica

De las 81 cepas de *S. aureus* analizadas, 57 (70,4%) fueron susceptibles a todos los agentes antimicrobianos ensayados. Una mayor susceptibilidad ha sido reportada en un estudio previo realizado en la región en cuatro explotaciones lecheras, donde el 86,36% de las cepas de *S. aureus* mostraron susceptibilidad [17]. A nivel mundial, la sensibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos con mastitis se ha reportado entre un 30 y 86% [4, 19, 21, 24, 36, 41, 47, 53], el amplio margen de los porcentajes reportados por las investigaciones pueden estar relacionadas con las diversas políticas existentes en los diferentes países en cuanto al uso de agentes antimicrobianos.

Los resultados obtenidos por el método de difusión del disco en agar y reportados por categoría de interpretación (sensible y resistente) se muestran en la TABLA II, donde se puede observar la resistencia obtenida en orden decreciente a los diferentes antimicrobianos probados. El mayor porcentaje de resistencia se presentó frente a penicilina con un 12,4% (10/81), seguido por 4,9% (4/81) a ciprofloxacina y estreptomycin, 3,7% (3/81) a eritromicina, 2,5% (2/81) a clindamicina y rifampicina, respectivamente, y 1,2% (1/81) de resistencia a tetraciclina. Debido a falta de disponibilidad, la enrofloxacin se ensayó solo en 35 cepas, de las cuales 3 fueron resistentes (8,6%). Contra oxacilina, cefoxitin, cloranfenicol, gentamicina, vancomicina y trimetoprim-sulfametoxazol todas las cepas se mostraron susceptibles.

Debido a que la penicilina ha sido el tratamiento de elección para la mastitis bovina desde los años 1940 [26], las investigaciones realizadas a nivel mundial reportan este fenotipo de resistencia como el más comúnmente observado en cepas de origen bovino [20]. Previamente, en la región se ha reportado resistencia a penicilina en un 13,63% [17], en otras latitudes el porcentaje de resistencia a penicilina es mayor oscilando entre un 30 y 89% [6, 21, 29, 31, 34, 40, 53], con la excepción de los resultados obtenidos en cepas procedentes de Noruega y Canadá, donde la resistencia a este antibiótico β-lactámico es menor (2-11%) [32, 41, 53].

TABLA II
SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE CEPAS
DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE BOVINOS
CON MASTITIS SUBCLÍNICA/ ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY
OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM
SUBCLINICAL BOVINE MASTITIS

Antibióticos	Nº Cepas	Sensibilidad		Resistencia	
		Nº	%	Nº	%
Cefoxitina	81	81	100	0	0
Ciprofloxacina	81	77	95,1	4	4,9
Clindamicina	81	79	97,5	2	2,5
Cloranfenicol	81	81	100	0	0
Eritromicina	81	78	96,3	3	3,7
Gentamicina	81	81	100	0	0
Oxacilina	81	81	100	0	0
Penicilina	81	71	87,7	10	12,4
Rifampicina	81	79	97,5	2	2,5
Tetraciclina	81	80	98,8	1	1,2
Vancomicina	81	81	100	0	0
Enrofloxacin	35	32	91,4	3	8,6
Estreptomycin	81	77	95,1	4	4,9
Trimetoprim/ sulfametoaxol	81	81	100	0	0

El mecanismo mediante el cual *S. aureus* es resistente a penicilina es debido a la producción de β -lactamasas. Las beta-lactamasas son enzimas bacterianas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, dejándolo inactivo antes de su unión con su sitio blanco (PBPs) siendo incapaz de inhibir la síntesis de la pared celular [7].

Según el CLSI [12], el criterio de interpretación para la clasificación de una cepa de *S. aureus* como susceptible o resistente a penicilina debe concordar con la producción de β -lactamasa. En el presente estudio, todas las cepas resistentes a penicilina fueron productoras de β -lactamasa, determinación que se realizó con previa inducción. Resultados similares han sido reportados previamente en cuanto a la relación de resistencia a penicilina y producción de β -lactamasa [24, 31, 40, 52].

En cuanto a las fluoroquinolonas ensayadas, el 4,9% de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina. Este resultado difiere del obtenido por Faría y col. [17] en la región bajo estudio, donde no hubo resistencia a ciprofloxacina en 22 cepas de *S. aureus* analizadas. De igual manera, en las investigaciones realizadas por Ruiz y col. [40] en Antioquia, Colombia y Sato y col. [44] en Dinamarca, no detectaron resistencia a este antibiótico. Por su parte, Haveri y col. [22] en Finlandia, reportaron sólo un 0,7% de resistencia.

Otra fluoroquinolona que se ensayó fue enrofloxacin, donde 3 cepas (8,6%) de 35, mostraron resistencia. El reporte de cepas de *S. aureus* de origen bovino resistente a enrofloxacin

es muy variado, en los estudios de Betancourt y col. [9], Güler y col. [21] y Nunes y col. [31] no se observó resistencia a enrofloxacin. Por el contrario, en la investigación realizada por San Martín y col. [42] en tres regiones de Chile, reportaron una resistencia entre 1,3 y 13,9%. Por su parte, Turutoglu y col. [52], en 103 cepas de *S. aureus* aislados de mastitis bovina en Turquía, detectaron un 3,9% de resistencia. La enrofloxacin es una fluoroquinolona desarrollada exclusivamente para ser usada en medicina veterinaria, se caracteriza por presentar una excelente actividad antimicrobiana incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antimicrobianos de uso corriente en animales, es usada en Estados Unidos y muchos países europeos para el tratamiento de una variedad de infecciones en animales [33].

Las fluoroquinolonas actúan a nivel de la síntesis de ADN inhibiendo el proceso de replicación al actuar sobre la enzima topoisomerasa IV en bacterias Gram positivas [8, 20]. La resistencia a las fluoroquinolonas surge en forma espontánea por medio de mutaciones que, ocasionan sustituciones de aminoácidos dentro de las subunidades ParC y ParE de topoisomerasas IV [55]. Aunque las fluoroquinolonas tienen una buena distribución en la glándula mamaria y tienen un amplio espectro de acción se encuentra en discusión el uso de este tipo de antibiótico en animales destinados a la producción de alimentos debido a la posible aparición de cepas resistentes que podrían ser transmitidas al humano [15].

En cuanto a los aminoglucósidos, 4/81 cepas (4,9%) presentaron resistencia a estreptomycin, éste es uno de los aminoglucósidos más usados para el tratamiento y control de mastitis bovina por *S. aureus*, utilizándose sólo o en combinación con otro antibiótico, como la penicilina. Aunque deben ser usados en forma cautelosa en producción animal, por el riesgo de la presencia de residuos por tiempo prolongado en la leche y por sus efectos nefrotóxicos [13], en algunos países como Polonia, Hungría, Palestina y Chile, la resistencia a aminoglucósidos ha sido el segundo fenotipo de resistencia observado con mayor frecuencia donde se ha reportado resistencia a estreptomycin por encima del 25% [6, 29, 53].

El mecanismo más común de resistencia a los aminoglucósidos por parte de *S. aureus* es la modificación estructural del antibiótico por enzimas modificadoras específicas, lo cual compromete la unión del antibiótico con su sitio de acción [55]. Muchas de estas enzimas modificadoras están localizadas a nivel de plásmidos y transposones en Gram positivos y son eficientemente transmitidos entre estafilococos y enterococos por conjugación [8].

La resistencia a eritromycin se observó en el 3,7% (3/81) de las cepas, este porcentaje es inferior al obtenido previamente en la región donde se reportó una resistencia del 9,09% [17], también está por debajo de los resultados obtenidos por Gentilini y col. [19] en Argentina (11,6%). En otros países subdesarrollados, la resistencia a este macrólido es incluso más elevada, con reportes de 28% en Hatay [6] y 40,9% en

Palestina [2], mientras que en países desarrollados, la resistencia oscila entre un 0,7 a 10% [4, 14, 22, 35, 41, 53].

La resistencia de *Staphylococcus* a macrólidos se basa en la modificación del sitio de acción, mecanismo de flujo e inactivación enzimática. La modificación del sitio de acción es el elemento de resistencia más común [55]. Esta modificación del sitio de acción ocurre por metilación del residuo de adenina del ARNr 23S mediante metilasas codificadas por el gen *erm*. Cuatro genes designados como *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* y *erm(F)* han sido identificados en *Staphylococcus* de origen animal [55]. Estos genes se encuentran localizados a nivel de transposones conjugativos o no conjugativos y a nivel de plásmidos [46].

La resistencia observada a clindamicina fue del 2,5% (2/81 cepas). Los resultados del presente estudio son comparables a los obtenidos por Pitkälä y col. [35] en Finlandia (0,5%) y por Anderson y col. [4] en Carolina del Norte y Virginia (Estados Unidos de Norteamérica) (0%). Los mayores porcentajes de resistencia conseguidos a clindamicina oscilan entre un 17 y 60% [2, 6, 29, 40, 42, 52].

La resistencia conferida por el gen *erm* y que ocasiona metilación en el ARNr 23S confiere resistencia también para el grupo de lincosamidas (clindamicina), pues la metilación de la molécula de adenina en la cadena de ARNr 23S se encuentra localizada en una región conservada del dominio V del ARNr 23S, que juega un papel clave en la unión de los antibióticos del grupo ML (macrólidos, lincosamidas). Como consecuencia de la metilación, la eritromicina no puede unirse a su sitio de acción. El solapamiento de los sitios receptores de este grupo de antibióticos provoca la resistencia simultánea a estas dos clases de drogas [27]. *In vitro*, las cepas con resistencia constitutiva grupo ML se muestran resistentes a eritromicina y clindamicina, mientras que las que poseen el fenotipo inducible de resistencia, son resistentes a eritromicina pero sensibles a clindamicina. *In vivo*, la terapia con clindamicina, podría seleccionar mutantes constitutivos *erm* y provocar una falla terapéutica [49].

La resistencia observada a tetraciclina del 1,2% (1/81 cepas), es menor a la reportada por Faria y col. [17] previamente en la región (9,09%). Los resultados del presente estudio son comparables a los obtenidos por Pitkälä y col. [35] en Finlandia (5,1%) y por Anderson y col. [4] en Carolina del Norte y Virginia (Estados Unidos de Norteamérica) (0,5%). Otras investigaciones efectuadas en diferentes países revelan un mayor porcentaje de resistencia a tetraciclina desde un 9 hasta un 67% [2, 6, 14, 22, 28, 29, 40, 42, 51, 52]. En estafilococos de origen animal se han detectado 4 genes diferentes (*tetM*, *tetO*, *tetK*, *tetL*) que confieren resistencia a tetraciclina. Los genes *tet(M)* y *tet(O)* codifican proteínas de protección ribosomal y los genes *tet(K)* y *tet(L)* codifican proteínas de flujo [55].

Aunque la rifampicina no es utilizada para el tratamiento y/o control de la mastitis bovina [23] se logró detectar 2 cepas resistentes (2,5%). Faria y col. [17], no reportaron resistencia a rifampicina en su estudio realizado en cepas de *S. aureus* aisladas en leche de cuartos mamarios en cuatro unidades de

producción del estado Zulia. Debido a la frecuencia de mutaciones espontáneas a nivel cromosomal, la resistencia se desarrolla rápidamente, razón por la cual su uso es limitado y se reserva para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* en medicina humana [8].

Debido a que con el método de difusión del disco en agar (Bauer y Kirby) no se pueden detectar cambios leves en la resistencia antimicrobiana [51], pues los resultados obtenidos son cualitativos (sensible, intermedio y resistente) [12], se compararon los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas de *S. aureus* cuyos resultados se muestran en la TABLA III. Se observa que los diámetros de la zona de inhibición para las cepas de *S. aureus* aisladas en la Finca A fueron menores para cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina y trimetoprim/sulfametoxazol, al ser comparadas con los obtenidos a partir de los aislamientos de la Finca B y C, diferencias que fueron significativas ($P < 0,05$). En el caso de tetraciclina y estreptomina, el diámetro de inhibición fue menor en las cepas provenientes de la Finca C en comparación con los de la Finca A y B ($P < 0,05$). No se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) en los diámetros de oxacilina, penicilina, rifampicina, vancomicina y enrofloxacin.

Estas diferencias obtenidas pueden ser debido al tipo de manejo en cuanto al uso de agentes antimicrobianos en cada una de las fincas de donde provenían las cepas estudiadas, lo que puede estar ejerciendo una presión selectiva favoreciendo el desarrollo de la resistencia a antibióticos, lo cual es evidenciado con un halo de inhibición de menor tamaño [51]. La reducción del diámetro de la zona de inhibición ha sido relacionada con la presencia de plásmidos; en el estudio conducido por Waage y col. [54], observaron que las cepas de *S. aureus* que presentaban un plásmido de 4,3 kb tenían un diámetro de inhibición a tetraciclina menor en comparación con los aislamientos donde el plásmido de 4,3 kb estaba ausente.

En la TABLA IV se muestran los diferentes patrones de resistencia (PR) obtenidos con su composición y frecuencia, estos PR fueron elaborados en función de la resistencia que mostraban las cepas de *S. aureus* a cada uno de los antibióticos. En las 24 cepas de *S. aureus* que presentaron resistencia se obtuvo 10 PR distintos. Se puede notar que la resistencia a un solo antibiótico se observó en el 25,9% (21/81) de las cepas y éstas se caracterizaron por presentar 7 PR diferentes.

Al tomar en cuenta la definición de multiresistencia antibiótica como la falta de susceptibilidad a 2 o más agentes antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias o grupos [47], ésta se presentó en 3 cepas (3,6%), cada una con un PR diferente (PR 8, PR 9 y PR 10). Esta característica es frecuentemente encontrada en cepas de origen humano, mientras que, en medicina veterinaria se reporta ocasionalmente, razón por la cual en medicina humana, la multiresistencia se determina cuando se detecta resistencia a 4 o más grupos de antibióticos.

En los últimos años, la resistencia múltiple a los agentes antimicrobianos ha sido reportada en cepas de *S. aureus* ais-

TABLA III
COMPARACIÓN DE LOS DIÁMETROS DE LAS ZONAS DE INHIBICIÓN DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN DEL DISCO ENTRE LAS CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS EN LAS FINCAS ESTUDIADAS/ COMPARISON OF ZONE DIAMETERS FROM DISK DIFFUSION TEST BETWEEN *S. aureus* ISOLATED IN STUDIED DAIRY FARMS

Antibióticos	Punto de corte (mm)	Finca A (n=50)		Finca B (n=27)		Finca C (n=4)	
		Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango
		(mm)		(mm)		(mm)	
Cefoxitina	≤ 21	33,62 ^b	26 - 40	33,89 ^b	28 - 40	38,50 ^a	35 - 48
Ciprofloxacina	≤ 15	27,26 ^b	20 - 33	32,85 ^a	26 - 39	32,75 ^a	28 - 40
Clindamicina	≤ 14	29,66 ^b	19 - 43	33,04 ^{ab}	25 - 40	34,50 ^a	30 - 39
Clorafenicol	≤ 12	27,88 ^b	20 - 39	30,19 ^b	25 - 37	34,50 ^a	33 - 36
Eritromicina	≤ 13	28,18 ^b	0 - 35	31,63 ^{ab}	26 - 36	34,25 ^a	30 - 37
Gentamicina	≤ 12	24,38 ^b	20 - 30	28,33 ^a	23 - 34	28,0 ^a	20 - 38
Oxacilina	≤ 10	27,84 ^a	0 - 35	26,41 ^a	19 - 35	27,75 ^a	23 - 33
Penicilina	≤ 28	43,66 ^a	34 - 50	37,30 ^a	0 - 50	35,00 ^a	25 - 50
Rifampicina	≤ 16	32,76 ^a	0 - 40	35,37 ^a	28 - 40	38,25 ^a	34 - 41
Tetraciclina	≤ 14	30,90 ^{ab}	20 - 40	34,59 ^a	30 - 42	25,25 ^b	0 - 35
Vancomicina	≤ 14	20,38 ^a	17 - 29	21,67 ^a	18 - 26	21,50 ^a	20 - 22
Enrofloxacin	≤ 23	30,62 ^a	21 - 38	30,75 ^a	30 - 32	ND	ND
Estreptomina	≤ 11	18,18 ^{ab}	10 - 24	19,56 ^a	0 - 23	14,75 ^b	0 - 22
Trimetoprim-sulfametoazol	≤ 10	31,76 ^b	17 - 37	36,67 ^a	30 - 45	39,25 ^a	36 - 45

medias con superíndices diferentes en la misma fila difieren significativamente (P<0,05); ND= no determinado.

TABLA IV
PATRONES DE RESISTENCIA DE LAS 81 CEPAS DE *S. aureus*/ PATTERNS OF RESISTANCE OF 81 *S. aureus* STRAINS.

Patrón Resistencia (PR)	Composición	Nº (%)
PR 1	Cip	3 (3,7)
PR 2	Cc	1 (1,2)
PR 3	E	1 (1,2)
PR 4	Pe	10 (12,4)
PR 5	Enr	2 (2,5)
PR 6	S	3 (3,7)
PR 7	Rif	1 (1,2)
PR 8	Te - S	1 (1,2)
PR 9	E - Cip - Enr	1 (1,2)
PR 10	E - Rif - Cc	1 (1,2)

Cip= ciprofloxacina; Cc= clindamicina; E= eritromicina; Pe= penicilina; Enr= enrofloxacin. S= estreptomina; Rif= rifampicina; Te= tetraciclina.

ladas de leche de cuartos mamarios de vacas con mastitis con resultados muy variables que oscilan entre 1 y 74% [6, 21, 24, 36, 47]. El aislamiento de cepas multiresistentes es el reflejo del uso indiscriminado no racional de antibióticos, tanto en producción animal como en salud humana, donde esta resistencia puede estar codificada por genes a nivel de ADN extracromo-

somal (plásmidos, transposones) que pueden ser transferibles, actuando estas cepas como reservorios de genes de resistencia. De manera que la contaminación cruzada de los alimentos por distintos biotipos de *S. aureus* durante la cadena de procesamiento de alimentos puede ser una vía de transmisión de genes de resistencia [51].

En la TABLA V se presentan los resultados de la CIM₉₀ y CIM₅₀ para las cepas de *S. aureus* aisladas en tres fincas del estado Zulia. La CIM₉₀ para penicilina fue baja (0,25 µg/ml), resultado similar al reportado por De Oliveira y col. [13] en cepas provenientes de Dinamarca, Suiza, e Islandia. Los valores descritos de CIM₉₀ por otros autores para penicilina en *S. aureus* aislados de mastitis se encuentran en un rango de ≤ 0,06 µg/mL a 4 µg/mL [4, 13, 19, 22, 31, 42].

Para oxacilina la CIM₉₀ fue de 0,5 µg/mL el cual es similar al reportado en los trabajos realizados en Portugal, Argentina y Dinamarca [13, 19, 31], pero es más bajo que el obtenido en Finlandia y otros países europeos (1 - 2 µg/mL) [13, 35].

En el caso de eritromicina la CIM₉₀ fue de 0,5 µg/mL en concordancia con el más frecuente valor de CIM₉₀ reportado en la literatura [4, 10, 13, 22, 35], con algunas excepciones como las encontradas en Argentina (0,75 µg/mL) [19], Irlanda, Suiza y Estados Unidos (1 µg/mL) [13].

Aunque la vancomicina no es utilizada en medicina veterinaria, fue probada en este estudio con la finalidad de monito-

TABLA V
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE 81 CEPAS
DE *S. aureus* AISLADAS EN LAS FINCAS ESTUDIADAS/
MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF 81 *S. aureus* STRAINS
ISOLATED IN STUDIED DAIRY FARMS

Antibióticos	Punto de corte	Rango	CIM			Resistencia %
			CIM ₅₀	CIM ₉₀		
			(µg/mL)			
Penicilina	≤ 0,125	0,065 - 1	0,064	0,25		12,3
Oxacilina	≤ 2	0,125 - 4	0,25	0,5		0
Vancomicina	≤ 2	0,125 - 2	0,5	2		0
Eritromicina	≤ 0,5	0,25 - 8	0,5	0,5		3,5

rear el grado de susceptibilidad y resistencia, puesto que es un medicamento de primera elección frente a cepas de *S. aureus* meticilina resistentes en humanos. Frente a este antibiótico no se ha reportado resistencia en cepas de *S. aureus* aislados de mastitis bovina [38, 40]. La CIM₉₀ obtenida en el presente estudio (2 µg/mL) fue mayor que la reportada por Ruiz y col. [40] en Colombia (≤ 0,5) y Anderson y col. [4] en Estados Unidos de Norteamérica (1 µg/mL).

Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en las cepas aisladas en leche de tanque

De las 7 cepas analizadas provenientes de la leche del tanque de enfriamiento, 3 presentaron resistencia a por lo menos un agente antimicrobiano, lo que representa el 42,8%. Son pocos los estudios realizados sobre susceptibilidad a los agentes anti-

microbianos en cepas de *S. aureus* aisladas en muestras de leche de tanque, sin embargo, existen trabajos que mencionan aislamiento de cepas resistentes del 19% y 72% [1, 30].

En la TABLA VI se presentan los resultados del método de difusión del disco en agar. Un 28,6% de las cepas fueron resistentes a penicilina y tetraciclina, mientras que un 14,3% mostró resistencia a clindamicina. No se observó resistencia para cefoxitina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, oxacilina, rifampicina, vancomicina, estreptomina, y trimetoprim/sulfametoxazol. La CIM₉₀ para penicilina fue 0,25 µg/mL, 1 µg/mL para oxacilina, 2 µg/mL en el caso de vancomicina y 0,5 µg/mL para eritromicina.

Peles y col. [34], en un estudio conducido en Hungría reportaron en cepas de *S. aureus* aisladas en leche de tanque un 20% de resistencia para penicilina. En Italia, Normanno y col. [30] obtuvieron el mayor porcentaje de resistencia frente a ampicilina (55,8%). Por su parte, Sato y col. [44] en cepas de *S. aureus* aisladas en leche de tanque en Wisconsin (EUA), observaron resistencia frente a bacitracina, penicilina, estreptomina, sulfametoxazol y trimetoprim. Se presume generalmente, que las cepas aisladas de *S. aureus* en leche de tanque son de origen bovino, sin embargo, es posible que la contaminación de origen humano se produzca durante el ordeño. Con fines epidemiológicos y ecológicos *S. aureus* se ha separado en seis biotipos o ecovariedades (humano, humano β⁺, aves, bovinos, ovino y huésped no específico), la biotipificación se realiza en base a la detección de algunas propiedades

TABLA VI
SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE 7 CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS EN LECHE DE TANQUE/
IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF 7 *S. aureus* STRAINS ISOLATED FROM BULK TANK MILK

Antibióticos	CIM				Difusión del disco en agar
	Punto de Corte (µg/mL)	Rango µg/mL	CIM ₅₀ µg/mL	CIM ₉₀ µg/mL	Resistencia %
Penicilina	≤ 0,125	0,065 - 1	0,064	0,25	28,6
Oxacilina	≤ 2	0,125 - 4	0,125	1	0
Vancomicina	≤ 2	0,125 - 2	1	2	0
Eritromicina	≤ 0,5	0,25 - 8	0,5	0,5	0
Cefoxitina	-	-	-	-	0
Ciprofloxacina	-	-	-	-	0
Clindamicina	-	-	-	-	14,3
Cloranfenicol	-	-	-	-	0
Gentamicina	-	-	-	-	0
Rifampicina	-	-	-	-	0
Tetraciclina	-	-	-	-	28,6
Estreptomina	-	-	-	-	0
Trimetoprim-sulfametoxazol	-	-	-	-	0

- = no determinado.

en la cepa, tales como; estafiloquinasa, coagulación de plasma humano y/o bovino, actividad de hemolisina frente a diferentes tipos de eritrocitos y habilidad para crecer en agar cristal-violeta [30].

En el estudio conducido por Normanno y col. [30], la mayoría de las cepas de *S. aureus* investigadas resultaron biotipo humano y estas cepas se caracterizaron por presentar resistencia a diversos antimicrobianos. En los países como Venezuela, donde existe una alta preferencia por parte de la población a consumir quesos frescos elaborados a partir de leche cruda, es preocupante el aislamiento de cepas resistentes a antibióticos en la leche de tanque, por la posible creación de reservorios bacterianos resistentes que podrían ser transmitidas al humano a través de la ingestión de productos lácteos elaborados a partir de leche cruda, lo cual es factible puesto que muchos genes de resistencia a antibióticos están localizados en elementos genéticos móviles que pueden transferir esos genes de resistencia a otras bacterias de la misma o diferente especie o género [51].

CONCLUSIONES

Se concluye que los aislamientos de *S. aureus* provenientes de leche de cuartos mamarios con mastitis subclínica fueron más susceptibles a todos los agentes antimicrobianos (70%) en comparación con las cepas procedentes de la leche de tanque (57%), siendo la resistencia a penicilina el mayor fenotipo de resistencia observado, tanto en los aislamientos de cuartos mamarios como en los de tanque. Los resultados muestran riesgo latente por parte de la población de consumir productos lácteos elaborados a partir de leche cruda, los cuales pueden contener bacterias resistentes a antibióticos y ser transmitidas al humano durante su consumo.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto CC 0062-07.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADESIYUN, A.; WEBB, L.; ROMAIN, H. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **J. Food Protect.** 61: 629-632. 1998.
- [2] ADWAN, G. Antibiotic resistance against Staphylococcal isolates recovered from subclinical mastitis in the north of Palestine. **Islam. Univ. J.** 14: 1-9. 2006.
- [3] ALONSO, F. R. Programas de control de mastitis subclínica bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo. **Rev. Vet. Venez.** XLVII: 11-67. 1981.
- [4] ANDERSON, K.; LYMAN, R.; BODEIS-JONES, S.; WHITE, D. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. **AJVR.** 67: 1185-1191. 2006.
- [5] ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO, F. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. **J. Dairy Sci.** 85: 1370-1375. 2002.
- [6] ASLANTAS, Ö.; ÖZTÜRK, F.; ÇELEBI, A.; AÇIK, L.; ERGÜN, Y. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile. **Ankara Üniv. Vet. Derg.** 53: 47-51. 2006.
- [7] BABIC, M.; HUJER, A.; BONOMO, R. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist. Updat.** 9: 142-156. 2006.
- [8] BERGER-BÄCHI, B. Resistance mechanisms of Gram positive bacteria. **Int. J. Med. Microbiol.** 292: 27-35. 2002.
- [9] BETANCOURT, O.; SCARPA, C.; VILLAGRÁN, K. Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX Región de Chile. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIII. (5): 413-417. 2003.
- [10] BRITO, M.; BRITO, J.; SILVA, M.; CARMO, R. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamaria bovina. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zoot.** 53: 12-28. 2001.
- [11] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Document M31-A2. Pennsylvania, USA. 45 pp. 2002.
- [12] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100 -S18. Pennsylvania, USA. 188 pp. 2008.
- [13] DE OLIVEIRA, A.; WATTS, J.; SALMON, S.; AARESTRUP, F. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. **J. Dairy Sci.** 83: 855-862. 2000.
- [14] ERSKINE, R.; WALTER, R.; BOLIN, C.; BARTLETT, P.; WHITE, D. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven year period. **J. Dairy Sci.** 85: 1111-1118. 2002.
- [15] ERSKINE, R.; WAGNER, S.; DE GRAVES, F. Mastitis therapy and pharmacology. **Vet. Clin. North Ame. Food Anim.** 19: 109-138. 2003.

- kept on organic and on conventional farms. **J. Dairy Sci.** 89:989-997. 2006.
- [39] RUEGG, P. Investigation of mastitis problems on farms. **Vet. Clin. North. Ame. Food Anim.** 19. 47-73. 2003.
- [40] RUIZ, J.; RAMÍREZ, N.; ARROYAVE, O. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. **Rev. Col. Cien. Pec.** 14 (2): 141-152. 2001.
- [41] SABOUR, P.; GILL, J.; LEPP, D.; PACAN, J.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **J. Clin. Microbiol.** 42: 3449-3455. 2004.
- [42] SAN MARTIN, B.; KRUIZE, J.; MORALES, M.; AGÜERO, H.; LEON, B.; ESPINOSA, S.; IRAGÜEN, D.; PUGA, J.; BORIE, C. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis em vacas lecheras de la V Región Metropolitana y X Región, Chile. **Arch. Med. Vet.** 34 (2): 221-224. 2002.
- [43] SARGEANT, J.; LESLIE, K.; SHIRLEY, J.; PULKRABEK, B.; LIM, G. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. **J. Dairy Sci.** 84: 2018-2024. 2001.
- [44] SATO, K.; BENNEDSGAARD, T.; BARTLETT, P.; ERSKINE, R.; KANEENE, J. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in organic and conventional dairy herds in the Midwestern United States and Denmark. **J. Food Protect.** 67 (6): 1104-1110. 2004.
- [45] SCHALM, O.; NOORLANDER, O. Experiments and observations leading to development of California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 130: 199-204. 1957.
- [46] SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Vet. Res.** 32: 201-225. 2001.
- [47] SHITANDI, A.; STERNESJÖ, Å. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large and small scale producers in Kenya. **J. Dairy Sci.** 87: 4145-4149. 2004.
- [48] STATISTIC ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS User's guide. 6th Ed. University North Carolina USA. 185 pp. 2003.
- [49] STEWARD, C.; RANEY, P.; MORELL, A.; WILLIAMS, P.; McDOUGAL, L.; JEVITT, L.; McGOWAN, J.; TENOVER, F. Testing of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** 43: 1716-1721. 2005.
- [50] SWENSON, J.; PATEL, J.; JORGENSEN, H. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: Manual of Clinical Microbiology. Murray, P.; Baron, E.; Jorgensen, J.; Landry, M.; Pfaller, M (Eds). 9th Ed. AMS Press. Washington DC. 1173-1192 pp. 2007.
- [51] TIKOFSKY, L.; BARLOW, J.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. **Microb. Drug Resist.** 9: S39-S45. 2003.
- [52] TURUTOGLU, H.; ERCELİK, S.; OZTURK, D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis. **Bull. Vet. Inst. Pulawy.** 50: 41-45. 2006.
- [53] VINTOV, J.; AARESTRUP, F.; ZINN, C.; OLSEN, J.; Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Vet. Microbiol.** 95: 133-147. 2003.
- [54] WAAGE, S.; BJORLAND, J.; CAUGANT, D.; OPPEGAARD, H.; TOLLERSRUD, T.; MØRK, T.; AARESTRUP, F. Spread of *Staphylococcus aureus* resistant to penicillin and tetracycline with and between dairy herds. **Epidemiol. Infect.** 129: 193-202. 2002.
- [55] WERCKENTHIN, CH.; CARDOSO, M.; MARTEL, J.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Vet. Res.** 32: 341-362. 2001.