

Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile*

Bacterial resistance of mastitis pathogens isolated from dairy cows in the Vth Region, Metropolitan Region and Xth Region, Chile.

B. SAN MARTIN¹, M.V., Dr. Med. Vet.; J. KRUIZE², M.V., Ph.D.; M. A. MORALES¹, M.V., Ms.Sc.; H. AGÜERO¹, M.V., Ms.Sc.; B. LEON³, M.V.; S. ESPINOZA¹, M.V.; D. IRAGÜEN¹, M.V.; J. PUGA¹, M.V.; C. BORIE¹, M.V., Ms.Sc.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15, La Granja, Santiago, Chile.

²Facultad de Ciencias, Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, Casilla 167, Valdivia, Chile.

³Cooprinsem, Casilla 827, Osorno, Chile.

SUMMARY

Antimicrobial chemotherapy in human and veterinary medicine is one of the most important therapeutic tool against pathogenic agents causing infectious diseases; nevertheless, the development of multiple resistant strains during the last years has been reported. Some of the measures adopted to control this problem have been the veterinary prescription of antimicrobials for animal use, the permanent rotation of drugs, and the implementation of continuous monitoring programs for bacterial resistance.

In the present paper the sensitivity of pathogenic bacteria isolated from dairy cows suffering mastitis in different regions of Chile against antimicrobials most frequently used in dairy herds is reported. The Plate Dilution Method and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were used to evaluate the bacterial resistance of each isolated strain.

A total of 449 bacterial strains were isolated from 963 aseptically collected milk samples in the 5th and Metropolitan Regions of Chile, *E. coli* being the most frequent mastitis pathogen recovered. In the 10th Region, however, *S. aureus* was the main pathogen among 1012 bacterial strains isolated from 2000 milk samples.

S. aureus, *Streptococcus spp* and coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) were shown to be highly resistant to amoxicillin, ampicillin, penicillin, streptomycin and lincomycin. Resistance to cloxacillin of *S. aureus* strains isolated in the 5th-Metropolitan and 10th Regions were 6.2% and 3.7% respectively. On the other hand, a high rate of sensitivity was observed in *E. coli* with resistance values below 25%.

According to these results it is possible to conclude that the mastitis pathogens present in the geographical regions under study are resistant to more than one antimicrobial drug and, therefore, usage of these drugs under medical prescription and implementation of permanent monitoring programs for bacterial resistance are strongly recommended.

Palabras claves: Antimicrobianos, resistencia, mastitis, vacas lecheras.

Key words: Antimicrobials, resistance, mastitis, dairy cows.

INTRODUCCION

Los antibióticos y sulfas en medicina humana y veterinaria constituyen una de las principales herramientas terapéuticas utilizadas

en el control y, en algunos casos, en la erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Sin embargo, existen numerosas publicaciones internacionales en el ámbito de la producción animal, incluyendo al ganado lechero, que señalan la existencia de multiresistencia bacteriana, donde se indica además que las bacterias adquieren resistencia

Aceptado: 20.06.2002

Financiado por FONDECYT: Proyecto N° 1000-782.

no solo a antimicrobianos de una misma familia, sino también a drogas con diferentes estructuras y mecanismos de acción (Stephan y Rusch, 1997; Martel y col., 2000).

Entre las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino de leche está la mastitis, patología reconocida mundialmente por causar grandes pérdidas económicas tanto al productor como a la industria (Watts y col., 1995). En Estados Unidos de América, se ha estimado que las pérdidas sólo por menor producción de leche alcanzan a 1 billón de dólares anuales y que el costo promedio de la mastitis clínica fluctúa entre 27 y 50 dólares/vaca/año (DeGraves y Fetrow, 1993).

En Chile, Moraga en el año 1988 estimó que se pierden anualmente entre 162 a 204 millones de litros de leche por concepto de esta patología y Pedraza (1991), determinó que la disminución en la producción de leche por lactancia en vacas con mastitis clínica puede llegar a un 14%, al compararla con la de animales que no presentaban la enfermedad. A estas pérdidas económicas hay que agregar los costos relacionados con eliminación prematura de vientres por mastitis crónica y los costos de reemplazo, pérdidas por eliminación de leche contaminada con antimicrobianos, costos de la terapia medicamentosa y honorarios médico veterinarios (Morse, 1991). De acuerdo con Hoblet y col. (1991), un cálculo más exacto de las pérdidas por leche descartada, debería incorporar el número de días que dura la terapia más el período de carencia del producto que se está administrando; estos investigadores estimaron que el gasto en medicamentos puede variar entre US\$ 1 y 27 por episodio de mastitis, y que a mayor severidad de los casos, mayor es el costo de los tratamientos.

Si bien existen numerosos factores que influyen en la presentación de la mastitis, estos responden principalmente a causas traumáticas o a la infección por microorganismos patógenos, entre los cuales algunas especies bacterianas juegan un rol particularmente importante. Considerando este último aspecto, la terapia de la mastitis clínica se focaliza fundamentalmente en la eliminación del agente infeccioso,

utilizando como primera herramienta terapéutica los antimicrobianos.

Para seleccionar adecuadamente un antimicrobiano, el médico veterinario no sólo necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también su sensibilidad a los antibióticos o sulfonamidas disponibles en el mercado nacional. Dentro de los más utilizados en la mastitis clínica, tanto en el ámbito internacional como nacional están los betalactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas (Watts y col., 1995); sin embargo, el indiscriminado uso de estos fármacos a través de los años, ha inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes, ocasionando, en algunos casos, fracaso terapéutico que puede incluso causar la muerte del animal (WHO, 2000).

En el caso particular de los patógenos mamarios, a nivel internacional se ha informado un aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos de uso habitual en la mastitis. Así por ejemplo, en un estudio realizado en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de diferentes rebaños lecheros de Finlandia, se determinó un incremento de la resistencia del 36.9% a un 63.6% entre los años 1988 y 1995 (Myllys y col., 1998). Por otro lado, Stephan y Rusch (1997), realizando un estudio de sensibilidad en 95 cepas de *Escherichia coli* frente a cefoperazona, polimixina B, colicistina y gentamicina, encontraron que un 29% de los aislados presentaron resistencia a uno o más antibióticos.

El problema de la multiresistencia bacteriana se agrava aún más, si se considera que investigaciones, tanto clínicas como epidemiológicas, han demostrado que cada vez son menos las barreras para la transferencia de genes de resistencia entre microorganismos patógenos, incluso entre bacterias de géneros y familias diferentes, como también para la transferencia horizontal de bacterias resistentes de los animales al hombre y viceversa (Heisig y col., 1995; Molbak y col., 1999). En la medida que aumenta la preocupación mundial por el tema de la multiresistencia, diferentes países han iniciado programas de monitoreo de resistencia

bacteriana, fomentando el uso racional de antimicrobianos en animales de producción (Altreuther y col., 1997; Bager, 2000; Martel y col., 2000).

En Chile, al igual que en la mayoría de los países, los antimicrobianos son la principal herramienta terapéutica en el tratamiento de las enfermedades bacterianas. Sin embargo, aunque los antimicrobianos representan el 45% de la venta total de fármacos utilizados en animales de producción en el país (ALAVET, 1999)¹, existe escasa información nacional sobre los patrones de sensibilidad en medicina veterinaria, incluyendo la mastitis. Así por ejemplo, San Martín y col. (1991), en un estudio realizado en rebaños lecheros de la Región Metropolitana, encontraron que un 26% de los aislados de *S. aureus* fueron resistentes a penicilina y un 21% a ampicilina; en el caso de *Streptococcus* spp, un 6,2% de las cepas aisladas presentó resistencia a penicilina.

Considerando los antecedentes planteados, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la resistencia a los antimicrobianos utilizados frente a los principales agentes etiológicos de mastitis bovina en rebaños lecheros de la V Región, Región Metropolitana y X Región. Los resultados obtenidos permitirán disponer de información actualizada sobre resistencia bacteriana en regiones geográficas con diferentes sistemas de producción y manejo y, de este modo, orientar el uso más racional de los antimicrobianos en la terapia de mastitis bovina.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de leche se obtuvieron de vacas con mastitis clínica y subclínica, provenientes de rebaños lecheros de la V Región, Región Metropolitana y X Región. Las muestras fueron recolectadas asépticamente de cuartos mamarios individuales en tubos estériles desechables con tapa rosca de 15 ml de capacidad, siguiendo las

recomendaciones del National Mastitis Council, USA (1990).

El tamaño muestral fue determinado mediante la fórmula de proporciones de Cochran (1963), estimándose un número mínimo de 399 cepas para las Regiones V y Metropolitana y 965 cepas para la X Región, de acuerdo a algunos antecedentes regionales de resistencia bacteriana obtenidos previamente por los autores (San Martín y col., 1991; León, 1997).

Para el aislamiento e identificación de los patógenos mamarios se siguieron normas internacionales estandarizadas, empleando agar sangre ovino con 0.1% esculina (FIL/IDF, 1981; NMC, 1990). La identificación de *Staphylococcus* spp se basó en sus propiedades morfológicas, hemolíticas y pruebas de la coagulasa y DNAsa. La identificación de los estreptococos mamarios (*Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*) se basó en las propiedades morfológicas, hemolíticas y bioquímicas, incluyendo el test de CAMP. Para la identificación de las bacterias coliformes, además de las características morfológicas, se utilizó el sistema API 20E. Una vez aisladas e identificadas, las cepas se mantuvieron a 4°C en cultivos duplicados hasta el análisis de sensibilidad a los antimicrobianos.

La evaluación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos se realizó mediante el Método de Dilución en Placa, siguiendo las recomendaciones del National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999) para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cada cepa bacteriana. Todos los antimicrobianos se evaluaron como drogas puras con potencia conocida, preparándose soluciones madres en concentraciones de 2.000 µg/ml, las cuales se mantuvieron refrigeradas entre 4 - 8 °C por un máximo de un mes. A partir de éstas, se prepararon concentraciones decrecientes a la mitad y posteriormente, previo a los ensayos, se mezclaron con agar Mueller Hinton (Difco), en una proporción 1:10. En un equipo Inóculo-Replicador Cathra, se colocaron suspensiones de cada cepa bacteriana ajustadas al 0.5 del tubo nefelométrico de McFarland, inoculándose cada placa que contiene una concentración conocida

¹ ALAVET: 1999. Asociación de Laboratorios Veterinarios de Chile.

del antimicrobiano. La inoculación se inició con las placas controles (sin antibiótico), siguiendo el orden de menor a mayor concentración de antimicrobiano. Una vez inoculadas las placas, se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se incubaron a 37°C por 18-24 horas. Como cepas controles se utilizaron *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, para cepas gram negativas y positivas, respectivamente.

Los antimicrobianos ensayados fueron aquellos de uso más frecuente para diferentes enfermedades en los rebaños lecheros del país y se seleccionaron para las diferentes especies bacterianas de acuerdo a su espectro de acción. Las drogas utilizadas fueron: amoxicilina (Sigma, 98.9% pureza), ampicilina (Sigma, 98.4% pureza), cloxacilina (Sigma, 91.8% pureza), cefoperazona (Sigma, 90% pureza), cefquinoma (Sigma, 90% pureza), ceftiofur (Pharmacia Corporation, 95% pureza), enrofloxacino (Laboratorio Chile, 99.8% pureza), espiramicina (Sigma, 97% pureza), estreptomina (Sigma, 77.3% pureza), florfenicol (Schering Plough, 98.15% pureza), gentamicina (Sigma, 69.2% pureza), lincomicina (Sigma, 98% pureza), novobiocina (Sigma, 90% pureza), oxitetraciclina (Sigma, 96% pureza), penicilina (Sigma, 1658 UI/mg), pirlimicina (Pharmacia Corporation, 86.4% pureza), sulfadiazina (Sigma, 99% pureza), trimetoprim, (Hoescht, 100% pureza).

Para el análisis de los resultados, se consideró que cada cepa bacteriana se comporta individualmente frente a las diferentes concentraciones de un antimicrobiano determinado, expresando las MIC en valores absolutos (ug/ml). La interpretación de la sensibilidad/resistencia se basó en las recomendaciones del NCCLS (1999). Para el análisis estadístico por regiones, se consideró a la V Región y Región Metropolitana como una unidad geográfica, ya que no existen diferencias entre ambas desde el punto de vista agropecuario, producción y manejo de los rebaños lecheros. A cada especie bacteriana identificada en las regiones en estudio, se le calculó el porcentaje de cepas resistentes frente a cada antimicrobiano. Además, para cada

antimicrobiano, se compararon descriptivamente las diferencias en la proporción de cepas resistentes entre regiones geográficas.

RESULTADOS

En la V Región, Región Metropolitana (VR,RM), a partir de 963 muestras de leche, se lograron aislar 449 cepas bacterianas (46.6%), mientras que de 2.000 muestras obtenidas en la X Región (XR), se aislaron 1.012 cepas (50.6%). En el cuadro 1 se presenta la frecuencia de aislamiento de los diferentes patógenos mamarios distribuidos por región geográfica. En la VR y RM se observó un fuerte predominio de bacterias gramnegativas (45.2%), principalmente *E. coli* (40.8%), mientras que en la XR *S. aureus* fue el agente más frecuente (55.5%).

Del total de cepas aisladas en cada región, sólo se investigó la sensibilidad en aquellas aisladas con mayor frecuencia (*E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) y *Streptococcus* spp).

En los cuadros 2, 3, 4 y 5 se señalan las MIC₅₀, MIC₉₀, rango de MIC y los puntos de corte considerados para el total de cepas aisladas de *S. aureus*, SNC, *Streptococcus* spp. y *E. coli*, respectivamente.

Se observaron valores elevados de resistencia (> 25%), frente a amoxicilina, ampicilina, penicilina, estreptomina y lincomicina en las cepas de *S. aureus* aisladas de las regiones en estudio (figura 1). Aunque para los otros antimicrobianos estos valores fueron menores a 25%, en la VR y RM hubo un mayor porcentaje de cepas resistentes a cefoperazona, ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina, gentamicina, oxitetraciclina y sulfadiazina+trimetoprim.

Para SCN (figura 2), destaca en ambas regiones la elevada proporción de cepas resistentes a lincomicina, observándose además resistencias superiores al 25% frente a amoxicilina, ampicilina y penicilina. Con respecto a los otros antimicrobianos, las cepas exhibieron resistencias menores al 25%, llamando la atención la gran diferencia

CUADRO 1. Distribución de patógenos mamarios aislados de mastitis bovina en la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y X Región (XR).**Pathogenic agents isolated from bovine mastitis in the 5th Region, Metropolitan Region (VR, RM) and Xth Region (XR).**

Patógenos	VR, RM		XR	
	Nº cepas	%	Nº cepas	%
<i>Escherichia coli</i>	183	40.76	40	3.95
<i>Enterobacter</i> spp	6	1.34	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	1.56	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp	3	0.67	-	-
Bacilos gramnegativos NT*	4	0.89	2	0.20
SCN**	72	16.04	271	26.78
<i>Staphylococcus aureus</i>	73	16.25	562	55.53
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8	1.78	8	0.79
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	43	9.58	33	3.26
<i>Streptococcus uberis</i>	15	3.34	35	3.46
<i>Streptococcus</i> spp	22	4.90	54	5.33
<i>Corynebacterium</i> spp	9	2.00	7	0.69
<i>Actinomyces pyogenes</i>	2	0.45	-	-
<i>Micrococcus</i> spp	2	0.45	-	-
Total	449	100.00	1.012	100.00

*NT: No tipificadas.

** SCN: *Staphylococcus coagulasa* negativo.**CUADRO 2. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM) de 635 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).****Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of 635 *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis in the Vth Region, Metropolitan Region (VR, RM) and Xth Region (XR).**

Agente antimicrobiano	(µg/ml)			
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rango	Punto de corte
Amoxicilina	0.125	1.0	0.06 - 4.0	0.5
Ampicilina	0.125	1.0	0.06 - 4.0	0.5
Cefoperazona	0.5	2.0	0.25 - 16.0	8.0
Cefquinoma	2.0	16.0	0.25 - 32.0	8.0
Ceftiofur	0.5	2.0	0.125- 16.0	8.0
Cloxacilina	0.25	1.0	0.125- 16.0	4.0
Enrofloxacino	0.125	0.5	0.06 - 8.0	2.0
Florfenicol	0.5	2.0	0.25 - 128.0	32.0
Gentamicina	1.0	4.0	0.25 - 32.0	16.0
Lincomicina	0.5	8.0	0.125- 16.0	2.0
Oxitetraciclina	2.0	4.0	0.5 - 64.0	16.0
Penicilina	0.25	1.0	0.062- 2.0	0.25
Pirlimicina	0.5	2.0	0.125- 16.0	4.0
Trimetoprim +Sulfametoxazol	0.25/4.75	1.0/19.0	0.25/4.75 a 8.0/152.0	4.0/76.0

CUADRO 3. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM) de 343 cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativo (SCN) aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of 343 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) strains isolated from mastitis in the the 5th Region, Metropolitan Region (VR,RM) and 10th Region (XR).

Agente antimicrobiano	(µg/ml)			
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rango	Punto de corte
Amoxicilina	0.25	2.0	0.125- 4.0	0.5
Ampicilina	0.125	1.0	0.06 - 4.0	0.5
Cefoperazona	0.25	1.0	0.125- 16.0	8.0
Cefquinoma	0.25	2.0	0.125- 32.0	8.0
Ceftiofur	0.25	2.0	0.125- 16.0	8.0
Cloxacilina	0.125	0.5	0.06 - 8.0	4.0
Enrofloxacino	0.25	1.0	0.125- 8.0	2.0
Gentamicina	0.50	4.0	0.25 - 64.0	16.0
Lincomicina	1.0	4.0	0.25 - 16.0	2.0
Oxitetraciclina	2.0	8.0	0.25 - 32.0	16.0
Penicilina	0.25	1.0	0.06 - 4.0	0.25
Pirlimycin	0.5	2.0	0.125- 16.0	4.0
Trimetoprim +Sulfametoxazol	0.25/4.75	1.0/19.0	0.125/2.38 a 4.0/76.0	4.0/76.0

CUADRO 4. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM) de 218 cepas de *Streptococcus spp.* aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of 218 *Streptococcus spp.* strains isolated from mastitis in the the 5th Region, Metropolitan Region (VR,RM) and 10th Region (XR).

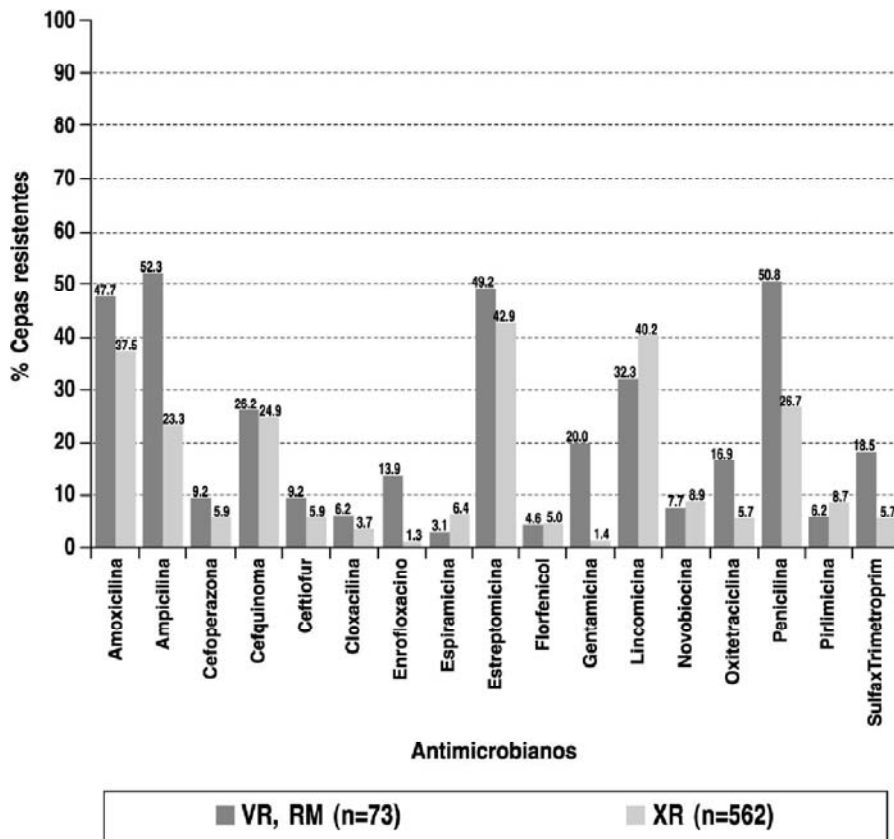
Agente antimicrobiano	(µg/ml)			
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rango	Punto de corte
Amoxicilina	2.0	16.0	0.5 - 64.0	8.0
Ampicilina	2.0	16.0	0.5 - 64.0	8.0
Cefoperazona	1.0	8.0	0.25 - 32.0	8.0
Cefquinoma	1.0	8.0	0.25 - 32.0	8.0
Ceftiofur	1.0	8.0	0.25 - 32.0	8.0
Enrofloxacino	0.5	4.0	0.25 - 8.0	2.0
Florfenicol	2.0	32.0	0.25 128.0	32.0
Lincomicina	1.0	4.0	0.25 - 8.0	1.0
Oxitetraciclina	1.0	16.0	0.25 - 64.0	8.0
Penicilina	1.0	8.0	0.25 - 64.0	4.0
Pirlimicina	0.5	2.0	0.062- 16.0	4.0
Trimetoprim +Sulfametoxazol	0.50/9.0	4.0/76.0	0.125/2.38 a 32.0/608.0	4.0/76.0

observada para enrofloxacino, donde alrededor del 22% de las cepas aisladas de la VR,RM presentaron resistencia, siendo inferior al 1% en la XR.

En el caso de las cepas de *Streptococcus spp.* (figura 3), se observó una mayor similitud en los porcentajes de resistencia entre regiones, frente a las diferentes drogas analizadas, siendo

**CUADRO 5. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM) de 223 cepas de *Escherichia coli* aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).
Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of 223 *Escherichia coli* strains isolated from mastitis in the the 5th Region, Metropolitan Region (VR, RM) and 10th Region (XR).**

Agente antimicrobiano	(µg/ml)			Punto de corte
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Rango	
Cefoperazona	0.5	2.0	0.125 - 32.0	8.0
Cefquinoma	0.5	2.0	0.125 - 32.0	8.0
Ceftiofur	1.0	8.0	0.125 - 32.0	8.0
Enrofloxacino	0.25	4.0	0.062 - 16.0	2.0
Florfenicol	1.0	8.0	0.25 - 64.0	32.0
Gentamicina	2.0	32.0	0.5 - 128.0	16.0
Neomicina	1.0	4.0	0.25 - 16.0	16.0
Oxitetraciline	2.0	32.0	0.25 128.0	16.0
Trimetoprim +Sulfametoxazol	0.125/2.38	0.5/9.5	0.063/1.20 a 2.0/38.0	4.0/76.0



**FIGURA 1. Resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).
Resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis in dairy farms of the Vth Region, Metropolitan Region (VR, RM) and Xth Region (XR).**

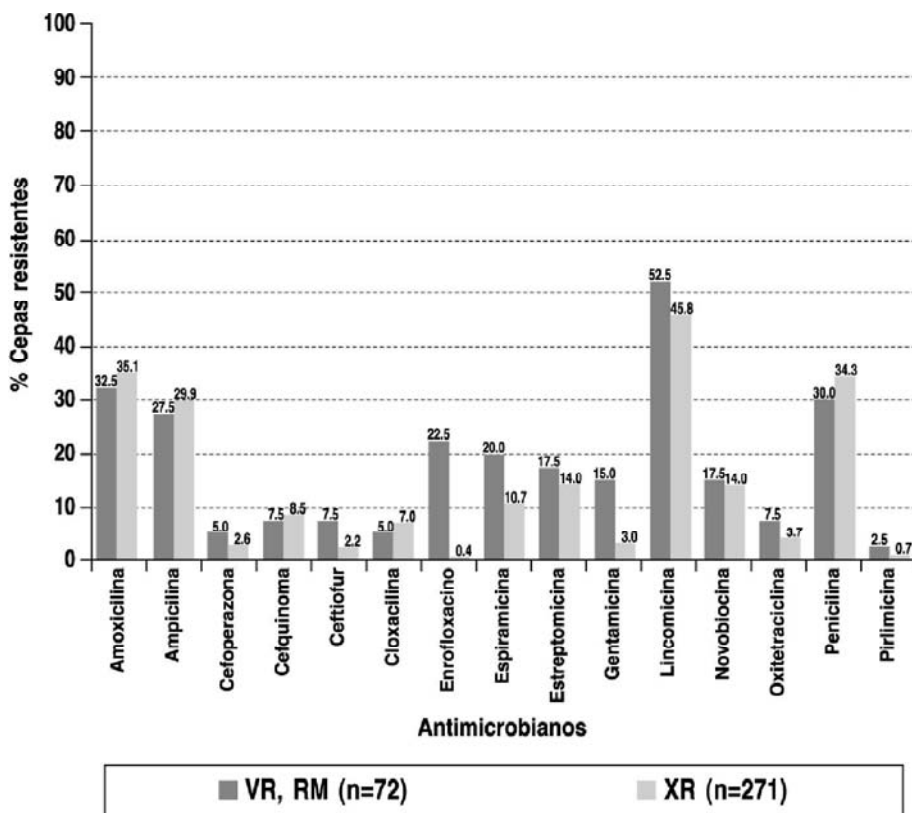


FIGURA 2. Resistencia en cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativo aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).

Resistance of *Staphylococcus* coagulase negative strains isolated from mastitis in dairy farms of the Vth Region, Metropolitan Region (VR, RM) and Xth Region (XR).

muy elevados para estreptomina (88.8 y 70.0%) y lincomicina (66.3 y 58.5%), en la VR, RM y XR, respectivamente.

Respecto a las cepas de *E. coli* (figura 4), es importante destacar la alta sensibilidad a sulfadiazina+trimetoprim detectada en ambas regiones y a neomicina en la VR, RM. En general, estos aislados presentaron bajos porcentajes de resistencia al resto de los antimicrobianos analizados en ambas regiones, considerando que ninguno sobrepasó el 25%. Sin embargo, la resistencia a enrofloxacin, gentamicina y oxitetraciclina fue mayor en la VR y RM, mientras que para cefquinoma resultó más elevada en la XR.

DISCUSION

El análisis de los resultados obtenidos respecto a frecuencia y distribución de los patógenos mamarios, aislados en los rebaños lecheros de las regiones geográficas en estudio, revela que no se han producido cambios importantes en los últimos años, de acuerdo a lo descrito previamente por otros autores (Kruze y col., 1986; Zurita, 1988; San Martín y col., 1991; Donoso, 1997; León, 1997). En consecuencia, es posible afirmar que en la zona central del país predomina la mastitis ambiental causada, principalmente, por *E. coli*; en cambio, en la zona sur son más frecuentes la mastitis

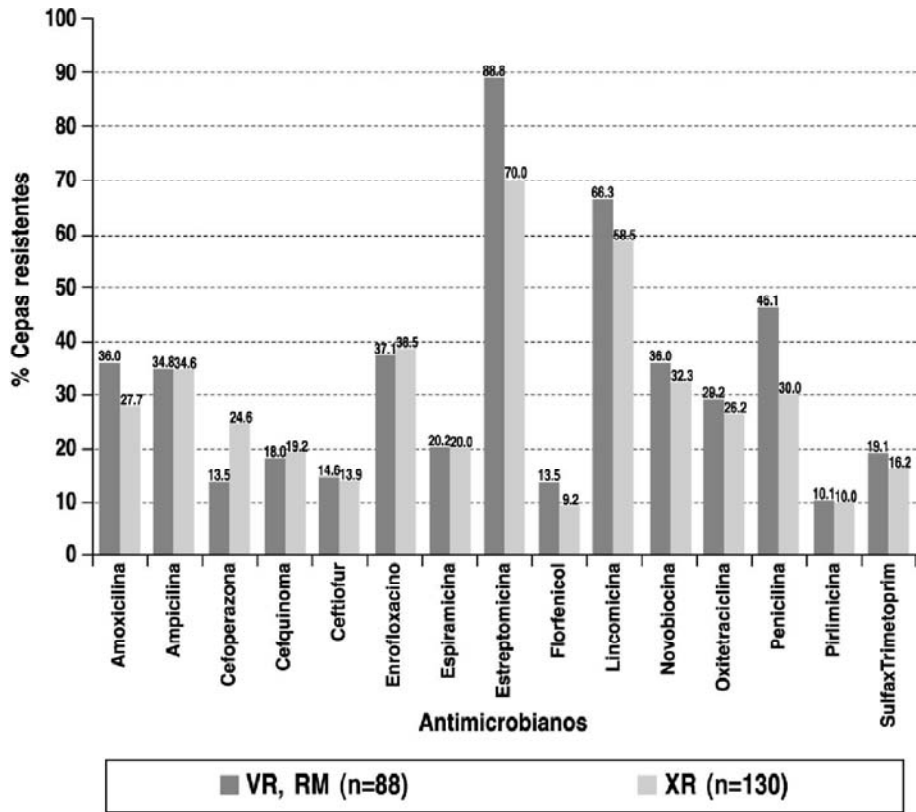


FIGURA 3. Resistencia en cepas de *Streptococcus spp* aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).
Resistance of *Streptococcus spp* strains isolated from mastitis in dairy farms of the Vth Region, Metropolitan Region (VR, RM) and Xth Region (XR).

contagiosas, cuyo principal agente etiológico es *S. aureus*. Estos antecedentes tienen gran importancia práctica, puesto que permiten definir mejor las medidas de control que se requieren en ambas regiones, incluidas en éstas la terapéutica antimicrobiana.

Atendiendo a su frecuencia, en ambas regiones la mastitis por *Streptococcus spp* podría calificarse como de importancia secundaria. Llama la atención el alto porcentaje de infecciones por SCN, situación que viene ocurriendo desde hace varios años en Chile (Saá y Kruze, 1995; León 1997) y también ha sido señalada en otros países como Finlandia, Brasil y Bélgica (Devriese y col., 1994; Mylly y col.,

1998; Costa y col., 2000). Al respecto, diferentes investigadores sostienen que el rol de los SCN como agentes etiológicos de mastitis bovina no está completamente claro, ya que, por un lado, incrementan el recuento de células somáticas en la glándula mamaria, alterando la calidad de la leche y, por otro, contribuyen a mantener elevada la barrera leucocitaria previniendo la colonización de otros patógenos mamarios (Mathews y col., 1991, Nickerson y Boddie, 1994). También se ha descrito que la mayoría de las mastitis por SCN son más leves y con mayores probabilidades de ser tratadas exitosamente, en comparación a las causadas por *S. aureus* (Pyörälä y Pyörälä, 1994), aunque

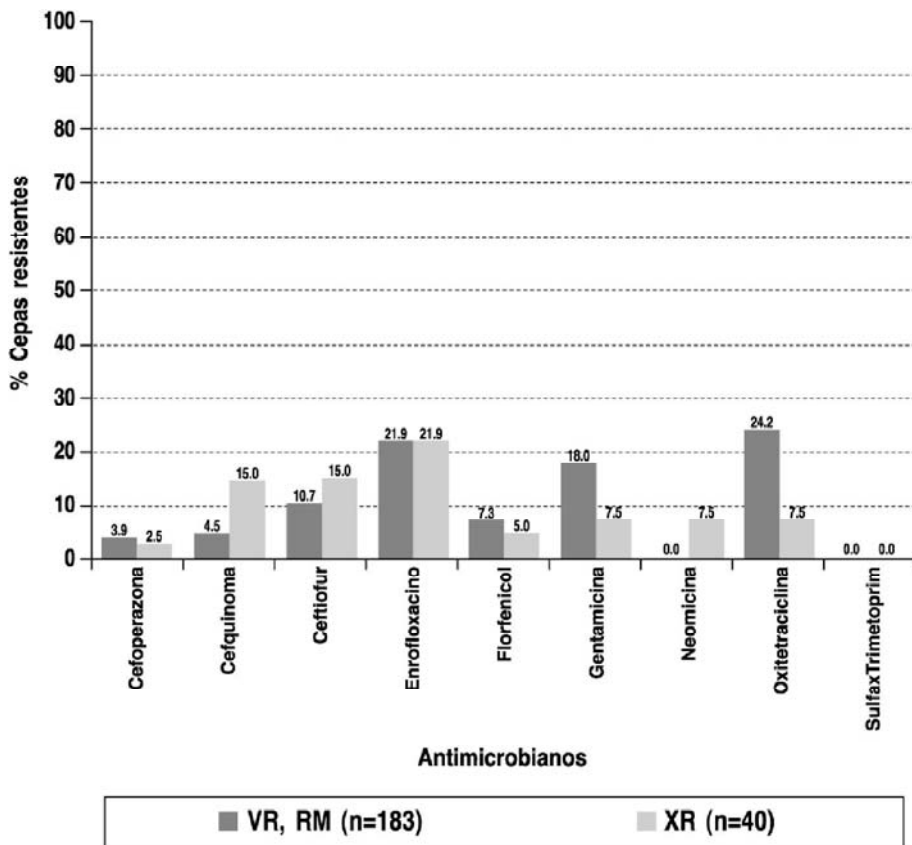


FIGURA 4. Resistencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de mastitis en predios lecheros de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y Décima Región (XR).

Resistance of *Escherichia coli* strains isolated from mastitis in dairy farms of the Vth Region, Metropolitan Region (VR, RM) and Xth Region (XR).

algunas especies de SCN pueden ser más patógenas que *S. aureus* (Saá y Kruze, 1995).

En relación a los resultados de sensibilidad, es importante destacar el alto porcentaje de resistencia a más de un antimicrobiano, observada en las cepas grampositivas (figuras 1,2 y 3). Esta situación era previsible ya que en Chile, a pesar que existen estudios locales de sensibilidad (San Martín y col.,1991; Borie y col., 1993; León, 1997; San Martín y col., 2001), no hay programas organizados de monitoreo de la resistencia a antimicrobianos en medicina veterinaria como ocurre en otros países. Al respecto, en los países miembros de la Unión Europea, con el fin de disminuir este factor de riesgo, se han instaurado

programas permanentes de monitoreo de resistencia en todas las especies animales productoras de alimentos, y los resultados emanados de ellos son informados periódicamente a instituciones gubernamentales y privadas. La importancia de tales programas, radica en que permite adoptar medidas para evitar que la resistencia vaya en aumento. Existen suficientes antecedentes que demuestran que las bacterias son capaces de generar mecanismos de defensa frente a una exposición permanente a un determinado antimicrobiano; cuando se dejan de exponer las bacterias a ese fármaco, por presión selectiva dejan de crecer las resistentes, exacerbándose las bacterias sensibles a otros

antimicrobianos (Aarestrup y col., 1998; Bager, 2000; Caprioli y col., 2000; Martel y col., 2000).

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud, señala que la antibioco-resistencia debe ser considerada un problema grave, complejo y de repercusión internacional, recomendando poner en marcha un sistema globalizado de vigilancia de la resistencia bacteriana tanto en medicina humana y como en veterinaria (WHO, 2000).

Al analizar la resistencia de cada especie bacteriana a los antimicrobianos de uso habitual en nuestro país, es interesante señalar que, en general, en ambas regiones las bacterias grampositivas (*Streptococcus* spp, *S. aureus* y SCN), presentaron elevada resistencia frente a ampicilina, amoxicilina y penicilina, determinándose los valores mayores en las cepas de *S. aureus*. Estos resultados no difieren de los observados a nivel internacional (Watts y Salmon, 1997; Myllys y col., 1998; Costa y col., 2000; Gentilini y col., 2000), y corroboran que las bacterias, mediante inactivación enzimática (como las betalactamasas entre otras), pueden generar resistencia no sólo a un antibiótico sino a un grupo de ellos con estructura química común, como es el caso de los betalactámicos, cuya estructura básica es el anillo tiazolidina unido a otro anillo β -lactámico (Goodman y Gilman, 1996).

Otro antimicrobiano importante de analizar frente a las cepas grampositivas es lincomicina, ya que en ambas regiones geográficas se observaron elevados porcentajes de resistencia. Al respecto, Prescott y Baggot (1993) señalan que en los microorganismos aparece resistencia cromosómica con bastante facilidad y en forma gradual a las lincosamidas. Por otro lado, debe recordarse que en nuestro país, este antibiótico se ha utilizado por más de una década, como una de las principales alternativas terapéuticas frente a las mastitis agudas producidas por estos microorganismos patógenos, pudiendo también explicarse estos resultados por una presión de selección.

En relación a la cloxacilina, antibiótico de primera elección frente a cepas de *S. aureus* betalactamasa positivas, si bien a nivel

internacional se ha descrito una sensibilidad de 100% (Watts y Salmon, 1997; Gentilini y col., 2000), llama la atención que en este estudio se encontraron cepas resistentes (6.2% en VR y RM y 3.7% en XR, figura 1), situación también señalada a nivel nacional en medicina humana (Trucco y col., 2000). Esto, podría explicarse por una presión de selección ante el uso masivo de la droga, ya que en nuestro país, hasta la fecha no existe restricción del uso de estos fármacos en medicina veterinaria, situación que recién a fines del año 1999 comienza a ser controlada en medicina humana a través del uso de receta obligatoria.

Al igual que lo descrito en Estados Unidos (Brown y Scasserra, 1990; Owens y col., 1990), en ambas regiones geográficas en estudio se observó un alto porcentaje de resistencia en las cepas de *Streptococcus* spp frente a estreptomycin. La resistencia adquirida a esta droga es muy frecuente en las bacterias patógenas de origen animal, debido a la gran facilidad con que ocurren mutaciones cromosómicas después de unos pocos días de iniciado un tratamiento (Prescott y Baggot, 1993). Similar a lo ocurrido con lincomicina, esta situación también podría deberse al uso terapéutico por más de una década de la asociación penicilina-estreptomycin en los rebaños bovinos, originando una presión de selección que agrava la situación.

En general, las cepas de *E. coli* aisladas en este estudio, presentaron una mayor sensibilidad en relación a las cepas grampositivas, no observándose resistencias superiores al 25% frente a cada antimicrobiano analizado (figura 4).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran claramente que la terapia antimicrobiana en ganado lechero de nuestro país no está ajena a la problemática mundial de la resistencia bacteriana denunciada por la OMS (WHO, 2000). Además, refuerzan la conveniencia de establecer, en el corto plazo, una racionalización y control del uso de esta importante herramienta terapéutica, mediante la introducción obligatoria de la receta médico veterinaria, además de la implementación de programas permanentes de monitoreo de

resistencia bacteriana a nivel nacional. Al respecto, Aarestrup (1999) señala que los mayores niveles de resistencia se pueden observar en países donde no existen políticas de restricción en el uso de estos fármacos, como es también el caso de Argentina (Gentilini y col., 2000), Brasil (Costa y col., 2000) y Finlandia (Myllys y col., 1998).

RESUMEN

La quimioterapia antimicrobiana en medicina humana y veterinaria es la principal herramienta terapéutica frente a los microorganismos patógenos causantes de enfermedades infecciosas; sin embargo, con el transcurrir de los años se ha observado la aparición de cepas multiresistentes. Dentro de las medidas utilizadas a nivel mundial para enfrentar este riesgo, están el uso de antimicrobianos bajo receta veterinaria, la rotación en el uso de estos fármacos y la instauración de programas permanentes de monitoreo de la resistencia bacteriana. Este trabajo forma parte de un proyecto de farmacovigilancia de resistencia bacteriana en el ganado lechero, cuyo objetivo fue determinar la sensibilidad en bacterias patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana (VR, RM) y X Región (XR), frente a los antimicrobianos utilizados con mayor frecuencia en lecherías del país. Para evaluar la resistencia bacteriana, se utilizó el Método de Dilución en Placa con el fin de determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cada cepa bacteriana. En la VR, RM a partir de 963 muestras de leche, se lograron aislar 449 cepas bacterianas, observándose un fuerte predominio de *E. coli* (40.76%). En la XR, de 2.000 muestras se aislaron 1.012 cepas, observándose un claro predominio de *S. aureus* (55.53%). Las bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp y *Staphylococcus coagulasa negativo*) presentaron altos porcentajes de resistencia (> 25%), frente a amoxicilina, ampicilina, penicilina, estreptomycin y lincomicina. Para *S. aureus*, un 6.15% y 3.74% de las cepas aisladas de la

VR, RM y XR respectivamente, mostraron resistencia a cloxacilina. Las cepas de *E. coli* presentaron una mayor sensibilidad, no observándose resistencias superiores al 25%. De los resultados se puede concluir también que las bacterias causantes de mastitis en las regiones en estudio presentan resistencia a más de un antimicrobiano, siendo recomendable que la adquisición de estos fármacos se realice a través de receta veterinaria, instaurando además programas permanentes de monitoreo de resistencia bacteriana en nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar sus agradecimientos a los Médicos Veterinarios asesores de los planteles lecheros, cuya valiosa colaboración resultó fundamental para la programación y cumplimiento del plan de muestreo. Además, agradecen a Cooprinsem el apoyo prestado a través de su Laboratorio Bacteriológico.

BIBLIOGRAFIA

- AARESTRUP, F. M. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 12: 279-285.
- AARESTRUP, F. M., F. BAGER, N. E. JENSEN, M. MADSEN, A. MEILYNG, H. C. WEGENER. 1998. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *APMIS* 106: 745-770.
- ALTREUTHER, P., A. BOTTNER, M. SCHEER, P. SCHMID, W. TRAEGER, S. WEISKOPF. 1997. Observations on resistance monitoring in animal health. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 110: 418-421.
- BAGER, F. 2000. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 271-274.
- BORIE, C., B. SAN MARTÍN., D. GUERRA., L. ZURICH. 1993. Estudio de sensibilidad frente a diferentes antibióticos y concentraciones mínimas

- inhibitorias de 3 cefalosporinas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de mastitis séptica bovina. *Av. Cs. Vet.* 8: 134-137.
- BROWN, M. B., A. E. SCASSERRA. 1990. Antimicrobial resistance in streptococcal species isolated from bovine mammary glands. *Am. J. Vet. Res.* 51: 2015-2028.
- CAPRIOLI, A., L. BUSANI, J. L. MARTEL, R. HELMUTH. 2000. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological methodologies. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 295-301.
- COSTA, E. O., N. R. BENITES, J. L. GUERRA, P. A. MELVILLE. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 47: 99-103.
- COCHRAN, W. G. 1963. Sampling techniques. 2nd ed. John Wiley and Sons. New York. USA. 411 p.
- DeGRAVES, F., J. FETROW. 1993. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9: 421-434.
- DEVRIESE, L. A., H. LAEVEENS, F. HAESEBROUCK, J. HOMMEZ. 1994. A simple identification scheme for coagulase negative staphylococci from bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 57: 240-244.
- DONOSO, M. 1997. Mastitis clínica: Determinación de la flora microbiana patógena en vacas de lechería de la Región Metropolitana. Memoria M.V., Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Santiago, Chile. 67 p.
- FIL/IDF. 1981. Laboratory Methods for Use in Mastitis Work. International Dairy Federation, IDF Bull. 132. Brusels, Belgium.
- GENTILINI, E., G. DENAMIEL, P. LLORENTE, S. GODALY, M. REBUELTO, O. DeGREGORIO. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 83: 1224-1227.
- GOODMAN, L., A. GILMAN. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9^a ed. McGraw-Hill Interamericana, México DF, México. Vol. II. 1996 p.
- HEISIG, P., B. KRATZ, E. HALLE, Y. GRASER, M. ALTWEGG, W. RABSCH, J. P. FABER. 1995. Identification of DNA gyrase A mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microb. Drug Res.* 1: 211-218.
- HOBLET, K. H., G. D. SCHNITKEY, D. ARBAUGH, J. S. HOGAN, K. L. SMITH. 1991. Economics of clinical mastitis. 30th Annual Meeting NMC. Reno, Nevada, USA. February 11-13, 1991. National Mastitis Council (NMC). pp. 24-30.
- KRUZE, J., E. CHAHUAN, V. GONZALEZ, A. SANTOS. 1986. Mastitis clínica. I. Estudio bacteriológico en rebaños bovinos de leche de la provincia de Osorno. VI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile. Resumen SA-025.
- LEON, B. 1997. Frecuencia de aislamiento de los principales agentes de mastitis en el sur de Chile. II Seminario Calidad de Leche Bovina. Osorno, Chile. 15-16 Julio 1997. Colegio Médico Veterinario de Chile. Consejo Regional Osorno. pp. 34-44.
- MARTEL, J. L., F. TARDY, A. BRISABOIS, R. LAILLER, M. COUDERT, E. CHASLUS-DANCLA. 2000. The French antibiotic resistance monitoring programmes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14: 275-283.
- MATTHEWS, K. R., R. J. HARMON, B. E. LANGLOIS. 1991. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococci infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. *J. Dairy Sci.* 74: 1855-1859.
- MOLBAK, K., D. L. BAGGESEN, F. M. AARESTRUP. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. *New Engl. J. Med.* 341: 1420-1425.
- MORAGA, L. 1988. Pérdidas económicas atribuibles a las mastitis. Curso Mastitis Bovina y su Impacto Económico. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. pp. 146-153.
- MORSE, D. 1991. Effective use of mastitis records as a management tool. 30th Annual Meeting NMC. Reno, Nevada, USA. February 11-13, 1991. National Mastitis Council (NMC). pp. 31-39.
- MYLLYS, V., K. ASPLUND, E. BROFELDT, V. HIRVELA-KOSKI, T. HONKANEN-BUZALSKI, J. JUNTILA, L. KULKAS, O. MYLLYKANGAS, M. NISKANEN, H. SALONIEMI, M. SANDHOLM, T. SARANPAA. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1998 and 1995 – changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.* 39: 119-126.
- NCCLS, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 1999. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically-Third Edition; Approved Standard. NCCLS Document M7-A3, Volume 13, Number 25.

- NMC, NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. National Mastitis Council, Inc., Arlington, VA, USA.
- NICKERSON, S. C., R. L. BODDIE. 1994. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 77: 2526-2536.
- OWENS, W. E., J. L. WATTS, B. B. GREENE, CH. RAY. 1990. Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against streptococci isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 73: 1225-1231.
- PEDRAZA, C. 1991. Efecto de la mastitis clínica sobre la producción de leche. *Agric. Técnica* (Chile) 51: 298-305.
- PRESCOTT, J. F., J. D. BAGGOT. 1993. *Terapéutica antimicrobiana veterinaria*. 2ª ed. Acribia S.A., Zaragoza, España. 409 p.
- PYÖRÄLÄ, S., E. PYÖRÄLÄ. 1994. Efficacy of bovine clinical mastitis therapy during lactation. Proceedings and Abstracts XVII Nordic Veterinary Congress. The Icelandic Veterinary Association; Reykjavik, Iceland. pp. 42-45.
- SAÁ, E., J. KRUZE. 1995. Factores de virulencia de *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) de origen humano y bovino. *Rev. Lat.-amer. Microbiol.*, 37:201-208.
- SAN MARTIN, B., C. BORIE, L. ZURICH. 1991. Estudio de resistencia bacteriana frente a diferentes antibióticos utilizados en mastitis clínica bovina. *Monogr. Med. Vet.* 13: 49-52.
- SAN MARTIN, B., H. CAÑON, D. IRAGÜEN, S. ESPINOZA, J. LILLO. 2001. Depletion study of trimethoprim and sulphadiazine in milk and its relationship with mastitis pathogenic bacteria strains minimum inhibitory concentrations (MICs) in dairy cows. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 24: 1-6.
- STEPHAN, R., P. RUSCH. 1997. Current resistance status of *Escherichia coli* strains from bovine mastitis milk samples. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 139: 495-499.
- TRUCCO, A., V. PRADO, M. C. DIAZ, A. OJEDA y GRUPO PRONARES. 2000. 24 meses de vigilancia de patógenos asociados a bacteremias y su patrón de resistencia a antimicrobianos. Programa de Vigilancia PRONARES. XVII Congreso Chileno de Infectología. Viña del Mar, Chile, Resumen p-86
- WATTS, J. L., S. A. SALMON, R. S. YANCEY, S. C. NICKERSON, L. J. WEAVER, C. HOEMBERG, J. W. PANKEY, L. K. FOX. 1995. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 78: 1637-1648.
- WATTS J. L., S. A. SALMON. 1997. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta-lactamase. *J. Dairy Sci.* 80: 788-791.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2000. Overcoming antimicrobial resistance. WHO. Geneva, Switzerland. 67 p. (World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000).
- ZURITA, L. 1988. Mastitis bovina: situación nacional. *Patol. Anim.* 2: 36-41.