

## Resistencia antibiótica de estafilococos aislados de leche de vacas del municipio de Maravatio Michoacán

### Antibiotic resistance of staphylococci isolated from the milk of cows from the municipality of Maravatio Michoacán

BEDOLLA, Jose Luis Carlos\*†, LUCIO, Rodolfo, CRUZ, Angel Raul

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

ID 1<sup>er</sup> Autor: Jose Luis Carlos, Bedolla / ORC ID: 0000-0002-2485-5615

ID 1<sup>er</sup> Coautor: Rodolfo, Lucio / ORC ID: 0000-0002-0535-3652, Researcher ID Thomson: X-2391-2018

ID 2<sup>do</sup> Coautor: Angel Raul, Cruz / ORC ID: 0000-0001-9809-1323, Researcher ID Thomson: S-4975-2918

Recibido 10 de Marzo, 2018; Aceptado 30 de Junio, 2018

#### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar la resistencia antibiótica de estafilococos aislados de leche de vacas del municipio de Maravatio, Michoacán. El presente trabajo se realizó de septiembre de 2016 a enero de 2017, con 64 hatos lecheros del municipio de Maravatio, Michoacán. Se obtuvieron 64 muestras de leche de igual número de hatos del municipio antes mencionado. La identificación de los estafilococos se llevó a cabo a través de su morfología colonial, prueba de catalasa, tinción Gram, prueba de coagulasa, prueba de manitol, gelatina y hemólisis. La prueba de susceptibilidad antibiótica se llevó a cabo a través del método de difusión en disco en agar Mueller-Hinton con 34 cepas de estafilococos, 25 (73.5%) de *Staphylococcus aureus*, y 9 (26.5%) de Estafilococos Coagulasa Negativos (*S. epidermidis*). Se encontró que de los 25 aislamientos de *S. aureus*, el 100% presentaron resistencia múltiple, al ser resistentes a los 12 antibióticos probados. Observándose mayor resistencia frente a Penicilina, Ampicilina y Trimetropin-Sulfametoxasol (92%, 92% y 60% respectivamente) seguido por un 52% de resistencia a dicloxacilina. En cuanto a los 9 aislamientos de ECN, el 100% de estos presentaron también resistencia múltiple al igual que el *S. aureus* pero en menor proporción (Penicilina 67%, Ampicilina 67% y Dicloxacilina 45%). Sin embargo, resultaron ser más susceptibles a la vez a los 12 antibióticos probados. Se concluye que la Penicilina, Ampicilina y Dicloxacilina fueron los antibióticos a los cuales presentaron mayor resistencia tanto los *Staphylococcus aureus*, como los Estafilococos Coagulasa Negativos.

**Resistencia antimicrobiana, Estafilococos, *Staphylococcus aureus*, Estafilococos Coagulasa Negativos, *Staphylococcus epidermidis*.**

#### Abstract

The objective of the present work was to determine the antibiotic resistance of isolated staphylococci from cows milk of the municipality of Maravatio, Michoacán. The present work was carried out from September 2016 to January 2017, with 64 dairy herds from the municipality of Maravatio, Michoacán. 64 milk samples were obtained from the same number of herds of the aforementioned municipality. The identification of staphylococci was carried out through their colonial morphology, catalase test, Gram stain, coagulase test, mannitol test, gelatin and hemolysis. The antibiotic susceptibility test was carried out using the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar with 34 staphylococcal strains, 25 (73.5%) of *Staphylococcus aureus*, and 9 (26.5%) of Coagulase Negative Staphylococci (*S. epidermidis*). It was found that of the 25 isolates of *S. aureus*, 100% had multiple resistance, being resistant to the 12 antibiotics tested. Observing greater resistance to Penicillin, Ampicillin and Trimetropin-Sulfamethoxazole (92%, 92% and 60% respectively) followed by a 52% resistance to dicloxacillin. As for the 9 isolates of ECN, 100% of these also showed multiple resistance as did *S. aureus* but in a lesser proportion (Penicillin 67%, Ampicillin 67% and Dicloxacillin 45%). However, they turned out to be more susceptible at the same time to the 12 antibiotics tested. It is concluded that Penicillin, Ampicillin and Dicloxacillin were the antibiotics to which both *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci showed greater resistance.

**Antimicrobial resistance, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus Coagulase Negatives*, *Staphylococcus epidermidis***

**Citacion:** BEDOLLA, Jose Luis Carlos, LUCIO, Rodolfo, CRUZ, Angel Raul. Resistencia antibiótica de estafilococos aislados de leche de vacas del municipio de Maravatio Michoacán. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias. 2018, 5-15: 1-5.

\*Correspondencia del Autor (Correo electrónico: dr.rlucio@hotmail.com)

†Investigador contribuyendo como primer Autor.

## Introducción

Los *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) son el principal objeto de estudio sobre la resistencia a los antimicrobianos en mastitis subclínica debido a su importancia y a la elevada frecuencia de aislamiento de cepas resistentes a Meticilina. Sin embargo, en la actualidad la incidencia de mastitis causada por Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) ha aumentado sustancialmente (Torutoglu *et al.*, 2006), debido al deficiente manejo, condiciones higiénicas y el control de los patógenos contagiosos en las explotaciones bovinas.

Los estafilococos también desarrollan resistencia a ciertos antimicrobianos como la eritromicina, ampicilina, penicilina y tetraciclinas, ya que participan en las infecciones más comunes en los hatos con mastitis subclínica. Las pruebas de susceptibilidad a dichos antimicrobianos en las especies de ECN, se deben al incremento de la resistencia a la penicilina y eritromicina cuando se aplican en el tratamiento de los hatos de ganado bovino (Álvarez *et al.*, 2008), cuyo propósito es enfrentar la problemática del uso inadecuado de los antimicrobianos aplicados contra los *S. aureus* y los ECN.

Lo anterior, también es debido al uso indiscriminado de antimicrobianos en algunos países, los cuales no son recetados por un Médico Veterinario y esto ha conllevado a un aumento en el porcentaje de especies bacterianas resistentes a diversos agentes antimicrobianos. 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 (Becerra, *et al.*, 2009). En México y Michoacán, la resistencia bacteriana también 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. Lo cual viene a favorecer el desarrollo de la resistencia en el ganado bovino.

## Objetivo

Determinar la resistencia antibiótica de estafilococos aislados de leche de vacas del municipio de Maravatio, Michoacán.

## Material y método

El presente trabajo se realizó durante el periodo de septiembre de 2012 a enero de 2013 en 17 hatos lecheros de Tájaro, Michoacán, los cuales contaban con un promedio de 8 vacas por establo. La mastitis subclínica se determinó mediante la prueba de California de acuerdo con Wolter *et al.* (2004), se obtuvieron 408 muestras de 102 vacas. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se llevó a cabo en 102 cepas de estafilococos (41 *S. aureus* y 61 Estafilococos Coagulasa Negativos) aislados de muestras de leche que se obtuvieron de los casos de mastitis subclínica de los hatos lecheros de Tájaro Michoacán. La identificación de los estafilococos se llevó a cabo de acuerdo con Sears y McCarthy (2003), es decir, a través de su morfología colonial, prueba de catalasa, tinción Gram, prueba de coagulasa, prueba de manitol gelatina y hemólisis.

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana, fue realizada utilizando el método de difusión en disco en Agar Mueller-Hinton (Oxoid) de acuerdo con Torutoglu *et al.* (2006). Diez colonias colocadas en medio agar sangre, e incubadas a 37°C durante 18 horas, fueron suspendidas en 2 ml de solución salina estéril a una densidad aproximadamente igual a la densidad del estándar 0.5 de McFarland. Un hisopo estéril seco de algodón fue colocado en la suspensión, enseguida se quitó el exceso de caldo presionando y girando el hisopo contra el interior del tubo.

La suspensión bacteriana fue inoculada sobre el agar Mueller-Hinton con el hisopo estéril de tal manera que la superficie entera del agar quedo cubierta. Posteriormente los discos que contenían los siguientes antimicrobianos: ampicilina (Bio-Rad, 10 µg), cefalotina (Bio-Rad, 30 µg), cefotaxima (Bio-Rad, 30 µg), ceftazidima (Bio-Rad, 30 µg), cefuroxime (Bio-Rad, 30 µg), Dicloxacilina (Bio-Rad, 1 µg), eritromicina (Bio-Rad, 15 µg), gentamicina (Bio-Rad, 10 µg), pefloxacina (Bio-Rad, 5 µg), penicilina (Bio-Rad, 10 U).

Tetraciclina (Bio-Rad, 30 µg), y trimetoprim/sulfametoxazol (Bio-Rad, 25 µg) fueron colocados en la superficie del medio e incubados aerobícamente a 37°C por 18 horas. Los resultados fueron registrados como sensibles o resistentes por el diámetro del halo de inhibición de acuerdo a los estándares interpretativos del NCCLS. La cepa de referencia utilizada para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana fue la ATCC 25923 de *S. aureus*.

## Resultados y discusión

De las 64 muestras de leche cruda recogida a nivel del bote de recepción de leche del ganado bovino del municipio de Maravatio, Michoacán., se aislaron 34 bacterianas, 25 (73.5%) de *Staphylococcus aureus*, y 9 (26.5%) de Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) (*S. epidermidis*). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en diversas investigaciones realizadas en la región (Patiño, 2008; Bedolla, 2011; Rodríguez, 2012), donde se ha reportado al *Staphylococcus aureus* y a los ECN como los principales agentes etiológicos en la producción de mastitis subclínica.

De los 25 aislamientos de *S. aureus*, el 100% presentaron resistencia múltiple, al ser resistentes a los 12 antimicrobianos probados. Ocasionalmente en medicina veterinaria se reportan aislamientos de cepas multiresistentes de *S. aureus*. La importancia de estas cepas radica en que pueden ser transmitidas al humano a través del consumo de leche o de quesos elaborados con leche cruda, práctica muy común en el país (Faria *et al.*, 2005).

Los porcentajes de susceptibilidad y resistencia de *S. aureus* frente a los 12 antimicrobianos probados. La mayor resistencia se observó frente a penicilina, ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol (92%, 92% y 60% respectivamente) seguido por un 52% de resistencia a dicloxacilina, 40% a eritromicina y gentamicina, 32% a cefuroxima y ceftazidima, 24% a cefalotina, 20% a pefloxacina, 16% a cefotaxima y 12% a tetraciclina.

En cuanto a la susceptibilidad se observa a cefalotina (76%), pefloxacina (76%), y ceftazidima (68%).

Estos resultados se encuentran por encima de lo reportado por Valero *et al* (2010), quienes aislaron cepas de *S. aureus* en leche de tanque resistentes en un 28.6% a penicilina. Asimismo, se encuentra por encima de lo reportado por Peles y col. (2007) en un estudio realizado en Hungría, quienes encontraron en cepas de *S. aureus* aisladas en leche de tanque un 20% de resistencia para penicilina, y por lo reportado por en Italia por Normanno y col. (2007) obtuvieron el mayor porcentaje de resistencia frente a ampicilina (55,8%). Por su parte, Sato y col. (2004) en cepas de *S. aureus* aisladas en leche de tanque en Wisconsin (EUA), observaron resistencia frente a penicilina, eritromicina, sulfametoxazol y trimetoprim, lo cual concuerda con este estudio.

Estudios realizados en diferentes países sobre sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus* de origen bovino, han revelado que la mayor resistencia de este microorganismo se presenta contra los antibióticos betaláctamicos y aminoglucósidos y en menor proporción contra macrólidos, lincosamina/clindamicina, tetraciclina y sulfonamidas (Valero *et al.*, 2010).

De los 9 aislamientos de ECN, el 100% de estas fueron resistentes en menor proporción, pero más susceptibles a la vez a los 12 antimicrobianos probados. Lo anterior concuerda con lo encontrado por Faria *et al.* (2005) el cual reporta que todos los aislamientos (51) fueron susceptibles a los 12 antimicrobianos probados. El porcentaje de resistencia encontrado en este estudio fue más alto al compararlo con lo reportado por Faría *et al.* (2005), quienes aislaron 20 cepas de ECN en leche recolectada a nivel de Cántara en el estado Zulia, las cuales se caracterizaron por ser todas multiresistentes.

Los ECN se han caracterizado por ser resistentes a más de un agente antimicrobiano, y poco susceptibles a los antibióticos cuando se comparan con los Estafilococos Coagulasa Positivos (Faria *et al.* 2005), condición que dificulta el tratamiento de los procesos infecciosos que ocasionan. En el mismo cuadro 1 también se muestran los resultados de la prueba de sensibilidad de los ECN frente a los antimicrobianos probados. La mayor resistencia de los ECN se observó frente a ampicilina (88.9%) y penicilina (66.7%).

En otros países latinoamericanos como Chile y Argentina, se han reportado resultados más bajos (25 y 27,6%, respectivamente) a los obtenidos en la presente investigación en cuanto a la resistencia de ECN a penicilina. También se observó resistencia frente a dicloxacilina (44.4%), cefalotina, eritromicina, trimetropin-sulfametoxazol y gentamicina (33.3%) respectivamente, cefuroxima (22.2%) y 11.1% respectivamente a pefloxacina, cefotaxima, ceftazidima y tetraciclina, los cuales son similares a lo reportado en otros estudios. Los aislamientos de ECN en este estudio se presentaron susceptibles a ceftazidima (88.9%), pefloxacina (77.8%), 66.7% a cefalotina, cefotaxima, tetraciclina y gentamicina, 55.6% a cefuroxima; 44.5% a eritromicina, trimetropin-sulfametoxazol y dicloxacilina; 33.3 a penicilina y 11.1% a la ampicilina. La literatura describe que a estos antibióticos son sensibles la mayoría de los ECN *in vitro* (Faria *et al.*, 2005).

Estos resultados evidencian la importancia de realizar la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos, previo a la aplicación del tratamiento, debido a las variaciones de patrones de sensibilidad de las cepas aisladas de una granja a otra y en diferentes sectores dentro de un mismo estado.

### Conclusiones

Se concluye que los aislamientos de *S. aureus*, y de Estafilococos Coagulasa Negativos, provenientes de leche del bote de recepción, fueron susceptibles a todos los agentes antimicrobianos, siendo la resistencia a ampicilina, penicilina y dicloxacilina los mayores fenotipos de resistencia observados, por lo cual la multiresistencia debe ser considerada un problema grave, complejo y de repercusión internacional, por ello se recomienda poner en marcha un sistema globalizado de vigilancia de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. La información obtenida aporta datos relevantes, como consecuencia del escaso número de trabajos en nuestro país sobre estudios de leche del bote contenedor. Y con ello el riesgo latente por parte de la población al consumir productos lácteos elaborados a partir de leche cruda, los cuales pueden contener bacterias resistentes a antibióticos y ser transmitidas al hombre durante su consumo.

### Referencias

Becerra, G., Plascencio, A., Luévanos, A., Domínguez, M. y Hernández, I. 2009. Mecanismos de resistencia a antibacterianos en bacterias. Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas. 167pp.

Bedolla, G. E. A. 2011. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* aislados de leche de vacas con mastitis de Téjaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Faría, R. J. F., Valero-Leal, K., D'Pool, G., García, A., Allara, M. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito., Vol. XV, No. 003. Rev. Científica. FCV-Luz. Maracaibo. 15 (3): 227-234

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). 2002. Anuario Estadístico del Estado de Michoacán. Censo General de Población y Vivienda.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth Informational Supplement. M100-S9. 19 (1): 104 pp.

National Mastitis Council (NMC), INC. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Revised Edition Walton Commons West Madison. 222 pp.

Patiño, S. N. 2008. Resistencia a antimicrobianos del *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis subclínica de tres municipios del Estado de Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 37 pp.

Rodríguez, G. J. L. 2012. Resistencia antibiótica de Estafilococos Coagulasa Negativo aislados de leche de vacas con mastitis de Téjaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. pp 45: 63

Turutoglu, H., Ercelik, S. and Ozturk, D. 2006. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. Bull Vet Inst Pulawy 50, 41-45.

Valero-Leal, K., Olivares, Y., Perozo, A., Valbuena, E., Boscán, L., Colina, G., Briñez, W. 2010. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. Revista Científica, vol. XX, No. 4, pp. 367-376.

Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschöck, M. 2004. Mastitis bovina. Prevención diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. Mexico. 146pp.