

Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* aislados de leche de vacas con mastitis

Quispe, R.; Peña, G.; Andía, V.

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú. E-mail: vidandia@yahoo.es

Resumen

Quispe, R.; Peña, G.; Andía, V.: *Resistencia antimicrobiana de Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae aislados de leche de vacas con mastitis.* Rev. Vet. 32: 1, 79-83, 2021. El uso indiscriminado de los antibióticos sin previa prueba de sensibilidad *in vitro* es la principal causa del fracaso para el tratamiento de la mastitis en la región de Ayacucho. Con el objetivo de evaluar la resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* -causantes de la mastitis bovina- se realizó el aislamiento, identificación y el antibiograma de las bacterias en estudio para determinar la resistencia frente a cinco antibióticos. Las muestras fueron recolectadas en el fundo Allpachaca de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Ayacucho, Perú), ubicado en las coordenadas 13°23'30.79" S; 74°15'56.48" O, con una altitud de 3528 msnm. En el campo se evaluaron 94 vacas lecheras utilizando la prueba del California Mastitis Test (CMT) de las cuales resultaron 35 bovinos con mastitis subclínica. En el laboratorio se realizó el aislamiento e identificación de *S. aureus* (35,2%) y *S. agalactiae* (12,7%) y posteriormente un antibiograma utilizando el método de Bauer et al. (1966). Los resultados indicaron que *S. agalactiae* resultó resistente a la penicilina en 22%, a la cefalexina en 22% y a la sulfatrimetoprima en 33,3%, mientras que para la tetraciclina y para la amoxicilina más ácido clavulánico fueron sensibles al 100%. Por su parte, *Staphylococcus aureus* resultó resistente a la penicilina en 52% y la amoxicilina más ácido clavulánico en 28%, mientras que para la cefalexina, tetraciclina y sulfatrimetoprima fueron sensibles al 100%.

Palabras clave: mastitis bovina, leche, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, resistencia antimicrobiana.

Abstract

Quispe, R.; Peña, G.; Andía, V.: *Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae isolated from milk from cows with mastitis.* Rev. Vet. 32: 1, 79-83, 2021. The indiscriminate use of antibiotics without prior *in vitro* sensitivity test is the main cause of failure for the treatment of mastitis in the Ayacucho region. In order to assess the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* causing bovine mastitis, the isolation, identification and antibiogram of the bacteria under study were carried out to find the resistance against five antibiotics. Samples were collected at the Allpachaca farm that belongs to the National University of San Cristobal de Huamanga (Ayacucho, Perú), located at coordinates 13°23'30.79 "S; 74° 15'56.48 "W, at an altitude of 3528 meters above sea level. In the field, 94 dairy cows were studied using the California Mastitis Test (CMT), which resulted in 35 cows with subclinical mastitis. In the laboratory, the isolation and the identification of *S. aureus* and *S. agalactiae* were carried out, later the antibiogram was carried out using the method of Bauer et al. (1966). Then 35.2% of *S. aureus* and 12.7% *S. agalactiae* were isolated. The results of the antibiogram show that *S. agalactiae* was 22% resistant to penicillin, 22% to cephalixin and 33.3% sulfatrimethoprim, whereas tetracycline, amoxicillin plus clavulanic acid were 100% sensitive. On the other hand, *S. aureus* was 52% resistant to penicillin and amoxicillin plus clavulanic acid 28%, while cephalixin, tetracycline and sulfatrimethoprim were 100% sensitive.

Key words: bovine mastitis, milk, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, antimicrobial resistance.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad multifactorial que ocasiona pérdidas económicas significativas en la producción de la leche mundial ^{3, 9, 20, 22, 27}. Se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria de las vacas lecheras, causada principalmente por *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumonia*, que ocasionan infecciones intramamarias ^{11, 15, 19}.

Tales microorganismos existen generalmente en el ambiente donde los animales se encuentran, por tanto, las vacas lecheras son susceptibles a la mastitis, siendo la tasa de infección más alta y frecuente durante la lactancia sucesiva ^{22, 29}.

La mastitis es una compleja y singular enfermedad resultante de la interacción de varios factores asociados con el huésped, bacterias patógenas y el ambiente. La mayoría de los casos de mastitis ocurren en vacas lecheras, por tanto, el tratamiento debe implicar estrategias eficaces e integrales ¹⁹. La terapia antimicrobiana juega un papel determinante en el control de la mastitis al reducir los niveles de infección en el animal y prevenir nuevas infecciones ²⁴.

El tratamiento de la mastitis clínica se focaliza principalmente en la eliminación de microorganismos infecciosos, y para ello se emplean los antibióticos. No obstante, para seleccionar adecuadamente un antimicrobiano, es necesario conocer el agente etiológico involucrado y la sensibilidad a los antibióticos del medicamento.

Actualmente existen en el mercado diferentes antibióticos para el tratamiento de la mastitis. No obstante, la utilización excesiva de los mismos en el tiempo, está permitiendo la aparición de bacterias patógenos multi-resistentes, generando, en algunos casos, el fracaso del tratamiento terapéutico, que puede incluso causar la muerte del animal ^{18, 19, 25, 26}.

Además, el uso de antibióticos para el tratamiento de la mastitis puede ocasionar residuos en leche constituyendo un problema de salud pública ¹². En la actualidad existe una preocupación mundial por la *multi-resistencia* y es una de las razones para que algunos países inicien la implementación de programas de monitoreo de resistencia bacteriana y fomenten el uso racional de los antibióticos en animales en producción ^{3, 5, 18}.

El uso indiscriminado de los antibióticos sin realizar previamente la prueba de sensibilidad *in vitro* es la causa principal del fracaso para el tratamiento de la mastitis en algunas regiones del mundo, inclusive en Ayacucho. El inadecuado tratamiento genera por un lado el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos de uso común y, por otro lado, aumenta las pérdidas económicas en la industria láctea.

Por tanto, para garantizar un tratamiento efectivo de la enfermedad, es clave el aislamiento y los estudios de sensibilidad a los antibióticos ^{21, 23}.

MATERIAL Y MÉTODOS

Desarrollo de la investigación. El trabajo se llevó a cabo en el centro experimental del fundo Allpachaca de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), Departamento Ayacucho, Perú, ubicado en las coordenadas 13°23'30.79" S; 74°15'56.48" O, con una altitud de 3528 msnm y en el Laboratorio de Microbiología Industr. y Aliment. de la Facult. de Cs. Biol. (UNSCH). En Allpachaca se procedió con la prueba CMT en 94 vacas lecheras de la raza *Brown Swiss* en periodo de ordeño y posteriormente se obtuvieron las muestras de leche de 35 vacas (65 cuartos).

Prueba de California para test de mastitis (CMT). Para la toma de muestras se desecharon los primeros chorros de leche de cada cuarterón y luego ella se colocó en las placas de la paleta, inclinándose la misma para eliminar la mayor parte de la leche obtenida. A la muestra obtenida se le añadió igual volumen de reactivo CMT, se mezcló el reactivo y se examinó el grado de precipitación de acuerdo a la tabla de interpretación de la Prueba CMT ⁹.

Recolección de muestras de leche para el análisis de laboratorio. La toma de muestras se realizó en el campo durante las primeras horas de la mañana, para ello, antes del ordeño se lavó las ubres, desinfectando con alcohol al 70%. Luego se eliminaron los primeros tres chorros de leche y se colectó 15 ml de leche en un frasco de boca ancha estéril. Los frascos con las muestras se transportaron en una caja de *tecnopor* a temperatura de 5±2°C para su posterior análisis en laboratorio.

Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Para realizar el aislamiento se tomó una alícuota de la muestra de leche y se sembró en placas de Petri que contenían agar sangre para *S. agalactiae* para observar el tipo de hemólisis en el cultivo y agar manitol salado para *S. aureus*. Luego se incubaron a 37 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se observaron las características macroscópicas que presentaron las colonias y se realizaron las pruebas: coloración de Gram ¹⁷, prueba de catalasa y coagulasa ⁴. También se realizó el test de CAMP para *S. agalactiae* ⁷.

Prueba de resistencia antimicrobiana. Para evaluar dicha prueba de resistencia se utilizó el método de difusión ², utilizando los discos de los antibióticos: penicilina, amoxicilina más ácido clavulánico, cefalexina, tetraciclina y sulfatrimetoprima.

Análisis de datos. Los datos obtenidos se procesaron mediante frecuencias, cuadros y gráficos, de acuerdo a los objetivos de la investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos de 94 vacas (376 cuarterones) de la raza Brown Swiss en el fundo de Allpachaca y utilizando la prueba de CMT (California Mastitis Test), se determinó la frecuencia de 58,1% para mastitis subclínica, de los cuáles el 16,1% resultó para reacción traza, 23,9% para grado 1°, 11,4% para grado 2° y 6,7% para grado 3° respectivamente (Figura 1).

En Colombia, trabajando con 644 vacas (2576 cuarterones) se determinó la producción de leche en base al grado de infección de la mastitis¹³. En Arequipa, de 52 vacas Holstein evaluadas, ocurrió una prevalencia de 40,38% de mastitis subclínica⁸ (la misma que tiene relación con el estudio realizado), y con respecto a la prueba de CMT reportó 52,73% para grado 1°, 33,21% para grado 2° y 14,97% para grado 3°.

Por otro lado, en la microcuenca Allpachaca (Ayacucho), examinando 347 vacas en su mayoría raza Brown Swiss de 65 rebaños, se determinó la prevalencia de 33,14% para la microcuenca Allpachaca, 55,13% para la comunidad Cusibamba, 36,11% para Manzanayoc, 28,57% Allpachaca, 26,03% Satica, 23,33% Munaypata y 20% para Unión Paqcha respectivamente¹⁶.

De los 1388 cuartos mamarios evaluados, el 12,18% mostraron mastitis subclínica, y con respecto a la prueba de CMT los resultados fueron 28,99% para reacción traza, 34,32% para 1° grado, 33,14% para 2° grado y 3,55% para 3° grado. Comparando los resultados obtenidos de los autores señalados, no surge ninguna relación con el estudio realizado en el fundo de Allpachaca.

En Ecuador se informó que en la Hacienda San Juan hubo mayor porcentaje de prevalencia de mastitis con el 44,68%¹; estos resultados tienen relación con la prevalencia de mastitis sub-clínica encontrados en las vacas con mastitis en el fundo de Allpachaca con un 58,1%.

En la Figura 2 se muestran los resultados de los cuartos afectados según el grado de mastitis en la que se determinó: 24,3% para el cuarto anterior derecho (CAD), 21,1% para el cuarto anterior izquierdo (CAI), 27,8% para el cuarto posterior derecho (CPD) y el 26,8% para el cuarto posterior izquierdo (CPI).

De un total de 52 vacas evaluadas, el cuarto con mayor prevalencia fue el cuarto posterior izquierdo (CPI) con 33,3% y el cuarto anterior izquierdo (CAI) con 30%, resultados obtenidos que son similares al presente estudio⁸.

Los resultados obtenidos en el aislamiento de *S. agalactiae* y *S. aureus* aislados

de leche de vacas con mastitis del fundo Allpachaca fueron 12,7% para *Streptococcus agalactiae*, 35,2% para *Staphylococcus aureus*, 16,2% para *Streptococcus sp*, 21,1% para *Staphylococcus sp* y 14,1% no mostró crecimiento (Figura 3).

Los resultados obtenidos en el fundo de Allpachaca tienen relación con un estudio realizado en la Sabana de Bogotá (Colombia)¹³, que encontró mayor prevalencia a *Staphylococcus aureus*, seguido de *Streptococcus agalactiae*.

Por otro lado, se determinó 73,28% para *Staphylococcus aureus* y 8,40% para *Streptococcus agalactiae*;

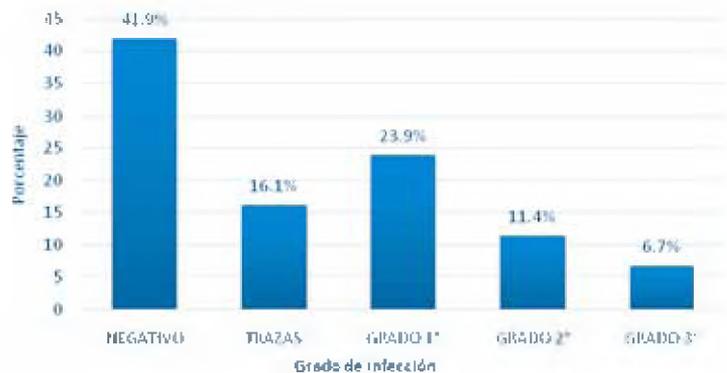


Figura 1. Frecuencia de mastitis según el grado de infección por la prueba de CMT realizada en vacas lecheras del fundo Allpachaca.

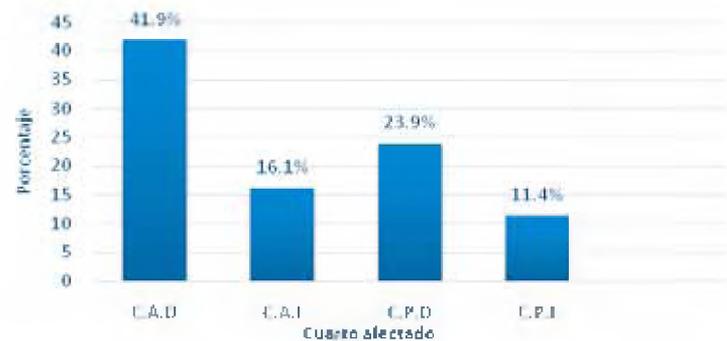


Figura 2. Frecuencia de cuartos afectados según grado de mastitis tomadas a partir de trazas: grado 1°, 2° y 3° en vacas lecheras de Allpachaca.



Figura 3. Frecuencias de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* aisladas de leche de vacas con mastitis del fundo Allpachaca.

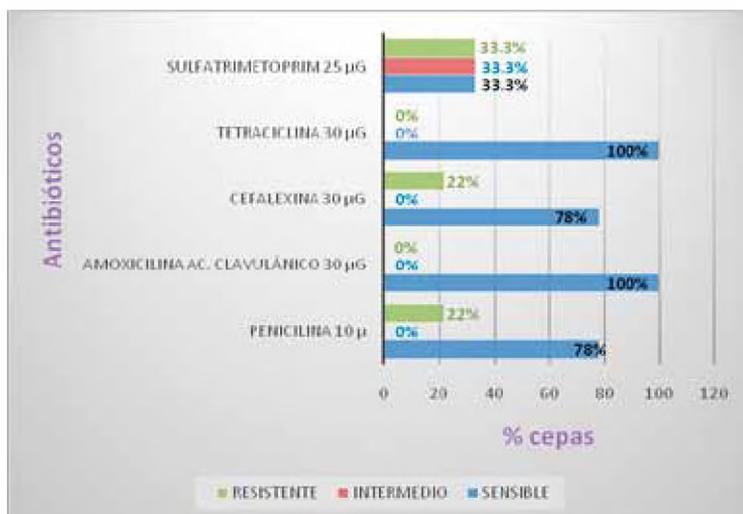


Figura 4. Resistencia antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* aislado de leche de vacas con mastitis del fundo Allpachaca.

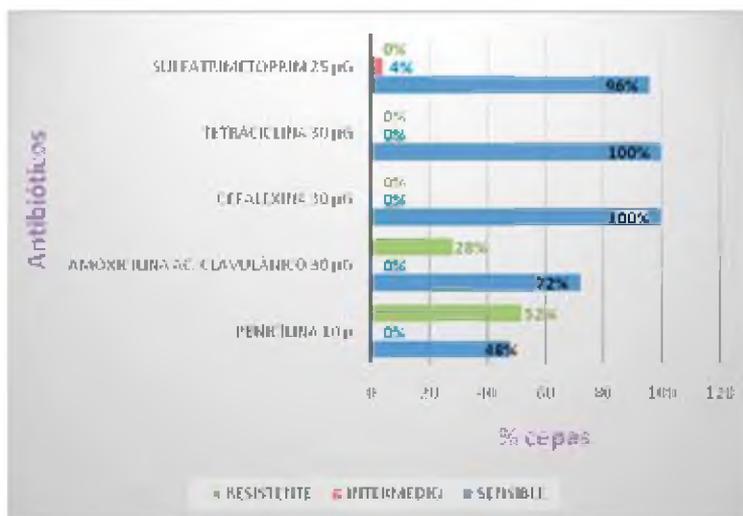


Figura 5. Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislada de leche de vacas con mastitis del fundo Allpachaca.

también se reportaron 16,34% para *Streptococcus sp* y 34,64% para *Staphylococcus sp*¹⁶. Ambos trabajos señalados tienen similitud con los resultados del presente trabajo.

Los resultados del antibiograma indican que *Streptococcus agalactiae* resultó resistente a la penicilina en 22%, a cefalexina en 22% y sulfatrimetoprima en 33,3%, mientras que para la tetraciclina como para la amoxicilina más ácido Clavulánico, fueron sensibles al 100% (Figura 4).

Por otro lado, *Staphylococcus aureus* resultó resistente a la penicilina en 52% y la amoxicilina más ácido clavulánico en 28%, mientras que para la cefalexina, tetraciclina y sulfatrimetoprim fueron sensibles al 100% (Figura 5).

En vacas con mastitis resistentes a tetraciclina (72,5%), se determinaron: gentamicina (29,4%), amikacina (29,4%) y eritromicina (23,5%)¹⁰. Los agentes antimicrobianos disponibles actualmente para tratar la mastitis bovina, demostraron una buena actividad

contra las cepas de *S. aureus*. Además, indican que penicilina + novobiocina demostró una actividad comparable a la amoxicilina + clavulanato contra *Staphylococcus aureus*⁶.

Por otro lado, *Staphylococcus aureus* es el patógeno etiológico más común de la mastitis bovina. Las cepas resistentes hacen que la enfermedad sea difícil de tratar la mastitis²⁸. Además, en casos de mastitis bovina en el noroeste de China se señaló que *S. aureus* es resistente a la penicilina (84,09%), eritromicina (20,45%), tetraciclina (15,91%), gentamicina (9,09%), tobramicina (6,82%), kanamicina (6,82%) y metilicina (2,27%).

El 9,09% de *S. aureus* fue multirresistente. Además, reportó resistencia a rifampicina (100%), penicilina (95,45%), tetraciclina (22,73%), eritromicina (22,73%) y vancomicina (2,27%).

Se demostró la susceptibilidad a diversos antibióticos, siendo *Staphylococcus aureus* susceptibles a ceftriaxona 80,88%, cefotaxima 79,41%, ciprofloxacina 73,52%, eritromicina 70,05%, amikacina 69,11%, gentamicina 52,94%, amoxicilina 36,76%, ampicilina 29,41% y la menor susceptibilidad se mostró con la penicilina: 13,23%.

La prueba de susceptibilidad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* a varios antibióticos reveló que el 86,76% eran resistentes a la penicilina seguidos de ampicilina 70,50%, amoxicilina 63,23%, gentamicina 47,05%, amikacina 30,80%, eritromicina 27,94%, ciprofloxacina 26,47%, metilicina 23,52%, cefotaxima 20,58% y la menor resistencia se mostró en ceftriaxona: 19,11%.

Asimismo, se mencionó la existencia de un alarmante nivel de resistencia de las bacterias de la mastitis a los agentes antimicrobianos. Por lo tanto, resulta necesaria una prueba de susceptibilidad antes del uso de antibióticos, tanto en el tratamiento como en la prevención de las infecciones intramamarias²⁴.

No obstante, se deben realizar exámenes para la detección de mastitis subclínica y también para el tratamiento adecuado del cuadro clínico de vacas durante el período de lactancia²⁹. La alta frecuencia de genes de virulencia y resistencia genética en los aislamientos, constituyen una razón principal para el fracaso del tratamiento y posiblemente conducen a la propagación de la resistencia¹⁴.

Agradecimiento: al Médico Veterinario *Diomedes Ataucusi Yupanqui*, Administrador de la Unidad de Producción de Bienes de Allpachaca, UNSCH.

REFERENCIAS

1. **Acuña V, Rivadeneira EP.** 2008. Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la Provincia de Pichincha. Ecuador. *Tesis de grado. Escuela Politécnica del Ejército, Pichincha. Ecuador*, p. 90-115.
2. **Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
3. **Bedolla C, Deleón M.** 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Red Vet* 9: 1-26.
4. **Bennett RW, Lancelette GA.** 1995. *Bacteriological analytical manual*, 8ª ed., AOAC Internat., Galthersburg, 355 p.
5. **Bhosale RR et al.** 2014. Mastitis: an intensive crisis in veterinary science. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 2: 96-103.
6. **Deoliveira AP.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci* 83: 855-862.
7. **Denamiel G, Puigdevall T, Chan D, Gentilini E.** 2013. Mastitis bovina: variaciones en la detección de β -hemolisina y factor CAMP para la identificación de *Streptococcus agalactiae*. *Rev Med Vet (Buenos Aires)* 94: 24-27.
8. **Dueñas B.** 2007. Prevalencia de mastitis subclínica bovina y determinación de sólidos totales de la leche en la *Irrigación Majes* sección (B2), Arequipa. Tesis de pregrado, *Univ Nac Antipl Puno* (Perú), p. 38-47.
9. **Figuroa P, Bedolla J.** 2008. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el municipio de Tarimbaro, Michoacán, mediante la prueba de California. *Rev Electr Vet* 9: 10.
10. **Gao JF et al.** 2012. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *The Vet Journal* 194: 423-424.
11. **Godden SM et al.** 2002. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. *The Canad Vet J* 43: 38.
12. **Leal M.** 2014. Antibacterial efficacy of plant extracts: clinical application in bovine mastitis. *Rev UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 17: 179-187.
13. **Martínez GR.** 2006. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista Medicina Veterinaria*, 12: 35-55.
14. **Memon J et al.** 2013. Genotypes, virulence factors and antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine subclinical mastitis from eastern China. *Pakistan Veterinary Journal* 33: 4.
15. **Oliveira L, Hulland C, Ruegg P.** 2013. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. *J Dairy Science* 96: 7538-7549.
16. **Paqui, E.** 2011. Prevalencia e identificación de agentes bacterianos causales de mastitis subclínica bovina en la microcuenca Allpachaka, Ayacucho. 2008. Tesis, Univ. Nac. San Crist. de Huamanga, Ayacucho, Perú, p. 37-57.
17. **Perilla MJ et al.** 2009. Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. *Medicina & Laboratorio*, 15: 69-91.
18. **Sanmartín B et al.** 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región, Chile. *Arch Med Vet* 34: 2, 221-234.
19. **Sharif A, Umer M, Muhammad G.** 2009. Mastitis control in dairy production. *Journal Agricult & Social Sci* 5: 102-105.
20. **Souza FN et al.** 2016. Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. *Pesq Vet Brasileira*, 36: 811-818.
21. **Sumathi BR, Veeregowda BM, Amitha RG.** 2008. Prevalence and antibiogram profile of bacterial isolates from clinical bovine mastitis. *Vet World* 8: 237-238.
22. **Tineo J, Andía V.** 2017. Mastitis bovina por recuento de células somáticas con Porta SCC y Test de California en el fundo de Allpachaca-UNSCH, Ayacucho, Perú. *Rev Electr Vet (REDVET)* 18: 7.
23. **Turnidge J, Paterson D.** 2007. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Reviews* 20: 391-408.
24. **Unakal C, Kaliwal B.** 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet World* 3: 65.
25. **Valenzuela M.** 2010. Sensibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis clínica bovina en rebaños lecheros de la Región de Los Ríos. *Tesis de grado, Universidad Austral de Chile*, p. 25-31.
26. **World Health Organization (WHO).** 2000. *Overcoming antimicrobial resistance*, Geneva, Switzerland, 67 p.
27. **Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, Zschöck M.** 2004. *Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento*. Ed. Universit., Guadalajara, Jalisco, 16: 62-72.
28. **Yang F et al.** 2016. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. *Journal of Integrat Agricult* 15: 2842-2847.
29. **Zeryehun T, Abera G.** 2017. Prevalence and bacterial isolates of mastitis in dairy farms in selected districts of eastern Harrarghe Zone, Eastern Ethiopia. *Journal of Vet Med* 17: 2-7.