

## Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia.

Jhon D. Ruiz <sup>1,2</sup>; Nicolás F. Ramírez <sup>1</sup>; Ofelia Arroyave <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo INFAT: Investigaciones Interdisciplinarias en Fisiología, Farmacología, Toxicología y Terapéutica. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. A.A. 1226 Medellín Colombia\*,

<sup>2</sup> Estudiante de Maestría en Farmacología Veterinaria de la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas Universidad de Antioquia.

### Resumen

(Recibido: 22 septiembre, 2000; aceptado: 7 mayo, 2001)

*Se evaluó la sensibilidad a un grupo de antibióticos de 37 cepas de microorganismos aislados de glándula mamaria bovina en 1999. Las bacterias correspondían en un 64,9% a Streptococcus agalactiae, un 18,9% a Staphylococcus aureus y un 16,2% a Staphylococcus coagulasa negativo. Por el método de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (C.I.M.), se determinó la susceptibilidad de las bacterias antes mencionadas a los siguientes antibióticos: ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, ofloxacina, oxacilina, penicilina G, tetraciclina, trimetoprim / sulfa, vancomicina y prueba para detectar  $\beta$ -lactamasa. El método utilizado fue el de microdilución (Vitek, biomérieux®) y los datos obtenidos se presentan en forma descriptiva. Los resultados obtenidos para Streptococcus agalactiae mostraron que el 100% de las cepas evaluadas fueron sensibles a los antibióticos del grupo farmacológico  $\beta$ -lactámico (ampicilina, cefazolina, penicilina G), en tanto que para el grupo de las tetraciclinas se observó resistencia en el 87% de los aislamientos. Staphylococcus aureus mostró 100% de sensibilidad para el grupo de las penicilinas  $\beta$ -lactamasas resistentes y  $\beta$ -lactamasas protegidas (cefazolina, oxacilina y ampicilina/sulbactam respectivamente), en tanto que para las penicilinas  $\beta$ -lactamasas sensibles como la ampicilina y la penicilina G se observó que el 28,6% de las bacterias fueron sensibles y el 71,4% fueron resistentes; el 71,4% de las bacterias Staphylococcus aureus fueron productores de  $\beta$ -lactamasas. Staphylococcus coagulasa negativo mostró para el grupo de las penicilinas  $\beta$ -lactamasas resistentes y  $\beta$ -lactamasas protegidas (cefazolina, oxacilina y ampicilina/sulbactam respectivamente) un 100% de sensibilidad, mientras que para las penicilinas  $\beta$ -lactamasas sensibles como la ampicilina y la penicilina G se observó que el 33,3% de las bacterias fueron sensibles y el 66,7% fueron resistentes; el 66,7% de las bacterias Staphylococcus coagulasa negativo fueron productores de  $\beta$ -lactamasas. La evaluación de los patrones de susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos por el método de las concentraciones inhibitorias mínimas es un procedimiento de buena predicción de la eficacia en la clínica; por esto debería establecerse como una prueba rutinaria en medicina veterinaria en nuestro medio.*

**Palabras clave:** Antibióticos, bacterias, Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), mastitis.

### Introducción

La mastitis en los Estados Unidos se estiman en \$2 billones de dólares por año (17), afectando la producción lechera en cuanto a su cantidad, calidad y eficiencia (23) La mastitis bovina es una enfermedad compleja que tiene diferentes causas, grado de inten-

sidad, variación, duración y efectos residuales negativos tanto económicos como en la salud animal y pública (20). La mastitis infecciosa es la forma más común de inflamación de la glándula mamaria. Cuando la mastitis no es causada por microorganismos, entonces es llamada mastitis inespecífica (13). Existen muchas formas de clasificar la mastitis y puede ha-

\* Dirección para solicitar reimpresos

cerse según la manifestación, la duración y la etiología. De acuerdo a esta última las mastitis pueden ser asépticas o sépticas. En las mastitis asépticas las lesiones pueden ser ocasionadas por traumas persistentes en la ubre como ordeño inadecuado, maquinas de ordeño defectuosas, ubres pendulares que ocasionan roces permanentes y que pueden ocasionar respuestas inflamatorias de las que no se aíslan gérmenes. Mientras que las mastitis sépticas, son ocasionadas por la invasión de microorganismos principalmente bacterias al interior de la glándula mamaria (13).

Muchas son las bacterias que causan mastitis séptica bovina, pero, las de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* son las más frecuentemente aisladas (2,14). Recientemente, *Streptococcus* medio ambientales están emergiendo como importantes agentes causantes de mastitis. Otros estudios han reportado *Streptococcus dysgalactiae* como la causa de esta enfermedad en vacas de primer parto y de las que se aislaron los mismos microorganismos antes del parto (6). Además se ha demostrado que el *Streptococcus dysgalactiae* puede sobrevivir dentro de las células epiteliales por largos periodos sin disminuir su viabilidad (8). Otro microorganismo patógeno altamente prevalente en la mastitis bovina en U.S. y varios otros países es el *Staphylococcus aureus*, siendo la leche la fuente más probable de la infección; y considerándose la infección medio ambiental muy poco probable (19). A pesar de las intensas investigaciones y programas de control para reducir la mastitis, ésta permanece como la enfermedad económicamente más perjudicial para la ganadería mundial (1). La terapia antimicrobiana a la vaca en lactancia es considerada esencial en el control de la mastitis (25). La identificación de la bacteria que causa la mastitis en las vacas y los patrones de su susceptibilidad antibiótica son necesarios para seleccionar un antibiótico apropiado para el tratamiento. Es prudente además monitorear periódicamente las bacterias aisladas de mastitis bovina en cuanto al patrón y rango de susceptibilidad a los antibióticos (6). Esto debido a que las variaciones en la susceptibilidad de las bacterias están relacionadas con las medidas terapéuticas y el uso frecuente de determinados antibióticos en zonas geográficas definidas.

Los clínicos en cualquiera de las áreas de la salud, dependen ampliamente de los datos microbiológicos de laboratorio para el tratamiento de sus pacientes. Por esto la importancia de las pruebas de sensibilidad

a antibióticos, ya que proveen una información valiosa para las decisiones terapéuticas; y deben ser realizados en condiciones óptimas para su eficiente interpretación (16). Algunas de éstas son las siguientes:

### 1. Pruebas de difusión en gel de agar o método de Kirby - Bauer

Este método consiste en el cultivo de los agentes patógenos en medios apropiados para su crecimiento, en el cual se colocan antibióticos en discos que dependiendo de la concentración del antibiótico en este y de la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano, da como resultado zonas donde el crecimiento bacteriano es inhibido luego de varias horas de incubación (16). Este método da como resultado datos cualitativos ordinales (sensible, intermedio y resistente), dichos resultados son la conclusión de varias consideraciones como la especie de microorganismo, la clase de antibiótico, concentración del antibiótico en el disco, el halo de inhibición del crecimiento (medido en mm) (5).

### 2. Pruebas de dilución o Concentraciones Inhibitorias Mínimas (C.I.M.)

La determinación de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (C.I.M.), para los patógenos específicos, provee datos, que conjuntamente con los parámetros farmacocinéticos de los agentes antibacteriales en el animal, permiten predecir la eficacia "in vivo" del compuesto en el tratamiento de una enfermedad específica. Aunque existen regímenes terapéuticos para muchos agentes antibacteriales utilizados en el tratamiento de infecciones intramamarias, la sensibilidad del germen puede variar de tal manera que es necesario replantear el esquema terapéutico; de acuerdo al patrón de sensibilidades desarrollado, y para esto las C.I.M. permiten a los veterinarios monitorear la sensibilidad antimicrobial de las cepas en los hatos lecheros (26).

La selección de los antibióticos se hace teniendo en cuenta el microorganismo a evaluar y los diferentes grupos farmacológicos que serian de primera elección para la terapéutica (de acuerdo con el espectro) y los resultados de los C.I.M. que se reportan con criterios de interpretación definidos como: sensible, intermedio y resistente (16).

*2.1. Sensible:* Esta categoría aplica a las infecciones por cepas que pueden ser apropiadamente tratadas con dosis de antibióticos recomendadas para ese tipo de infección y especie infectada (16).

2.2. *Intermedio*: Ésta categoría incluye aislamientos bacteriales, evaluados con agentes antibacterianos, cuyas C.I.M. se aproximan a los niveles alcanzables en tejidos y sangre, y para los que la tasa de respuesta puede ser más baja que los de las cepas sensibles. La categoría intermedia implica aplicabilidad clínica en los sitios corporales en donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ejemplo, Quinolonas y B-lactámicos en orina) o cuando altas dosis de la droga pueden ser usadas (por ejemplo B-lactámicos) (16).

2.3. *Resistente*: Las cepas no son inhibidas por las concentraciones sistémicas usualmente alcanzables de un agente con régimen terapéutico normal y/o fallas atribuibles a mecanismos de resistencias (por ejemplo B-lactamasa) y cuya eficacia clínica no es confiable en estudios terapéuticos (16).

La determinación de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas es una prueba con mejor poder predictivo de la eficacia "in vivo" que las pruebas de difusión en gel de agar (21).

#### *Resistencias*

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema que concierne a la salud humana y animal. Grupos de expertos científicos tanto del Instituto de Medicina, la Sociedad Americana de Microbiología y la Organización Mundial de la Salud han expresado preocupación a cerca del incremento global de las resistencias (10). En la pérdida de sensibilidad a un antibiótico intervienen varios factores. Las dos fuerzas principales son la prevalencia de genes de resistencia (que determinan proteínas que protegen a las bacterias de los efectos de los fármacos) y la difusión del uso de antibióticos. Si la flora bacteriana de una comunidad carece de genes que confieren resistencia contra un antibiótico, este podrá eliminar con éxito toda la infección, pero si en la flora existen genes de resistencia y la comunidad hace uso persistente de un antibiótico, las bacterias que escapen a la erradicación por ese fármaco harán acto de presencia y proliferarán y además la resistencia puede propagarse a lugares distantes (24).

Los antibióticos si bien son necesarios para el control de las infecciones bacterianas, pueden tener efectos indeseables sobre la ecología microbiana. Pudiendo producir cambios en las proporciones de las bacterias sensibles/resistentes a los antibióticos, tanto en el individuo sometido al tratamiento como en el medio y

la comunidad en general (24). Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilinas semi-sintéticas penicilasa resistentes, fueron descubiertas después de la introducción de la meticilina, ampliamente usada en medicina humana (3). Los reportes de *Staphylococcus* resistentes en Medicina Veterinaria, son poco frecuentes y se han detectado en mastitis bovina (9). Como se puede observar el tratamiento de las mastitis bovina con antibióticos, es una práctica que debe hacerse con criterios profesionales debido a que son muchos los factores que intervienen no sólo para una eficiente terapéutica, sino también para la prevención en la generación de resistencia bacterial y la presencia de residuos de antibióticos en leche; problemas que competen no sólo a la salud animal sino también a la salud humana. Por tales motivos el desarrollo de un programa de control efectivo requiere un extenso conocimiento de la epidemiología de la mastitis bovina, incluyendo la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos de los microorganismos aislados de la glándula mamaria, así como programas de prevención.

Se pretendió con este trabajo, determinar las concentraciones inhibitorias mínimas para cada género y especie de bacterias aisladas de la glándula mamaria bovina, en San Pedro de los Milagros (Antioquia) en 1999, para los antibióticos: Ampicilina, Cefazolina, Clindamicina, Eritromicina, Norfloxacin, Oxacilina, Tetraciclina, Trimetoprim/ sulfa, Vancomicina, así como la realización de la prueba para la actividad de b - lactamasa.

#### **Materiales y métodos.**

*Tipo de estudio*: Se realizó un estudio de tipo descriptivo.

*Población de estudio*: los microorganismos para este trabajo, corresponden a los agentes aislados en el trabajo de investigación «Prevalencia de la mastitis clínica y subclínica bovina en hatos lecheros del municipio de San Pedro de los Milagros». Estudio realizado por el Dr. Nicolás Ramírez y colaboradores. Se aplicó el muestreo por conglomerados con estratificación según el número de vacas en producción; además, se trabajó con afijación proporcional de acuerdo con el número de predios por vereda y con afijación óptima, es decir, que tuviesen facilidades de acceso, tanto por distancia del casco urbano como por la existencia de vías carretables, que tuvieran al menos 4

animales en producción y que su propietario o encargado estuviese dispuesto a prestar sus animales para la correspondiente toma de muestras y a suministrar la información que se le solicitare.

Para el inventario ganadero se tomó como base los datos de vacunación contra fiebre aftosa del segundo semestre de 1998 en el municipio; tales datos fueron suministrados por el Fondo Nacional del Ganado, según el cual se tenían 23 veredas, incluyendo la zona urbana, donde se localizaban 1697 predios, que albergaban 24000 vacas de las cuales el 84% o sea 20.160 aproximadamente correspondían a vacas en producción.

Por varias razones no se pudo realizar el muestreo en 3 hatos por lo que la muestra real quedó en 28 hatos y 112 animales. Las 1697 fincas se estratificaron de acuerdo con el número de vacas en producción así: De 4 hasta 20 vacas (84%); se tomaron 26 predios, De 21 a 50 vacas (12%); se tomaron 4 predios, De 51 vacas en adelante (4%); se tomó 1 predio.

Debido a la extensión del municipio y a la dificultad para ingresar a algunas veredas y fincas, inicialmente se hizo un listado de cerca de 300 predios incluidos en 15 veredas que reunían las características previstas para la afijación óptima. De allí se sacaron aleatoriamente los 31 hatos requeridos; cada una de las 15 veredas participó de acuerdo con el número de fincas que poseía. Las vacas a muestrear fueron seleccionadas al azar.

*Examen de los animales y análisis de la leche.* En el campo se realizaron el CMT y el examen clínico y a nivel del laboratorio se efectuó el conteo de células somáticas, así como el cultivo bacteriológico y antibiograma de las muestras, las cuales se hicieron para mostrar el tipo de infección en los cuartos al CMT positivo. Estas dos últimas pruebas se efectuaron en las muestras con CMT mayor o igual a trazas. Los análisis se realizaron en el laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquia.

*Examen clínico de los animales.* Se hizo examen clínico completo sólo a las vacas que manifestaron algún compromiso general o a las que tenían mastitis clínica.

Se realizó siempre examen clínico de la glándula mamaria y se anotaron los hallazgos a la observación y a la palpación.

*Colección de la muestra.* Para este procedimiento se siguió el método descrito por Honkanen (12).

*Prueba de CMT:* Para la realización de esta prueba se siguió el método descrito por Blowey (7).

#### *Examen bacteriológico.*

Todas las muestras con una reacción de CMT mayor o igual a T (trazas) fueron bacteriológicamente examinadas para el aislamiento y tipificación de las bacterias patógenas de acuerdo con libro guía national mastitis council Barnes (4).

De estas cepas se tomaron para la evaluación por C.I.M. a los 3 agentes más prevalentes hallados en dicho estudio, los cuales fueron *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*.

*Conservación de las cepas:* Las cepas fueron conservadas en caldo tripticase soya, suplementado con glicerol y se transportaron hasta el laboratorio de microbiología del Hospital San Vicente de Paul para la determinación de las C.I.M. por un método automatizado.

*Determinación de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas:* Los aislamientos bacteriológicos se evaluaron para determinar la susceptibilidad a los siguientes antibióticos: Ampicilina, Cefazolina, Ciprofloxacina, Clindamicina, Eritromicina, Ofloxacina, Oxacilina, Penicilina G, Tetraciclina, Trimetoprim/Sulfa, Vancomicina y Prueba para la actividad de  $\beta$ -lactamasa, por el método de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (C.I.M.), usando el método de microdilución (Vitek, biomerieux<sup>®</sup>). Este método adhiere a los lineamientos del Comité Nacional para los Estándares de Laboratorio Clínico de los Estados Unidos (N.C.C.L.S. por sus siglas en inglés) (16). El rango de las concentraciones evaluadas para los diferentes antibióticos se mostrará con los resultados.

Las suspensiones bacteriales usadas para inocular en el panel de C.I.M. se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante del método (Vitek, biomerieux<sup>®</sup>) 24 horas después de la siembra del microorganismo, tres a cuatro colonias se removieron de la superficie del cultivo, usando una asa estéril y suspendiéndola en 5 ml de solución salina. Esta suspensión fue ajustada a una turbidez equivalente a 0.5 estándar McFarland, y alícuotas de 10  $\mu$ l fueron trans-

feridas a 10 ml de ajuste catiónico, Muller-Hinton broth (Vitek, biomerieux). Luego se empleó el autoinoculador (Autoinoculador, Vitek, biomerieux), 50 µl del inóculo estandarizado se depositaron en cada pozuelo del panel de antibióticos, después de la inoculación los paneles fueron incubados aerobícamente a 35°C durante 18 horas.

La primera dilución en la que no se detectó crecimiento bacteriano fue considerada como la C.I.M. para ese aislamiento y antibiótico. De esta manera se reportaron los valores de CIM observado, la CIM máxima y mínima (rango) para cada especie bacterial reportadas en términos de porcentaje.

## Resultados

De las 37 cepas analizadas en este estudio procedentes de aislamientos de muestras tomadas de glándula mamaria el 64,9% (24 aislamientos) correspondieron a *Streptococcus agalactiae*, el 18,9% (7 aislamientos) fueron *Staphylococcus aureus* y el 16,2% (6 aislamientos) a *Staphylococcus coagulasa* negativo.

### *Sensibilidad de los Streptococcus agalactiae a los antibióticos*

Los resultados de los análisis de concentraciones inhibitorias mínimas para *Streptococcus agalactiae* mostraron que el 100% de las cepas evaluadas fueron sensibles a los antibióticos del grupo farmacológico β-lactámico (ampicilina, cefazolina, penicilina G), de igual manera el 100% de los aislamientos fueron sensibles a la ofloxacina un antibiótico perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas; en cuanto a la eritromicina que es un antibiótico macrólido mostró que el 41,7% de los aislamientos fueron sensibles, mientras que el 58,3% fueron intermedios para este antibiótico; para la clindamicina el 41,7% de los aislamientos fueron sensibles mientras que el 58,3% mostró resistencia; la tetraciclina mostró resultados más variables en cuanto al patrón de susceptibilidad para este microorganismo siendo el 8,3% de estos sensibles, el 4,2% intermedio, mientras que el 87,5% de aislamientos fueron resistentes. Para la vancomicina el 100% de las bacterias evaluadas se mostraron sensibles para este antibiótico. (Véase tabla 1).

Los resultados de resistencias del *Streptococcus agalactiae* evidenciaron que el 87,5% de los aislamientos fueron resistentes a la tetraciclina sola o en combinación con la clindamicina (el 58,3% de estos

aislamientos tuvieron resistencia combinada a clindamicina y tetraciclina; y el 29,2% fueron resistentes a la tetraciclina sola). (Ver figura 1).

*Sensibilidad de los Staphylococcus aureus a los antibióticos:* Las concentraciones inhibitorias mínimas para *Staphylococcus aureus* dieron como resultados que el 100% de los aislamientos fueron sensibles a las penicilinas β-lactamasas resistentes y β-lactamasas protegidas (cefazolina, oxacilina y ampicilina/sulbactam respectivamente), en tanto que para las penicilinas β-lactamasas sensibles como la ampicilina y la penicilina G se observó que el 28,6% de las bacterias fueron sensibles y el 71,4% fueron resistentes; el 100% de estas bacterias resistentes fueron productoras de β-lactamasas. Para el grupo de las quinolonas (ciprofloxacina y ofloxacina) se determinó que el 100% de los aislamientos fueron sensibles. Para los antibióticos bacteriostáticos como macrólidos (eritromicina) lincosánidos (clindamicina) y tetraciclinas (tetraciclina) se registró sensibilidad de 100%, igual porcentaje de sensibilidad se registró para el trimetoprim-sulfa. Para la vancomicina la sensibilidad reportada fue del 100%. (Véase figura 2 y tabla 2).

Las concentraciones inhibitorias mínimas para el *Staphylococcus coagulasa* negativo dieron como resultado que para las penicilinas β-lactamasas resistentes y β-lactamasas protegidas (cefazolina, oxacilina y ampicilina/sulbactam respectivamente) una sensibilidad del 100%, en tanto que para las penicilinas β-lactamasas sensibles como la ampicilina y la penicilina G se observó que el 33,3% de las bacterias fueron sensibles y el 66,7% fueron resistentes; siendo éstas últimas productoras de β-lactamasas. Para el grupo de las quinolonas (ciprofloxacina y ofloxacina) se determinó que el 100% de los aislamientos fueron sensibles. Para antibióticos del tipo de los macrólidos (eritromicina) el 66,7% de los aislamientos fueron sensibles, el 16,6% intermedio y 16,6% resistente. Para los lincosánidos (clindamicina) el 83,3% fueron sensibles y el 16,7% resistentes. Para las tetraciclinas (tetraciclina) el 16,6% fueron sensibles, el 16,6% intermedio y 66,7% resistente. Una sensibilidad del 100% se registró para el trimetoprim-sulfa y para la vancomicina. (Véase tabla 3 y figura 3).

Los resultados respecto a las resistencias mostraron que el 16,7% de los aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativo presentaron resistencias combinadas a la ampicilina, penicilina G,

eritromicina, y tetraciclina; otro porcentaje igual de cepas presentaron resistencias combinadas a la ampicilina, penicilina G, clindamicina y tetraciclina; otro 16,7% de los aislamientos fueron resistentes a la ampicilina, penicilina G y tetraciclina en forma combinada y un 16,7% adicional presentó resistencia a la ampicilina y penicilina G. El resto de los aislamientos (32%) fueron sensibles a todos los antibióticos evaluados para este microorganismo. (Ver figura 3).

### Discusión

El *Streptococcus agalactiae* mostró que el 100% de las bacterias fueron sensibles a los diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos evaluados (penicilina G, ampicilina, cefazolina), por ejemplo, el 100% de los aislamientos mostró que para la penicilina G las C.I.M. fueron  $\leq 0.25$  mg/ml, lo cual concuerda con lo hallado

por Owens, W. E. y colaboradores, 1997 (17). Lo anterior hace que este tipo de antibióticos sea de primera elección para el tratamiento de infecciones mamarias ocasionadas por esta bacteria, que es la de más alta prevalencia en nuestro medio.

El 100% de los aislamientos de *Streptococcus agalactiae* fueron sensibles a la ofloxacina, antibiótico que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas. Aunque la ofloxacina no es utilizada en Medicina Veterinaria; esta sensibilidad puede ser extrapolada a otros compuestos de este mismo grupo como la enrofloxacin, norfloxacin y danofloxacin las cuales si son utilizadas en la terapéutica con los animales domésticos. Es importante anotar que estos compuestos no están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para uso en el ganado productor de leche en los Estados Unidos.

**Tabla 1.** Susceptibilidad «*In Vitro*» de 24 cepas de *Streptococcus agalactiae* aislados de glándula mamaria bovina. San Pedro de los Milagros-Antioquia 1999.

Antibiótico	Concentraciones Inhibitorias		n = 24 aislamientos	
	Rango Evaluado	Resultados C.I.M.	%	Clasificación susceptibilidad
Ampicilina	0.12 – 16	$\leq 0.12$	100	Sensible
Cefazolina	8.0 – 32	$\leq 8.0$	100	Sensible
Clindamicina	0.5 - 8.0	$\leq 0.5$	41.7	Sensible
		$\geq 8.0$	58.3	Resistente
Eritromicina	0.5 - 8.0	$\leq 0.5$	41.7	Sensible
		1.0 - 4.0	58.3	Intermedio
Ofloxacina	1.0 - 8.0	$\leq 1.0$	95.8	Sensible
		2.0	4.2	Sensible
Penicilina G	0.03 – 16	$\leq 0.03$	95.8	Sensible
		0.25	4.2	Sensible
Tetraciclina	1.0 – 16	$\leq 1.0$	8.3	Sensible
		8	4.2	Intermedio
		$\geq 16$	87.5	Resistente
Vancomicina	0.5 – 32	$\leq 0.5$	100	Sensible

Los criterios para la clasificación de la susceptibilidad (sensible, intermedio, resistente), se hicieron siguiendo los parámetros establecidos por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999.

**Tabla 2.** Sensibilidad "In Vitro" de 7 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de glándula mamaria bovina. San Pedro de los Milagros-Antioquia 1999.

Antibiótico	Concentraciones Inhibitorias		n = 7 aislamientos	
	Rango Evaluado	Mínimas µg/ml o mg/L	Resultado C.I.M.	Clasificación sensibilidad
Ampicilina	0.12- 16	≤0.12	14.3	Sensible
		0.25	14.3	Sensible
		≥16	71.4	Resistente
Ampicilina Sulbactam <sup>1</sup>	4.0 - 32	≤ 4.0	100	Sensible
Cefazolina	8.0 - 32	≤ 8.0	100	Sensible
Ciprofloxacina	0.5 - 4.0	≤ 0.5	85.7	Sensible
		1.0	14.3	Sensible
Clindamicina	0.5 - 8.0	≤ 0.5	100	Sensible
Eritromicina	0.5 - 8.0	≤ 0.5	100	Sensible
Ofloxacina	1.0 - 8.0	≤ 1.0	100	Sensible
Oxacilina	2.0 - 8.0	≤ 2.0	100	Sensible
Penicilina G	0.03 - 16	≤ 0.03	14.3	Sensible
		0.12	14.3	Sensible
		≥ 16	71.4	Resistente
Tetraciclina	1.0 - 16	≤ 1.0	100	Sensible
Trimetoprim/S <sup>2</sup>	10 - 320	≤ 10	100	Sensible
Vancomicina	0.5 - 32	≤ 0.5	100	Sensible
β-lactamasa	+ ó -	+	71.4	Productor
		-	28.6	No productor

1. Ampicilina-Sulbactam relación concentración 2:1 respectivamente.

2. Trimetoprim-Sulfa relación concentración 1:19 respectivamente.

Los criterios para la clasificación de la susceptibilidad (sensible, intermedio, resistente), se hicieron siguiendo los parámetros establecidos por National Committee for Clinical Laboratory Standars. (NCCLS) 1999.

La proporción de susceptibilidad de *Streptococcus agalactiae* a antibióticos como la eritromicina fue de aproximadamente 1:1 (sensibilidad:intermedio). Lo que difiere de los resultados obtenidos en un estudio realizado en Finlandia en 1995, en el cual se evaluó la susceptibilidad de *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* por el método de sensidiscos

(Kirby - Bauer) y en el que se observó que el 98,6% de estos *Streptococcus* fueron sensibles a este antibiótico (15).

Para la tetraciclina se observó que el 87,5% de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* fueron resistentes, lo que contrasta con un estudio de

Myllys, V. y colaboradores, en 1998; en el cual se observó que en el 90,3 % de los aislamientos, esta bacteria fue sensible (15). En nuestro medio la resistencia del *Streptococcus agalactiae* a la tetraciclina se puede deber al uso indiscriminado de este grupo de antibióticos en una gran cantidad de enfermedades infecciosas que afectan al ganado lechero sin un criterio claro por parte del ganadero.

El 100 % de los aislamientos de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativo* mostró sensibilidad a la vancomicina, lo cual adquiere relevancia si tomamos en cuenta que la vancomicina es un antibiótico de reserva terapéutica en casos de infecciones multiresistentes a antibióticos muy importantes en medicina humana.

El análisis de las cepas de *Staphylococcus aureus* mostró que el 71,4 % fueron resistentes a las penicilinas  $\beta$ -lactamasas sensibles como la ampicilina y la penicilina G, con concentraciones inhibitorias mínimas mayores o iguales a 16mg/ml; esta resistencia está estrechamente relacionada con la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas. Esta circunstancia se confirma con el hecho de que estos *Staphylococcus aureus* se mostraron sensibles en el 100% de los aislamientos a las penicilinas  $\beta$ -lactamasas resistentes y  $\beta$ -lactamasas protegidas (cefazolina, oxacilina y ampicilina/sulbactam respectivamente). La oxacilina es una penicilina anti-staphylococcus que es resistente a  $\beta$ -lactamasas similar a la dicloxacilina y cloxacilina. Watts J. (26) encontró en un estudio publicado en 1997 que el 34,6% de los *Staphylococcus aureus* fueron productores de  $\beta$ -lactamasas. Los resultados del presente estudio en cuanto a la alta presencia de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina G y ampicilina son de interés epidemiológico ya que puede indicar un uso indiscriminado de este grupo farmacológico de antibióticos en las explotaciones lecheras de nuestro medio. Además es importante mencionar que en los últimos años se ha reportado un aumento en el mundo de los *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (11) lo que debe hacer tomar conciencia que ante un aislamiento de *Staphylococcus aureus* es importante establecer su susceptibilidad a antibióticos para hacer un control racional y evitar que se desarrollen cepas multiresistentes que podrían llegar a ser muy difíciles de erradicar.

Para el grupo de las quinolonas (ciprofloxacina y ofloxacina) se determinó que el 100% de los aislamientos fueron sensibles con concentraciones inhibitorias mínimas de  $\leq 1$  mg/ml, aunque estas no se utilizan en la

terapéutica veterinaria, permiten ser una guía para establecer un patrón de comparación con otras fluoroquinolonas como la enrofloxacin, la norfloxacin y la danofloxacin que si se utilizan en los animales domésticos. La enrofloxacin, se reportó con buena actividad contra las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina en Nueva Zelanda y Dinamarca por Salomön S. A. y colaboradores (21) y en cepas de Finlandia por Myllys V. y colaboradores (15); ambos estudios publicados en 1998.

Para los antibióticos bacteriostáticos como macrólidos (eritromicina) y los lincosánidos (clindamicina) los aislamientos de *Staphylococcus aureus* se encontraron sensibles en el 100% de los casos. La similar susceptibilidad de las bacterias frente a estos dos grupos farmacológicos de antibióticos se relaciona con el hecho de que ambos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en la subunidad 50s del ribosoma bacteriano, bloqueando la traslación del ribosoma en el RNAm. Igual susceptibilidad a estos antibióticos para los *Staphylococcus aureus* encontraron Salomön y colaboradores en 1998 (18). Myllys V. y colaboradores narraron para el *Staphylococcus aureus* una sensibilidad a la eritromicina de 95,9 y 97,4% en 1988 y 1995 respectivamente en un estudio publicado en 1998 (15).

Este estudio mostró para *Staphylococcus aureus*, el 100% de sensibilidad hacia el trimetoprim-sulfa igual a lo reportado por Myllys V. Y colaboradores en 1998 (15). Sin embargo debemos tener en cuenta que la eficacia de estos medicamentos en ubre bovina es limitada, debido a su pobre distribución y la disminución de su potencia en medios lácteos.

Según Philpot (18). aunque las bacterias *Staphylococcus coagulasa negativo* son las más frecuentemente aisladas en los hatos, las infecciones con estos microorganismos son de un grado moderado, y solo causan un incremento leve de las células somáticas, el cual puede alcanzar 1.000.000 por mililitro en cuartos infectados subclínicamente (18). En tanto que Sandholm M. y colaboradores narran que es aceptado comúnmente que el *Staphylococcus coagulasa negativo* es causante de mastitis y su diagnóstico es importante (22).

En nuestro estudio las concentraciones inhibitorias mínimas para *Staphylococcus coagulasa negativo* dieron un 100% de sensibilidad para las penicilinas  $\beta$ -lactamasas resistentes y  $\beta$ -lactamasas



**Tabla 3.** Sensibilidad *In Vitro* de 6 cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativo aisladas de glándula mamaria bovina. San Pedro de los Milagros-Antioquia 1999.

Antibiótico	Concentraciones Inhibitorias		n = 6 aislamientos	
	Rango Evaluado	Mínimas µg/ml. o mg/L	Resultado C.I.M.	Clasificación susceptibilidad
Ampicilina	0.12 - 16	≤0.12 ≥16	33.3 66.7	Sensible Resistente
Ampicilina Sulbactam <sup>1</sup>	4.0 - 32	≤ 4.0	100	Sensible
Cefazolina	8.0 - 32	≤ 8.0	100	Sensible
Ciprofloxacina	0.5 - 4.0	≤ 0.5	100	Sensible
Clindamicina	0.5 - 8.0	≤ 0.5 ≥ 8.0	83.3 16.7	Sensible Resistente
Eritromicina	0.5 - 8.0	≤ 0.5 1.0 ≥ 8.0	66.7 16.6 16.6	Sensible Intermedio Resistente
Ofloxacina	1.0 - 8.0	≤ 1.0	100	Sensible
Oxacilina	2.0 - 8.0	≤ 2.0	100	Sensible
Penicilina G	0.03 - 16	≤ 0.03 ≥ 16	33.3 66.7	Sensible Resistente
Tetraciclina	1.0 - 16	≤ 1.0 8.0 ≥ 16	16.6 16.6 66.7	Sensible Intermedio Resistente
Trimetoprim/S <sup>2</sup>	10 - 320	≤ 10	100	Sensible
Vancomicina	0.5 - 32	≤ 0.5	100	Sensible
β-lactamasa	+ ó -	+ -	66.7 32.3	Productor No productor

1. Ampicilina-Sulbactam relación concentración 2:1 respectivamente.

2. Trimetoprim-Sulfa relación concentración 1:19 respectivamente.

Los criterios para la clasificación de la sensibilidad, se hicieron siguiendo los parámetros establecidos por National Committee for Clinical Laboratory Standards. (NCCLS) 1999.

protegidas; en tanto que para las penicilinas β-lactamasas sensibles se observó que el alto grado de resistencia estaba relacionado con la producción de β-lactamasas. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Myllys el cual obtuvo para la penicilina

G un porcentaje de sensibilidad de 75.9 % en 1988 y 62.8% en 1995 (15).

Para el grupo de las quinolonas se determinó que el 100% de los aislamientos de *Staphylococcus*

coagulasa negativo fueron sensibles; datos similares a los obtenidos por Myllys (15). Para los antibióticos como macrólidos y lincosánidos el patrón de susceptibilidad fue similar (100 %), mostrando que son dos grupos altamente relacionados en su efecto y mecanismo de acción sobre la bacteria.

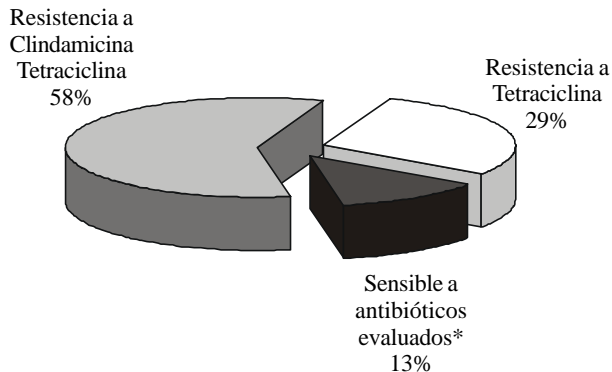
Para las tetraciclinas se observó en las cepas aisladas de *Staphylococcus coagulasa negativo* una elevada resistencia lo que contrasta con lo hallado por Myllys (15), que obtuvo una alta sensibilidad (90%).

Es importante resaltar el alto porcentaje de sensibilidad del *Streptococcus agalactiae* a los antibióticos del grupo  $\beta$ -lactámico, hallado en este estudio; lo cual perfila a dicho grupo de antibióticos como la primera elección para el control de la mastitis causadas por *Streptococcus agalactiae*.

*Staphylococcus aureus* presenta resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos sensibles a  $\beta$ -lactamasas utilizados en medicina veterinaria.

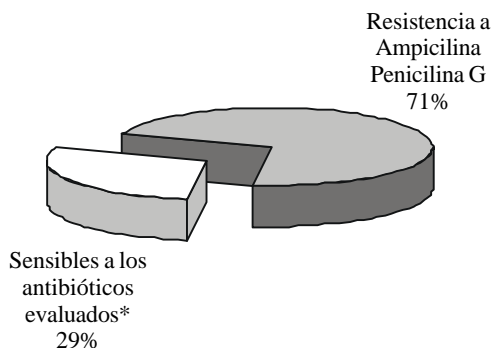
Es importante tener en cuenta que los reportes de susceptibilidad de las bacterias a los diferentes antibióticos evaluados por concentraciones inhibitorias mínimas, tiene como referencia datos de farmacocinética plásmatica en humanos, esta información es extrapolada a los animales domésticos para la dosificación de medicamentos antibacteriales en medicina veterinaria. Dichas consideraciones aunque sirven de referencia; tienen múltiples variaciones entre humanos y animales, y aun variaciones entre diferentes especies de animales. Las diferencias son aun más extremas si consideramos el caso específico de la glándula mamaria bovina; ya que ésta se comporta como un compartimento adicional en donde el antibiótico debe distribuirse cuando se administra por vía sistémica. Esta distribución estaría determinada por las propiedades físico-químicas del medicamento (liposolubilidad, pK) y condiciones del medio (pH, proteínas ligadoras, células, etc.).

La evaluación de los patrones de susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos por el método de las concentraciones inhibitorias mínimas; es un procedimiento de mayor precisión en comparación con el método de difusión, por esto debería establecerse como una prueba rutinaria en medicina veterinaria.



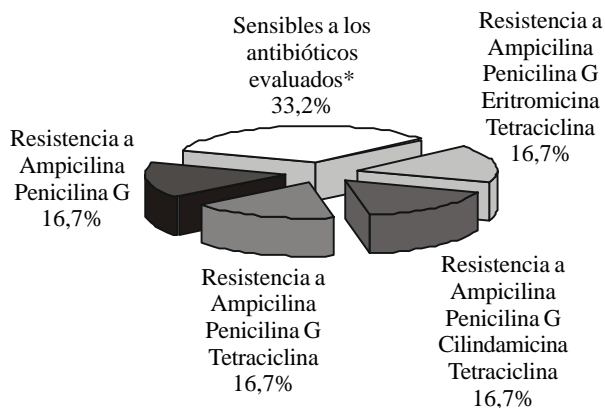
**Figura 1.** Distribución de las resistencias "In vitro" de 24 cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de g. mamaria bovina. San Pedro 1999.

\*Ampicilina, Cefazolina, Clindamicina, Eritromicina, Ofloxacina, Penicilina G, Tetraciclina, Vancomicina.



**Figura 2.** Distribución de las resistencias "In vitro" de 7 cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de g. mamaria bovina. San Pedro 1999.

\* Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Cefazolina, Ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, ofloxacina, oxacilina, penicilina G, tetraciclina, trimetoprim-S y vancomicina



**Figura 3.** Distribución de las resistencias "In Vitro" de 6 cepas de *Staphylococcus coagulasa negativo* aisladas de g. mamaria bovina. San Pedro 1999.

\* Ampicilina, Ampicilina-Sulbactam, Cefazolina, Ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, ofloxacina, oxacilina, penicilina G, tetraciclina, trimetoprim-S y vancomicina

## Agradecimientos

Al Departamento de Haciendas de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquia. Al Dr. Sigifredo Ospina, jefe del laboratorio de microbiología del Hospital San Vicente de Paul. Al Dr. Francisco Javier Gutiérrez, director del grupo INFAT. (Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia).

## Summary

*Antibiotic susceptibility of the bacteria isolates from bovine mastitis in San Pedro de los Milagros. 1999. Using minimum inhibitory concentration method.*

*An evaluation of 37 strains of microorganisms from the bovine mammary gland was conducted in 1999 in order to measure the antibiotic susceptibility. Of the total bacteria 64,9 % was Streptococcus agalactiae, 18,9 % was Staphylococcus aureus and 16,2 % was coagulase negative Staphylococci. The susceptibility of the bacteria was determined using the Minimum Inhibitory Concentrations method. The antibiotics used were: Ampicillin, Cefazolin, Ciprofloxacin, Clindamicin, Erythromycin, Ofloxacin, Penicillin G, Tetracyclin, Trimethoprim/Sulfa, and Vancomycin. The lactamase test was also conducted. The commercial method utilized was the Vitek biomerieux. The data obtained is presented in a descriptive form. One hundred percent of the Streptococcus agalactiae strains evaluated showed antibiotic susceptibility to the  $\beta$ lactamic group (Ampicillin, Cefazolin, Penicillin G). These bacteria had resistance to the tetracyclin antibiotic in a 87 % of the strains isolated. One hundred percent of the Staphylococcus aureus isolated bacteria showed susceptibility to the penicillin  $\beta$ lactamase resistant and  $\beta$ lactamase protected group, (cefazolin, oxacillin and sulbactam/ampicillin respectively). A 28,6 % of the Staphylococcus aureus showed susceptibility to the  $\beta$ lactamase susceptible penicillin like ampicillin, and penicillin G. 71,4 % of this group was resistant. A 71,4 % of these bacteria was  $\beta$ lactamase producer. One hundred percent of the coagulase negative Staphylococci had susceptibility to penicillin  $\beta$ lactamase resistant and  $\beta$ lactamase protected group (cefazolin, oxacillin, and sulbactam/ampicillin respectively). A 33,3 % of these bacteria had susceptibility for the  $\beta$ lactamase susceptible group (ampicillin and penicillin G), and a 66,7 % was resistant to this group of antibiotics. A 66,7 % of this bacteria was  $\beta$ lactamase producer. An evaluation of antibiotic susceptibility to the bacteria by using the minimum inhibitory concentration method is more reliable than the diffusion method, consequently, the minimum inhibitory concentrations method should be used in our region in veterinary medicine practice as a routinely procedure.*

**Key words:** Antibiotics, bacteria, mastitis, Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

## Referencias

1. Aarestrup FM, Jensen NE. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. Journal Dairy Science. 1997; 80 : 307-312.
2. Alvarez A, Céspedes JC. Aplicación de una técnica de anaerobiosis en el diagnóstico de la mastitis bovina en dos hatos lecheros del departamento de Antioquia. Trabajo de grado. Universidad de Antioquia. Medellín. 1993. p 90-102.
3. Barber M. Methicilin-resistant staphylococci. Journal Clinical Pathology. 1961; 14 : 385-393.
4. Barnes – Pallensen, Francis D. et al. Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Inc. 1987. 25-147.
5. Bauer AW, Kirby WM, Sherris J C. y col. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. American Journal Clinical Pathology. 1996; 45 : 493 - 496.
6. Bezek DM. Genus identification and antibiotic susceptibility patterns of bacterial isolates from cows with acute mastitis in a practice populations. Journal American Veterinary Medical Association. 1998; 212 : 3 : 404-406.
7. Blowey R., Edmonson P. In Mastitis control in dairy herds. Farming press books. United Kingdom. 1995. 121p.
8. Calvino LF, And Oliver SP. Invasion and persistence of *Streptococcus dysgalactiae* within bovine mammary epithelial cells. Journal Dairy Science. 1998; 81 : 678 - 686.
9. Devriese LA, Van Damme LR, Famerre L. Methicilin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains

- isolated from bovine mastitis cases. Zentralbl Veterinarmed. 1972; 19: 598-605.
10. Fedorka-Cray PJ, Dargatz DA, Wells SJ. *y col.* Impact of antimicrobial use in veterinary medicine. Journal American Veterinary Medicine Association. 1998; 213 : 12: 1739–1741.
  11. Hartman FA, Trostle SS, Klohnen A. Isolation of methicilin-resistant from a postoperative wound infection in a horse. Journal of American Veterinary Medical Association. 1997; 211 : 5 : 590-592.
  12. Honkanen-Buzalski T. Sampling technique, transportation and history. In The bovine udder and mastitis. University of Helsinki. Helsinki. 1995. 111-112
  13. International dairy federation. Bovine mastitis definition and guidelines for diagnosis. In: Bulletin of International Dairy Federation. Brussels, Belgium. 1987; 211.: 3–8.
  14. Londoño ME, Sierra CA. Caracterización de la información clínica del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquía. Trabajo de grado. Universidad de Antioquia. Medellín. 1998. p 61-64.
  15. Myllys V, Asplund K, Brofeldt E, Hirvelä – Koski V, Honkanen Buzalski T. *Y col.* Bovine mastitis in Finland in 1998 and 1995 – Changes in prevalence and microbial resistance. Acta vet Scand. 1998; 39 : 1 : 119–126.
  16. National committee for clinical laboratory standards. 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth Informational Supplement. M100-S9. 1999; 19 : 1. 104p.
  17. Owens WE, Ray CH, Watts JL, Yancey JR. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and result of antimicrobial susceptibility test for bovine mastitis. Journal Dairy Science. 1997; 80 : 313 - 317.
  18. Philpot W, Nickerson SC. Mastitis: Counter attack a strategy to combat mastitis. Babson Bros Co. Naperville, Illinois. 1991. 142p.
  19. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD. *y col.* Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. Journal Dairy Science. 1998; 81 : 687 – 693.
  20. Rodríguez, G. La mastitis bovina vista como un problema importante y en la salud y la productividad. Series Monográficas. CICADEP suplemento. 1988; 69-76.
  21. Salomon SA, Watts JL, Aarestrup FM *y col.* Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. Journal Dairy Science. 1998; 81:570 -578.
  22. Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, kaartinen L and Pyörälä. The bovine udder and mastitis. Sandholm M; Honkanen-Buzalski T; kaartinen L and Pyörälä. Helsinki. 1995. 312p.
  23. Schukken YH, Deluyker HA. Design of field trials for the evaluation of antibacterial products for therapy of bovine clinical mastitis. Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics. 1995; 18 : 274-283.
  24. Stuart B L. La resistencia contra los antibióticos. Investigación y Ciencia. Mayo de 1998; 14 – 21.
  25. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. Veterinary Microbiology 1988; 16 : 41.
  26. Watts JL, Salmon SA. And Yancey JR. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. Journal Dairy Science. 1995; 78 : 7 : 1637–1648.