



EPIDEMIOLOGIA Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS DE ESTREPTOCOCOS AMBIENTALES CAUSANTES DE MASTITIS EN LOS TAMBOS DE CALIFORNIA

J.H. Kirk, B. McCowen, R.W. Atwill, J. Cullor

Extensión en Medicina Veterinaria, Escuela de Medicina Veterinaria, Centro de Investigación y Enseñanza de Medicina Veterinaria, Universidad de California - Davis Tulare, CA USA

INTRODUCCION

A medida que las bacterias Gram+ causantes de mastitis (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*) han sido controladas de forma más eficaz debido a estrategias de manejo exitosas, las mastitis causadas por agentes ambientales se han tornado más importante (1-3). El aumento en los casos de mastitis parece ser particularmente real en el caso de los estreptococos ambientales. Generalmente se cree que las infecciones debidas a los estreptococos ambientales ocurren entre ordeños cuando las vacas están en las áreas de confinamiento, o durante el periodo seco (4-6). El estreptococo ambiental más reportado es el *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio de calidad de leche (sin publicar) indican que algunos de los otros estreptococos ambientales pueden demostrar una resistencia frente a múltiples antibióticos usados en casos leves de mastitis clínicas.

Recientemente, muchos tambos en California tuvieron un aumento en la incidencia de recuentos celulares altos en tanque de frío causado por estreptococos ambientales, como también un aumento en el número de casos clínicos de mastitis que son resistentes a la terapia intra mamaria. El propósito de nuestro estudio era determinar las diferentes variedades de especies bacterianas que forman el grupo de los Strep. Ambientales, prevalencia por temporada, sensibilidad a los antibióticos, técnicas de ordeño, métodos de confinamiento, y los patrones en el movimiento del animal para identificar aquellos factores asociadas a la resistencia antibiótica.

MATERIALES Y METODOS

Rutinariamente se examina muestras de tanque frío de más de 400 tambos cada mes en nuestro laboratorio de calidad de leche. Se utilizaron pruebas microbiológicas estándares para las muestras de tanque, utilizando placas de agar sangre, tal como sugiere el Consejo Nacional de Mastitis de EEUU. Luego del aislamiento preliminar de especies de Strep. Ambientales, se utilizaron técnicas AP120 para identificar los aislamientos. Los patrones de sensibilidad y resistencia de aislamientos seleccionado al azar se determinaron usando métodos estándar de MIC sugeridos por el Comité Nacional para Estándares en Laboratorios Clínicos. Las placas MIC probaban lincomicina, ampicilina, oxacilina, cefalotina, ceftiofur, penicilina, novobiocina, eritromicina, y pirimicina.

Se llevo a cabo una encuesta directamente en el establecimiento por el autor (JHK) y los asesores de tambo del departamento de Extensión en Cooperativa de la Universidad de California. Se utilizo el mismo cuestionario en cada tambo. El cuestionario contenía preguntas

sobre el tipo de estabulación, tipos de camas, manejo de las camas, utilización de antibióticos en terneros y vacas para condiciones que no estén relacionadas a la mastitis, utilización de antibióticos en vacas secas y en casos leves o severos de mastitis, métodos de crianza de los terneros, técnicas de ordeño, higiene en el ordeño, y sobre que tanto están involucrados el dueño/ordeñador/veterinario en la prevención, control y tratamiento de la mastitis. Las preguntas sobre el uso de los antibióticos describían el tipo de antibiótico, el uso según las recomendaciones de etiqueta o no, su uso en el momento, uso previo, y la existencia de protocolos escritos y registros.

RESULTADOS Y DISCUSION

De esos tambos, en 92 de ellos se aislaron Strep. Ambientales de forma consistente desde su tanque de frío. De éstos, se hizo un muestreo 8 rodeos 7 veces, 21 rodeos 6 veces, 26 rodeos 5 veces, 23 rodeos 4 veces y el resto al menos 3 veces.

Se han aislado las siguientes bacterias. *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. mitis*, *Strep. boris*, *Strep. suis*, *Strep. salavaries*, *Strep. acedominimus*, *Lactococcus lactis lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Aerococcus viridans II*, *Gamella sp.* y *Leuconostoc sp.* *Strep. uberis* fue el aislamiento más común y se encontró en 45% de las muestras de tanque. Otros aislamientos comunes fueron *Strep. dysgalactiae* (17%), *Enterococcus faecium* (11%), *Lactococcus lactis lactis* (6%), *Aerococcus viridans* (6%), *Strep. boris* (4.5%) y *Enterococcus faecalis* (3%). De los 93 tambos muestreados, en 71% de ellos se aisló *Strep. uberis* de la leche en el tanque de frío (Tabla 1). El *Strep. dysgalactiae* se aisló de 39% de los tambos en el estudio. *Enterococcus faecium* (29%), *Aerococcus viridans* (18%), *Lactococcus lactis lactis* (15%), *Strep. boris* (13%), *Enterococcus faecalis* (9%) y *Strep. suis* (7%). La mayoría de las veces se encontraba al *Strep. uberis* en combinación con otros *Strep. ambientales* (Tabla 2). Generalmente se encontraba con *Strep. dysgalactiae* (19%), *Enterococcus faecium* (14%), *Strep. dysgalactiae* y *Enterococcus faecium* (7%) y *Lactococcus lactis lactis* (6%). Tampoco era difícil el aislamiento de más de un *Strep. ambiental* en cualquiera de las muestras de leche de tanque de los tambos muestreados (Tabla 3). En solo 19% de los casos se encontró únicamente al *Strep. uberis*. Similarmente, se aisló al *Strep. dysgalactiae* en combinación con otros *Strep. ambientales* (80%).

Los resultados de estudios hechos anteriormente en este laboratorio han encontrado bacterias resistentes a antibióticos dentro del grupo de los *Strep. ambientales*. Dichas bacterias pueden ser la causa del aumento en los recuentos de células somáticas en tanque y los problemas en el tratamiento.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria para los 10 antibióticos en 335(87.9%) de los 381 aislamientos. Algunos de los aislamientos se perdieron en el almacenaje. Debido a problemas de costos, la mayoría



de los aislamientos que no se les realizó la CMI eran de *E. uberis* (14%), *E. dysgalactiae* (13%), y *E. faecium* (10%). Un número insuficiente de aislamientos disponibles (<10) determinó que no se calcularan los valores de CIM50 y CIM90 para algunas bacterias. Los análisis en masa de los aislamientos bacterianos basados en valores de CIM, indicaron 4 grupos de resistencia a antibióticos.

El cuestionario fue completado por 51 de los 73 tambos en los cuales se determinó la CMI para por lo menos 3 aislamientos. De los 22 tambos que se perdieron en el seguimiento, 4 habían cambiado de propietario, los asesores lecheros no pudieron contactarse con los otros 10 tambos en sus condados, y los 8 restantes se encontraban en áreas que ya no se encontraban en las áreas de servicio de los asesores.

Los análisis retrospectivos demostraron una asociación significativa entre los acumulos de resistencia antibiótica en los aislamientos y varias estrategias de manejo y tratamientos. El análisis demostró una asociación para las bacterias en ciertos patrones de agrupamiento de los antibióticos y sus características de manejo y tratamiento. Estos resultados fueron determinados por los cuestionarios completados en el establecimiento. El riesgo de que un aislamiento se encuentre en el grupo 2 con resistencia a lincomicina y neomicina en comparación al grupo 1 sin resistencia se incrementó (RR 2.61, $p=0.06$) por el uso de agregados orgánicos tales como cáscara de almendras o chips de madera en la cama de vacas lecheras en comparación a no usar agregados orgánicos. Las prácticas de acondicionamiento de los materiales de las camas de varios grupos de vacas también se asoció con bacterias en el grupo 2. Un aumento en el número de días entre acondicionamientos de las camas para vacas en ordeño (RR 1.04, $p=0.01$) y vacas preparto (RR 1.01, $p<0.0001$) se asoció con bacterias en el grupo 2 comparado al grupo 1. El incremento en el número de días entre los reemplazos de las camas para las vacas secas también se asoció con encontrarse en el grupo 2 (vacas secas lejos del parto RR 0.99, $p<0.0001$, y vacas secas cerca al parto RR 1.01, $p=0.01$) comparado al grupo 1. También era más común encontrar las bacterias en el grupo 2 comparado al grupo 1 cuando las ubres no se secaban antes de ponerles la ordeñadora (RR 4.40, $p=0.02$). El uso de algunos antibióticos para el tratamiento de enfermedades aparte de la mastitis también se asoció con bacterias en el grupo 2 en vez del 1. Era más probable que se encontraran las bacterias en el grupo 2 comparado al 1 cuando se usaron productos con ceftiofur (Excenel RR 6.26, $p=0.03$; Naxcel RR 4.91, $p=0.08$), y también cuando se usó Albon (sulfadimethoxine) (RR 4.95, $p=0.06$).

También se encontraron varios factores de riesgo que incrementaban la probabilidad de que un aislamiento se encontrara en el grupo 3 con resistencia frente a lincomicina, neomicina, eritromicina, y pirlimicina comparado a estar en el grupo 1 sin resistencia a los antibióticos. El uso de agregados orgánicos para las camas de las vacas en lactancia durante el verano (RR 2.94, $p=0.05$) o el invierno (RR 3.05, $p=0.03$), se asoció con bacterias en el grupo 3 en vez del grupo 1. Un aumento en el número de días entre los cambios de cama de las vacas secas cercanas al parto aumentó el riesgo de estar en el grupo 3 (RR 1.29, $p<0.0001$) comparado al grupo 1. El uso de penicilina (RR 5.50, $p=0.06$) y

Naxcel (ceftiofur) (RR 5.32, $p=0.05$) para tratar a las vacas en lactancia con condiciones que no eran mastitis también se asoció con el grupo 3 en vez del grupo 1.

Algunas prácticas en el manejo también se asociaron con el grupo 4 que tenía resistencia antibiótica al ceftiofur, cefapirina y oxacilina en comparación al grupo 1 sin resistencia. El uso de agregados inorgánicos a la cama de las vacas en ordeño durante el invierno se asoció con estar en el grupo 4 (RR 4.06, $p=0.03$) comparado a estar en el grupo 1. El número de días entre el acondicionamiento de las camas también se asoció con estar en el grupo 4 (vacas en ordeño RR 8.44, $p<0.01$; vacas secas cerca al parto RR 0.12, $p<0.0001$) comparado al grupo 1. Similarmente, se asoció el número de días entre reemplazos de cama para las vacas secas lejos del parto con el grupo 4 (RR 0.87, $p<0.0001$) comparado al grupo 1.

MENSAJE FINAL

Los aislamientos que se hicieron de los tanques de frío eran los mismos tipos que se encontraron en casos clínicos de mastitis que se analizaron en el laboratorio de calidad de leche en el VMTRC. Esto indica que los aislamientos hechos a partir de tanques de frío, son capaces de causar casos clínicos de mastitis.

Los aislamientos de tanques fueron hallados frecuentemente en nuestro estudio. Esto indica que las vacas son continuamente expuestas a agentes potenciales de mastitis en el ambiente de la estabulación o durante el proceso de ordeño.

Algunas de estas bacterias (*Gamella* spp., *Leuconostoc* spp.) se aislaron muy pocas veces desde los tanques de frío en este estudio y en los casos de mastitis analizados por el laboratorio de calidad de leche. El significado de estos organismos es desconocido, pero al parecer no son una causa importante de casos clínicos de mastitis.

Es común encontrar más de un tipo de estas bacterias en la leche del tanque de frío. Esto indica que las vacas están siendo expuestas a más de un tipo de *Strep.* ambientales en el galpón de estabulación y durante el ordeño.

En casos crónicos de rodeos con recuentos altos de células somáticas en tanque o casos clínicos que no están respondiendo a los tratamientos con antibióticos, es una buena práctica pedir al laboratorio algunos pasos adicionales en el diagnóstico de estos *Strep.* ambientales para ver que tipo específico de estreptococo u otra bacteria está causando el problema. Esto puede ser de gran ayuda cuando se guardan las muestras de leche de todos los casos clínicos y muestras de casos que no han respondido al tratamiento común con antibióticos. Estas muestras podrían indicar las bacterias más resistentes.

Mientras que las pruebas de resistencia a los antibióticos no significa que éstos sean un 100% eficaces en todas las infecciones, nos da una información va-



liosa que por lo menos nos sirve para eliminar algunos antibióticos que se puede esperar que no funcionen. Cuando los tratamientos están fallando, es una buena práctica hacer algunas pruebas de resistencia a antibióticos con los aislamientos de casos clínicos.

El análisis de la asociación entre prácticas de manejo y terapia antibiótica con los patrones de agrupamiento de resistencia antibiótica indica que algunas prácticas de los tambos pueden aumentar el riesgo de que las bacterias desarrollen resistencia a los antibióticos. Era más probable que las bacterias estén en los grupos 2 y 3 en vez del grupo 1 cuando se incorporaban agregados orgánicos a las camas como paja, cáscara de arroz, o cáscara de almendras. Estos dos grupos están compuestos principalmente por estreptococos, y se ha reportado que muchas veces estos organismos están asociados a componentes orgánicos de las camas como la paja. Un aumento en el número de días entre acondicionamiento y reemplazo de las camas también aumentaba el riesgo de desarrollo de resistencia, aunque el éste era pequeño refiriéndolo al uso de material orgánico en las camas. Mientras que los agregados orgánicos se asociaban con un aumento del riesgo de bacterias en los grupos 2 o 3, se encontró que el uso de agregados inorgánicos como la cal en el invierno para las vacas en ordeño, estaba asociado con bacterias del grupo 4 comparado al grupo 1.

El único procedimiento en el ordeño que se asocia con un aumento en la resistencia fue el secado de la ubre antes de conectar las unidades de ordeño. El no secar las ubres se asoció con un aumento del riesgo de estar en el grupo 2 en vez del 1, cuando se comparó con el secado de las mismas.

No se asoció ninguna práctica de tratamiento con antibióticos de las mastitis con un aumento de estar en los grupos 2, 3, o 4 comparados con el grupo 1 sin resistencia. Aunque sí se asoció el uso de algunos antibióticos para el tratamiento de otras enfermedades que no eran mastitis con un aumento en el riesgo de estar en uno de los grupos con resistencia a antibióticos. Por ejemplo, se encontró que el uso de ceftiofur en dos formulaciones diferentes aumenta el riesgo de que una bacteria esté en el grupo 2 comparado al 1. Sulfademetoxine tenía un riesgo similar. El uso de penicilina y ceftiofur (solo una formulación) se asociaban con un riesgo aumentado de que las bacterias estén en el grupo 3 comparado al grupo 1. No se identificó ningún antibiótico que tuviera un riesgo aumentado de que el aislamiento se encuentre en el grupo 4 comparado al grupo 1.

Tabla 1. Especies de Strep. ambientales aisladas del tanque de frío en los tambos muestreados repetidamente.

Aislamientos Bacterianos	Número de Tambos	Número de veces aislados
Aerococcus viridans, II, III	18	21
Enterococcus avium	2	2
Enterococcus durans	1	3
Enterococcus faecalis	9	11
Enterococcus faecium	27	39
Enterococcus spp.	12	13
Gamella sp.	1	1
Lactococcus lactis lactis	17	22
Leuconostoc spp.	3	3
Streptococcus acidominimus	2	2
Streptococcus bovis	13	16
Streptococcus dysgalactiae	38	61
Streptococcus mitis	3	3
Streptococcus salavaries	1	1
Streptococcus spp.	6	10
Streptococcus suis	7	9
Streptococcus uberis	65	160

Tabla 2. El número de veces que los Strep. ambientales más comúnmente encontrados se aislaron del tanque de frío en el tambo.

Número de veces que se aisló en un tambo dado.	Strep. dysgalactiae	Strep. uberis	Entero faecium
1	22	23	19
2	15	11	6
3	15	4	1
4	7	1	1
5	4		
6	1		
7	1		

Tabla 3. Número de Strep. ambientales aislados en los tambos.

Número de bacterias deferentes aisladas	Número de Tambos
1	13
2	21
3	43
4	10
5	0
6	2

**Tabla 4. Numero de aislamientos bacterianos con resistencia a los antibióticos.**

Bacteria	Aislamientos Totales	% de Resistencia
Strep uberis	141	30
Strep dysgalactiae	55	22
Strep bovis	16	69
Enterococcus faecalis	9	56
Enterococcus faecum	36	44
Strep species	16	44

Agradecimientos: Queremos agradecer al apoyo técnico del laboratorio de la Sra. Lisa Ruiz y Cathy Glenn. También agradecemos a Pharmacia Animal Health por la asistencia económica.

REFERENCIAS

1. Robinson TC, Jackson ER, Marr A. Factors involved in the epidemiology and control of *Streptococcus uberis* and coliform mastitis. *Br Vet J* 141:635-642, 1985.
2. Leigh JA. Progress in the understanding of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* for lactating bovine mammary gland. *Proceedings of the National Mastitis Council* 96:1-3, 1994.
3. Bartlett PC, Miller GY, Lance SE, Heider LE. Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infection in Ohio dairy herds. *J Dairy Sci* 75:1241-1252, 1992.
4. Mellenberger R, Kirk J. Mastitis control program for non-strep.-infected dairy cows. *North Central Regional Extension Publication* 278, 1987. Revised 2001.
5. Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 78:2366-2374, 1995.
6. Williamson JH, Woolford MW, Day AM. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. *New Zealand Vet J* 43:228-234, 1995.