



EVALUACION DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA EN AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* PROVENIENTES DE MUESTRAS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS

Hernández J¹, Benavides D², Perez R³, Carulla J⁴ y Suárez M C⁵.

¹jechernandezba@unal.edu.com - ²dabenavidess@unal.edu.co - ³redlactea@gmail.com

⁴jacarullaf@unal.edu.co - ⁵mcsuarezal@unal.edu.co

Resumen

Se ejecutó un estudio de mastitis en la zona central lechera del Departamento de Cundinamarca en Colombia, valorando 1800 animales durante un año. Se realizó cultivo microbiológico de muestras de cuartos de animales que mostraron evidencia clínica de la enfermedad o fueron positivos a CMT en grado 3. De un total de 334 muestras positivas, de 73 (21,9%) se aisló *Staphylococcus aureus* y se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, rifampicina, trimetropin/sulfametoxazol y la presencia del gen *mecA* por PCR. Dos aislamientos (2,7%) mostraron resistencia a tres o más antimicrobianos. Uno de los aislamientos de *S. aureus* fue meticilino resistente MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) y exhibió patrón de multiresistencia.

Summary

A study was conducted in the Cundinamarca Department in Colombia, 1800 animals were evaluated during last year. We performed microbiological culture of samples of quarters that showed clinical evidence of disease or were positive for grade 3 CMT reaction. Of the 334 positive samples, 73 (21.9%) were *S. aureus* and determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against penicillin, oxacillin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, rifampin, trimethoprim / sulfamethoxazole and the presence of *mecA* by PCRTwo isolates (2.7%) were resistant to three or more antimicrobials, as determined by CMI. One of the isolates of *S. aureus* was methicillin-resistant MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) and exhibited multiresistance pattern.

Objetivo

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y la presencia del gen *mecA* frente a aislamientos de *Staphylococcus aureus* proveniente de leche de vacas con mastitis

Metodología

Se propuso un estudio observacional tipo transversal, donde la población de estudio fueron 1800 vacas de 16 hatos lecheros de Cundinamarca en Colombia. El aislamiento, clasificación e identificación de los patógenos se efectuó con base en los protocolos del *National Mastitis Council* (1-2). Los aislamientos obtenidos fueron confirmados con el sistema automatizado VITEK® 2

Compact (bioMérieux).

Se determinó de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante la técnica de microdilución con el sistema automatizado Vitek 2 Compact® (bioMérieux) empleando la Tarjeta AST-GP67 (3-4). Todas los aislamientos fueron evaluadas por PCR para detectar la presencia del gen *mecA* (5-6).

Resultados

De un total de 527 cuartos, 334 muestras fueron positivas y 73 correspondieron a *Staphylococcus aureus* (21,9%). Los patrones de resistencia y la Concentración Mínima Inhibitoria se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria *Staphylococcus aureus* (n = 73)

ANTIMICROBIANO	PUNTO DE CORTE (µg/ml)	MIC										R		
		<=0.03	<=0.06	<=0.12	<=0.25	<=0.5	<=1	<=2	>=4	>=5	>=8		>=10	>=16
PENICILINA	S(< 0,12), R(>0,25)	20	18	10	15	9				1				34,2%
OXACILINA	S(< 2), R(>=4)				59	12	1		1					1,4%
ERITROMICINA	S(< 0,5), I(1 - 4), R(>=8)				69		2	1			1			1,4%
CLINDAMICINA	S(< 0,5), I(1 - 2), R(>=4)				69						4			5,5%
TETRACICLINA	S(<4), I(8), R(>=16)						69	1					3	4,1%
RIFAMPICINA	S(<1), I(2), R(>=4)					71	1						1	1,4%
TRIMETROPIN/ SULFAMETOXA	S(<2/38) R(>4/76)												73	0,0%

S = Sensible; I = Intermedio; R = Resistente, (Punto de Corte CLSI), CMI = Concentración Mínima Inhibitoria, n= aislamientos.

Se detectaron 2 aislamientos resistentes a 3 y 4 antimicrobianos que representaron el 2,7%, los patrones se observan en la tabla 2.

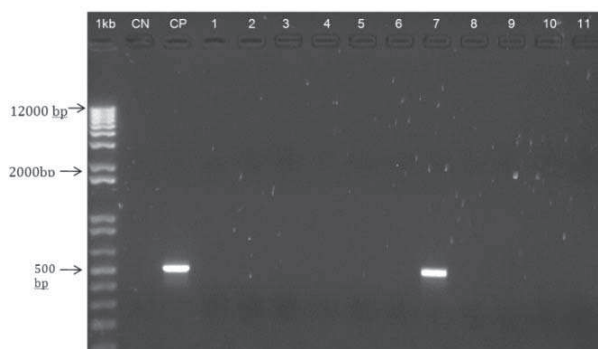
Tabla 2. Patrones multiresistencia por Concentración Mínima Inhibitoria en *Staphylococcus aureus* (n = 73)

No DE AISLAMIENTOS	PATRONES DE MULTIRESISTENCIA							TOTAL AISLAMIENTOS MULTIRESISTENTES	
	P	E	TE	CLI	SXT	RF	OX	n	% Multiresistencia
1	X	X		X				2	2,7%
1	X	X		X			X		

P(penicilina), OX(cloxacilina), SXT(trimetropim/sulfametoxazol), CLI(clindamicina), TE(tetraciclina), RF(rifampicina), E(eritromicina).

De todas las muestras evaluadas en una cepa se detectó la presencia del gen *mecA* (Figura 1), esta cepa MRSA presentó un patrón de resistencia por CMI fue Penicilina-Eritromicina-Clindamicina-Oxacilina

Figura 1: Productos de PCR para detección del gen *mecA* en *S. aureus*.



Carril 1. marcador de peso molecular 1kb; Carril 2. Control negativo; Carril 3. Control positivo *S. aureus* ATCC 43300; Carriles 4 al 6 y 8 a 11. aislamientos de *S. aureus*; Carril 7. cepa MRSA.

Discusión

En este estudio encontramos dos aislamientos de *S. aureus* con patrones de multiresistencia determinados por CMI, donde en uno de ellos adicionalmente se detectó la presencia del gen *mecA*, este gen se ha asociado con resistencia a β -lactámicos y otros antimicrobianos (7-8). La transmisión de estas cepas puede ocurrir por contacto directo con personas o animales infectados, o a través de alimentos (9-11). La presencia del gen *mecA* ha sido reportada en especímenes de origen animal. O'Mahony *et al.* en 2005, detectó 35 aislamientos positivos de 133 aislamientos provenientes de especies productivas, mascotas y personal veterinario (12). El gen ha sido detectado en aislamientos asociadas a brotes nosocomiales (13). En un estudio realizado en 530 aislamientos de *S. aureus* provenientes de muestras de mastitis de cuatro países se detectó uno positivo, proveniente de un caso de Brasil (14). Vanderhaeghen *et al.*, 2010, a partir de 118 aislamientos *Staphylococcus aureus* proveniente de vacas con mastitis detectó el gen en 11 (15).

Conclusión

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública de diseminación mundial. Adicionalmente *Staphylococcus aureus* es un patógeno zoonótico, que puede estar presente en alimentos de origen animal y ha sido reportada en él una causa importante de intoxicación alimentaria en humanos. La presencia de cepas MRSA en la producción primaria no solo representan un riesgo para la salud pública, constituyen un riesgo de infección para los animales en la granja dificultando su tratamiento. Se requiere implementar el enfoque "de la granja a la mesa" para prevenir la diseminación de patógenos, cepas resistentes y genes de resistencia a lo largo de las cadenas productivas bajo un enfoque de riesgo y control en el origen.

Bibliografía

1. Oliver SP, editor. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of

milk quality 2004: National Mastitis Council.

2. Sears P, Gonzalez R, Wilson D, Han H. Procedures for mastitis diagnosis and control. The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 1993;9(3):445.

3. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard. M31-A3. 3 ed: NCCLS; 2008.

4. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth informational supplement. M100-S20: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

5. Lee JH. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. Veterinary Microbiology. 2006;114(1-2):155-9.

6. Kumar R, Yadav BR, Dev K, Singh RS. A Simple Protocol for DNA Extraction from *Staphylococcus aureus*. Livestock genome analysis laboratory, National Dairy Research Institute, Karnal. 2008.

7. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, Van Duijkeren E, Johnson AP, et al. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010;65(4):601-4.

8. Aarestrup F. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin: Amer Society for Microbiology; 2006.

9. Seguin JC, Walker RD, Caron JP, Kloos WE, George CG, Hollis RJ, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. Journal of clinical microbiology. 1999;37(5):1459.

10. Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Applied and environmental microbiology. 2003;69(11):6489.

11. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food microbiology. 2009;26(3):278-82.

12. O'Mahony R, Abbott Y, Leonard F, Markey B, Quinn P, Pollock P, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. Veterinary Microbiology. 2005;109(3-4):285-96.

13. Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nöbel U, Ohlsen K, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. International Journal of Medical Microbiology. 2010;300(2-3):109-17.

14. Zschöck M, El-Sayed A, Eissa N, Lmmler C, Castañeda-Vazquez H. Resistencia a penicilina G y oxacilina, de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina subclínica. Veterinaria México. 2011;42(3):207-17.

15. Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Veterinary Microbiology. 2010;144(1-2):166-71.