

Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche (Bovine Mastitis: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk)

Pellegrino, MS^{1*}, Frola, ID¹, Odierno, LM¹, Bogni, CI¹

¹Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 8 Km 601, X5804ZAB Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

*Contacto: Dr. Matías Pellegrino. TE/FAX: 54-0358-4676238,
mpellegrino@exa.unrc.edu.ar

Resumen

La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico mundial, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente patógeno en muchos países. Si bien existen métodos para prevenir y controlar la mastitis bovina, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de infecciones, aún cuando esta práctica lleve a la selección de cepas resistentes que intervienen de manera negativa en el tratamiento. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la resistencia de cepas de *S. aureus* aisladas de leche frente a antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina y estudiar la relación entre las cepas resistentes y la presencia de casos de la enfermedad. De las 271 muestras de leche se aislaron 300 cepas bacterianas, de las cuales el 21% fueron identificadas como *S. aureus*. El 58,7% de las cepas de *S. aureus* mostraron resistencia *in vitro* a uno o más antibióticos y de ellas, el 70,3%, fueron aisladas de vacas con mastitis. Además, el 36,5%, 22,2% y 20,6% fueron resistentes a eritromicina, penicilina y estreptomina, respectivamente, y el 19% presentaron multiresistencia. Todos los *S. aureus* estudiados fueron sensibles a gentamicina, ampicilina/sulbactam, rifampicina y oxacilina. El análisis de los datos permitió determinar que no existe asociación directa entre la presencia de mastitis y el aislamiento de *S. aureus* resistentes. De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que las cepas de *S. aureus* aisladas mostraron una elevada resistencia, sin que ello esté necesariamente relacionado con la presencia de mastitis bovina en los tambos estudiados. Esta investigación permite orientar a la selección de los antibióticos más eficaces para el tratamiento de esta enfermedad y predecir el éxito de la terapia.

Palabras claves: mastitis bovina | *Staphylococcus aureus* / resistencia a antibióticos

Abstract

Bovine mastitis is a frequent cause of economic loss in worldwide dairy herds, being *Staphylococcus aureus* the main etiological agent in many countries. Although several preventive strategies have been applied to minimize the incidence of this disease, antibiotic therapy plays a decisive role in eliminating the infections. Even though the main problem of this practice is the increased resistance of *S. aureus* strains that makes therapy difficult. The aim of the present work was to evaluate the resistance of *S. aureus* strains isolated from milk to antibiotics used in the control of the bovine mastitis and to study the relationship between the antibiotic resistance and the presence of this disease. Three hundred bacterial strains were isolated from 271 milk samples, being *S. aureus* identified in 21% of the samples. The 58.7% of the *S. aureus* strains isolated showed *in vitro* resistance to one or more antimicrobial drugs analyzed and 70.3% of them belong to cows with mastitis. The 36.5%, 22.2% and 20.6% were resistant to erythromycin, penicillin and streptomycin, respectively, whereas the 19% showed multiresistance. All strains were susceptible to gentamicin, ampicillin/sulbactam, rifampicin and oxacillin. Dates analysis allowed determining that there is not a direct association between the presence of mastitis and the isolation of *S. aureus* resistance strains. According to these results it is possible conclude that *S. aureus* strains showed a high antimicrobial resistance, without necessary related to the presence of bovine mastitis in dairy herds. This study make possible to conduct an efficient antibiotic selection for bovine mastitis therapy.

Introducción

En Argentina la producción lechera en el año 2010 alcanzó un volumen de 10.500 millones de litros de leche anual, según informe del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación (2011). La provincia de Córdoba se encuentra dentro de las cuencas lecheras más importante del país, cuenta con alrededor de 3000 tambos y contribuye con el 37% a la producción de leche nacional.

La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico debido a una disminución en la producción de leche y deterioro en la calidad (Ceron-Muñoz y col., 2002; Wellenberg y col., 2002; Rabello y col., 2005). Se estima que entre el 15% y el 20% de las vacas de un rodeo lechero están afectadas por alguna forma de mastitis en uno o más cuartos (Philpot y Nickerson, 1993; Calvino y Tirante, 2005).

Una gran variedad de microorganismos han sido involucrados como causales de mastitis bovina, siendo *Staphylococcus aureus* el principal agente infeccioso por su prevalencia y patogenicidad, ocasionando más del 80% de las infecciones intramamarias (Gonzalez y col., 1980; McDonald, 1984; Rampone y col., 1993; Wilson y col., 1997; Watts, 1998).

Si bien existe una gran variedad de medidas de control de la enfermedad, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de la mastitis bovina (Neave y col., 1969; Zecconi y col., 2003). La mayoría de las drogas antimicrobianas utilizadas son β -lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos (Owens y col., 1997). La respuesta a estos antibióticos varía según el agente etiológico, encontrándose datos variados en distintas zonas de nuestro país (Calvinho y col., 1991; Frigerio y col., 1995; Gentilini y col., 2000, 2002). Estos estudios notificaron los mayores porcentajes de resistencia para penicilina (40,3%-47,6%) y estreptomicina (20%-58%), mientras que para eritromicina y oxacilina indicaron porcentajes entre el 2%-13% y 0%-2%, respectivamente. Uno de los principales inconvenientes de la terapia con antibióticos es que, además de ser utilizados por su acción terapéutica en el tratamiento de las infecciones intramamarias, también son administrados con fines profilácticos en la prevención de la enfermedad durante el secado de los animales, entre una lactancia y la siguiente. Esta práctica favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana e influye negativamente en el tratamiento de la enfermedad (Calvinho y col., 1991). Además, otro aspecto desfavorable, resulta de la acumulación de residuos de antibióticos en el animal y sus implicancias en la salud humana. Por ello, existen presiones cada vez mayores por parte de los entes reguladores para limitar el uso de de estos productos en el ganado destinado a consumo humano.

El presente trabajo de investigación fue realizado con el objetivo de evaluar la resistencia de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche provenientes de tambos de la región central de la provincia de Córdoba, Argentina frente a antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento de la mastitis bovina. Por otro lado se estudió la relación entre la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas y la presencia de casos de mastitis.

Materiales y Métodos

Animales y muestreo

Las cepas de *S. aureus* estudiadas en el presente trabajo fueron aisladas a partir de muestras de leche compuesta de vacas Holando-Argentino pertenecientes a siete establecimientos lecheros (A-G) ubicados en la región centro sur de la Provincia de Córdoba, Argentina, durante el período de marzo a septiembre de 2009. Los tambos se seleccionaron teniendo en cuenta su ubicación geográfica, número de vacas en ordeño (100-250) y producción diaria promedio de leche por vaca (10-20 litros). Además, cada uno fue visitado en una ocasión durante el ordeño matutino y fueron muestreados en

forma sistémica y al azar entre el 20% y el 40% de los animales en ordeño y se registraron datos sobre la apariencia de la leche, la condición de las ubres y el estado general de los animales.

Se recolectaron 271 muestras de leche, provenientes de igual número de animales. La toma de muestra se realizó de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el National Mastitis Council (NMC) (1999). Antes de la toma de muestras, los pezones fueron desinfectados con etanol al 70% y secados con papel absorbente y el primer chorro de leche descartado. Cuarenta mililitros de leche proveniente de los 4 cuartos de cada bovino se depositaron en un recipiente conteniendo 0,5 ml de conservante Azidiol, y 10 ml en tubo de ensayo estéril para la determinación del recuento de células (RCS) y bacteriología, respectivamente. Las muestras fueron transportadas refrigeradas al laboratorio y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento durante un tiempo inferior a 18 h de su recolección.

Recuento de células somáticas (RCS)

El RCS se realizó de forma automática, utilizando un contador Somacount 300 (Bentley, USA, 1997) de acuerdo al protocolo 148A método C de fluorcitometría laser, International Dairy Federation (IDF, 2001). Se consideró un RCS elevado cuando la muestra analizada presentó valores ≥ 200.000 cel/ml.

Aislamiento e identificación de cepas de *S. aureus*

Las muestras de leche se homogeneizaron y alícuotas de 0,01 ml se sembraron en placas de agar sangre de carnero (Agar Tripteína Soya mas sangre de carnero al 8%) y se incubaron durante 48 h a 37°C. Los aislamientos fueron seleccionados según su morfología, tamaño y pigmentación de colonia, como así también presencia y tipo de hemólisis. Las colonias que se aislaron de una misma muestra de leche y que se diferenciaron en al menos una de las características anteriormente mencionadas, se consideraron como cepas distintas. Las colonias presuntivas de pertenecer al género *Staphylococcus* se identificaron en base a su morfología y características microscópicas: tinción de Gram, producción de catalasa y coagulasa, crecimiento a 45°C y utilización aeróbica de acetoína y maltosa (Rampone y col., 1993). Los cocos Gram positivos, catalasa y coagulasa positivos, capaces de crecer a 45°C y de usar acetoína y maltosa en forma aeróbica, fueron clasificados como pertenecientes a la especie *S. aureus*.

Determinación de casos de mastitis clínica (MC) y subclínica (MS)

Los casos de MC se identificaron en base a signos clínicos, incluyendo apariencia normal de la leche (coágulos, sangre), alteraciones en la ubre (enrojecimiento, hinchazón, calentamiento, dolor), elevado RCS y aislamiento de microorganismo. Por otro lado, a los animales que no presentaron signos

clínicos de la enfermedad y que mostraron un RCS ≥ 200.000 cel/ml, con o sin aislamiento de microorganismo, se los consideró como afectados por MS.

Prueba de sensibilidad a antibióticos

Las cepas aisladas de *S. aureus* fueron analizadas con el método de difusión en disco de Kirby-Bauer siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) (ex NCCLS). Se tomaron 3-5 colonias de cada cepa previamente identificada, se resuspendieron en 2 ml de caldo tripteína soya (TSB) (Merk) estéril y la suspensión bacteriana se homogenizó y se incubó a 37°C por 24 h en baño con agitación (200 rpm). Posteriormente, se colocaron 500 μ l del cultivo en 5 ml de solución fisiológica y se ajustó la densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) de cada mezcla alrededor de 0.084, turbidez equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml). Luego la suspensión se sembró con hisopo estéril en placas contenido 20 ml de agar Muller Hinton (Merk) realizando estrías en todas direcciones con el fin de cubrirla completamente. Los discos de antibióticos utilizados en este ensayo, se seleccionaron en base a su frecuente utilización en medicina veterinaria en la Argentina. Los antibióticos y concentraciones utilizadas, fueron: penicilina 10 UI, gentamicina 10 μ g, oxacilina 1 μ g, rifampicina 5 μ g, eritromicina 15 μ g, estreptomycinina 10 μ g y ampicilina/sulbactam 10 μ g/10 μ g. Estos se depositaron en condiciones de esterilidad sobre las placas y se presionaron cuidadosamente para asegurar el completo contacto con la superficie del agar. Se distribuyeron cuatro discos por placa con el fin de mantener una distancia de 24 ml entre ellos. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y en función del tamaño de los halos de inhibición, las cepas fueron clasificadas como sensibles (S), intermedias (I) o resistentes (R) según los criterios de interpretación de la CLSI (CLSI, 2008) (Tabla 1). Para corroborar los resultados de inhibición, cada una de las cepas fue analizada por triplicado. Como control se utilizó *S. aureus* ATCC 25923.

Tabla 1. Interpretación del diámetro de las zonas de inhibición para patógenos veterinarios

Table 1. Zone diameter interpretive standards for veterinary pathogens

Agente Antimicrobiano	Concentración	Zona de inhibición (mm)		
		S	I	R
Penicilina*	10 UI	≥ 29	-	≤ 28
Gentamicina*	10 μ g	≥ 15	13-14	≤ 12
Oxacilina*	1 μ g	≥ 13	11-12	≤ 10
Rifampicina*	5 μ g	≥ 20	17-19	≤ 16
Eritromicina*	15 μ g	≥ 23	14-22	≤ 13
Estreptomycinina**	10 μ g	≥ 15	12-14	≤ 11
Ampicilina/Sulbac tam**	10 μ g/10 μ g	≥ 15	12-14	≤ 11

* Diámetros de inhibición según CLSI, 2008.

** Diámetros de inhibición según NCCLS, 2002 (no reportados por la CLSI)

Análisis Estadístico

Para determinar las diferencias entre el porcentaje de aislamiento de *S. aureus* en los distintos establecimientos lecheros y el comportamiento de estas cepas frente a cada uno de los antibióticos, se utilizó la prueba de homogeneidad empleando el estadístico "Chi-Cuadrado" (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Por otro lado, para establecer una asociación entre cepas resistentes y la presencia de mastitis en los animales a partir de los cuales fueron aisladas, se realizó la prueba de concordancia empleando el estadístico "Chi-Cuadrado" (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Un *p*-valor < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

A partir del muestreo realizado a los 7 establecimientos lecheros (A-G) se obtuvieron 271 muestras de leche correspondientes a igual número de animales. En la Tabla 2 se detallan el número de bovinos muestreados, por establecimiento, así como algunas características sanitarias y de manejo registradas. El 85,7% (6/7) de los establecimientos visitados presentaron elevado RCS (≥ 200.000 cel/ml) asociado a una baja producción láctea (litros) diaria (Tabla 2). Por otro lado, 5 de los establecimientos no implementaron la desinfección post-ordeño como una herramienta preventiva para el control de la mastitis bovina.

Tabla 2. Principales características de tambos pertenecientes a la región central de Córdoba, Argentina

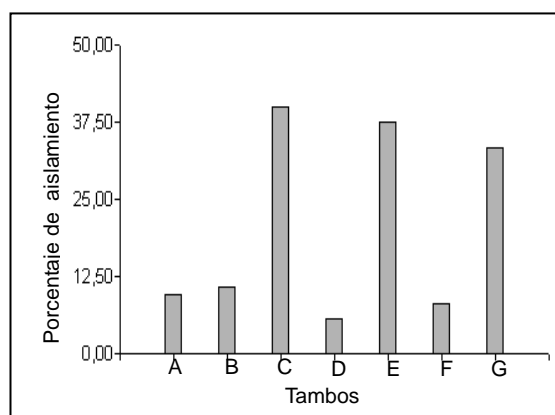
Table 2. Main characteristics of dairy herds from the central region of Córdoba, Argentina

Tambos	A	B	C	D	E	F	G
Ubicación	Río Cuarto	San Basilio	Sampac ho	Villa María	Villa María	Villa María	Villa María
N° de vacas en ordeño	220	124	200	105	130	150	212
N° de vacas muestreadas	40	23	29	42	49	48	40
RCS tanque (ml)	700.000	227.000	727.000	274.000	418.000	408.000	144.000
Leche vaca/lit/día	11	23	14	17	20	15	18
Desinfección post-ordeño	NO	SI	SI	NO	NO	NO	NO

Del total de muestras obtenidas (n=271), se aislaron 300 cepas bacterianas de las cuales 226 (75,3%) correspondieron al género *Staphylococcus* y de ellas, 63 (27,9%) fueron identificadas como *S. aureus*. El resto de los microorganismos (24,7%) correspondieron a especies pertenecientes a los géneros *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. y *Bacillus* spp., entre otros. En la Figura 1 se muestran los porcentajes de aislamiento de *S. aureus* discriminados por tambo. Los tambos C, E, y G presentaron el mayor porcentaje de aislamiento de este patógeno, mientras que en el resto de los establecimientos predominaron los microorganismos ambientales, como *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. y *Staphylococcus* coagulasa negativo. El análisis estadístico realizado indicó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes de aislamiento de *S. aureus* entre los diferentes tambos.

Figura 1. Porcentajes de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de 7 tambos (A-G) de la región central de Córdoba, Argentina

Figure 1. Percent of *S. aureus* strains isolated from milk samples of 7 dairy herds (A-G) from the central region of Córdoba, Argentina



Con respecto al número de casos de mastitis, del total de animales muestreados (271), 12 (4,5%) presentaron MC y 111 (41%) MS. *S. aureus* fue aislado en 5 y 44 animales con MC y MS respectivamente. El resto de las cepas de *S. aureus* (13) fueron aisladas de leche de vacas sanas.

Para evaluar los perfiles de resistencia de las cepas de *S. aureus*, se realizaron ensayos de resistencia *in vitro* frente a 7 agentes antimicrobianos de uso frecuente para el tratamiento de la mastitis bovina (Tabla 3). De las 63 cepas de *S. aureus* estudiadas, 37 (58,7%) fueron resistentes a uno o más antibióticos, y de ellas 24 (64,9%) fueron aisladas de vacas con MS, 2 (5,4%) de vacas con MC y 11 (29,7%) de vacas sanas. El 36,5% (23/63), 22,2% (14/63) y 20,6% (13/63) del total de las cepas de *S. aureus* fueron resistentes a eritromicina, penicilina y estreptomina, respectivamente. Cabe destacar que el 68% de las cepas resistentes a eritromicina fue aislado del tambo E. En la Figura 2 se muestra la distribución de cepas de *S. aureus* resistentes a estos últimos antibióticos discriminados por tambo. Como se observa en dicha figura,

del total de los establecimientos lecheros muestreados, 5 presentaron cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina, 4 a eritromicina y 3 a estreptomina. Todas las cepas analizadas fueron sensibles a gentamicina, ampicilina/sulbactan, rifampicina y oxacilina. El comportamiento diferente de estas cepas (resistencia o sensibilidad) frente a los 7 antibióticos ensayados, fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Por otro lado, no se encontró una asociación directa entre la presencia de MC y MS y el aislamiento de cepas de *S. aureus* resistente o sensibles a los antibióticos ensayados ($p > 0.05$).

Tabla 3. Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche.

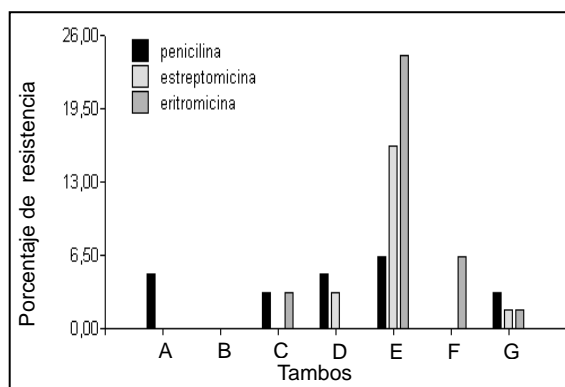
Table 3. Antimicrobial resistance patterns among *S. aureus* strains isolated from milk samples

Perfil	Resistencia a Antibióticos	<i>S. aureus</i> N° (%)
1	-	26 (41,2)
2	Pn	9 (14,3)
3	Em	14 (22,2)
4	Sm	2 (3,2)
5	Pn, Em	1 (1,6)
6	Em, Sm	7 (11,1)
7	Pn, Sm	3 (4,8)
8	Pn, Em, Sm	1 (1,6)

Pn: Penicilina; Gm: Gentamicina; Em: Eritromicina; Ap/Sb: Ampicilina/Sulbactan; Rf: Rifampicina; Sm: Estreptomina; Oxa: Oxacilina.

Figura 2: Distribución de cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina, estreptomina y eritromicina, aisladas de muestras de leche de 7 tambos (A-G) de la región central de Córdoba, Argentina

Figure 2. Distribution of *S. aureus* resistant strains to penicillin, streptomycin and erythromycin, isolated from milk samples of 7 dairy herds (A-G) from the central region of Córdoba, Argentina



Doce (19%) de las cepas aisladas presentaron multirresistencia a dos o más antibióticos (Tabla 3). Es importante destacar que del total de estas cepas, el 58,4% (7/12) fueron resistentes a eritromicina y estreptomina, el 25% (3/7) a penicilina y estreptomina y el 8,3% (1/12) a penicilina y eritromicina. Solo una de las 12 cepas presentó resistencia a penicilina, eritromicina y estreptomina. El mayor porcentaje (75%) de las cepas multiresistentes fue aislado del Tambo E, seguido por un 16,6% y 8,4% en D y G, respectivamente, mientras que del establecimiento B no presentó cepas resistentes a ninguno de los antibióticos estudiados. El 58,3% de las cepas que presentaron resistencia a dos o más antibióticos fue aislado de muestras de vacas con MS. Dos de las tres cepas aisladas de muestras de vacas con MC presentaron resistencia a penicilina.

Discusión

En el presente trabajo se evaluó la resistencia a antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento de la mastitis bovina de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche provenientes de 7 tambos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba, Argentina. Con respecto a los datos obtenidos sobre establecimientos lecheros, no se pudo establecer una relación directa entre la desinfección post-ordeño, el elevado RCS observado en leche de tanque y la baja producción láctea. Esto estaría indicando que la implementación de esta medida preventiva, aplicada de forma individual, no sería eficaz para prevenir la aparición de casos de mastitis. La National Mastitis Council (NMC, 2003) en su publicación sobre Principios para la Prevención de la Mastitis Bovina, describe la aplicación de trece puntos de manera conjunta para establecer un programa de control de la mastitis de forma más correcta para mejorar la calidad de la leche. Entre estos puntos se encuentran: evitar las nuevas infecciones, mantener los animales en un medio ambiente seco y cuidado, establecer pautas de tratamiento adecuadas y eliminar los animales incurables. Por otro lado, si bien se observó que en la mayoría de los establecimientos lecheros que presentaron un elevado RCS en leche de tanque estaban asociados a una baja producción láctea, esto último no puede ser atribuido únicamente a procesos inflamatorios que pudieron haber estado ocurriendo en la glándula mamaria. Esto se debe a que este parámetro se puede ver alterado por numerosos factores, como la nutrición, edad del animal, número de partos, entre otros (Sordillo, 2005).

Con respecto a los microorganismos aislados de las muestras de leche obtenidas de los siete establecimientos lecheros, se observó que los porcentajes obtenidos para *S. aureus* resultaron similares a los encontrados por diferentes investigadores en rodeos lecheros pertenecientes a las provincias de Córdoba y Buenos Aires, Argentina (Rampone y col., 1993; Giraudo y col., 1995; François y col., 2000; Amand de Mendieta y col., 2001) y de diferentes países de Latinoamérica (Faria Reyes y col., 2005; Florentin Aponte, 2007). Por otro lado, en base al porcentaje de cepas de *S. aureus*

asociados a casos de MC y MSC en comparación con las observaciones sanitarias y de manejo realizadas para cada tambo, se puede sugerir que tal vez no hubo una relación directa entre la presencia de este microorganismo patógeno y el elevado RCS en leche de tanque, la baja producción de leche diaria o la desinfección post-ordeño.

El análisis del comportamiento de las cepas de *S. aureus* aisladas frente a los antimicrobianos de uso frecuente en mastitis bovina, mostró que el porcentaje de resistencia encontrado para eritromicina (36,5%) fue elevado en comparación con los informados por Calvinho y col. (2003), Gentilini y col., (2000), Giannechini y col. (2002), y Faría Reyes y col. (2005), quienes informaron un 2%, 11,6%, 2,6% y 10%, respectivamente. Es importante aclarar que en Argentina este antibiótico es uno de los más utilizados para el tratamiento de mastitis bovina debido a que alcanza concentraciones efectivas en leche, alrededor de 12 h luego de su administración parenteral (Ziv, 1980). Por otro lado, la resistencia observada para penicilina (22,2%) fue similar a la informada por Reinoso y col. (2008) (28%) y relativamente menor a la observada por Gentilini y col. (2000) (40,3%) y Calvinho y col. (2003) (47,6%) en Argentina; por Giannechini y col. (2002) en Uruguay (46,1%) y De Olivera y col. (2000) y Vintov y col. (2003) en Europa (37%), mientras que superó a la encontrada por Faría Reyes y col. (2005) en Venezuela (13%). Estudios realizados en Argentina y en otros países indican que un elevado porcentaje de las cepas resistentes a la penicilina son productoras de beta lactamasas o penicilinasas (Watts y col., 1998; Gentilini y col., 2000), reconocido como el mecanismo más frecuente de resistencia a este antibiótico (Prescott, 1999). En cuanto a los resultados de resistencia a estreptomicina, el valor obtenido (20,6%) fue similar al observado por San Martín y col. (2002) (25%) en Chile, mientras que difiere del encontrado por Trinidad y col. (1990) en Estados Unidos (33,9%) y por Florentín Aponte (2007) en Paraguay (70%). Sumado a lo expresado en el párrafo anterior, las cepas de *S. aureus* aisladas mostraron una sensibilidad total *in vitro* frente a gentamicina, ampicilina/sulbactam, rifampicina y oxacilina. Con respecto a gentamicina, investigadores en Argentina (François y col., 2000; Gentilini y col., 2000; Revelli y col., 2001), Uruguay (Giannechini y col., 2002), Venezuela (Faría Reyes y col., 2005) y Estados Unidos (Trinidad y col., 1990; Owens y col., 1997) observaron también una sensibilidad total de las cepas de *S. aureus*, mientras que Florentín Aponte (2007) informó un 8% de cepas resistentes a este antibiótico. Sumado a esto, Revelli y col. (2001) y Faría Reyes y col. (2005) en Argentina y Venezuela, respectivamente, informaron también una sensibilidad total de las cepas de *S. aureus* aisladas a rifampicina. Por otro lado, para oxacilina, los resultados hallados por nuestro grupo concuerdan con los encontrados por Calvinho y col. (1991) y Gentilini y col. (2002) y difieren de los valores informados por Giannechini y col. (2002) (2%) y Faría Reyes y col. (2005) (10%).

En los últimos años, la problemática de la multiresistencia en nuestro país, se ha profundizado debido a la carencia de una política racional reguladora del

uso de los antibióticos con fines terapéuticos en medicina veterinaria. La importancia principal radica en que se favorece la transferencia horizontal de de estas cepas multiresistentes de los animales al hombre, dejando claro que el uso inapropiado de antibióticos constituye un riesgo emergente para la salud pública. En el presente trabajo, se encontró un 19% de cepas de *S. aureus* multiresistentes a dos o más antibióticos (eritromicina, estreptomina y penicilina). Un resultado similar se observó en un estudio realizado por Faría Reyes y col. (2005), quienes informaron un porcentaje de resistencia múltiple del 13,6%. Por otro lado, Frigerio y col. (1995) en Argentina, reportaron un porcentaje de multiresistencia elevado (38%) en comparación con nuestros resultados y los de Faría Reyes y col. (2005). Ambos investigadores señalaron que la resistencia múltiple no sólo se adquiere para antimicrobianos de la misma familia, sino también a drogas con diferentes mecanismos de acción y estructura química.

En conclusión, las cepas de *S. aureus* aisladas en este estudio mostraron una elevada resistencia *in vitro* a uno o más antimicrobianos de uso frecuente en la terapia de la mastitis bovina y no se encontró una relación directa entre estas cepas y la presencia de mastitis bovina. La información obtenida aporta datos relevantes como consecuencia del bajo número de trabajos en nuestro país y en Latinoamérica que remarquen el comportamiento de *S. aureus* frente a antibióticos de uso frecuente en veterinaria. Además, estos resultados no reflejan necesariamente la actividad del antimicrobiano en la glándula mamaria; sin embargo permite, en conjunto con el análisis de otros parámetros como las condiciones sanitarias y de manejo del rodeo, orientar a la selección de antibióticos más eficaces para el tratamiento y la prevención de la mastitis bovina. Contar con esta información y su variación en el tiempo es de primordial importancia al aplicar un plan de control de mastitis en un tambo con probabilidades de éxito.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con subsidios otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto. M. Pellegrino e I. Frola son becarios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

Bibliografía

- Amand De Mendieta V, C Micheo, C Soriano, A Tabera, A Stefano, G Casanovas, P Purrán, A Corradetti, S Carabajal. 2001. Aislamiento e identificación de patógenos mamarios de animales bovinos lecheros de la Cuenca Mar y Sierras. *Vet. Arg.* 18, 499-504.
- Calvino LF, AR Delgado, CA Vitulich, HL Occhi, VR Canavesio, MA Zurbriggen, HD Tarabla. 1991. Susceptibilidad *in vitro* a los

- antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafesina. *Vet. Arg.* 8, 677-680.
- Calvinho LF, FG Toselli, WR Weimann, VR Canavesio, VE Neder, IA Iguzquiza. 2003. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de estafilococos coagulasa positivos aisladas de mastitis bovina en la cuenca lechera central de la Argentina. Anuario 2002. INTA. Estación Experimental Rafaela.
 - Calvinho LF, L Tirante. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en argentina en los últimos 25 años. Anuario 2005. *Revista FAVE*. Sección Ciencias Veterinarias.
 - Ceron-Muñoz M, H Tonhati, J Duarte, J Oliveira, M Muñoz-Berrocal, H Jurado-Gámez. 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85, 2885-2889.
 - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard. Third Edition. CLSI Vol. 28 Número 8. M31.A3.
 - De Oliveira AP, JL Watts, SA Salmon, FM Aarestrup. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* 83(4), 855-862.
 - Faría Reyes JF, K Valero-Leal, G D´Pool, A García Urdaneta, M Allara Cagnasso. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Revista Científica*. 15(3) Maracaibo.
 - Florentin Aponte CC. 2007. Perfil de resistencia *in vitro* a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. SENACSA (Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal), Asunción-Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 5(1) Junio 2007.
 - François S, S Meregalli, E Sutich. 2000. Mastitis bovina: tipificación de cocos Gram positivos y determinación de su sensibilidad a quimioterápicos. Disponible en Internet: <http://www.e-campo.com>.
 - Frigerio C, I Scalise, S Bettera, J Giraud A Calzolari. 1995. Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina. *Rev. Med. Vet.* 76(5), 288-291.
 - Gentilini E, G Denamiel, P Llorente, S Godaly, M Rebuelto, O DeGregorio. 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 83, 1224–1227.
 - Gentilini E, G Denamiel, A Betancor, M Rebuelto, M Rodriguez Fermepin, RA De Torres. 2002. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 85, 1913–1917.
 - Giannechini RE, C Concha, A Franklin. 2002. Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens Isolated from Dairy Herds in the West Littoral Region of Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 43, 31-41.

- Giraud J, H Rampone, L Martínez, A Calzolari. 1995. Recuento de células somáticas en leche bovina de cuartos mamarios con aislamiento negativo e infectados. *Rev. Med. Vet.* 76, 6-10.
- Gonzalez RN, J Giraud, J Busso. 1980. Investigación en mastitis subclínica. Agentes etiológicos bacterianos. *Rev. Med. Vet.* 61, 225-227.
- International Dairy Federation. 2001. World dairy situation. Bulletin, p. 339.
- McDonald JS. 1984. Streptococcal and staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North. Am. Large Anim. Pract.* 1984(2), 269-85.
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca de la Nación. 2011. Producción Argentina de Leche. Disponible en Internet: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/lacteos/docs/02_Nacional/indice_x/Indica_2011.pdf.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard. Second Edition. NCCLS Vol. 22 Número 6. M31.A2
- National Mastitis Council. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI. National Mastitis Council. p. 222.
- National Mastitis Council. 2003. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th ed. National Mastitis Council, W.D. Hoard and Sons Co., Fort Atkinson, WI. pp. 39-44.
- Neave FK, FH Dodd, RG Kingwill, DR Westgarth. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy Sci.* 52(5), 696-707.
- Owens WE, CH Ray, JL Watts, RJ Yancey. 1997. Comparison of Success of Antibiotic Therapy During Lactation and Results of Antimicrobial Susceptibility Tests for Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci.* 80, 313-317.
- Philpot WN, S Nickerson. 1993. Mastitis: El contraataque. Surge International Babson Bros Ed., Ill., USA.
- Prescott JF. 1999. Antimicrobial Chemotherapy. En: Hirsh DC, Zee YC (Eds), *Vet. Microbiol.* Blackwell Science, Inc. Malden, Massachusetts, pp. 28-45.
- Rabello RF, CR Souza, RS Duarte, RMM Lopes, LM Teixeira, ACD Castro. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 88(9), 3211-3219.
- Rampone H., C Bogni, J Giraud, A Calzolari. 1993. Identification of *Staphylococci* from Bovine Milk in Argentina. *Zbl. Bakt.* 279, 537-543.
- Reinoso EB, SG Bettera, CL Odierno CI Bogni. 2008. rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentine. *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.* 44, 115-121.
- Revelli GR, CG Rodriguez. 2001. Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina. *Tecnología Láctea Latinoamericana* N°23.
- San Martín B, J Kruze, MA Morales, H Agüero, B León, S Espinoza, D Iragüen, J Puga, C Borie. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X^a Región, Chile. *Arch. Med. Vet.* 34(2), 1-18.

- Sordillo LM. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Liv. Prod. Sci.* 98, 89-99.
- Trinidad PS, C Nickerson, DG Luther. 1990. Antimicrobial susceptibilities of *Staphylococcal* species isolated from mammary glands of unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73, 357-362.
- Vintov J, FM Aarestrup, CE Zinn, JE Olsen. 2003. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet. Microbiol.* 29(95), 133-147.
- Watts J. 1998. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16, 620-627.
- Wellenberg GJ, WHM Van Der Poel, JT Van Oirschot. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet. Microbiol.* 88(1), 27-45.
- Wilson DJ, RN Gonzalez, HH Das. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80, 2592-2598.
- Zecconi A, R Piccinini, LK Fox. 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during the program control in nine commercial dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223(5), 684-688.
- Ziv G. 1980. Drug selection and use in mastitis: systemic vs local therapy. *J.A.V.M.A.* 176, 1109-1115.