

Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina

F. L. PANTOZZI*, F. A. MOREDO, G. B. VIGO, G. I. GIACOBONI

Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, (1900) La Plata, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

** Correspondencia. E-mail: fpantozzi@fcv.unlp.edu.ar*

RESUMEN

Se estudiaron los patrones de resistencia a diversos antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de muestras fecales de individuos sanos, sin signología clínica, pertenecientes a los siguientes grupos animales: bovinos, equinos, ovinos, porcinos, gallinas ponedoras y caninos. Los antimicrobianos seleccionados fueron los empleados con mayor frecuencia en medicina veterinaria y humana, y el método de evaluación utilizado fue el de difusión en agar con discos. Los resultados obtenidos a partir de 240 *Escherichia coli*, 189 *Enterococcus* spp., 11 *Campylobacter* spp. y 2 *Salmonella* Gaminara (16:d:1,7), revelaron un mayor porcentaje de resistencia y multiresistencia en porcinos y aves, esto es, en animales de cría intensiva. El perfil de resistencia observado en los aislamientos de *E. coli* incluyó a la ampicilina, la estreptomycin, la tetraciclina y el ácido nalidíxico, en coincidencia con los antimicrobianos más utilizados en las explotaciones animales, al igual que lo detectado en *Enterococcus* spp. respecto a la tetraciclina y la eritromicina. Las cepas de *Salmonella* Gaminara (16:d:1,7) fueron sensibles a todos los antimicrobianos probados. En *Campylobacter* spp., si bien el número de aislamientos evaluados fue reducido, se observó una mayor resistencia a tetraciclina y quinolonas. Teniendo en cuenta la falta de datos en nuestro país sobre resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas en animales domésticos, consideramos que la información obtenida podría utilizarse como punto de partida para futuros programas de monitoreo.

Palabras clave: bacterias indicadoras, bacterias zoonóticas, monitoreo antimicrobiano, animales domésticos

ABSTRACT

Antimicrobial resistance in indicator and zoonotic bacteria isolated from domestic animals in Argentina. Antimicrobial resistance profiles in indicator and zoonotic bacteria isolated from faeces of healthy animals without clinical signs of the following species: bovine, equine, ovine, porcine, layer hens, and canine, were studied. The chosen antimicrobials are frequently used in veterinary and human medicine. The agar diffusion was the method used. The obtained results of 240 *Escherichia coli*, 189 *Enterococcus* spp., 11 *Campylobacter* spp. and 2 *Salmonella* Gaminara (16:d:1,7) showed a greater percentage of resistance and multiresistance in intensive breeding animals, porcines and layer hens. The observed resistance to ampicillin, streptomycin, tetracycline and nalidixic acid in *E. coli* coincides with the antimicrobials most commonly used on animal farms, the same as tetracycline and erythromycin in *Enterococcus* spp. The strains of *Salmonella* Gaminara (16:d:1,7) were susceptible to the antimicrobials tested. In *Campylobacter* spp. the scarce number of isolates hindered an adequate interpretation of the results. Owing to the lack of data in our country on antimicrobial resistance in indicator and zoonotic bacteria in domestic animals, we consider that the obtained values could be used as a starting point for a future monitoring program.

Key words: indicator bacteria, zoonotic bacteria, antimicrobial monitoring, domestic animals

Los agentes antimicrobianos son la principal herramienta terapéutica para controlar las infecciones bacterianas en humanos y animales. Sin embargo, desde el comienzo de su utilización se sabe que las bacterias poseen mecanismos para resistir a la acción de estos agentes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la resistencia a los antimicrobianos es un serio y complejo problema mundial que requiere la creación de un sistema de monitoreo global en medicina humana y animal. Estados Unidos, Canadá, Australia, Noruega y algunos países de la Unión Europea poseen pro-

gramas de monitoreo permanente que involucran tres importantes grupos bacterianos: las bacterias patógenas, las bacterias zoonóticas y las bacterias indicadoras. Estos programas se llevan a cabo en pollos, cerdos y vacas. El monitoreo de la resistencia en las bacterias entéricas indicadoras provenientes de animales sanos es de gran valor para detectar la tendencia. Aunque estas bacterias no son causa frecuente de infecciones en animales, pueden ser reservorios de genes de resistencia y diseminarse a otras bacterias, las que sí pueden causar infecciones en animales y en el hombre. Las bac-

terias zoonóticas pueden ser naturalmente transmitidas entre los animales y el hombre; por lo tanto, la resistencia a los antimicrobianos es importante para la salud pública. Las bacterias patógenas son aquellas que causan infecciones y que se aíslan de animales enfermos en muestras clínicas de rutina o en muestras *post mortem*.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de resistencia a diferentes antimicrobianos en bacterias indicadoras como *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp., y zoonóticas *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp., aisladas de distintas especies de animales domésticos sanos, entre los que se incluyeron pecuarios y mascotas. A tal fin se utilizaron las normas establecidas por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (5).

Se obtuvieron 50 muestras fecales de bovinos, equinos, ovinos, porcinos, gallinas ponedoras y caninos sanos, sin signología clínica. Las muestras de bovinos y ovinos se obtuvieron a partir de ganado de carne de cría extensiva. El método de cría de los porcinos, las gallinas ponedoras y los equinos era intensivo. Las muestras de bovinos se obtuvieron de 5 frigoríficos de la provincia de Buenos Aires. Las de equinos, porcinos y aves se obtuvieron de 5 establecimientos productivos para cada especie. En cada establecimiento se obtuvieron 10 muestras. El muestreo en caninos se realizó, también al azar, de animales que fueron asistidos en el Hospital de Pequeños Animales de nuestra institución. El muestreo se realizó entre los años 2006 y 2007.

Los géneros y especies estudiados fueron: *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. Las muestras se sembraron en medios de cultivo selectivos y diferenciales, de acuerdo con cada especie bacteriana. Para el aislamiento de *E. coli* se utilizó agar eosina azul de metileno (Britania, CABA, Argentina). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. De cada placa se tomó una colonia sospechosa de ser *E. coli* y se repicó en agar tripticasa de soja para su posterior identificación bioquímica, la que se llevó a cabo según la metodología estandarizada (6). Para detectar la presencia de *Enterococcus* spp., las muestras se sembraron en agar bilis esculina con azida (Britania). A las 48 horas de incubación a 37 °C, se tomó una colonia sospechosa y se repicó en agar tripticasa de soja y, tras 24 horas de incubación a 37 °C, se le realizaron las pruebas de pirrolidoniil-beta naftilamida (Pyr-A-Enterococos, Britania), y de crecimiento a 45 °C y a 10 °C. Para el aislamiento de *Campylobacter* spp., las muestras se sembraron en el medio Skirrow modificado (Becton Dickinson & Co., Sparks, EE.UU.), con sangre ovina desfibrinada al 5%, cefalotina 10 mg/l (ICN Biomedicals Inc., Ohio, EE.UU.), trimetoprima 5 mg/l (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), vancomicina 10mg/l (Sigma), polimixina B 2500 UI/l (Sigma). Las placas se incubaron en atmósfera microaerófila a 37 °C durante 48 horas. La identificación de las colonias sospechosas se realizó sobre la base de la coloración de Gram, reacciones de catalasa y oxidasa,

hidrólisis de hipurato, hidrólisis de indoxil acetato, sensibilidad a cefalotina y ácido nalidíxico y crecimiento a 26 °C, 37 °C y a 42 °C. Para el aislamiento de *Salmonella* spp., se siguieron las normas de FDA/CFSAN - BAM (4). Los aislamientos identificados como *Salmonella* spp. se serotipificaron por aglutinación de acuerdo con el esquema de Poppof (12). La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos se realizó por el método de difusión en agar con discos según normas del CLSI (3). Los antimicrobianos (Britania) ensayados con los aislamientos de *E. coli* y *Salmonella* spp. fueron: ampicilina (AMP) 10 µg, amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 20/10 µg, cefalotina (CEF) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, amicacina (AKN) 30 µg, estreptomycin (STR) 10 µg, tetraciclina (TET) 30 µg, ácido nalidíxico (NAL) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, cloranfenicol (CMP) 30 µg y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS) 25 µg. Con los aislamientos de *Enterococcus* spp. se ensayaron: AMP, vancomicina (VAN) 30 µg, linezolid (LZD) 30 µg, gentamicina (GENT) 120 µg, TET y eritromicina (ERY) 15 µg. En el caso de los aislamientos de *Campylobacter* spp. se probaron AMP, GEN, TET, NAL, enrofloxacin (ENR) 5 µg, CIP y ERY. La interpretación de los resultados se realizó según los documentos M 100- S 16 y M 31 A2 del CLSI (3, 10). En el caso particular de la estreptomycin, para la cual no existen puntos de corte publicados por el CLSI, se adoptaron los de la Sociedad Francesa de Microbiología (2). Como cepas control se utilizaron *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Se definió como multirresistente al aislamiento que presentó resistencia a cuatro o más familias de antimicrobianos.

Se obtuvieron 240 aislamientos de *E. coli*, 189 de *Enterococcus* spp. y 11 de *Campylobacter* spp: 8 *Campylobacter jejuni* y 3 *Campylobacter coli*. El número de aislamientos obtenidos por especie animal y los datos de la resistencia hallados frente a los diferentes antimicrobianos probados con estos aislamientos se muestran en las Tablas 1, 2 y 3. Se obtuvieron 2 aislamientos de *Salmonella* Gaminara (16:d:1,7) de bovinos, sensibles a todos los antimicrobianos probados.

El mayor porcentaje de resistencia y multirresistencia se observó en los animales de cría intensiva (porcinos y aves) en concordancia con datos internacionales, donde se informa resistencia en establecimientos que utilizan antimicrobianos. En nuestro estudio, en *E. coli* la resistencia observada a ampicilina, estreptomycin, tetraciclina y ácido nalidíxico coincide con los antimicrobianos más utilizados en explotaciones animales, al igual que la resistencia a tetraciclina y eritromicina en *Enterococcus* spp. En *E. coli*, los valores de resistencia en aislamientos obtenidos de cerdos coinciden con los encontrados en estudios previos en nuestro país y en países donde el empleo de agentes antimicrobianos no está debidamente controlado (15). En esta bacteria, la resistencia a

Tabla 1. Resistencia a los antimicrobianos en aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de diferentes especies animales (n= 240)

Antimicrobiano	N° de aislamientos resistentes (%)					
	Bovinos (n= 45)	Ovinos (n= 19)	Equinos (n= 35)	Porcinos (n= 43)	Gallinas (n= 49)	Caninos (n= 49)
Penicilinas						
Ampicilina	2 (4,4)	2 (10,5)	1 (2,8)	23 (53,5)	13 (26,5)	7 (14,3)
Cefalosporinas						
Cefalotina	0	1 (5,3)	0	2 (4,6)	8 (16,3)	3 (6,1)
Aminoglucósidos						
Gentamicina	0	0	2 (5,7)	3 (6,9)	12 (24,5)	1 (2,0)
Amikacina	4 (8,9)	0	5 (14,3)	0	20 (40,8)	1 (2,0)
Estreptomina	1 (2,2)	1 (5,3)	2 (5,7)	27 (62,8)	8 (16,3)	9 (18,4)
Tetraciclinas						
Tetraciclina	4 (8,9)	4 (21,0)	2 (5,7)	38 (88,4)	37 (75,5)	10 (20,4)
Quinolonas						
Ácido nalidíxico	3 (6,7)	0	3 (8,6)	9 (20,9)	34 (69,4)	4 (8,2)
Ciprofloxacina	0	0	0	1 (2,3)	5 (10,2)	3 (6,1)
Fenicoles						
Cloranfenicol	1 (2,2)	0	1 (2,9)	19 (44,2)	12 (24,5)	1 (2,0)
Sulfonamidas						
Trimetoprima/ sulfametoxazol	0	0	1 (2,9)	13 (30,2)	9 (18,4)	5 (10,2)

La amoxicilina/ácido clavulánico y la cefotaxima fueron activas frente al 100% de los aislamientos.

Tabla 2. Resistencia a los antimicrobianos en aislamientos de *Enterococcus* spp. obtenidos de diferentes especies animales (n = 189)

Antimicrobiano	N° de aislamientos resistentes (%)					
	Bovinos (n = 10)	Ovinos (n = 29)	Equinos (n = 38)	Porcinos (n = 28)	Gallinas (n = 45)	Caninos (n = 39)
Penicilinas						
Ampicilina	0	0	0	0	0	2 (5,1)
Aminoglucósidos						
Gentamicina	0	0	2 (5,3)	0	2 (4,4)	2 (5,1)
Tetraciclinas						
Tetraciclina	2 (20)	5 (17,2)	2 (5,3)	26 (92,8)	33 (73,3)	12 (30,8)
Macrólidos						
Eritromicina	0	1 (3,4)	0	20 (71,4)	33 (73,3)	9 (23,1)

El linezolid y la vancomicina fueron activos frente al 100% de los aislamientos.

tetraciclina se observa con mayor frecuencia que la resistencia al resto de los antimicrobianos utilizados; esto coincide con datos presentados en otros países (7, 13). La multiresistencia también está asociada a dicho antimicrobiano, el patrón más frecuentemente observado en cepas de *E. coli* aisladas de porcinos y vacunos fue AMP-STR-TET-CMP. Estos datos concuerdan con los que se informan en publicaciones extranjeras (14). Sayah *et al.* (13) sugiere que las cepas de *E. coli* resis-

tentes a tetraciclina poseen una mayor capacidad de adquirir resistencia a otros antimicrobianos.

La resistencia al ácido nalidíxico se debería al uso de enrofloxacin, fluoroquinolona que actuaría como factor de selección de resistencia (14) y la resistencia a eritromicina al uso de macrólidos (8). Los porcentajes de resistencia hallados en *Enterococcus* spp. coinciden con datos publicados en países europeos, como Dinamarca, España y Lituania (1). En *Campylobacter* spp., el méto-

Tabla 3. Resistencia a los antimicrobianos en aislamientos de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* obtenidos de diferentes especies animales (n = 11)

Antimicrobiano	N° de aislamientos resistentes		
	Porcinos (n = 5)	Gallinas (n = 1)	Caninos (n = 5)
Penicilinas			
Ampicilina	1 / 5	0	0
Tetraciclinas			
Tetraciclina	4 / 5	1 / 1	4 / 5
Macrólidos			
Eritromicina	1 / 5	0	0
Quinolonas			
Ácido Nalidíxico	4 / 5	1 / 1	3 / 5
Ciprofloxacina	3 / 5	0	1 / 5

La gentamicina fue activa frente a todos los aislamientos.

do de difusión en agar con discos puede ser utilizado para la evaluación de aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclina y eritromicina (9). Si bien en nuestro estudio el número de aislamientos estudiado fue bajo, se observa una mayor resistencia a tetraciclina y quinolonas, en coincidencia con datos hallados en otros países (11). Teniendo en cuenta la falta de información en nuestro país sobre resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas en animales domésticos, consideramos que los valores obtenidos podrían utilizarse como punto de partida en futuros programas de monitoreo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup FM, Hasman H, Jensen LB, Moreno M, Herrero IA, Domínguez L, *et al.* Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three european countries. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4127-9.
- CASFM. Les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2008; du Groupe de Travail: Antibiogramme Vétérinaire.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, 2006; M 100-S 16. Wayne, Pa, USA.
- Food and Drug Administration. Chapter 5: *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual, 9th edition, USA, 2003.
- Franklin A, Acar J, Anthony F, Gupta R, Nicholls T, Tamura Y, *et al.* Antimicrobial resistance: harmonisation of national antimicrobial resistance monitoring and surveillance programmes in animals and in animal-derived food. *Scientific and Technical Review, Office International des Épizooties (O.I.E.)* 2000; 20: 859-70.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Enterobacteriaceae*. En: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, editors. *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1999, p. 171-250.
- Lim SK, Lee HS, Nam HM, Cho YS, Kim JM, Song SW, *et al.* Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. *Int J Food Microbiol* 2007; 116: 283-6.
- Lin J, Yan M, Sahin O, Pereira S, Chang YJ, Zhang Q. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1678-86.
- Luangtongkum T, Morishita TY, El-Tayeb AB, Ison AJ, Zhang Q. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 590-4.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard, 2nd edition, 2002; M31-A2. Wayne, Pa, USA.
- Payot S, Dridi S, Laroche M, Federighi M, Magras C. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Vet Microbiol* 2003; 101: 91-9.
- Popoff M, Bockemuhl J, McWorther-Murlin A. Supplement 1990 (no. 34) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 1991; 142: 1029-33.
- Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic -and wild- animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 1394-404.
- Webber M, Piddock JV. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet Res* 2001; 32: 275-84.
- Yang H, Chen S, White D, Zhao S, McDermond P, Walter R. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from diseases chickens and swine in China. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3483-9.