

Sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* en bovinos de explotación intensiva y extensiva interpretadas por punto de corte epidemiológico

Florencia L. Pantozzi¹, Mariana I. Buffoni Almeida¹, María L. Casaux¹



Resumen: Se estudió la "disminución de sensibilidad" o población "non-wild-type" (NWT) a diferentes antimicrobianos en 120 cepas de *Escherichia coli*, aisladas de materia fecal de bovinos de terminación aparentemente sanos, 60 cepas de bovinos de explotación intensiva (EI) y 60 cepas de bovinos de explotación extensiva (EE). Los antimicrobianos seleccionados son los frecuentemente utilizados en medicina veterinaria y humana. La sensibilidad antimicrobiana fue determinada por el método de concentración inhibitoria mínima (CIM) de dilución en agar. El criterio de interpretación fue establecido en base al punto de corte epidemiológico, epidemiological cutoff (ECOFF), epidemiological cutoff values (ECV) o wild type cutoff values (WCV). Las cepas de *Escherichia coli* aisladas de EI mostraron "disminución de sensibilidad" a tres familias de antimicrobianos: aminoglucósidos, tetraciclinas y fluorquinolonas, mientras que las cepas aisladas de EE a la familia de quinolonas y fluorquinolonas, coincidiendo con los antimicrobianos más utilizados en la explotación animal. Además se hallaron 16/60 cepas pertenecientes a la población NWT o con "disminución de sensibilidad" a cefotaxima aisladas en animales de EE.

Palabras clave: *Escherichia coli*, punto de corte epidemiológico, "non-wild-type", bovinos, explotación intensiva.

Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* in bovinos from intensive and extensive breeding interpreted by epidemiological cutoff values

Abstract: "Reduced susceptibility" or "non-wild-type" population (NWT) to different antimicrobial in 120 *Escherichia coli* strains, isolated from finishing bovinos faeces of apparently healthy animals, 60 strains from intensive breeding bovinos (EI) and 60 from extensive breeding (EE) bovinos were studied. The selected antimicrobials are frequently used in veterinary and human medicine. The minimal inhibitory concentration was determined by agar dilution method. Interpretative criteria on the basis of epidemiological cutoff (ECOFF) epidemiological cutoff values (ECV) or wild type cutoff values (WCV) were established. *Escherichia coli* strains isolated from EI showed "reduced susceptibility" to three antimicrobial families: aminoglycosides, tetracyclines and fluorquinolones, whereas strains isolated from EE showed "reduced susceptibility" to quinolones and fluorquinolones families, coinciding with the antimicrobials most used in animal farms. In addition, 16/60 strains belonging to NWT population or with "reduced susceptibility" for cefotaxime isolated from EE animals were found.

Key words: *Escherichia coli*, epidemiological cutoff values, "non-wild-type", bovinos, intensive breeding.

Introducción

La resistencia antimicrobiana es un problema global que atañe a la salud pública y animal que está influenciado por el uso de antimicrobianos (ATM) en las poblaciones. Existen evidencias que el uso racional de los mismos disminuye la emergencia de resistencia¹. La preocupación por el aumento de las resistencias bacterianas frente a los ATM comenzó a principios de los años noventa al detectarse en algunos enfermos bacterias resistentes a todos los ATM conocidos. Los ATM se emplean en animales para los dos mismos usos que en personas; combatir las infecciones producidas por bacterias sensibles y prevenir la aparición de infecciones en situaciones de riesgo. Sin

embargo, existe una tercera forma de uso, que sí es específica de animales y que es su empleo como agentes promotores de crecimiento (APC), fundamentalmente en explotación intensiva, creando otro frente de generación de resistencias.

Los epidemiólogos deben conocer los datos de la sensibilidad bacteriana que indican la emergencia de resistencia y permiten un control apropiado de las medidas a considerar². Para hacer el reporte de los datos se utiliza el punto de corte epidemiológico (ECOFF o ECV) o "wild-type cutoff values" (WCV). Éste se utiliza para describir la distribución de la sensibilidad de la población "wild type" (WT) para las especies bacterianas. El *European Commit-*

1. Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. fpantozzi@fcv.unlp.edu.ar

tee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) define la distribución de bacterias WT como la población de microorganismos que no poseen mecanismos de resistencia detectables fenotípicamente. La población que se aleja de la población normal o WT es categorizada como "non-wild-type" (NWT). El ECOFF, ECV o WCV se determina en base a la distribución de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para un agente antimicrobiano y una especie bacteriana dada. Los datos de referencia internacional son recolectados, aceptados y agregados en una base de datos de distribución de CIM de la población WT por el EUCAST³. Cuando se citan datos donde se usan ECOFF, ECV o WCV, los términos "sensible" o "resistente" son inapropiados, las bacterias deberían citarse como WT si el valor de la CIM cae dentro del rango WT o NWT si el valor de la CIM es mayor al rango WT⁴.

El objetivo de este trabajo fue detectar la "disminución de sensibilidad" o población NWT a diferentes ATM en *Escherichia coli*, aisladas de materia fecal de bovinos de terminación aparentemente sanos, provenientes de explotación intensiva (EI) y extensiva (EE) y obtener datos para evaluar junto con estudios prospectivos la influencia de los APC en la resistencia ATM.

Materiales y métodos

Se obtuvieron 60 muestras de materia fecal de 4 establecimientos de explotación intensiva (EI) de la provincia de Buenos Aires y 60 muestras de cuatro establecimientos de explotación extensiva (EE), tres de ellos de la provincia de Buenos Aires y uno de la provincia de Santiago del Estero. Del total de los establecimientos se obtuvieron: en cuatro de ellos 10 muestras al azar y en los 4 restantes 20 muestras al azar. La materia fecal fue remitida en bolsas de polietileno y refrigerada hasta su procesamiento. El muestreo se realizó entre los años 2010 y 2012.

La especie bacteriana estudiada fue *Escherichia coli* como bacteria indicadora, aislada de materia fecal de bovinos de terminación aparentemente sanos, sin signología clínica, provenientes de EI y EE. Las muestras se sembraron en medio de cultivo selectivo y diferencial, agar eosina azul de metileno (Britania, Buenos Aires, Argentina). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. De cada una se tomó una colonia sospechosa de *Escherichia coli* y se repicó en agar tripticasa soya para su posterior identificación bioquímica, la que se llevó a cabo según la metodología estandarizada⁵. La prueba de sensibilidad antimicrobiana fue determinada por el método de la concentración inhibitoria mínima de dilución en agar según normas del CLSI⁶.

Los ATM probados fueron: ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefotaxima (CTX), gentamicina (GEN), ampicilina (AKN), estreptomina (STR), ácido nalidíxico (NAL), enrofloxacin (ENR), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol

(CMP), florfenicol (FLO), tetraciclina (TET) y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS). Como cepa control se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25 922.

La interpretación de los resultados se llevó a cabo en base a los puntos de corte epidemiológicos o "wild-type cutoff values" de acuerdo a los datos del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)³.

Resultados

Los resultados de la CIM y ECOFF, ECV o WCV de *Escherichia coli* para bovinos de EI y EE están expresados en la Tabla 1.

De las 60 cepas de *Escherichia coli* aisladas de bovinos provenientes de EI, se hallaron 18/60 cepas pertenecientes a la población NWT para GEN, 11/60 para AKN y 29/60 cepas NWT para STR. Para ENR, se hallaron 11/60 cepas y para CIP 20/60 pertenecientes a la población NWT. Para TET 29/60 fueron las cepas NWT halladas.

De las 60 cepas de *Escherichia coli* aisladas de bovinos provenientes de EE, se hallaron 19/60 cepas NWT para NAL, 20/60 para ENR y 18/60 para CIP.

Además, se hallaron 16/60 cepas NWT ó con "disminución de sensibilidad" para CTX.

Discusión

En los establecimientos de producción intensiva se utilizan normalmente diferentes sustancias como promotores de crecimiento, sustancias que adicionadas a dosis subterapéuticas por un prolongado período de tiempo, producen mejoras en los índices de crecimiento y eficiencia en la conversión alimenticia. Entre estas sustancias se encuentran agentes antimicrobianos. A nivel mundial, los antimicrobianos como promotores de crecimiento (APC), se utilizaron desde la década del 50. En el año 1999, debido a la preocupación causada por el incremento de la resistencia antimicrobiana en medicina humana y veterinaria, la Unión Europea decidió prohibir el uso de algunos APC, en particular productos que contenían ATM que eran también usados en tratamientos humanos. En el año 2006, como medida precautoria, se prohibió el uso de las ATM restantes como APC. No hay evidencias que estos APC hayan causado problemas de resistencia antimicrobiana en humanos, pero la UE considera prudente evitar cualquier riesgo por el uso de los mismos⁷.

Según informes del Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP), la prohibición de los APC determinó un aumento en el uso terapéutico de ATM debido al aumento de la incidencia de enfermedades en los animales. A partir de la primera prohibición se esperaba una disminución de la tasa de resistencia a los ATM usados en medicina humana, y contrariamente a lo esperado aumentó la misma en bacterias zoonóticas a varios ATM usados en medicina humana⁸.

Tabla 1. Distribución de CIM y ECOFF, ECV ó WCV de *Escherichia coli* para bovinos de Explotación Intensiva (n= 60) y de Explotación Extensiva (n= 60)

		Distribución (n) de CIM (mg/L) y ECOFF, ECV o WCV															
ATM	Explotación	0.004	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
AMP	Intensiva										31	8	15	3	1	2	
	Extensiva										20	32	4	4			
CEF	Intensiva											5	29	7	19		
	Extensiva											13	25	17	5		
CTX	Intensiva			8	1	31	15	3									
	Extensiva		5	6	10	17	5	1	1	15							
GEN	Intensiva							27	11	4		8	9	1			
	Extensiva					6	2	15	12	21		3	1				
AKN	Intensiva									14	8	24	3	9	2		
	Extensiva						1	3	5	27	8	11		4	1		
STR	Intensiva										2	1	17	11	20	7	2
	Extensiva										22	13	15	4	4	2	
NAL	Intensiva										4	22	26	6	1		1
	Extensiva									7	14	11	9	2			17
ENR	Intensiva			2	14	23	11	8	2								
	Extensiva		8	4	18	9	1	2	3	4	4	7					
CIP	Intensiva	1	2	15	22	11	2	7									
	Extensiva	6	5	26	5	1	1	1	5	3	7						
CMP	Intensiva											12	32	13	3		
	Extensiva								5		7	8	31	8		1	
FLO	Intensiva											9	35	2	14		
	Extensiva								4	3		3	28	18	4		
TET	Intensiva										8	12	10	1	15	14	
	Extensiva								7		16	23	10	2		2	
TMS	Intensiva							46	6	6		1	1				
	Extensiva							60									

Las líneas verticales en negrita indican el punto de corte epidemiológico (ECOFF, ECV o WCV) para disminución de sensibilidad o población NWT.

AMP: ampicilina, CEF: cefalotina, CTX: cefotaxima, GEN: gentamicina, AMK: amicacina, STR: estreptomycin, NAL: ácido nalidíxico, ENR: enrofloxacin, CIP: ciprofloxacina, CMP: cloranfenicol, FLO: florfenicol, TET: tetraciclina, TMS: trimetoprima-sulfametoxasol.

En Argentina, en los establecimientos de EI de bovinos el APG usado por excelencia es la monensina, ATM que pertenece al grupo de los ionóforos de uso exclusivo en salud animal. Es probablemente uno de los APC más efectivos y seguros en relación a la salud humana y animal asociado con los problemas de resistencia bacteriana.⁹ Prohibida en la UE como APC desde el año 2006, no siendo así en otros países.

Las cepas de *Escherichia coli* aisladas de EI mostraron valores superiores al punto de corte a tres familias de ATM, aminoglucósidos, tetraciclinas y fluorquinolonas, mientras que las cepas aisladas de EE a la familia de quinolonas y fluorquinolonas. Además se hallaron 16/60 cepas pertenecientes a la población NWT ó con sensibilidad disminuída a CTX aisladas en animales de EE que se debería al uso de cefalosporinas de tercera generación como uso terapéutico.

Estos valores epidemiológicos servirán para cotejar con datos obtenidos con el mismo procedimiento en estudios prospectivos, y de esa manera vigilar la emergencia de resistencia ATM, observar la influencia que produce el uso de APC y permitir el control apropiado de las medidas a considerar.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del subsidio otorgado por la Secretaría de Políticas Universitarias del Ministerio de Educación de la Nación, SPU: 2118/10, N° de SIDIF 311 226, para el proyecto “Desarrollo de un Programa Nacional de Monitoreo de Resistencia Antimicrobiana en Bacterias de Origen Animal”.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. OIE [Internet]. Francia: Organización mundial de Sanidad. List of Antimicrobials of Veterinary Importance at its 75th General Session in May 2007 (Resolution No. XXVIII); 2007 [consulta: el 19 febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/18997700/OIE-List-Antimicrobials>
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Generation, Presentation, and Application of Antimicrobial Susceptibility Test Data for Bacteria of Animal Origin; A Report 2011; X08-R 31 17. Wayne, Pa, USA.
3. EUCAST [Internet]. Suiza: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *MIC distributions of wild type microorganisms; 2013* [consulta: el 21 de febrero de 2013]. Disponible en: <http://217.70.33.99/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=init>
4. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP & Gaastra W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol* 2010; 141: 1-4.
5. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Enterobacteriaceae. En: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, eds. *Diagnóstico Microbiológico*. 5ª edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 1999. Págs. 171-250.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition 2008; M31-A3 28. Wayne, Pa, USA.
7. Phasing Out of Antimicrobial Growth Promoters [Internet]. Reino Unido: Veterinary Medicines Directorate. Department for Environment, Food and Rural Affairs; 2011 [consulta: el 26 de febrero de 2013]. Disponible en: http://www.vmd.defra.gov.uk/vet/antimicrobial_agp.aspx.
8. DANMAP [Internet]. Copenhagen: Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme; 2007 [consulta: el 20 de febrero de 2013]. Disponible en: http://www.food.dtu.dk/upload/f%C3%B8devareinstituttet/food.dtu.dk/publikationer/tilbagevendende_publicationer/danmap/danmap_2006.pdf.
9. Butaye P, van Damme K, Devriese LA, et al. In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. *Int J Food Microbiol* 2000; 54: 181-7.