



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DEL *Staphylococcus aureus* EN
VACAS LECHERAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA DE TRES MUNICIPIOS
DEL ESTADO DE MICHOACÁN

TESIS QUE PRESENTA

NORBERTO PATIÑO SÁNCHEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESORES
MC JOSÉ LUIS CARLOS BEDOLLA CEDEÑO
MC SALVADOR PADILLA ARELLANES

Morelia, Michoacán Diciembre de 2008



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DEL *Staphylococcus aureus* EN
VACAS LECHERAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA DE TRES MUNICIPIOS
DEL ESTADO DE MICHUACÁN

TESIS QUE PRESENTA

NORBERTO PATIÑO SÁNCHEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Morelia, Michoacán Diciembre de 2008

AGRADECIMIENTOS

A MIS PAPAS FELIPE PATIÑO FRASCO, SALUD SÁNCHEZ DE P, Y A MIS HERMANOS QUE SIN SU APOYO Y AYUDA, NO HUBIESE REALIZADO EL TERMINAR COMO MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA.

La realización de este trabajo hubiese resultado imposible sin el esfuerzo realizado por muchas personas que aportan desinteresadamente su tiempo y sus conocimientos. Siendo normal el apoyo de los doctores Ariel Jiménez Torres, José Adauto De niz García, Rogelio Garcidueñas Piña, Marcelino Martínez Contreras y Rene Bello en lo referente a formato, material bibliográfico, redacción, etc. El autor desea dar las gracias a todos estos importantes participantes por su apoyo incondicional, orientación y consejos.

ÍNDICE

| | |
|--|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | - 1 - |
| 2.0. REVISIÓN DE LITERATURA | - 3 - |
| 2.1 LA VACA COMO UNIDAD DE PRODUCCIÓN | - 3 - |
| 2.2 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA | - 3 - |
| 2.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA..... | - 4 - |
| 2.4 DEFINICIÓN DE MASTITIS | - 5 - |
| 2.5 CLASIFICACIÓN DE LA MASTITIS..... | - 6 - |
| 1.- <i>Mastitis Clínica</i> | - 6 - |
| 2.- <i>Mastitis Subclínica</i> | - 7 - |
| 3.- <i>Infección latente</i> | - 8 - |
| 2.6 IMPACTO DE LA MASTITIS EN LA SALUD PÚBLICA..... | - 8 - |
| 2.7 FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS A LA MASTITIS..... | - 8 - |
| 2.7.1 <i>Factores Socio-culturales y de Manejo</i> | - 9 - |
| 2.7.2 <i>Factores Ambientales</i> | - 9 - |
| 2.7.4 <i>Factores Nutricionales</i> | - 10 - |
| 2.8 TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS DE LA MASTITIS | - 10 - |
| 2.8.1 <i>Prueba de California (California mastitis test=CTM)</i> | - 11 - |
| 2.8.2 <i>Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)</i> | - 11 - |
| 2.8.3 <i>Prueba Hymast para Mastitis</i> | - 11 - |
| 2.9 FARMACOLOGÍA BÁSICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS | - 12 - |
| 2.9.1 <i>Grupos de Fármacos empleados</i> | - 12 - |
| 2.10 CONTROL DE LA MASTITIS | - 15 - |
| 2.11 RESISTENCIA DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS A LOS ANTIBIÓTICOS | - 16 - |
| 2.11.1 <i>Desventajas de los antibióticos en salud pública</i> | - 17 - |
| 3. JUSTIFICACIÓN | - 18 - |
| 4. OBJETIVO GENERAL | - 18 - |
| 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | - 19 - |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | - 19 - |
| 6. RESULTADOS | - 20 - |
| 7. DISCUSIÓN | - 22 - |
| 8. CONCLUSIONES | - 24 - |
| 9. LITERATURA CITADA | - 25 - |

1. INTRODUCCIÓN

La leche ha sido considerada un excelente alimento para humanos debido a que posee un gran valor nutricional. La cantidad y composición de la leche es afectada por factores genéticos, ambientales, frecuencia de ordeño, intervalo entre ordeños, eficiencia del ordeño, época del año, persistencia de lactación, enfermedades de la ubre, contaminantes “residuos de fármacos” etc. (Ruegg 2002, Ávila, 2004).

Dentro de estos factores cabe mencionar especialmente a las enfermedades de la ubre por agentes patógenos y específicamente el *Staphylococcus aureus*, que es uno de los principales microorganismos contagiosos de la mastitis o inflamación del parénquima de la glándula mamaria con variable presentación clínica (Ávila 2004, Fox 2002, Morin 2004). El cuadro clínico puede presentarse desde una leve mastitis subclínica hasta la completa gangrena de la glándula por el desprendimiento de toxinas del *Staphylococcus aureus*, por una gama amplia de prácticas mal llevadas a cabo en las granjas. Se puede llegar a presentar una alta prevalencia de hasta del 40% o más en diferentes grados, siendo la mastitis subclínica la presentación más frecuente (Ávila 2003, Radostits 1999, Zecconi 2006). Sin embargo, un gran número de glándulas con mastitis no se detecta fácilmente mediante palpación ni por el examen visual de la leche (mastitis subclínica).

Debido al elevado número de casos subclínicos, el diagnóstico de la mastitis depende principalmente de las pruebas indirectas, como lo son: tazon de fondo oscuro, la de California (CMT), Wisconsin, Hymast, cuenta microscópica de células somáticas, conteo infrarrojo, etc (Ávila 2004, Cano 2004, Ruegg 2004), que a su vez depende del contenido de leucocitos en la leche (Ruegg 2002, Romero y Ruiz 2003).

Hoy en día las vacas lecheras son sometidas a un máximo rendimiento a través de la práctica repetida de ordeños “dos o tres ordeños en 24 horas”, con lo cual se consigue una mayor irrigación sanguínea en el parénquima mamario y por lo tanto una mayor producción (Harmon, 2007, Ingalls 2007).

Por un lado la higiene y por otro la técnica empleada en el ordeño ya sea manual o mecánica son considerados puntos críticos importantes para la persistencia de un microorganismo e infección en la glándula mamaria de una vaca en lactación así como la diseminación en el rebaño (Philpot y Nickerson, 1993).

En cualquier operación lechera se puede aplicar un plan completo para el control de mastitis, desde aspectos tan básicos como el manejo, hasta llegar a realizar muestreos continuamente de leche y cultivos para la demostración específica del o los agentes que se encuentran en el establo y obviamente su tratamiento oportuno y correcto (Philpot y Nickerson 1993).

Sin embargo, la mastitis causada por microorganismos específicos, requiere una especial atención para reducir la prevalencia de la infección. Cuando se tratan de controlar infecciones específicas, es necesario considerar la naturaleza de los microorganismos (Fox 2002).

El control de microorganismos contagiosos se considera muy difícil ya que pueden estar presentes en el hato diferentes cepas simultáneamente. Por lo cual es factible reducir las infecciones con las buenas prácticas como lo son el presellado, colocación correcta de las pezoneras, sellado de los pezones, el tratamiento antimicrobiano adecuado, el retrolavado para prevenir el esparcir la mastitis, etc (Nickerson y Philpot 1993, Nappert 2001).

Por tanto, con sencillas prácticas bien llevadas a cabo se pueden evitar problemas tan drásticos como lo son problemas de salud pública por leche contaminada con agentes patógenos, residuos de antibióticos y resistencia a estos últimos “creación de superbacterias”, además del impacto económico que representan para el granjero (Cano 2004, Ocampo 2004, Philpot 1993).

Hoy en día aun se siguen utilizando tratamientos empíricos por parte del granjero sin conocimiento alguno de los riesgos que implica para la salud pública y de las mismas vacas en el establo así como de la creación de resistencia por parte de las bacterias, principalmente contagiosas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la resistencia a los antimicrobianos de variable espectro que presenta el *Staphylococcus aureus* aislado de leche de vacas lecheras con mastitis subclínica en algunos hatos de los municipios de, Maravatío, Pátzcuaro, y, Tarímbaro en el estado de Michoacán.

A partir de 30 establos con 10 vacas en promedio por granja se procedió a diagnosticar la mastitis subclínica por la prueba de California, obteniéndose los siguientes resultados: 64.3, 83.5 y 36% para el 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} municipio respectivamente. Y con 17, 22 y 32%, de cultivos positivos al *Staphylococcus aureus* respecto a cada uno de los municipios. Encontrándose los siguientes porcentajes de resistencia 16% ampicilina, 5% cefalotina, 11% ceftazidima, 4% cefotaxima, 7% cefuroxima, 4% dicloxacilina, 34% eritromicina, 3.5% gentamicina, 14% pefloxacina, 36% penicilina, 15% tetraciclina, y 28% sulfatrimetoprim.

2.0. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La vaca como unidad de producción

Aún cuando se han logrado avances significativos en el control de la mastitis, la enfermedad continúa siendo una de las principales causas de desecho de vacas en las unidades de producción, así como de pérdidas económicas en la industria lechera del mundo, principalmente debido a una menor producción láctea, mayores costos de producción y menor calidad de la leche (Ruiz y Romero 2003).

Las vacas lecheras son generalmente ordeñadas dos o tres veces por día. Típicamente esto involucra un sistema de ordeño mecánico, pero en algunas áreas el ordeño a mano es aun practicado. Sin tener en cuenta como son ordeñadas las vacas los pezones y la punta de estos específicamente son puntos críticos de control para remoción de leche y control de mastitis. Cuando un problema ocurre en estas áreas la consecuencia usualmente es pobre comportamiento del ordeño, incremento en el número de nuevas infecciones y elevado recuento de células somáticas (Ingalls 2008).

Existen muchos estudios que se dirigen a la cantidad “normal” o mínima de enfermedades que se presentan en hatos lecheros bajo diferentes condiciones de granja. Diferentes riesgos se aplican a la mastitis “animales de primera lactación deben de tener una cantidad mucho menor de mastitis en comparación de los adultos” (Ruegg 2001).

2.2 Anatomía y Fisiología de la Glándula Mamaria

La ubre representa un conjunto de cuatro glándulas de origen dérmico, considerada como una glándula sudorípara modificada y cubierta externamente por una piel suave al tacto, provista de vellos finos excepto en los pezones (Cunningham 2003; Sisson 1983; Swenson 1999; Ávila y Gutiérrez 2006).

Cada cuarto consiste en tejido secretor que produce leche que se conoce como alvéolo, dos áreas de almacenamiento denominadas cisternas y un pezón. Un componente importante del pezón es el “canal de Streak” un tejido muscular grueso que esta protegido con sustancias antibacteriales y cierra el pezón cuando no se está extrayendo leche. Cada cuarto es independiente y está separado de los otros por ligamentos gruesos (Ruegg 2001; Ávila 2006; Swenson 1999).

La mayor parte de la ubre está compuesta de alvéolos y la leche se almacena en las siguientes proporciones: 60% en los alvéolos, 20% en los conductos y 20% en las cisternas. Las células que cubren el alvéolo son las que producen la leche; al llenarse el alveolo con leche, la presión en las células epiteliales aumenta y la producción de leche se hace más lenta. Las arterias que suministran los nutrientes para la producción de leche corresponden a cada

alvéolo. Se estima que cada ml de leche requiere entre 500 y 100 ml de sangre circulando por la ubre y 8% del volumen total de la vaca lechera está presente en la ubre. Células de músculo rodean el alvéolo, denominadas "mioepiteliales". Para extraer leche, los músculos alrededor del alvéolo se deben contraer para mover la leche hacia los conductos y cisternas, proceso denominado bajada de la leche. Este proceso es iniciado por el entorno y el estímulo físico que activa una serie de eventos hormonales. El estímulo positivo envía señales a la glándula pituitaria para producir oxitocina. La oxitocina viaja a la ubre por el torrente sanguíneo y hace que las células mioepiteliales alrededor del alvéolo se contraigan y muevan la leche hacia el conducto y sistema de cisterna donde puede ser extraída mediante el proceso de ordeño (Ruegg 2001; Swenson 1999; Cunningham 2003; Ávila 2006).

2.3 Fisiopatología de la Glándula Mamaria

Los microorganismos no pueden pasar directamente entre los cuartos, pero los antibióticos (administrados en un cuarto o sistemáticamente) se absorben y se pueden diseminar por toda la ubre (Ruegg 2001).

El *Staphylococcus aureus* es el agente etológico más común de la mastitis contagiosa bovina, es una bacteria encapsulada gram positiva. El polisacárido capsular es antifagocítico y es uno de los muchos factores de virulencia producido por este patógeno (Ma 2005; Fox 2002; Zecconi 2006).

La mastitis bovina se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria, leche anormal y la reducción del rendimiento. Los casos severos pueden manifestarse con signos clínicos tales como fiebre, depresión, anorexia y pérdida de peso. Es una de las causas más importantes de pérdidas económicas en la industria lechera, con un estimado en pérdidas anuales mayores a \$1.8 millones de dólares en los EUA (Ma 2005; Philpot 1992).

Ruiz (1968) en México señala un porcentaje en mastitis subclínica de 75% en ganado ordeñado manualmente en el Valle de México, Trejo (1978) reportó una frecuencia de mastitis subclínica del 75% en ganado ordeñado mecánicamente y del 98% para el ordeñado a mano, Juárez (1980) informó para esta misma región una frecuencia del 78%. Ávila, et al, (1993), en un estudio de hato realizado en 500 vacas ubicadas en el Valle de México y ordeñadas mecánicamente, la frecuencia anual de mastitis clínica fue del 69%, lo que representó una pérdida económica comparativa a la producción de 43 vacas con 6,000 kg de leche por lactancia.

Esta bacteria es altamente dañina al tejido productor de leche debido a las toxinas patógenas que desprende. Dichas toxinas son capaces de provocar gangrena húmeda, delimitándose claramente esta lesión dado que el color de la piel de la ubre toma un tono azul, al tacto es fría y húmeda, si el animal sobrevive a la afección, esta zona se necrosa y se cae totalmente (Ávila 2004; Perusia 1997; Philpot 1993).

Inicialmente, la bacteria daña los tejidos de las paredes de las cisternas, luego pasan a los ductos y crean unos bolsillos profundos de infección en los tejidos alveolares. A esto le sigue la formación de abscesos y el secuestro de las bacterias en los tejidos cicatrizantes. Dicho secuestro puede ser un mecanismo de defensa útil para mantener la infección en un sólo sitio, pero resultan en la formación de tejido cicatrizante responsable en cierto modo de la pobre cura con los antibióticos durante la lactancia, lo que se experimenta comúnmente con las infecciones del *Staphylococcus aureus* (Philpot y Nickerson 1993).

Durante el curso de la mastitis causada por *Staphylococcus*, el daño de los tejidos es variable, y sólo pequeñas áreas de la glándula se ven afectadas, pero los tejidos no involucrados usualmente se convierten a un estado no segregador y adormilado. Las células de los alvéolos y ductos pueden no degenerarse, y juntamente con células somáticas tapan los ductos de la leche que vacían las áreas productoras de la misma (Philpot y Nickerson 1993).

Esto lleva a la involución de los alvéolos restantes, lo mismo que a la formación de tejido cicatrizante. Es posible que ductos taponados vuelvan a abrirse, regando con *Staphylococcus aureus* a otras áreas de la glándula, y el proceso se repita, iniciándose un ciclo continuo de infección y reinfección en diferentes áreas del cuarto. Durante las primeras etapas de infección el daño es mínimo y reversible, y si se trata efectivamente en sus primeras fases, el cuarto volverá a su producción de leche casi normal en las lactancias siguientes. Si hay microorganismos que permanecen dentro de las áreas tapadas, los abscesos pueden ser más grandes y convertirse en abultamientos apreciables en el tejido de la ubre (Philpot 1992; Zecconi 2006).

La toxina producida por el *Staphylococcus aureus* hace que los vasos de la sangre se contraigan y produzcan un cierre masivo, parando todo el flujo de la sangre en el área afectada. Esta mastitis súper aguda con gangrena lleva a la pérdida del cuarto, y en algunos casos, a la muerte de la vaca. La mastitis con gangrena se caracteriza por manchas azulosas, frío en los tejidos afectados y secreción de suero sanguíneo por la piel (Philpot y Nickerson 1993; Hébert 2000).

Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* de infecciones intramamarias producen muchos factores potenciales de virulencia, incluyendo enterotoxinas, coagulasa, alfa, beta y gama-toxinas, hemolisina, hialuronidasa y leucocidinas, que participan en los distintos grados de la inflamación característica de la mastitis por estafilococos, desde la forma subclínica hasta gangrenosa sobreaguda (Radostits 1998; Fox 2002).

2.4 Definición de Mastitis

Del griego mastos=glándula mamaria y del sufijo itis=inflamación, por lo tanto se define como la inflamación de la glándula mamaria que generalmente se presenta como respuesta a la invasión por microorganismos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o

subclínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño (Ruegg 2001; Ávila 2004; Cano 2004; Radostits 1999; Leslie 2004).

2.5 Clasificación de la Mastitis

Muchos autores clasifican la mastitis dependiendo del agente etiológico que la produce, esto tiene varios inconvenientes ya que a nivel práctico rara vez se realiza el diagnóstico etiológico de cada glándula afectada por medio del laboratorio con cultivos, antibiogramas, etc.; lo cual sería ideal, sin embargo muchas veces no se realiza porque representa gastos, no hay laboratorios o es tardado el resultado (Ávila 2004; Cano 2004; Dawn 2004; Radostits 1999; Ruegg 2001).

Las infecciones intramamarias por *S. aureus* ocurren raramente antes del parto debido a que el canal de Streak se encuentra contraído o tiene un tono que evita la entrada del *Staphylococcus aureus* al interior del pezón y por ende de la glándula, además de que se refuerza con el tapón de queratina que se forma durante la etapa de vacas secas y más aun la suma de las sustancias antibacteriales producidas en dicho canal. Pero aumentan durante la primera semana del puerperio ya que en este periodo el canal del pezón se encuentra relajado. No se ha observado relación alguna entre la prevalencia de *S. aureus* en novillas antes del parto y la prevalencia en las vacas en lactación (Radostits 1999; Zecconi 2006).

La prevalencia de la infección por *Staphylococcus aureus* en las vacas varía ampliamente, del 7 al 40%, y en algunos rebaños es incluso superior en relación a los factores de riesgo próximos a la vaca (Leslie 2004; Morin 2004; Osteras 2006; Radostits 1999; Zecconi 2006)

De acuerdo con Ávila (2004), la mastitis se puede clasificar en clínica, subclínica e infección latente:

1.- Mastitis Clínica

Con diferentes cuadros: a) Severamente aguda, b) Suave (moderada o ligera), c) Crónica y d) Gangrenosa.

La inflamación de la glándula mamaria se caracteriza por los signos cardinales de la inflamación, los cuales son tumor, dolor, calor, rubor y disminución de la función (Trigo 2002; Ávila y Gutiérrez 2004).

La mastitis **severa-aguda** es de presentación súbita con inflamación severa de la glándula mamaria afectada, pudiendo o no presentarse con alteraciones aparentes de la secreción láctea, pero sí una disminución de la cantidad producida, en esta forma de mastitis podrán presentarse signos sistémicos como septicemia, toxemia, fiebre, anorexia, depresión y movimientos ruminales

disminuidos entre otros signos (Ávila y Gutiérrez 2004; Radostits 1999, Trigo 2002, Dawn 2004)

La mastitis **suave-moderada** es de presentación súbita que se presenta con un decremento de la producción de leche y alteraciones que pueden ser de aspecto seroso, con hilos de fibrina, coágulos, grumos, etc. En esta clasificación pueden presentarse signos sistémicos como se señalan en la mastitis severamente aguda pero de menor intensidad (Ávila 2004; Radostits 1999).

La mastitis **suave-ligera** es una forma intermedia entre la forma suave moderada y la mastitis crónica. Esta clase de inflamación puede presentarse con brotes de reagudización o pasar a una fase de inflamación crónica. Aquí es frecuente que no se den cambios aparentes en la ubre y únicamente al inicio del ordeño se observen pequeños grumos en la secreción láctea (Ávila 2004)

La mastitis **crónica** se presenta cuando la agresión en la glándula mamaria persiste y no hay una solución a la reacción inflamatoria aguda, el resultado es una inflamación crónica. Microscópicamente puede verse necrosis tisular, tejido de granulación o infiltración de células inflamatorias tales como linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes multinucleadas. Un cuadro de mastitis crónica podrá presentarse clínicamente en forma aguda (Ávila 2004; Ruegg 2001).

La mastitis **gangrenosa** se clasifica de esta forma en aquellos casos cuando los microorganismos involucrados o sus toxinas producen vasoconstricción, isquemia y muerte del tejido. A la inspección la glándula afectada se encuentra inflamada, fría y cianótica, se observa una línea de demarcación entre el tejido sano y el afectado, viéndose éste de color azul o negro. En esta presentación se puede llegar a desprender totalmente la glándula afectada como medio de defensa y la vaca seguir viva o de otra forma llevarla hasta la muerte (Ávila 2004; Perusia 1997; Blowey y Weaver 1992)

2.- Mastitis Subclínica

Esta ocurre cuando un patógeno infecta uno o más cuartos pero no causa suficiente daño a los alvéolos de modo que resulte en leche anormal a la vista. En estos casos el sistema inmune de la vaca responde a la invasión bacteriana enviando glóbulos blancos al cuarto infectado para combatirla. El conteo de células somáticas (CCS) es una medida del número de glóbulos blancos y células epiteliales presentes en la leche. El CCS en una ubre no infectada es generalmente menor a 200,000 células/ml. Conteos más altos generalmente están asociados a infecciones por bacterias (Perusia 1997; Ruegg 2001).

Se ha estimado que las pérdidas totales de leche de los cuartos afectados de la mastitis subclínica varían entre el 10 y el 26% (Radostits 1999).

3.- Infección latente

Es una forma de presentación de mastitis subclínica en la cual se da en leche el aislamiento del microorganismo considerado como tradicionalmente patógeno para la glándula mamaria (Ávila 2004).

2.6 Impacto de la mastitis en la salud pública

El amplio consumo de productos lácteos y las recientes epidemias de enfermedades animales que reciben mucha publicidad ha aumentado la preocupación del consumidor acerca de la calidad de alimentos de origen animal, coincidente con estas tendencias, la globalización que ha influenciado la definición de leche de alta calidad además que las expectativas del consumidor cada vez afectan más las prácticas de manejo animal (Ruegg 2001).

La resistencia cuesta dinero, medios de subsistencia y vidas humanas, y amenaza con socavar la eficacia de los programas de atención de la salud. Se ha descrito recientemente como un problema para la estabilidad mundial y la seguridad de los países. Pocos estudios han indicado que los clones resistentes se pueden reemplazar por otros susceptibles; sin embargo, en general, tarda en revertirse o es irreversible (OMS y FAO 2008).

La leche contaminada pone en peligro la salud de quienes la consumen, en el caso del hombre cobra gran importancia la diseminación de bacterias causantes de enfermedades tales como: tuberculosis, brucelosis, faringitis estreptocócica, entre otras (Ávila 2004; Radostits 1999; Romero y Ruiz 2003; Vela 1997).

Las dos fuentes más importantes de bacterias en la leche cruda son (Reinemann 1998):

1. Patógenos de mastitis de la ubre
2. Patógenos ambientales que contaminan la maquina de ordeño

2.7 Factores de riesgo relacionados a la mastitis

Los efectos de la estación se consideran un factor de riesgo de mastitis. El conteo celular somático (CCS) es importante para el productor lechero porque hay una buena relación documentada entre la mastitis subclínica (según medida por CCS) y la producción de leche. Una revisión de 19 monografías que estudiaban la relación concluyó que cada aumento al doble de la CCS sobre 50,000 células/ml causaba una pérdida de 0.4 a 0.6 kg de leche por día en vacas primíparas y multíparas respectivamente. Se estima que la producción total de leche de lactancia se reduce en 80 kg para primíparas y 120 kgs en multíparas por cada doble de aumento en la media geométrica CCS sobre 50,000 células/ml (Ruegg 2001; Ávila 2004).

2.7.1 Factores Socio-culturales y de Manejo

El *Staphylococcus aureus* reside principalmente en la ubre de las vacas infectadas; la fuente de la infección es otra vaca infectada y la exposición de los cuartos no infectados está limitada al proceso de ordeño (Radostits 1999).

La fuente principal de infección es la secreción de la glándula mamaria infectada y que se disemina por las manos de los ordeñadores y por el equipo de ordeño (Hernández 2007).

Cuando se utiliza personal con falta de capacitación o cuando la carga de trabajo es muy intensiva y la gratificación por su desempeño es limitada; se propicia la presentación de actividades que repercuten negativamente tanto en la salud de la ubre y en la calidad de la leche; así, como indirectamente, sobre la salud propia del ordeñador (Ávila y Gutiérrez 2003).

En los establos los vaqueros rutinariamente aplican una jeringa antimastítica cuando detectan el problema y al siguiente día si sigue mal la glándula aplican otro diferente, estas prácticas empíricas provocan resistencias bacterianas por lo que no debemos permitir que sucedan ni que el uso de antibióticos y los tratamientos los realicen empíricamente (Cano 2004; Cires 2002).

Dentro de las actividades incorrectas llevadas a cabo por el personal que labora en el establo cabe destacarse:

- a) Presentarse a laborar con ropa sucia
- b) No lavarse las manos antes del ordeño, y de lavarse las manos se las seca sobre la ropa
- c) No utilizar un antiséptico al preparar los pezones para el ordeño
- d) En caso de ordeño manual, el lubricar los pezones con la leche de la glándula, de la cubeta o con un escupitajo
- e) Utilizar un trapo para preparar todas las vacas para ordeño
- f) No lavarse las manos entre vaca y vaca ordeñada
- g) Realizar diferentes actividades a la vez como dar alimento, pialar vacas, ordeñar, etc
- h) No descartar los primeros 2 o 3 chorros de leche, y de hacerlo, eliminarlos sobre su mano, en el piso o sobre la pezuña de la vaca
- i) Utilizar como técnica de extracción de leche el método de ordeño a pulgar
- j) No aplicar un antiséptico al final del ordeño (Ávila, Gutiérrez, 2003).

2.7.2 Factores Ambientales

El ganado estabulado se encuentra en más riesgo que el ganado en pastoreo. Las condiciones que aumentan la densidad del ganado, como en las concentraciones en áreas techadas, pueden contribuir a aumentar la carga de patógenos (Harmon 2007; Fox 2002).

Un incremento de la temperatura ambiental incrementará la frecuencia respiratoria que es el principal mecanismo mediante el cual las razas europeas disipan el calor. El calor producido por las vacas lactantes es cerca del doble de las no lactantes. La producción de leche y el consumo de alimento se reducen automáticamente en un esfuerzo para contrarrestar la producción de calor corporal cuando se eleva la temperatura ambiental. Un menor apetito es la causa principal de una menor producción láctea (Ávila y Gutiérrez 2003).

La humedad elevada afecta adversamente la producción únicamente cuando la temperatura excede los 24°C. La provisión de sombra, ventiladores, rociadores o aire refrigerado alivia el estrés térmico (Ávila y Gutiérrez 2004).

No existe un método o un producto único para reducir la exposición en el medio ambiente. La remoción diaria de las excretas y los materiales de cama sucios y el alojamiento de las vacas sobre arena lavada pueden reducir las tasas de infección (Harmon 2007).

2.7.4 Factores Nutricionales

Se ha hecho un énfasis particular sobre la adecuada nutrición de micro nutrientes durante el periodo seco, porque al momento del secado y del periodo periparto son los momentos cuando la glándula mamaria está más susceptible a las nuevas infecciones por patógenos (Harmon 2007).

Las vitaminas A, E y el selenio pueden contribuir a la resistencia frente a ciertos tipos de mastitis. Estudios realizados a cerca del tema demostraron que la adición a la dieta de antioxidantes como es selenio y las vitaminas A y E tenía un efecto beneficioso en la salud de la ubre de las vacas lecheras, al disminuir la incidencia y la duración de las mastitis clínicas (Ávila 2004; Radostits 1999; Dahl 1998).

Un aumento en la concentración de selenio en la sangre total se asoció con una disminución de todas las infecciones, incluyendo las causadas por *Staphylococcus aureus*, *Arcanobacter pyogenes* y especies de *Corynebacterium* (Radostits 1999).

La suplementación con proteínatos de cobre y zinc parece ser prometedora en el mejoramiento de la salud de la ubre y el conteo de células somáticas. La reducción de mastitis y la disminución de conteo de células somáticas en el rebaño lechero resultará en beneficios económicos significativos; así, como en el mejoramiento y bienestar de los animales (Harmon 2007).

2.8 Técnicas diagnósticas de la mastitis

Debido al elevado número de casos subclínicos, el diagnóstico de la mastitis depende principalmente de pruebas indirectas, que a su vez dependen del

contenido de leucocitos en la leche (Radostits 1999; Ruegg 2001; Ruiz y Romero 2003).

El diagnóstico rápido en el establo como por ejemplo con Hy mastitis test que es un laboratorio bacteriológico portátil para muestras de leche, con una paleta de plástico con dos vistas que contienen medios de cultivos para bacterias gram (+) y (-) son de mucha ayuda. En estudios realizados se ha encontrado que utilizando este método comparado con el laboratorio tradicional, no hubo diferencias estadística significativa en el diagnóstico y se concluyó que el cultivo fue sencillo, eficaz, fácil de transportar, económico y rápido para el diagnóstico, ahora están por ingresar al mercado nacional otros laboratorios portátiles parecidos pero más específicos, con los que se puede diagnosticar mejor la mastitis (Ávila 2004; Cano 2004).

2.8.1 Prueba de California (California mastitis test=CTM)

En las afecciones por bacterias, de los vasos localizados en el área afectada escapan leucocitos, siendo generalmente ésta, una respuesta celular proporcional a la severidad de la infección. Las cuentas mayores a 500,000/ml indican mastitis subclínica. Para realizar la prueba se toma una paleta para CTM con el mango dirigido hacia la cola de la vaca, se descartan los dos primeros chorros de leche de cada pezón y seguidamente se colectan en cada una de las charolas de plástico (debiendo estar la superficie bien pulida y uniforme), 2 ml de leche de cada glándula y se anexan a cada uno de los compartimientos la misma cantidad del reactivo de California (Alkil aril sulfonato de sodio+púrpura de bromocresol), cuidando que la proporción de reactivo a leche sea de 1:1, de inmediato se mezclan la leche y el reactivo mediante un movimiento rotatorio suave, haciendo la lectura de la reacción alrededor de los 7 segundos próximos, momento en el que alcanza el pico de reacción (Radostits 1999; Ávila y Gutiérrez 2004; Cano 2004; Ruegg 2001; Ruiz y Romero 2003).

2.8.2 Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT)

Se basa en la viscosidad de la mezcla del reactivo de California que ha sido diluido 1:1 con agua destilada y que se combina con leche (Ruegg 2001; Ávila 2004).

2.8.3 Prueba Hymast para Mastitis

Se utiliza para diferenciar entre agentes patógenos gram-positivos y gram-negativos y la falta de crecimiento. También facilita el uso racional y dirigido de los compuestos antimicrobianos en los casos de mastitis clínica que puedan deberse a microorganismos patógenos ambientales. Esta prueba presenta una sensibilidad y especificidad para identificar los agentes patógenos gram positivos y gram negativos de 0.80/0.76 y de 0.60/0.98, respectivamente, en

comparación con el método ideal, que es el cultivo en el laboratorio. La muestra de leche se cultiva en un medio durante 12 h. Si la prueba es gram positiva, se trata el cuarterón con un antimicrobiano, como la pirlimicina, dos veces cada 24 hrs; si la prueba es gram negativa, el cuarterón se ordeña frecuentemente (5 veces al día) con oxitocina hasta que los signos clínicos mejoren (Radostits 1998; Ávila 2004; Cano 2004).

2.9 Farmacología básica para el tratamiento de la mastitis

Los antimicrobianos son sustancias producidas por fermentación de microorganismos o en forma sintética y que se utilizan para curar infecciones bacterianas, favorecen la recuperación de los animales enfermos y alivian el sufrimiento y las lesiones asociados con la enfermedad (Dtb Dsa 2003; Martin 2006).

El tratamiento de los animales con antibióticos debe tener una adecuada relación costo-beneficio, un claro ejemplo es el tratamiento de todas las glándulas mamarias de todas las vacas que finalizan lactación (Ruiz y Romero 2003).

Las mastitis subclínicas por lo general no se tratan ya que realizando medidas de higiene y desinfección, buen ordeño y buen funcionamiento de la maquina de ordeño se corrigen estos problemas (Cano 2004; Philpot y Nickerson 1993).

2.9.1 Grupos de Fármacos empleados

Aminoglucósidos

Se denominan así, por estar formados por aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos. Su mecanismo de acción incluye la inhibición de la síntesis proteica bacteriana debido a la unión de la sub-unidad ribosómica 30S de la bacteria. Estos son captados activamente por la bacteria mediante un proceso que requiere condiciones aeróbicas. La resistencia bacteriana a estos antimicrobianos se desarrolla rápidamente y se produce como resultado de la modificación enzimática del fármaco en varios lugares. Un microorganismo resistente a un aminoglucósido puede ser todavía sensible a otro del mismo grupo. Tienen una rápida absorción por la vía intramuscular y subcutánea. Estos se distribuyen en los líquidos extracelulares, pero tienen una escasa acumulación en el líquido cefalorraquídeo. Se inactivan rápidamente en altas concentraciones de pus (Martin 1991; Fuentes 1992; Plumb 2005). Los de mayor uso en el bovino son la gentamicina (recomendada a dosis de 4.4-6.6mg/kg/día IM y 100-150mg^c/12hrs por infusión intramamaria), estreptomina y dihidroestreptomina (derivado sintético de la estreptomina, los cuales siempre se administran en combinación con penicilina, debido a que si se administran solos estos compuestos rápidamente los microorganismos desarrollan resistencia).

Cefalosporinas

Este grupo está estrechamente relacionado con las penicilinas y tiene un núcleo 7-amino-cefalosporánico, siendo similar a su modo de acción, disposición fisiológica y toxicidad. Tienen una resistencia superior a la inactivación por las enzimas B-lactamasas producidas por los estafilococos. Inhiben la formación de la pared celular (Martin 1991; Meyer 1982).

Fenicoles

Son compuestos bacteriostáticos de amplio espectro y presentan acción contra bacilos gram-positivos y gram-negativos. Actúa interfiriendo con la síntesis proteica mediante el bloqueo de la síntesis en el ribosoma. Se combina competitivamente con la subunidad ribosómica 50S, bloqueando la entrada de aminoácidos en la cadena peptídica en desarrollo. La conjugación del cloranfenicol tiene lugar en el hígado y la eliminación es principalmente por vía urinaria. Actualmente la utilización del cloranfenicol esta limitada en México y otras partes del mundo debido a los casos de reacciones tóxicas, provocando particularmente discrasias sanguíneas. Este compuesto inhibe el metabolismo microsomal del fármaco en el hígado y por lo tanto prolonga los efectos de otros fármacos, que normalmente son eliminados del organismo por oxidación. Además de los efectos tóxicos de este compuesto, su utilización está restringida por su implicación en las resistencias transmisibles (Martin 1991; Meyer 1982; Plumb 2005). A pesar de su restricción por los efectos colaterales se siguen utilizando derivados como el florfenicol y el tianfenicol.

Macrólidos

Este grupo de componentes antimicrobianos posee un gran anillo lactónico. Son activos contra la mayoría de los microorganismos gram-positivos. La mayoría de los macrólidos son bacteriostáticos, pero en altas concentraciones y contra determinadas bacterias pueden ser bactericidas. Su modo de acción es por interferencia con la síntesis proteica por alteración de los ribosomas bacterianos (Martín 1991; Sumano 1997; Fuentes 1992; Plumb 2005).

Penicilinas

Se distribuyen en los líquidos extracelulares, incluyendo las articulaciones, los líquidos de las heridas, la glándula mamaria y el feto en el animal gestante. Sin embargo, cuando se administra parenteralmente no alcanza el líquido cefalorraquídeo ni el ojo. En general presenta eficacia para la mayoría de las bacterias gram positivas como los *Staphylococcus*. Su mecanismo de acción interfiere con la síntesis de la pared celular bacteriana, siendo por tanto bactericida, es decir, interfiere con la síntesis de los polipéptidos necesarios para la pared celular y presenta su eficacia máxima contra las bacterias en rápido crecimiento. Presenta poco efecto contra las bacterias maduras que no están en división. Determinadas cepas de las bacterias estafilocócicas producen una penicilinasasa (B-lactamasas), que transforma la penicilina en ácido peniciloico inactivo. Este grupo de compuestos no son inactivados por la

sangre, el pus, los autolisados tisulares, ni por un gran número de bacterias. En algunos casos se pueden observar reacciones de hipersensibilidad que van desde urticaria y prurito hasta anafilaxia aguda y muerte (Martin 1991; Sumano 1997).

Quinolonas

Son el grupo farmacológico de mayor desarrollo en la actualidad. Se distinguen tres generaciones con potencia antibacteriana y rasgos farmacológicos progresivamente mayores. Las bacterias resistentes a las quinolonas aparecen en clínica como resultado de la terapia con estos agentes. Su efecto citotóxico depende de que penetren a través de la membrana bacteriana y alcancen su diana celular (DNA girasa o topoisomerasa IV) para inducir la muerte de la bacteria. En principio, las resistencias a las quinolonas puede deberse a mutaciones que afecten cualquier paso de este proceso. Así, los mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas pueden agruparse en tres categorías: a) Resistencia de tipo cromosómico que dan lugar a mutaciones en segmentos definidos de los genes que codifican la DNA girasa (especialmente en la subunidad A y la topoisomerasa IV, dando lugar a las QRDR (regiones-determinantes-de resistencia-a quinolonas); b) Resistencia por alteraciones en la membrana externa bacteriana que disminuyen la presión intracelular del fármaco. Estas modificaciones se originan en alteraciones de los genes que codifican los canales de las porinas, lo que impide la entrada del quimioterápico en la bacteria; c) Resistencias basadas en la expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores endógenos activos (Sumano 1997; Taléns, Garrigues y Cantón 2008).

Sulfamidinas-Trimetoprim

Las sulfonamidas son ácidos débiles y moderadamente solubles. Actúan interfiriendo con la síntesis de ácido fólico a partir de ácido paraminobenzoico (PABA). Dado que las sulfonamidas actúan de esta forma, los gérmenes que pueden utilizar el ácido fólico transformado son insensibles. Ya que la síntesis de ácido fólico es necesaria para un rango amplio de bacterias, las sulfonamidas tienen un amplio espectro de acción. Su espectro incluye a bacterias gram-positivas y gram-negativas. La frecuente utilización previa de sulfonamidas ha dado lugar a muchos gérmenes resistentes. Para evitar la resistencia se ha utilizado exitosamente la incorporación de **trimetoprim**, que actúa sinérgicamente con la sulfonamida bloqueando la síntesis de ácido fólico, por tanto esta asociación es eficaz contra un amplio rango de gérmenes. También aumenta la potencia utilizando mezclas múltiples (generalmente 3) de sulfonamidas las cuales ya se encuentran disponibles comercialmente (Martin 1991; Sumano 1997).

Tetraciclinas

Tienen el espectro más amplio que todos los antibióticos y actúa bien contra los cocos gram positivos. Actúan interfiriendo la síntesis proteica en la unidad ribosómica 30S, y en menor grado interfieren con la fosforilación oxidativa, con

la oxidación de la glucosa y con permeabilidad de la membrana celular. Este grupo se distribuye ampliamente, atraviesan la placenta y alcanza el líquido cefalorraquídeo (Martin 1991)

2.10 Control de la mastitis

El control depende en impedir y esparcir este microorganismo contagioso de cuartos infectados a cuartos sanos y, de la separación de vacas infectadas que no responden a ningún tratamiento (Nickerson 1993; Radostits 1998; Timms 2008).

La transmisión ocurre mayormente a la hora del ordeño, esta puede minimizarse con el uso de prácticas de ordeño recomendadas, dentro de las importantes destacan: un ordeño limpio, de pezones secos con sistemas de ordeño apropiados y sellar los pezones con un producto efectivo después del ordeño. Los pezones y ubres deben prepararse para el ordeño y darse mantenimiento a los sistemas. El orden de ordeña debe ser en primer lugar las novillas de primer parto, seguidas de las vacas no infectadas, y por último de las infectadas, se puede lograr así algunos beneficios (Philpot y Nickerson 1993; Hernández 2007).

El post sellado de pezones post-ordeño, combinado con la terapia de sacado y los buenos métodos de ordeño son las medidas más efectivas para controlar la mastitis producida por *Staphylococcus aureus*. El uso de un sellador efectivo después del ordeño reducirá enormemente el número de *Staphylococcus aureus* en la piel y canal del pezón, disminuyendo el potencial de los microorganismos de penetrar en la ubre durante los ordeños (Nickerson 1993). El método para secar las vacas es de alguna forma beneficioso para curar las infecciones existentes de *Staphylococcus aureus* y para prevenir que ocurran nuevas durante el periodo inicial del secado (Nickerson y Philpot 1993).

A cualquier animal nuevo vaca o ternera, debe hacerse un cultivo antes de ingresar al hato. Estos animales a veces traen microorganismos contagiosos a los hatos libres de *Staphylococcus aureus*, provocando más mastitis y baja calidad de la leche (Philpot 1993).

El uso de bacterinas o sus toxoides dirigidos a sus factores de virulencia específicos responsables del desarrollo de la mastitis han tenido una respuesta inconstante. Se han desarrollado vacunas basadas en componentes de la pared celular (proteína A), factores de adhesión (factores que permiten la adhesión de la bacteria a las células epiteliales) y pseudocápsulas (una capa que rodea a las bacterias y que reduce la capacidad de los leucocitos para destruir la bacteria). Investigadores Australianos utilizando una bacterina inactivada producida con cepas de *S. aureus* que producen pseudocápsulas, encontraron que la bacterina era capaz de estimular el desarrollo de anticuerpos anti-pseudocápsula y que reducía el desarrollo de signos clínicos. Sin embargo, no se redujo significativamente la cuenta de células somáticas o incremento la producción láctea de las vacas infectadas. Por otro lado en Argentina se desarrolló una bacterina con cepas encapsuladas y sin encapsular

y exopolisacáridos, la cual redujo las nuevas infecciones intramamarias con *S. aureus* y no afectó significativamente el conteo celular somático (Ruiz y Romero 2003).

2.11 Resistencia del *Staphylococcus aureus* a los antibióticos

La resistencia no es un fenómeno nuevo; al principio se reconoció como una curiosidad científica y luego como una amenaza a la eficacia del tratamiento. Sin embargo, el desarrollo de nuevas familias de antimicrobianos en décadas de 1950 y 1960, y las modificaciones de esas moléculas en las de 1960 y 1980 nos indujo a creer que siempre podríamos adelantarnos a los agentes patógenos. Al comenzar el nuevo siglo, estamos pagando muy cara esa complacencia. La generación de medicamentos nuevos se está estancando y son pocos los incentivos para elaborar antimicrobianos nuevos que permitan combatir los problemas mundiales de la farmacorresistencia (WHO y FAO 2008; Harrison y Joshua 1998; Giacoboni 2006; Cires 2002).

Las bacterias adquieren la capacidad de resistir la acción de los antibióticos a través de varios mecanismos como lo son:

La variabilidad genética

La modificación de la permeabilidad de la membrana interna

La extracción del compuesto y la inhibición enzimática

La modificación del blanco ribosomal o la alteración de la composición y el contenido de glicoproteínas de la pared bacteriana (Cires 2002; Hellinger 2000; OMS 2000).

Esta resistencia es transmitida entre microorganismos de un mismo género (transmisión horizontal) y entre microorganismos de géneros diferentes (transmisión vertical). A todo lo anterior se adiciona el hecho de que se dispone de escasos datos de susceptibilidad a los antimicrobianos y la vigilancia de la resistencia no se lleva a cabo en todos los países (Cires 2002)

La mastitis causada por *Staphylococcus aureus* es casi imposible de controlar con terapia de antibióticos únicamente (Philpot y Nickerson 1993; Ruiz 2004).

La efectividad de la terapia tiene un rango de un 20 a un 70%, dependiendo de si las infecciones son crónicas y/o acompañadas de formaciones grandes de tejido cicatrizante. Sin embargo, muchas infecciones persisten, provocando manifestaciones clínicas durante el inicio de la lactancia. Los animales que presentan estos signos deben separarse del hato pues representan una reserva significativa de contagio a otras vacas (Philpot 1993).

El tratamiento con antibióticos en la lactancia es de poco beneficio. Sólo de un 10 a un 30% de los cuartos infectados serán curados. La infusión de drogas puede reducir temporalmente el conteo de células somáticas y hasta mejorar la apariencia de la leche en cuartos clínicamente infectados, pero realmente no eliminan muchas infecciones. Esto se debe a que los microorganismos quedan

amurallados con el tejido cicatrizante el cual los protege de los antibióticos (Ma 2005; Philpot 1993; Ruiz 2004).

El *Staphylococcus aureus* también desarrolla una resistencia a ciertos antibióticos y puede producir una enzima (penicilinasa) que inactiva a la penicilina. Por eso el método para infecciones subclínicas usando terapia convencional durante la lactancia, no debe recomendarse (Ma 2005; Philpot 1993).

Se han descrito por lo menos, tres mecanismos de resistencia del *S. aureus* a los B-lactámicos, en muchas ocasiones relacionados entre sí: producción de B-lactamasas, fenómenos de tolerancia, y resistencia por proteínas fijadoras de penicilina modificadas o supernumerarias, conocida como resistencia intrínseca a meticilina (Camarena y Sánchez 1998).

Cuando se detecta una cepa resistente a oxacilina, ninguna otra penicilina resistente a penicilinasa, cefalosporina, combinación de B-lactámicos, con inhibidores de B-lactamasa o incluso imipenem, serán eficaces para el tratamiento del *S. aureus*, independientemente de que las distintas cepas muestren sensibilidad *in vitro* en los estudios de laboratorio (Camarena 1998).

2.11.1 Desventajas de los antibióticos en salud pública

Cada vez son más las pruebas científicas que relacionan la administración de antimicrobianos a los animales destinados al consumo y el desarrollo de resistencia de los agentes patógenos comunes (WHO 2008; Doyle 2008).

La resistencia tiene consecuencia para la salud de los animales, así como para la de los seres humanos cuando los agentes patógenos se introducen en la cadena alimentaria. Los agentes que inciden en este uso de los antimicrobianos, ya sea por motivos terapéuticos, profilácticos o de fomento del crecimiento, son complejos y las intervenciones necesarias deberán realizarse de forma coordinada entre el grupo de trabajo de la granja (WHO y FAO 2008; FDA 2002; Ocampo 2004; Doyle 2008).

La contaminación de la leche con diferentes fármacos como son; antibióticos, antisépticos, promotores del crecimiento, etc., es una secuela frecuente posterior al tratamiento o prevención de enfermedades que afectan a los animales de producción. Existen pérdidas evidentes si se retiran de la ordeña de manera muy estricta y sin datos específicos a los animales tratados con fármacos. Por otro lado, la consecuencia de permitir la distribución de esos productos para la población, puede acarrear serios problemas de salud. Un claro ejemplo es la presencia de residuos antibióticos en la leche, puede inducir alergias y resistencias bacterianas; a otro nivel puede afectar los procesos de industrialización de la misma. Aunado a esto el aspecto que más temor causa es la incertidumbre de que aun no se sabe cuáles y qué tan graves efectos tendrán los residuos de tantos fármacos ingeridos de manera crónica. Por ejemplo, se ha estimado que la presentación de anemia aplásica en humanos

se puede inducir con tan solo 1 ppm de cloramfenicol presente en productos de origen animal (Ocampo 2004; Doyle 2008).

3. Justificación

La aplicación de terapia antimicrobiana obliga a seguir los principios de un uso prudente de antibióticos que es propuesta por varias organizaciones científicas. Al aplicar un protocolo prudente y eficaz para el tratamiento de las mastitis, deben ser considerados diferentes factores como: el tipo de patógeno involucrado, susceptibilidad patente al antibiótico, severidad de la respuesta inflamatoria, duración de la infección, estadio de lactación y edad de la vaca (Zecconi 2006).

Dichos principios deben ser aplicados al *Staphylococcus aureus* y en este aspecto también la concentración mínima inhibitoria, el análisis más comprehensivo de los diferentes factores que afectan la tasa de cura para mastitis clínica, subclínica y para vacas secas afectadas por *Staphylococcus aureus* (Zecconi 2006; Zschock 2005).

Cuando estos factores son considerados y la terapia es aplicada seleccionando moléculas en relación al resultado de susceptibilidad y es seguido un protocolo racional y eficiente la tasa de cura específica para *S. aureus* puede ser mayor al 75% para ambos casos (terapia de vacas secas y tratamiento de vacas frescas), (Zecconi 2006).

En años recientes, protocolos terapéuticos severos basados en diferentes combinaciones de tratamientos (intramamario+parenteral, diferentes combinaciones de moléculas, diferentes tratamientos es relación al tiempo, administración prolongada, etc) tienden a ser propuestos (Osteras 1999; Radostits 1999; Zecconi 2006).

Sin embargo el mal uso y abuso de los fármacos en las granjas lecheras para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la mastitis, ha llevado a que se establezca una alta presión de selección por parte de los microorganismos contagiosos hacia los antibióticos y por lo tanto, se ha dado el desarrollo de resistencia a antimicrobianos, la importancia de esta radica en que tiene un impacto negativo en la salud publica, económica y eficiencia productiva de la granja.

4. Objetivo General

Determinar la resistencia a diferentes antimicrobianos que presenta el *Staphylococcus aureus* aislado de leche de vacas lecheras con mastitis subclínica de los municipios de Maravatío, Pátzcuaro, y Tarímbaro en el estado de Michoacán.

4.1 Objetivos Específicos

- a) Determinación de la presencia de mastitis subclínica en algunos establos lecheros de tres municipios del estado de Michoacán.
- b) Realizar el aislamiento de *Staphylococcus aureus* en los casos de mastitis subclínica.
- c) Realizar el antibiograma correspondiente enfrentando a 12 antimicrobianos específicos.
- d) Determinar el porcentaje de resistencia a los diferentes antimicrobianos que presenta el *Staphylococcus aureus*.

5. Material y métodos

El presente trabajo se realizó en 30 establos lecheros de los municipios de Maravatío, Pátzcuaro y Tarímbaro en el estado de Michoacán, contando cada uno de estos con un promedio de 10 vacas de la raza Holstein por establo, en condiciones de instalaciones de tipo rústico.

Primero se procedió a diagnosticar las vacas con mastitis subclínica por medio de la prueba de California (CMT), donde se llevo a cabo la lectura visual calificándose de acuerdo a la escala en trazas y 1, 2, 3.

Se tomaron muestras en vacas positivas a mastitis subclínica por la prueba de California en los municipios de Maravatío, Pátzcuaro y Tarímbaro como se observa en la siguiente tabla 1.0. Las muestras de leche fueron tomadas en tubos estériles para su cultivo en laboratorio, el cual consistió en sembrar muestras de leche en agar sangre con esculina y agar 110 estafilococos. Los *Staphylococcus* se identificaron de acuerdo a la forma de la colonia, tinción de Gram, pruebas de catalasa, coagulasa, manitol y gelatina. Las muestras positivas a *Staphylococcus aureus* se observan en la tabla

Tabla 1.0. Numero de vacas, muestras tomadas y muestras positivas a *S. aureus* en diferentes municipios del estado de Michoacán

| Municipio | No. de vacas muestreadas | Muestras tomadas* | Muestras positivas a <i>S. aureus</i> |
|-----------|--------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| Maravatío | 80 | 320 | 35 |
| Pátzcuaro | 88 | 347 | 64 |
| Tarímbaro | 71 | 284 | 32 |

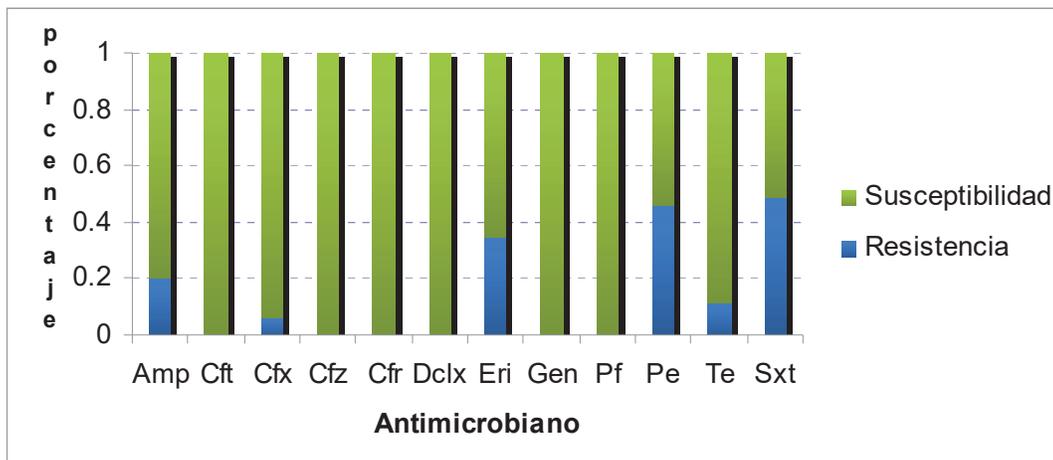
*Por cuarto positivas a la prueba de California

En las muestras positivas a *S. aureus* se llevó a cabo la prueba de sensibilidad por medio del método de Mueller-Hilton con sensidiscos impregnados con múltiples antimicrobianos de variable espectro y concentraciones: (Amp) Ampicilina 10ug, (Cft) Cefalotina 30ug, (Cfx) Cefotaxima 30ug, (Cfz) Ceftazidima 30ug, (Cfr) Cefuroxima 30ug, (Dclx) Dicloxacilina 1ug, (Eri) Eritromicina 15ug, (Gen) Gentamicina 10ug, (Pf) Pefloxacina 5ug, (Pe) Penicilina 10UI, (Te) Tetraciclina 30 ug, (Sxt) Sulfa-Trimetoprim 25ug. Se realizó el tratamiento con el modelo estadístico de Chi2 ($\chi^2=33.9$), en el cual se concluye que no hay variabilidad estadística significativa en los resultados de sensibilidad y resistencia obtenidos de los tres diferentes municipios.

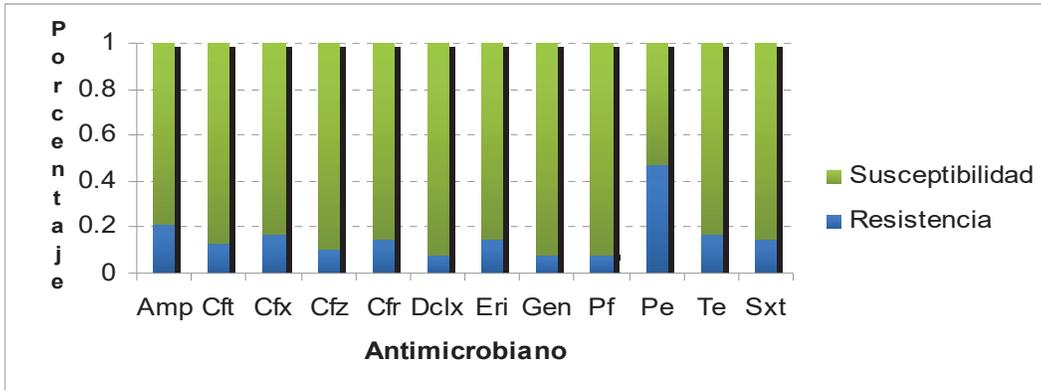
6. Resultados

Los resultados obtenidos se reportan en las siguientes gráficas.

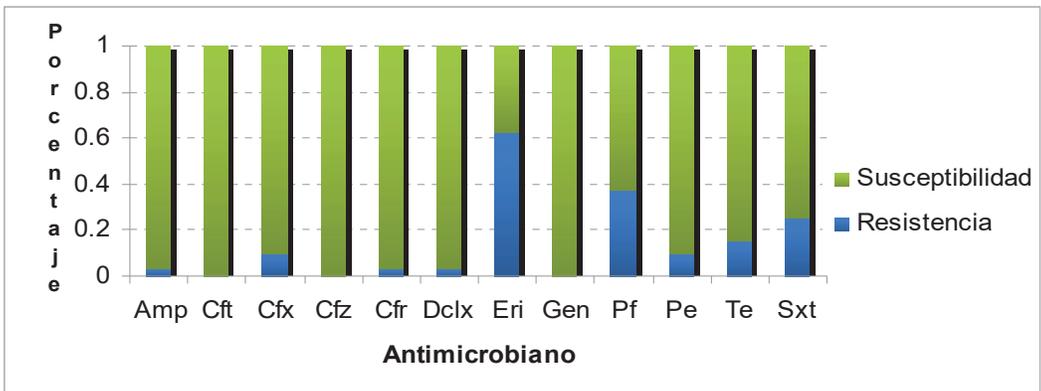
Gráfica 1.- Resultados de antibiogramas realizados a *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica en Maravatío Mich.



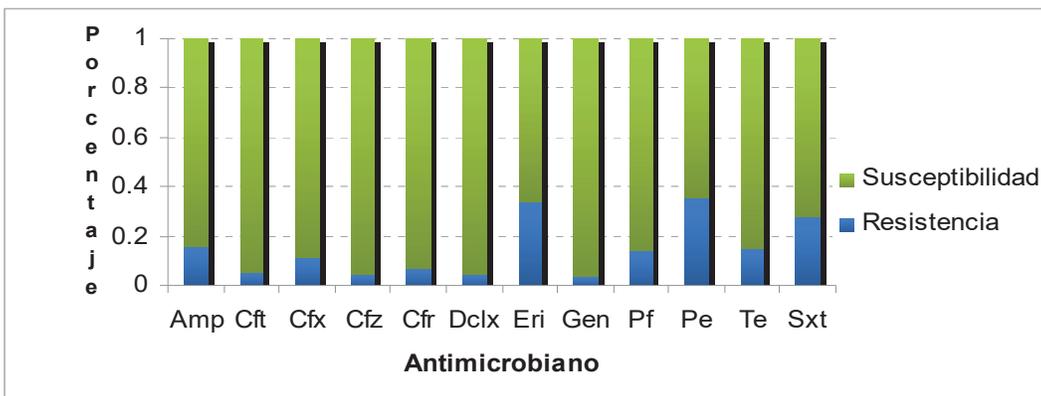
Gráfica 2.- Resultados de antibiograma realizados a *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica en Pátzcuaro Mich.



Gráfica 3.- Resultados de antibiograma realizados a *Staphylococcus aureus* aislado de muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica en Tarímbaro, Mich.



Gráfica 4.- Se observa el promedio de la resistencia y susceptibilidad de los tres municipios, en los cuales no existe variabilidad significativa de acuerdo al análisis estadístico de Chi cuadrada.



7. Discusión

La mastitis es la razón más común para el tratamiento antimicrobiano en las vacas lecheras (Pyörälä, 2006). Motivo por el cual algunos patógenos contagiosos frecuentes en el hato llegan a desarrollar resistencia.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado en este trabajo utilizando χ^2 , no se encontró diferencia significativa en los resultados de resistencia a los antibacterianos de variable espectro utilizados en los antibiogramas realizados a los aislamientos de *Staphylococcus aureus* de los tres diferentes municipios, probablemente sea debido al pequeño tamaño de muestra.

Un gran problema es la extensión de resistencia del *Staphylococcus* particularmente el *S. aureus*, a penicilina G (Pyörälä, 2006). El *Staphylococcus* coagulasa-negativo tiende a ser más resistente que el *S. aureus* y pueden desarrollar multi-resistencia (Pyörälä, 2006). En un estudio realizado en rebaños lecheros de la región Metropolitana de Chile, encontraron que un 26% de los aislados de *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina y un 21% a ampicilina (San Martín, 2002), Owens y Watts (1988), evaluaron 722 cepas aisladas de *Staphylococcus spp* de 7 rebaños lecheros, encontrando variabilidad desde 0 hasta 80.7% para penicilina y desde 7 hasta 100% para el caso de ampicilina. Ávila (2004), reporta que Alfonseca, en México durante el periodo de 1982-1990 encontró únicamente 26% de susceptibilidad para el *Staphylococcus aureus*, mientras que en otro caso Morales y Huerta (2004), reportan el 100% de resistencia a la penicilina en un estudio realizado en Tehuacán, Puebla. En este caso se encontró en promedio un 66% de susceptibilidad y un 34% de resistencia.

En el caso de las cefalosporinas encontramos en promedio para cefalotina, cefotaxima, cefatazidima y cefuroxima; 4.25, 10.7, 3.54, y 6.1% de resistencia respectivamente para cada uno de estos compuestos. Mientras que otro estudio realizado por Morales y Huerta (2004), menciona haber encontrado 100% de sensibilidad al Ceftiofur, que es uno de los principios activos de mayor uso en medicina veterinaria; sin embargo, probablemente se deba a que por el elevado precio de esta familia de antimicrobianos no sea uno de los principios activos de primera elección para el granjero y aun no se haya desarrollado tanta resistencia. En una prueba de campo realizada por Matus, et al (2004), en 7 aislamientos de *Staphylococcus aureus* de vacas lecheras con mastitis clínica, reportan 57% de eficiencia en la respuesta al tratamiento con una combinación de cefalexina monohidrato más kanamicina sulfato por vía intramamaria, resultado del cual se puede inferir que la asociación de estos dos principios activos presenta un alto sinergismo para el tratamiento de las mastitis clínicas; sin embargo, se debe tener cuidado en la elección de los fármacos para la atención de la glándula mamaria, ya que en determinadas situaciones la respuesta al uso de un solo antibiótico no será la adecuada, pudiéndose desarrollar resistencia a múltiples drogas en cortos periodos de tiempo.

En 1990, Owens y Nickerson encontraron cepas resistentes de *Staphylococcus spp* a eritromicina por estudios de concentración mínima inhibitoria y difusión

en disco. Para la eritromicina en este caso se encontró 37.22% de resistencia en promedio.

En cuanto a la gentamicina se encontró un 2.86% de resistencia. Mientras que, Matus (2004), menciona que Ferreiro en 1980, avalando los patrones de sensibilidad de bacterias provocadoras de mastitis que fueron aisladas de muestras de leche de rebaños de California (EU) y Rio Grande do Sul (Brasil) encontró una eficacia de 100% *in vitro* de una combinación de Gentamicina y Kanamicina y un 97% de eficacia para la Kanamicina como antibiótico único. En dicha cuestión de debe tomar en cuenta que son pruebas realizadas *in vitro*, por lo que su desempeño dentro de la glándula mamaria y en presencia de leche, así como su mecanismo de acción y su eficiencia llega a reducirse de forma significativa en el campo. Clavijo, et al (2002), reporta 100% de sensibilidad a la amikacina y gentamicina en una finca caprina en el municipio de Falcón, Venezuela, con 44.4% de mastitis, donde la mayor parte de infecciones predominaba el *Staphylococcus aureus* (62%), mientras que en otra investigación encontró que 61% de los aislamientos pertenecían a *Staphylococcus aureus* y de estos aislamientos ninguno fue totalmente sensible a ningún antibiótico, lo que nos lleva a deducir que el manejo es un factor determinante en la persistencia del *Staphylococcus aureus* en los establos lecheros, situación que conduce a la aparición de cepas multirresistentes.

Las fluoroquinolonas son una familia de quimio-terapéuticos relativamente nueva. Su precio en el mercado es accesible a la mano del productor, justificación que lleva a su uso frecuente en diferentes enfermedades infecciosas como la mastitis del ganado, situación que predispone al rápido desarrollo de cepas resistentes. Predominando principalmente la enrofloxacin como medicamento de uso veterinario comercialmente. Para la determinación de la resistencia en este trabajo se utilizó únicamente a la Pefloxacin en la cual se muestra un promedio de 15.33% de resistencia. Clavijo (2002), reporta 100% de sensibilidad a enrofloxacin y danofloxacin *in vitro* de *Staphylococcus aureus* aislado de mastitis caprinas. En el estado de Falcón, Venezuela, reporta 100% de sensibilidad para la tetraciclina en un rebaño caprino con una presentación de mastitis de 44.4% y de aquí el 62% de los aislamientos correspondieron a *Staphylococcus aureus*

En los resultados de antibiogramas reportados por Valencia y Ansalmeti (2003), se encuentran con 100% de resistencia para la ciprofloxacina, 100% de sensibilidad para la enrofloxacin y eritromicina *in vitro* de *Staphylococcus aureus* aislado de leche de vacas con mastitis subclínica (45%) en una lechería del trópico.

En la situación de la tetraciclina se encontró un 14.69% de resistencia. Morales y Huerta (2004), reportan para la tetraciclina y oxitetraciclina 100% de susceptibilidad en pruebas *in vitro*. Valencia y Ansalmeti reportan 100% de sensibilidad a la tetraciclina del *Staphylococcus aureus* aislado de leche de vacas con mastitis subclínica en el estado de Veracruz, México.

En cuanto a sulfa-trimetoprim muestra un 29.84% de resistencia *in vitro*, pero en el campo está demostrado que el antibiograma no es totalmente confiable, por lo que se puede recurrir a este tipo de fármacos en aquellas granjas donde no sea común el empleo de sulfa-trimetoprim (Radostits 1999). Morales y Huerta (2004), reportan 100% de susceptibilidad para la sulfametoxipiridazina+trimetoprim en aislamientos de leche de vacas con mastitis clínica.

8. Conclusiones

El diagnóstico correcto de la mastitis a través de la ayuda de laboratorios es fundamental para saber contra qué agente específico se debe atacar la inflamación de la mama o mamas afectadas en las vacas.

Orientar el uso racional de los antimicrobianos en la terapia de mastitis bovina es la clave para evitar la resistencia de microorganismos contagiosos como es el caso del *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis en las granjas lecheras.

Todo esto aunado a la corrección de factores de riesgo del problema en los establos lecheros es clave para el control y prevención de la mastitis, así como la resistencia de las bacterias contagiosas.

9. Literatura citada

- 1.- Ávila, TS, (1990), Producción Intensiva de Ganado Lechero, Ed. CECOSA, México, pp 139-158.
- 2.- Ávila, TS, et al, Confianza en la Determinación de Células Somáticas en Leche de Vaca Mediante la Aplicación de las Pruebas para Mastitis: CMT, WMT, CMCS, FOSSOMATIC y DCC, FMVZ, UNAM, en línea, from: www.bovinotecnia.unam. (Consulta 03-08-08).
- 3.- Ávila, TS, et al, (2004), Mastitis en Ganado Bovino, Seminario Pre-Congreso, del XXVIII Congreso Nacional de Buiatria, Morelia Michoacán, México.
- 4.- Ávila, TS, et al, (2001) Mastitis y Glándulas Improductivas en Hatos Pequeños, Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatria, México
- 5.- Ávila, TS, Gutiérrez, CAJ, (2006), Producción de Ganado Lechero, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, en línea, from: www.bovinotecnia.unam. (Consulta 19-08-08).
- 6.- Bannerman, M. J. Paape, J. Lee, X. Zhao, J. C. Hope, and P. Rainard, (2004), "*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Elicit Differential Innate Immune Responses Following Intramammary Infection", Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 11, 3, pp. 463-472.
- 7.- Bernal, MLR, (2007), Determinación de la Calidad Fisicoquímica de la Leche Cruda Producida en Sistemas Campesinos en dos Regiones del Estado de México, Revista Veterinaria México, Vol. 38, número 4, pp. 395-407.
- 8.- Blood DC, Studdert VP, (1994), Diccionario de Veterinaria, Vol. I-II, McGraw-Hill Interamericana, México.
- 9.- Blowey, RN, Weaver, AD, (1992), A Colour Atlas of DISEASES & DISORDERS OF CATTLE, MaCgraw-Hill Interamericana, Madrid.
- 10.- Camarena, RR, Infección por *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario, Doctor Peset, Valencia.
- 11.- Cano, CP, (2006), Evaluación de la Eficiencia Clínica de la Combinación Farmacológica Enrofloxacin más Piroxicam en Vacas con Mastitis, Artículo de Investigación, laboratorio Senosiain.
- 12.- Cano, CP, (2004), Nuevas Alternativas en el Diagnostico Clínico de Campo y en el Tratamiento de Mastitis, FMVZ, UNAM, en línea, from: <http://www.bovinotecnia.unam>. (Consulta 26-08-08).

-
- 13.- Cardinale, E, et al, (2007), Genetic Characterization and Antibiotic Resistance of *Campylobacter* spp. Isolated from Poultry and Humans in Senegal, Proceeding of the 12th International Conference of the Asociation of Institution of Tropical Veterinary Medicine – Montpellier, France, in line from: www.ivis.org. (Consulta 19-08-08).
- 14.- Cires, PM, (2002), La Resistencia a los Antimicrobianos Un Problema Mundial, *Rev Cubana Med Gen Integr.*
- 15.- Cruz, AM, (1998), Mastitis Bovina y estrategias de Control, Congreso Internacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas Practicantes en Rumiantes, 67-77.
- 16.- Cruz, CF, (2007), Mastitis Bovina: Recordando Aspectos Básicos, FMVZ, UNAM, en línea, from: <http://www.bovinotecnia.unam>. (Consulta 14-08-08).
- 17.- Cunningham JG, (2003), *Fisiología Veterinaria*, 3^a Edición, ELSEVIER, Saunders, España, pp. 406-420.
- 18.- Dahl, CL, (1988), Calidad de la Leche y Mejoramiento de la Producción, The Dairy Equipment Division of Dec Internacional, Madison, Wisconsin, pp. 1-162
- 19.- Dinsmore, “Biosecurity for mammary diseases in dairy cattle”, *Vet Clin Food Anim.*, 18, 2002, pp.115-131.
- 20.- Donovan, D. M. Lardeo y J. Foster-Frey, “Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11endolysin”, *Microbiol Lett.*, 265, 2006, pp.133–139
- 21.- Dtb, Dsa, (2003), Uso racional de productos Antimicrobianos, *Revista Bayvet*, año 5 vol. 7 no. 11 Enero-Febrero 2003, México.
- 22.- Doyle, PM, (2008), Dealing Whith Antimicrobial Resistance, *Food Technology*, from: <http://www.ift.org>. (Consulta 7-08-08).
- 23.- FDA-CVM, AVMA, (2002), The Judicious use Antimicrobials for Beef Producers, Department of Health and Human Services Public Health Service Food and Drugs Administration Center for Veterinary Medicine.
- 24.- Feil, EJ, (2003), How Clonal Is *Staphylococcus aureus*, *Journal of Bacteriology*.
- 25.- Fedorka-Cray, PJ, et al, (2007), USADA Data on Antimicrobial Resistance, Proceeding of 15th AAVPT Biennial Symposium, Pacific Grove, CA, in line from: www.ivis.org
- 26.- Flaherty, SO, (2005), Ihibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk, *Letters in Applied Microbiology*.

-
- 27.- Fox, L, (2002), Mastitis por *Staphylococcus aureus*: Factores críticos asociados con infecciones, Memorias del III Congreso Mundial de la Leche, León, Guanajuato, México, Julio de 2002.
- 28.- Fuentes, HVO, (1992), Farmacología y Terapéutica Veterinarias, 2ª Ed, McGraw-Hill Interamericana, pp65-153.
- 29.- García, LY, Ávila, TS, Sánchez, GJI, (2004), Comparación de la Higiene en Máquina de Ordeño Portátil Utilizando el Lavado Automático Contra el Lavado Manual, Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatría, Morelia Mich. México.
- 30.- Gasque, GR, La Longevidad de Vacas Lecheras se reduce, Nota técnica, FMVZ, UNAM, en línea, from: www.bovinotecnia.unam. (Consulta 3-08-08).
- 31.- Geoffrey, W, (1991), Diccionario Enciclopédico, 16ª Edición, edt. IATROS, México.
- 32.- Giacoboni, G, (2006), Monitoreo de la Resistencia Antimicrobiana en Bacterias Comensales, Zoonóticas y Patógenas en Diferentes Especies de Animales Domésticos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
- 33.- Gill, P. M. Sabour, K. E. Leslie y M. W. Griffiths, "Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K", Journal of Applied Microbiology., 101, 2006, pp. 377–386.
- 34.- Gutiérrez, CAJ, Mastitis en Vaquillas, FMVZ, UNAM, en línea, from: <http://www.bovinotecnia.unam>. (Consulta 3-08-08).
- 35.- Hansen, P. Soto and Natzke, RP, (2004), "Mastitis and fertility in cattle-possible involvement of inflammation or immune Activation in Embryonic Mortality", American Journal of Reproductive Inmonology., 51, pp. 294-301.
- 36.- Harrison, FP, Joshua, L, (1998), Antimicrobial Resistance: Issues and Options, in line from: <http://www.nap.edu/catalog/6121.html>. (Consulta 7-09-08).
- 37.- Harmon, JR, (2007), Aspectos de la calidad de la leche: ¿Que se requiere para bajar los puntajes de células somáticas a 100, 000 y mantenerlos allí?, More Information, en línea, from: http://www.milkproduction.com/About_us/TermOf.htm (Consulta 04-09-08).
- 38.- Hellinger, WC, (2000), Confronting the Problem of Increasing Antibiotic Resistance, South Med.
- 39.- Hernández, AL, (2007), Susceptibilidad Antimicrobiana y Producción de B-Lactamasa en *Staphylococcus* de Origen Bovino y Humano, XXXI Congreso

Nacional de Buiatria y XIII Congreso Latinoamericano de Buiatria, Acapulco Guerrero, México.

40.- Hillerton and E. A. Berry, (2005), "A Review. Treating Mastitis in the cow-a Tradition or an Archaism", *Journal of Applied Microbiology.*, 98, pp.1250-1255.

41- Hébert, A, et al, (2000), Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk, *Microbiology Letters*, ELSEVIER, from www.fems-microbiology.org. (Consulta 2-08-08).

42.- Hillerton, JE, et al, (2007), Preventing Bovine Mastitis by a Postmilking teat Disinfectant Containing Acidified Sodium Chlorite, *American Dairy Science Association*, pp. 1201-1208.

43.- Hulsen, J, (2007), *Cow Signals, A Practical Guide for Dairy Farm Management*.

44.- Hutton, CF, Hancock, D, (1990), Mastitis Control Practices: differences between herds with high and low milk somatic cell counts, *Journal of Dairy Science*.

45.- IFT, Antimicrobial Resistance: Implications for the food system, Antimicrobial Use and Risk Analysis, in line from:www.ift.org. (Consulta 23-08-08).

46.- Ingalls, W, (2007), La Influencia de la Piel del Pezón y la Condición de la Punta del Pezón en el Comportamiento del Ordeño, Mastitis y Calidad de la Leche, More Information, en línea from: http://www.milkproduction.com/about_Us/TermsOfUse.htm . (Consulta 11-08-08).

47.- Izak, E, (2005), Programa de Control de Mastitis y Calidad de la Leche, Memorias de la 21 Conferencia Internacional sobre Ganado Lechero, Guadalajara, Jalisco México.

48.- J, Ma, (2005), Evaluación de Serotipos de Cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas en la Producción de una Bacterina contra Mastitis Bovina, *Revista Rumiantes y más*, Vol. 3 número 15, Septiembre-Octubre, pp.14-18

49.- Joffe, R, and Baranovics, E, (2006), Bovine Mastitis as de the Primary Contamination Source of Milk and Milk Products with *S. aureus* Enterotoxns, *Veterinarija ir Zootechnica*, pp. 21-26.

50.- Keown, JF, Kononoff, PJ, (2006), Producing Milk with a Low Bacteria Count, Published by University of Nebraska-Lincoln Extension, Institut of Agriculture and Natural Resources, in line from:<http://www.extension.unl.edu/publications>. (Consulta 11-08-08).

-
- 51.- Keown, JF, Kononoff, PJ, (2007), How to Interpret the DHIA-520 Somatic Cell Count Profile, Published by University of Nebraska-Lincoln Extension, Institut of Agriculture and Natural Resources, in line from:<http://www.extension.unl.edu/publications>. (Consulta 19-08-08).
- 52.- Keown, JF, Kononoff, PJ, (2007), Dairy 10-Points Quality Control Program - Mastitis Treatment Record, Published by University of Nebraska-Lincoln Extension,
- 53.- Kirk, JH, (1997), Elementos Indispensables para el Control de Mastitis y Calidad de Leche, Memorias del Congreso Nacional de Mastitis, León Guanajuato, México.
Institut of Agriculture and Natural Resources, in line from:<http://extension.unl.edu/publications>
- 54.- Lämmler, C, et al, (2006), Estudio Comparativo de las Características Genotípicas de Cepas de *Staphylococcus aureus* Aisladas de Casos de Mastitis Clínica y Subclínica en México, Revista Veterinaria México, Vol. 37 número 2, pp. 165-179.
- 55.- Lammers, E. Kruijt, C. van de Kuijt, P. J. M. Nuijten y H. E. Smith, "Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis?", Microbiology., 46, 2000, pp. 981-987.
- 56.- Lechuga, AAA, et al, Concentración de Fibrinógeno Plasmático en Vacas Lecheras con Mastitis, FMVZ, UNAM, from: <http://www.bovinotecnia.unam> (Consulta 16-08-08).
- 57.- Leslie, EK, (2004), New Concepts on Bovine Mastitis Control, Memories of World Buiatrics Congress, Québec ,Canada.
- 58.- Martin, RJ, (1991), Terapéutica en Pequeños animales, Interamericana MacGraw-Hill,
- 59.- Martin, LJ, (2006), Antimicrobial recistance among Salmonella and Shigella isolates in five Canadian provinces (1997 to 2000), Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 17 No 4 July/August.
- 60.- Martinez, AA, (2003), Encontrandole la Cuadratura al Círculo Vicioso de los Problemas de Mastitis, Revista Carta Ganadera, Año XVII, no. 187, Abril, pp 8-19.
- 61.- Matthews, L, Dairy Herd Health, from: <http://www.powerpoint.backgrounds.com> (Consulta 07-08-08).
- 62.- McEwen, SA, (2008), Special Issue - Antimicrobial Recistance, The Canadian Journal of Veterinary Research

-
- 63.- Mclsaac, WJ, (2006), Community- acquired antibiotic resistance in urinary isolates from adult women in Canada, Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 17 No 6 November/December.
- 64.- Mejía, AJ, Mastitis Bovina, Revista Rumiantes y más, Vol. III número 15 Septiembre-Octubre 2005, pp.12-13.
- 65.- Mendoza, TCA, (2003), Susceptibilidad Antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* sensible, con sensibilidad a "BORDELIN" y resistentes a la Meticilina, Revisión Medica Hered.
- 66.- Merck & Co., Inc. and Merial Limited. The Merck Veterinary Manual – 8th Edition Online.- home: generalized conditions: Bacterians diseases
- 67.- Meyer, LJA, (1982), Farmacología y Terapéutica Veterinaria, Hispano Americana, México, pp. 804-811.
- 68.- Morin, ED, (2004), Acute Mastitis: Revisiting the Goal of Therapy, 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada.
- 69.- Nappert, G, (2001), Investigation of Elevated Bulk Tank Milk Bacteria Counts Asociated with cow Infections, Large Animal Veterinary Rounds, Western College of Veterinary Medicine, in line from: www.canadiansveterinarians.net/larounds. (Consulta 09-08-08).
- 70.- Nicolle, LE, (2006), Beyond Antibiotics, Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 17 No 5 September-October.
- 71.- Norman, DC, (2002), Management of Antibiotic- Resistant Bacteria, by the American Geriatrics Society.
- 72.- Nunes, SF, et al, (2007), Antimicrobial Susceptibility of Portuguese Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in Subclinical Bovine Mastitis, Journal of Dairy Science.
- 73.- Olgún, y BA, et al, Producción de Leche de Vacas Holstein en los Primeros 60 Días de Lactación, Sometidas a un Programa de Desparasitación y/o un Programa de Control de Mastitis Durante el Periodo de Descanso Lactacional, FMVZ, UNAM, en línea from: <http://www.bovinotecnia.unam> (Consulta 7-09-08).
- 74.- Oliveira, SS, (1998), Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides, Letters in Applied Microbiology.
- 75.- OMS, (2000), Boletín de Medicamentos esenciales, Resistencia a los Antimicrobianos: Los Hechos.

-
- 76.- OMS, 2001, Estrategia Mundial OMS de Contención de la Resistencia a los Antimicrobianos, en línea, from: http://www.who.int/emc/diseases/zoo/who_global_principles.html (Consulta 04-09-08).
- 77.- Osteras, O, (2006), Mastitis Epidemiology Practical Approaches and Applications, XXIV World Buiatrics Congress, Nice, France.
- 78.- Papich, MG, (2005), Mixing and Matching Drugs, Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference, Jan. 8-12, Orlando, Florida, in line from: www.ivis.org. (Consulta 12-08-08)
- 79.- Perusia, RO, (1997), Atlas de Patología Bovina, 2ªEd, Facultad de Agronomía y Veterinaria (F.A.V.E.) – Esperanza (Provincia de Santa Fe) – Universidad Nacional del Litoral- Republica Argentina.
- 80.- Philpot, WN, and Nickerson, SC, Quality Milk Production and Mastitis Control, Holstein Association, USA.
- 81.- Philpot, WN, and Nickerson, SC, (1993), Mastitis: El Contra Ataque, una estrategia para combatir la mastitis, Babson Bros. Co., Louisiana State University, Agricultural Center Homer.
- 82.- Plumb, CD, (2005), Veterinary Drug Handbook, Fifth Edition, Blackwell Publishing.
- 83.- Radostits, OM, (1999), -Medicina Veterinaria, 5ª Ed, Interamericana McGraw-Hill, Madrid, pp. 711-746.
- 84.- Rajaram, KD, (2007), PCR-based Detection of Genes Encoding Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus* from Bovine Subclinical Mastitis Cases, Journal of Veterinary Science.
- 85.- Reid, G, (2006), Probiotics to prevents the need for, and augment the use of, antibiotics, AMMI CANADA ANNUAL MEETING SYMPOSIUM, Can J Infect Dis Med Microbiol Vol 17 No 5 September/October.
- 86.- Réocreux, A, (2005), ¿Como Controlar el Recuento de Células Somáticas?, Memorias de la 21 Conferencia Internacional Sobre Ganado Lechero, CIGAL, Guadalajara, Jalisco México.
- 87.- Reséndiz, MR, Villareal, EOA, (2004), Diagnóstico de la mastitis subclínica en bovinos lecheros del municipio de Tochtepec, Estado de Puebla, Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatria, Morelia, Mich. México.
- 88.- Rossitto, L. Ruiz, Y. Kikuchi, K. Glenn, K. Luiz, J. L. Watts, J. S. Cullor, "Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental Streptococci Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies", Dairy Sci., 85, 2002, pp.132-138.

-
- 89.- Ruegg, LP, (2001), *Secreción de Leche y Estándares de Calidad, Novedades Lácteas, Ordeño y Calidad de la Leche* N° 404, Instituto Babcock, Universidad de Wisconsin-Madison.
- 90.- Ruegg, LP, (2002), *Manejo hacia la Calidad de la Leche*, Chart developed with input from Dan Schreiner and Mike Maroney, en línea from: <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/UDDER%20HYGIENE%20CHART.pdf> (Consulta 12-08-08).
- 91.- Ruiz, SH, (2004), *Tratamiento de la Mastitis*, Revista Acontecer Lechero, Vol. III número 18 Enero-Febrero 2004, pp. 56-61
- 92.- Ruiz, SH, Romero, AT, (2003), *10 Estrategias en la Prevención de la Mastitis Bovina*, Manual de Buenas Prácticas de Ordeño para el Aseguramiento de la Calidad de la Leche, AMMVEPA y AMMVEB.
- 93.- San Martín, B, (2002), *Resistencia Bacteriana en Cepas Patógenas Aisladas de Mastitis en Vacas Lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile*, Arch. Med. Vet. XXXIV, N° 2.
- 94.- Santiago, VC, Ansalmeti GM, (2003), *Tratamiento de la mastitis subclínica al secado en explotaciones lecheras del trópico*, Revista Bayvet, Año 5 vol. 7 no. 12, Marzo-Abril, México.
- 95.- Saran, A, y M. Chaffer M, (2000), *Mastitis y calidad de la leche*, Inter-Médica S. A I. C. I., Buenos Aires, 194 pp.
- 96.- Sears y K. K. McCarthy, "Diagnosis of mastitis for therapy decisions", *Vet Clin Food Anim.*, 19, 2003, pp. 93-108.
- 97.- Silva, MF, Ávila, TS, Gutierrez, CAJ, Sánchez, GJI, (2004), *Eficacia de tres antisépticos utilizados en la preparación de los pezones de vacas para el ordeño*, Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatría, Morelia, Mich. México.
- 98.- Sisson, S, Grossman, JD, (1983), *Anatomía de los Animales Domésticos*, 5ª Ed., Ed. Salvat, pp.1053-1056.
- 99.- Soloaga, R, et al, (2004), *Detección de metilino-resistencia en Staphylococcus aureus: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con MRSA-Screen latex*, Revista Argentina de Microbiología.
- 100.- Sumano, LHS, y Ocampo, CL, (1997), *Farmacología Veterinaria*, 2ª Ed, McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 95—189.
- 101.- Swenson, MA, y Reece, WO, (1999), *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*, 2ª Ed, UTEHA, Noriega editores, pp. 711-729.

-
- 102.- Timms, LL, Evaluation of Pirlimycin for Blitz Terapy Chronich Staphylococcus aureus Mastitis in Dairy Cattle, Departament of Animal Science, DSL56.
- 103.- Tollersrud, T, (2000), Characterisacion of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway, APMIS.
- 104.- Trigo,t. f., et al, (2004), Patología general veterinaria, FMVZ, UNAM, 4ª edición, México 2004.
- 105.- Vela, OA, Benítez, RE, Villaseñor, HG, (1997), Bases de Salud Publica para Estudiantes de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.
- 106.- Villegas VJ, 1997. Producción de Leche de Alta Calidad, Memorias del Congreso Nacional de Mastitis y Calidad de la Leche, León Guanajuato, México.
- 107.- Wajjwalku, W, et al (2007), Multiple-Antimicrobial Recistance *Salmonella enterica* Isolated from Pig Farm in Thailand, Proceedin of the 12th International Conference of the Asociations of Institutions of Tropical Veterinary Medicine, Montpellier, France, in line from: www.ivis.org (Consulta 10-08-08).
- 108.- White, DG, (2006), The National Antimicrobial Resistance Monitoring Sistem, National Center for Infectious Disease, Atlanta, en línea, from: http://www.fda.gov/cvm/narms_pg.html (Consulta 10-08-08).
- 109.- WHO, FAO, INFOSAN, (2008), Resistencia a los Antimicrobianos Transferida por Animales Productores de Alimentos, Nota Informativa no. 2- Resistencia a los Antimicrobianos. en línea from: http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf (Consulta 10-08-08)
- 110.- Zecconi y R. Piccinini, (2002), "Intramamary infections: epidemiology and diagnosis", XXII World Buiatrics Congress, 346-359.
- 111.- Zecconi, A, (2006), Can we Eradicate Staphylococcus aureus Mastitis?, XXIV World Buiatrics Congress, Nice, France.
- 112.- Zschöck, K. Riße y J. Sommerhäuser, "Ocurrence and clonal relatedness of sec/tst-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quarter milk samples of cows suffering from mastitis", Letters in Applied Microbiology., 38, 2004, pp. 493-498.