



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## **RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVO AISLADOS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS DE TÉJARO, MICHOACÁN.**

TESIS

QUE PRESENTA:

JORGE LUIS RODRÍGUEZ GARCÍA

PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

ASESOR: MC. JOSÉ LUIS CARLOS BEDOLLA CEDEÑO

COASESORES: QFB. ROSALVA MEJÍA ALFARO

DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO

Morelia, Michoacán. Octubre de 2012.





# UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

## RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVO AISLADOS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS DE TÉJARO, MICHUACÁN.

TESIS

QUE PRESENTA:

JORGE LUIS RODRÍGUEZ GARCÍA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

MORELIA, MICHUACAN. OCTUBRE DE 2012.



## **DEDICATORIA.**

A mi esposa Leonor Pérez e hijo Jorge Alfonso que siempre han estado conmigo.

A mis padres M<sup>a</sup> Dolores García y Mario Rodríguez porque creyeron en mi y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta a mis hermanos Mario, Yamel y Liliana, por darme su apoyo.

Al profesor MC. José Luis Carlos Bedolla Cedeño por haberme apoyado desde del inicio de mis estudios Universitarios y ahora por apoyarme en la tesis como mi asesor.

A mis profesores que me dieron su enseñanza conmigo a lo largo de estos 5 años gracias a todos y gracias a ellos logre mi formación, a mis compañeros y amigos que siempre estuvieron en las buenas y en las malas.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a Dios por permitirme llegar a este punto de mi vida, ya que eh luchado por este sueño desde mi niñez y ahora es realidad.

A mis Papas M<sup>a</sup> Dolores y Mario que me apoyaron en todas mis decisiones, su cariño y comprensión sin condiciones ni medida. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación.

Gracias a mi Esposa Leonor e Hijo Jorge Alfonso que siempre estuvieron a mi lado apoyándome, sin condición alguna y aconsejándome, gracias por que nunca me dejaron solo y por su gran amor.

A mis Hermanos Mario, Yamel y Liliana por sus comentarios, sugerencias y opiniones. Además de ser mis amigos.

Gracias a todos mis amigos Adrian y Laura que estuvieron conmigo y compartimos tantas aventuras, experiencias, desveladas y triunfos. Gracias a cada uno por hacer que mi estancia en el Universidad fuera divertida.

Gracias a mi asesor Mc. José Luis Carlos Bedolla por permitirme ser parte del grupo de trabajo, sus consejos, paciencia y opiniones sirvieron para que me sienta satisfecho en mi participación dentro del proyecto.

Gracias a todos ellos por este momento de mi vida en el cual logre un obstáculo mas de varios que se me presentaran para los cuales estaré preparado.

## INDICE

1. RESUMEN.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	2
2. TIPOS DE MASTITIS.....	4
2.1. Mastitis subclínica.....	4
2.2. Mastitis clínica.....	5
2.3. Mastitis clínica subaguda.....	6
2.4. Mastitis clínica aguda.....	6
2.5. Mastitis clínica hiperaguda.....	6
3. CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DE MASTITIS.....	7
3.1. Patógenos causantes de la mastitis contagiosa.....	7
3.1.1. IMPACTO DE LA MASTITIS EN LA SALUD PÚBLICA .....	8
3.2. Patógenos causantes de la mastitis ambiental.....	9
4. ESTAFILOCOCOS.....	11
4.1. Habitación de los Estafilococos.....	12
4.2 División de los Estafilococos.....	12
5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTAFILOCOCOS.....	13
5.1. ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS (ECN).....	14
5.2. Etiología y Epidemiología.....	17
6. INFECCIONES EN LA PARICIÓN Y FASE DE LACTACIÓN POR ECN.....	18
7. FARMACOS EMPLEADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS BOVINA.....	19
7.1. Beta lactámicos.....	21
7.2. Penicilinas.....	21
7.3. Tetraciclinas.....	22

7.4. Cefalosporinas.....	22
7.5. Aminoglucosidos.....	22
7.6. Macrólidos.....	23
7.7. Eritromicina.....	23
8. DESVENTAJAS DE LOS ANTIBIÓTICOS EN LA SALUD PÚBLICA.....	24
9. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA.....	26
9.1 Pruebas de difusión en gel de agar o método de Kirby-Baver .....	26
9.2 Pruebas de dilución o concentraciones inhibitorias mínimas (C.I.M.).....	27
10. OBJETIVO.....	29
11. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
11.1. Procesamiento de las muestras en el laboratorio.....	32
11.2. Prueba de sensibilidad a antibióticos.....	34
12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
13. CONCLUSIÓN.....	39
14. BIBLIOGRAFIA.....	40



## 1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la resistencia antibiótica de Estafilococos Coagulasa Negativos aislados de leche de vacas con mastitis en la población de Téjaro, Michoacán. El presente trabajo se realizó de marzo a agosto del 2011 en la comunidad de Téjaro, Municipio de Tarímbaro Michoacán en 16 hatos lecheros de Téjaro, Michoacán. La mastitis subclínica se determinó mediante la prueba de California de acuerdo con Wolter *et al* (2004), Un total de 484 muestras de leche fueron recolectadas asépticamente de los cuartos de 122 vacas en ordeño. La prueba de susceptibilidad antibiótica se llevó a cabo en 102 cepas de estafilococos (41 *S. aureus* y 61 Estafilococos Coagulasa Negativos) aislados de muestras de leche que se obtuvieron de los casos de mastitis subclínica de los hatos lecheros de Téjaro Michoacán. Se concluye que la Eritromicina y Tetraciclina fueron los antibióticos que presentaron mayor resistencia a los Estafilococos Coagulasa Negativos.

## SUMMARY

The objective of this study was to determine the antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of cows with mastitis in the population of Tejaro, Michoacán. Subclinical mastitis was determined by California Test according to Wolter *et al* (2004), A total of 484 milk samples were collected aseptically from the quarter of 122 milking cows. Antibiotic susceptibility testing was performed on 102 strains of staphylococci (41 *S. aureus* and 61 coagulase-negative staphylococci) isolated from milk samples obtained from cases of subclinical mastitis in dairy herds Tejaro, Michoacán. We conclude that erythromycin and tetracycline were the antibiotics that showed higher resistance to coagulase-negative staphylococci.



## 1.1 INTRODUCCIÓN

La Mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y generalmente es una consecuencia de infección microbiana causadas por agentes patógenos que encuentran su camino a través del lumen de la glándula (Tomasinsig *et al.*, 2010).

La mastitis continúa siendo la enfermedad más común y costosa que padece el ganado lechero en todo el mundo; existe donde quiera que se encuentren vacas. No hay un solo rebaño de ganado lechero, en cualquier parte y sin importar su tamaño, que esté absolutamente libre de este mal. Generalmente es el resultado final de la interacción de los microorganismos como agentes causales, la vaca como huésped y el medio ambiente, que puede influir en la vaca y en los microorganismos (Tomasinsig *et al.*, 2010).

Se trata de una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero y el más costoso para la industria láctea, causando considerables pérdidas económicas debido a disminución de la calidad y cantidad de la producción de leche, incremento en el costo del tratamiento y de los servicios veterinarios, y la pérdida de animales (Tomasinsig *et al.*, 2010).

La reacción inflamatoria es un mecanismo de protección que sirve para: eliminar a los microorganismos, neutralizar sus toxinas y ayudar a reparar al tejido productor de leche para que la glándula mamaria vuelva a funcionar normalmente. La eliminación completa de la mastitis de un hato es imposible, sin embargo se puede reducir el número de nuevas infecciones y disminuir la duración de las infecciones (Chávez, 2010).





El grado de inflamación puede variar mucho, desde subclínico hasta clínico, en sus diversas formas, dependiendo esto de la severidad con que la ubre reaccione a los patógenos y/o toxinas (Bedolla, 2006).

Las especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* son las más prevalentes en infecciones subclínicas y clínicas. Dentro del género *Staphylococcus*, las especies caracterizadas como coagulasa negativas son consideradas como patógenos menores, siendo causantes tanto de mastitis subclínica como clínica. Asimismo, las infecciones intramamarias (IIM) causadas por algunas especies de Estafilococos Coagula Negativos (ECN) interfieren con la colonización de la glándula mamaria por bacterias de mayor patogenicidad.

Los ECN son con frecuencia los organismos más prevalentes en secreciones mamarias de vacas lactantes y no lactantes siendo la prevalencia de estas especies de variable en distintos países (Delgado *et al.*, 1998).

Los ECN han sido considerados como patógenos menores de la mastitis. Sin embargo, es tanta su importancia como la causa principal de infecciones intramamaria en el ganado bovino a lo largo del mundo (Smith, 2001; Gentilini *et al.*, 2002).

Este grupo de ECN pertenecen diferentes tipos de *Staphylococcus*, excepto el *Staphylococcus aureus* (Sears, 2003). Las infecciones son típicamente subclínicas y producen un elevado conteo de células somáticas de la leche (NMC, 1999).

Este grupo de agentes son los patógenos oportunistas e infectan el canal de la teta y las fuentes superficiales de la glándula., algunas especies de estos microorganismos se

pueden originar del ambiente. Muchas infecciones de ECN son transitorias. Se piensa que la infección entre vaca y vaca es un riesgo muy bajo.

## 2. TIPOS DE MASTITIS

### 2.1 Mastitis Subclínica

Esta forma de mastitis es el tipo más frecuente de infección intramamaria y tanto la ubre como la leche tienen aspecto normal. La mastitis subclínica no es observada a simple vista ni por el ordeñador (figura 1), pero puede ser detectada por distintos tipos de análisis que manifiestan la presencia de los microorganismos o un aumento en el Conteo de Células Somáticas ( CCS ) (Chávez, 2010).



Figura 1. Vaca con mastitis subclínica

Es la forma más importante de mastitis porque causa las mayores pérdidas económicas debido a que:

- ❖ disminuye la producción de leche
- ❖ disminuye la calidad de la leche
- ❖ provoca pérdidas de bonificaciones por calidad

Las bacterias asociadas más frecuentemente con las infecciones intramamarias subclínicas son:

*Staphylococcus aureus*, Estafilococos coagulasa negativos (figura 2), *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis*.

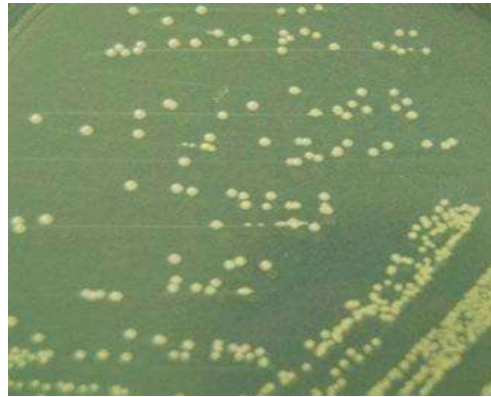


Figura 2. Cultivo de Estafilococos

## 2.2 Mastitis Clínica

Esta forma de infección intramamaria se caracteriza por anomalías visibles en la ubre y/o en la leche, cuya severidad varía mucho en el transcurso de la enfermedad. Pueden observarse cuartos enrojecidos e hinchados (figura 3), o bien palpase endurecimientos (Chávez, 2010).



Figura 3. Vaca con mastitis clínica

La mastitis clínica generalmente es causada por alguno de los patógenos mayores, como son: Estafilococos, *Estreptococos* y *Coliformes* (Chávez, 2010).

Según el grado de severidad, una clasificación clásica de las mastitis clínicas es:

### 2.3 Mastitis Clínica Subaguda

Esta forma de inflamación es levemente clínica y los síntomas son alteraciones menores en la leche, como grumos o flóculos. El cuarto afectado puede presentar leve hinchazón y sensibilidad al tacto, además de un poco o nada de calor localizado y enrojecimiento. Puede haber reducción de la producción de leche. No hay signos sistémicos de la enfermedad (Chávez, 2010).

### 2.4 Mastitis Clínica Aguda

Estas mastitis se caracterizan por un ataque repentino con enrojecimiento, hinchazón y endurecimiento del cuarto afectado (figura 4), el cual además es sensible al tacto. La leche tiene un aspecto muy anormal (purulento o sanguinolento) y la producción disminuye marcada y repentinamente (Chávez, 2010).



Figura 4. Patología clínica aguda de la ubre

### 2.5 Mastitis Clínica Hiperaguda

Esta forma muy poco frecuente de inflamación mamaria se caracteriza por acontecer muy rápidamente, su tiempo es de uno a cuatro días, y la aparición de la inflamación, de tres a cinco días (Chávez, 2010).



### 3. CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DE MASTITIS

Los microorganismos causantes de mastitis viven en la vaca, en su ubre y en sus alrededores. Más de 140 microorganismos diferentes pueden causar una infección intramamaria (IIM). Los microorganismos son invisibles a la vista y generalmente son bacterias, aunque también es posible encontrar micoplasmas, levaduras, algas, hongos. No todos los microorganismos causan reacciones perjudiciales en el animal (Chávez, 2010).

Se llaman patógenos a los microorganismos que causan una reacción adversa en el animal infectado.

#### 3.1 Patógenos causantes de la mastitis contagiosa

Los agentes clásicos contagiosos de mastitis “asociados a la ubre”. (*Sc. agalactiae*, *G. estreptococos*, *L-estreptococos*, *Sc. dysgalactiae* y *S.aureus*).

Estos agentes contagiosos pueden a largo plazo únicamente sobrevivir en la ubre. Por ello es la glándula mamaria el reservorio principal para los agentes contagiosos que salen al exterior en la leche.

El contagio se efectúa principalmente en la ordeña, de un cuarto a otro, de una vaca a otra y son transmitidos principalmente de la siguiente forma:

Mediante la mano del ordeñador.

A través de aerosoles de la leche.

Mediante las toallas para secar la ubre.

Mediante el equipo de ordeño (figura 5).



Figura 5. Equipo de ordeño

Los patógenos contagiosos se transmiten de cuartos infectados a cuartos sanos. Los cuartos infectados son el principal reservorio de éstos patógenos. El contagio ocurre principalmente durante el ordeño (a través de las pezoneras, de las manos del ordeñador, trapos para limpiar ubres). Generalmente causan infecciones subclínicas con brotes periódicos de casos clínicos (Chávez, 2010).

Debido al carácter contagioso de los agentes causales de mastitis “asociados a la ubre”, los animales infectados representan un peligro para el hato lechero. Las bases para el combate actual de los patógenos de la mastitis son por ello medidas higiénicas durante el periodo de ordeño o a la mitad del ordeño y una utilización consecuente de los selladores de los pezones.

### **3.1.1 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 (Bedolla, 2011)

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, 2001).

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 (Bedolla, 2011)

Según Reinemann, (1998) las dos fuentes más importantes de bacterias en la leche cruda son: 1) Los patógenos de la mastitis de la ubre. 2) Los patógenos ambientales que contaminan la máquina de ordeño (Patiño, 2008).

### **3.2 Patógenos causantes de la mastitis Ambiental**

Cepas del medio ambiente o agentes causales de mastitis asociados al “ambiente”. (Estreptococos Esculina Positivos, Estafilococos Coagulasa Negativos, *Escherichia Coli* y cepas *Coliformes*).

Los agentes patógenos de la mastitis ambiental, como el nombre lo dice, por el contrario de los agentes patógenos contagiosos de la mastitis, se localizan principalmente en el medio que rodea a la vaca. Las bacterias pertenecen a la microbiota normal del ambiente y se encuentran en cada establo. Como los principales



representantes de este grupo tenemos a los Estreptococos esculina positivos (frecuentemente *Streptococcus uberis*, ocasionalmente enterococos), Estafilococos Coagulasa Negativos (diferentes tipos de Estafilococos, con excepción de *S. aureus*) y cepas *Coliformes* (*Escherichia coli*, diferentes especies de *Citrobacter*, especies de *Enterobacter*).

Estos patógenos poseen en general un potencial muy pobre para causar enfermedad. Sin embargo pueden penetrar en el conducto galactoforo hacia la ubre y causar infecciones muy persistentes y con una terapia muy difícil. Se ha mencionado al *Sc. uberis* como un agente causal muy común de mastitis, sobre todo en el periodo seco de la vaca. Raramente se presenta una mastitis clínica causada por *Sc. uberis*. En comparación con los patógenos mencionados anteriormente el *Sc. uberis* es muy poco patógeno para la glándula mamaria. Sin embargo este microorganismo puede, especialmente cuando hay una baja muy notable de las defensas del organismo en general y especialmente de la ubre, causar infecciones de una terapia sumamente difícil y muy persistente.

Las infecciones en la ubre causadas por Estafilococos Coagulasa Negativos causan un aumento en los conteos de células somáticas y raramente una mastitis clínica. Entre los Estafilococos Coagulasa Negativos se encuentran varias especies capaces de causar mastitis. Se menciona principalmente a *S. xylosum*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. conii*, *S. ceuri*, y *S. hyicus*.

Las infecciones debidas a los agentes patógenos de mastitis asociados al medio ambiente son posibles cuando fallan los mecanismos de defensa de la vaca, es decir de la ubre. Las causas son errores en el manejo, especialmente en la higiene, la alimentación y el régimen de ordeña. Con un clima muy malo en el establo y una deficiente higiene en los echaderos de las vacas (las bacterias se reproducen mejor en



un medio húmedo), aumenta el número de bacterias y una variedad mayor de cepas, que rebasan la capacidad de defensa de la ubre de la vaca.

#### 4. ESTAFILOCOCOS

El género *Staphylococcus* se ha clasificado tradicionalmente en la familia *Micrococcaceae* junto con, el género *Micrococcus*.

Los Estafilococos son cocos gram positivos (de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 o de 4 células) y más característicamente en grupos irregulares en forma de racimos (su denominación procede del griego *Staphyle*, racimo de uvas (figura 6)) (Vadillo *et al.*, 2002).

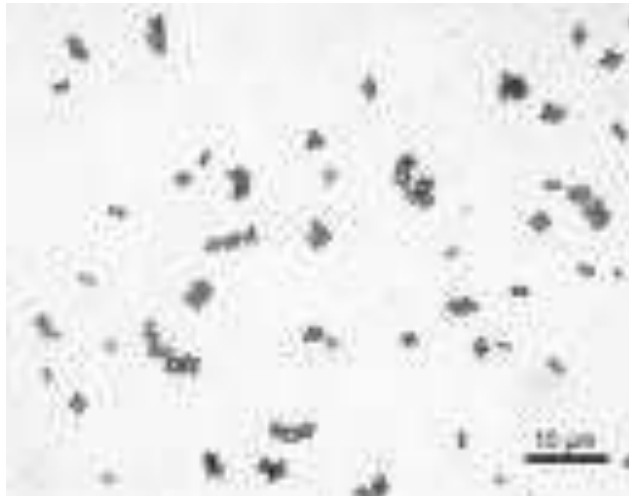


Figura 6. Estafilococos en forma de racimos de uvas

Son anaerobios facultativos, catalasa positivos, generalmente oxidasa negativos, no esporulados, inmóviles y generalmente no forman cápsula o tienen una limitada formación capsular.



#### 4.1 Habitad de los Estafilococos

Los Estafilococos están ampliamente difundidos en la naturaleza. Su hábitat natural es la piel y las membranas mucosas de los mamíferos y las aves. También pueden encontrarse de forma transitoria en el tracto intestinal.

#### 4.2 División de los Estafilococos

Los Estafilococos, según produzcan o no la enzima coagulasa, se divide en dos grandes grupos:

1.- Estafilococos coagulasa positivos (ECP) (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus Hycus*).

2.- Estafilococos coagulasa negativos (ECN) (*Staphylococcus chomogenes*, *Staphylococcus heamolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hycus*).

Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de los Estafilococos, de tal manera que en general se considera que los ECP son patógenos y que los ECN no lo son (Cuadro1) (vadillo *et al.*, 2002).

**Cuadro 1. Familia Micrococacceae**

Familia	Género	Especie			
Micrococacceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>			
		<i>S. intermedius</i>	<b>Coagulasa +</b>		
		<i>S. hyicus</i>			
		<i>Staphylococcus chromogenes</i>			
		<i>S. heamolyticus</i>			
		<i>S. hominis</i>	<b>Coagulasa -</b>		
		<i>S. hyicus</i>			
		<i>S. simulans</i>			
		Otros			
			<i>Micrococcus</i>	<i>M. roseus</i>	
				<i>M. varians</i>	
			<i>Planococcus</i>		
			<i>Stomatococcus</i>		

(Fuente: Saran y Chaffer, 2000).

**5. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS ESTAFILOCOCCOS**

Los Estafilococos crecen en los medios de cultivo ordinarios, como el agar nutritivo, si bien para la siembra de muestras clínicas se utiliza habitualmente el agar sangre (preferentemente de oveja), medio en el que puede apreciarse la capacidad hemolítica y el tipo de hemolisis producido por las bacterias (Vadillo *et al.*, 2002).

Las colonias aparecen normalmente a las 24 horas y al cabo de 48 horas de incubación pueden alcanzar los 4mm de diámetro. Estas colonias son redondas, lisas y brillantes y en el agra sangre opacas, lo que las diferencia de las colonias de los Estreptococos beta-hemolíticos, que son mas pequeños y translucidas (Vadillo *et al.*, 2002).



El criterio generalmente utilizado para la identificación de las especies patógenas es la capacidad de coagular el plasma. Esta capacidad se determina bien con una prueba en tubo, o bien con una prueba en porta objetos. La prueba en tubo permite detectar la coagulasa libre y se realiza añadiendo 0.5 ml de plasma de conejo citratado o con EDTA un par de gotas bien de un cultivo líquido de 18 horas, o bien de una suspensión densa preparada a partir de un cultivo de agar. La lectura de la prueba se hace a las 4 y a las 24 horas (Vadillo *et al.*, 2002).

La prueba de la coagulasa en porta objetos permite detectar el *clumping factor* y se realiza preparando una suspensión muy densa de bacterias en una gota de agua depositada en un portaobjetos y sobre la suspensión se añade con un asa de platino una gota de plasma de conejo y se mezcla rotando el asa (Vadillo *et al.*, 2002).

### 5.1 ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS (ECN)

En los ECN se incluyen numeroso grupo de especies que se caracterizan, como su nombre lo indica, por no producir coagulasa. Las especies de ECN que se presentan en los animales domésticos carecen de *clumping factor*, no producen ADNasa termoestable y aunque algunas pueden mostrar actividad hemolítica esta suele aparecer lentamente y ser débil (Vadillo *et al.*, 2002).

El *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus epidermidis* son las especies de ECN mas comunes en las infecciones intramamarias (IIM) bovinas. También en las ovejas y en las cabras los ECN son la causa mas frecuente de infecciones intramamarias siendo estas generalmente subclínicas (Vadillo *et al.*, 2002).



Son muy comunes, pero las infecciones suelen ser leves. Raramente generan casos clínicos, y si aparecen suelen ser moderados. Las bacterias suelen vivir en piel sana de los pezones y manos del ordeñador. Las nuevas infecciones aumentan durante el período seco. Puede infectar a vaquillonas antes de su primer parto. La mayoría de las infecciones se curan espontáneamente (sin terapia) (Chávez, 2010).

La Mastitis causada por estafilococos suelen estar divididos en dos grupos: *Staphylococcus aureus* y otros estafilococos, comúnmente denominado como Estafilococos Coagulasa Negativos son considerados como un grupo homogéneo, aunque representen 39 especies. Algunos de ellos son en realidad Estafilococos Coagulasa Positivos (Suvi y Sato, 2007).

Uno de los grupos de bacterias que provocan la mastitis son los denominados Estafilococos Coagulasa Negativos. Estas bacterias son de elevado interés, debido a que a día de hoy son los microorganismos más frecuentemente aislados en vacas y novillas de los rebaños, y en la actualidad se consideran patógenos emergentes de la mastitis bovina (Navarro, 2011).

Los ECN son un grupo de patógenos adaptables y oportunistas cuya habilidad es persistente y se multiplica en una gran variedad de causas de ambiente en un espectro ancho de enfermedades en humanos y animales (Tomo *et al.*, 2005).

Normalmente pasado por alto, estos patógenos son frecuentemente aislados de las muestras de leche y son una causa significativa de inflamaciones y elevado los conteos celulares dos a tres veces mayor en los cuartos infectados (Smith, 2001).



Normalmente los ECN se encuentran en la piel sana del pezón y en las manos del ordeñador. A menudo son denominados microorganismos oportunistas, ya que habitan zonas donde les es sencillo colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores (Navarro, 2011).

La implementación de programas de control de mastitis durante los últimos 30 años condujo a una reducción de la incidencia general de la mastitis clínica en la mayoría de rebaños. En algunos casos, la disminución llegó al 90%. Mientras que la enfermedad clínica causada por patógenos mayores, como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* descendió significativamente, patógenos menores como los ECN han ido en aumento tomando cada vez una importancia mayor. Las vacas y las novillas pueden infectarse por ECN antes del parto. En la lactación, la infección debida a ECN se asocia a un aumento en el recuento de células somáticas (RCS) (Navarro, 2011).

La prevalencia de las mastitis por ECN es más elevada en primíparas. Generalmente, suelen ser infecciones leves y se limitan a flóculos en la leche debidos a cambios locales en la ubre. Muchas de estas infecciones incluso se curan espontáneamente. Pero, en ocasiones, también se observan animales con infecciones intramamarias por ECN con síntomas sistémicos, y también ejemplares con infecciones persistentes que pueden tener una duración de varios meses si no se interviene (Navarro, 2011).

Se consideran patógenos secundarios en ubre, pero la importancia de estas infecciones intramamarias son aún una cuestión de debate ya que, por otro lado, también se les otorgan gran importancia en la etiología de la mastitis subclínica o clínica y en el aumento de células somáticas de las vacas afectadas (Navarro, 2011).



Los ECN son la causa principal de infecciones intramamarias en granjas modernas lecheras donde la mastitis contagiosa por *Streptococcus agalactia* y *Staphylococcus aureus* ha sido eliminado en las vaquillas al parir (Smith, 2001).

Ya hacia los años 80's, con medidas de manejo de la explotación, uso de nuevos antibióticos y descarta de vacas portadoras de *Staphylococcus aureus*, se produce una reducción considerable del mismo, dando paso a un aumento de los Estafilococos Coagulasa Negativos (Sara y Chaffer, 2000).

## 5.2 Etiología y epidemiología

Los ECN son cocos Gram (+) que habitan tanto en el exterior como en el interior de las ubres infectadas. Muchas veces se les denomina oportunistas de la flora de la piel, porque pueden ser aislados de: la piel del pezón, el canal del pezón, la vagina, el pelaje y las fosas nasales (Navarro, 2011).

Este grupo de bacterias incluye más de 50 especies y subespecies. Las especies más comunes de ECN aisladas de mastitis bovina son *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus simulans* (Navarro, 2011).

Especies como *S. epidermitis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. simulans* y *Staphylococcus warneri* pertenecen a la flora bacteriana normal de la piel del pezón, mientras otras como *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus sciuri* parecen provenir del ambiente. *S. chromogenes* puede colonizar la piel del pezón y también otros lugares del cuerpo del animal como el pelaje, la vagina y el canal de pezón (Navarro, 2011).



La incidencia de nuevas infecciones es máxima durante el periodo de vaca seca y antes del parto, por lo tanto, el porcentaje de cuartos infectados es alto en el momento del parto. La prevalencia de ECN es más alta en primíparas que en vacas adultas. Desafortunadamente, muchos productores creen erróneamente que sus novillas están sanas, y la presencia de mastitis no se observa hasta el momento del parto (Navarro, 2011).

Muchas de las infecciones intramamarias causadas por ECN curan espontáneamente y la prevalencia decrece a medida que avanza la lactación. Aunque por lo general las infecciones por ECN suelen ser leves o de tipo subclínico, se ha demostrado también que pueden causar procesos más graves y persistentes y provoca un aumento en el recuento de células somáticas y una disminución en la calidad y producción de la leche debido al daño causado al tejido mamario (Navarro, 2011).

La prevalencia de las bacterias contagiosas clásicas *Streptococcus agalactiae* y el *Staphylococcus aureus* ha disminuido. Los Estafilococos Coagulasa Negativos y *Corynebacterium bovis* que se consideran tradicionalmente que son los patógenos del mastitis menor, se han hecho más comunes (Huxley *et al.*, 2002).

## 6. INFECCIONES EN LA PARICIÓN Y FASE DE LA LACTACIÓN POR ECN

Los Estafilococos Coagulasa Negativo son una parte de la flora superficial que colonizan el canal de la teta y entran en la glándula para producir *Staphylococcus* que normalmente se aíslan del canal de la teta antes de parir la vaca y de la leche a la parición, pero el número de cuartos afectados tienden a disminuir a través del primer mes de lactación (Almeida y Oliver, 2000).





Los ECN se encuentran en 46.7% de los canales de la teta de 113 lactaciones de vacas primíparas y vacas del múltiparas sólo antes de parir la vaca comparó con sólo 9%. La prevalencia es más alto en primera lactación y disminuciones con las lactaciones subsecuentes. No se conoce si esta disminución por la edad es debida por un éxito alto de curas del bacteriológico después de la terapia de la vaca seca o un aumento en la inmunidad en los animales más viejos (Almeida y Oliver, 2000).

Como se ha mencionado, estos patógenos son más prevalecientes en las vacas de primera lactación al momento del parto, y el número de infecciones disminuye durante el primer mes después de parir la vaca (Sears *et al.*, 2003).

Las vacas en la primera lactación tendrán un predominio más alto de infecciones de ECN que las vacas más viejas. Todas las vacas al parir tienen una prevalencia alta de infecciones por ECN, que declinan rápidamente durante la primera semana o dos de la fase de lactación con el uso de germicidas eficaz sumergiendo la teta después del ordeño. Esta declinación de patógenos en las lactaciones tempranas se presume que sea una forma de eliminación de lagunas infecciones de canal de la teta (NMC, 1999).

## **7. FÁRMACOS EMPLEADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA MASTITIS BOVINA**

Existen numerosos factores que influyen en la presentación de la mastitis, estos responden principalmente a causas traumáticas o a la infección por microorganismos patógenos, entre los cuales algunas especies bacterianas juegan un rol particularmente importante. Considerando este último aspecto, la terapia de la mastitis clínica se focaliza fundamentalmente en la eliminación del agente infeccioso, utilizando como primera herramienta terapéutica los antimicrobianos.



Los antibióticos son sustancias producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos o actinomicetos), que suprimen el desarrollo de otros microorganismos y que incluso pueden llegar a destruirlos.

El mal uso o uso intensivo de antibióticos puede llevar al desarrollo de resistencia entre diferentes cepas bacterianas y la contaminación de alimentos, de la sanidad animal y consecuencias para la salud humana.

Uno de los principales inconvenientes de la terapia con antibióticos es que, además de ser utilizados por su acción terapéutica en el tratamiento de las infecciones intramamarias, también son administrados con fines profilácticos en la prevención de la enfermedad durante el secado de los animales, entre una lactancia y la siguiente. Esta práctica favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana e influye negativamente en el tratamiento de la enfermedad según Calvino y col. (1991).

Además, otro aspecto desfavorable, resulta de la acumulación de residuos de antibióticos en el animal y sus implicancias en la salud humana. Por ello, existen presiones cada vez mayores por parte de los entes reguladores para limitar el uso de estos productos en el ganado destinado a consumo humano (Pellegrino *et al.*, 2011).

La mayoría de las drogas antimicrobianas utilizadas son  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos. La respuesta a estos antibióticos varía según el agente etiológico (Giannechini *et al.*, 2002).



## 7.1 Beta lactámicos

Es el grupo de drogas que mayor uso tiene para el tratamiento o la prevención de las infecciones de la glándula mamaria. En la actualidad, dentro de las formulaciones para infusión intramamaria, el 60 % de los productos del mercado están compuestos únicamente por beta lactámicos, y el 88% tienen al menos una de estas drogas en su composición en combinación con fármacos de otros grupos (Ambros, 2010).

Dentro de este grupo se incluyen a las penicilinas (Ampicilina, Cloxacilina) y a las cefalosporinas (cefalosporinas de 1er generación como cefradina, cefalexina, cefalotina cefadroxilo, cefacetilo, cefazolina).

Todos los beta lactámicos mencionados poseen características farmacocinéticas semejantes. Luego de su administración parenteral, ya sea por vía intramuscular o subcutánea, se absorben en forma completa muy rápidamente.

Al ser drogas hidrosolubles, van a distribuirse principalmente por el líquido extracelular, donde alcanzan concentraciones terapéuticas, viéndose dificultado su ingreso al interior celular. Las concentraciones alcanzadas en leche, son para todos estos antimicrobianos, muy inferiores a las plasmáticas (Ambros, 2010).

## 7.2 Penicilinas

La principal diferencia en el espectro entre los gram positivos se encuentra entre los estafilococos, ya que hay muchas cepas que son productoras de enzimas (beta lactamasas) que hidrolizan a estos fármacos, inactivándolos; esto hace que dichas bacterias sean resistentes a las penicilinas, exceptuando a la cloxacilina y dicloxacilina, ya que estas dos no son sensibles a la hidrólisis por estas enzimas. Es importante señalar que, a pesar del extenso empleo de las penicilinas en medicina veterinaria durante muchos años, a excepción de algunas cepas de *Staphylococcus aureus* la mayor parte de las bacterias gram positivas se mantienen susceptibles (Ambros, 2010).



Para el caso de las enterobacterias, muchas cepas, al igual que los estafilococos son productoras de beta lactamasas, por lo tanto, son resistentes a la amoxicilina y ampicilina (únicas drogas activas frente a estos microorganismos). El aumento de la frecuencia con que se aíslan a este tipo de bacterias, limita el uso de estas drogas a muy pocas situaciones clínicas, es por ello, que se las combina con ácido clavulánico, el cual se une a la enzima impidiendo de esta forma que el fármaco sea hidrolizado (Ambros, 2010).

### **7.3 Tetraciclinas**

Tienen el espectro más amplio que todos los antibióticos y actúa bien contra los cocos Gram positivos. Actúan interfiriendo la síntesis de 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 (Patiño, 2008).

### **7.4 Cefalosporinas**

Tienen un efecto inhibitor de la síntesis del mucopeptido sin permeabilidad selectiva que se destruye. Las cefalosporinas se unen dentro de la pared y membranas celulares de las bacterias y varias enzimas denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (Ambros, 2010).

### **7.5 Aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que actúan a nivel de ribosomas en el subunidad 30S bacteriana, y por ende, a nivel de síntesis de proteínas, creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. Tienen actividad



especialmente en contra de bacterias Gram negativas y aeróbicas y actúan sinérgicamente en contra de organismos Gram positivos. La Gentamicina es la más usada de los aminoglucósidos, sin embargo, la amikacina tiende a ser especialmente efectiva en contra de organismos resistentes. Son, junto con los antibióticos betalactámicos, uno de los pilares básicos de la moderna quimioterapia (Ambros, 2010).

## 7.6 Macrólidos

Este grupo de componentes antimicrobianos posee un gran anillo lactónico. Son activos contra la mayoría de los microorganismos gram-positivos. Los macrolidos son bacteriostáticos pero se sabe que puede ser bactericidas en especial contra *Streptococcus* sp. Dependiendo de la fase de reproducción bacteriana, la concentración que logre en el tejido afectado y el tiempo de exposición (Ambros, 2010).

## 7.7 Eritromicina

La Eritromicina pertenece a la familia de los macrólidos. Es un antibiótico bacteriostático para la mayoría de las cepas susceptibles. Se une con la subunidad 50S de los ribosomas 70S, inhibiendo la síntesis de proteínas.

Tiene amplio espectro de actividad contra las bacterias aerobias y anaerobias gram positivas y gram negativas, además de especies de mycoplasmas y clamidias. Puede ser bacteriostático y bactericida, según la concentración en los sitios de infección. Tiene actividad bactericida contra las enterobacterias y pseudomonas en condiciones estrictamente alcalinas.

Es incompatible con las vitaminas B y C, así como con la cefalotina, tetraciclina, cloramfenicol y la heparina (Sumano, 1997).



## 8. 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 (Bedolla, 2011).

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema que tiene consecuencias para la salud animal y humana cuando los agentes patógenos se introducen en la cadena alimentaria. Grupos de expertos científicos tanto del Instituto de Medicina, la Sociedad Americana de Microbiología y la Organización Mundial de la Salud han expresado preocupación acerca del incremento global de las resistencias (Patiño, 2008; Fedorka *et al.*, 1998).

En la pérdida de sensibilidad a un antibiótico intervienen varios factores. Las dos fuerzas principales son la prevalencia de genes de resistencia (que determinan proteínas que protegen a las bacterias de los efectos de los fármacos) y la difusión del uso de antibióticos. Si la flora bacteriana de una comunidad carece de genes que confieren resistencia contra un antibiótico, este podrá eliminar con éxito toda la infección, pero si en la flora existen genes de resistencia y la comunidad hace uso persistente de un antibiótico, las bacterias que escapen a la erradicación por ese fármaco harán acto de presencia y proliferarán y además la resistencia puede propagarse a lugares distantes.

Los antibióticos si bien son necesarios para el control de las infecciones bacterianas, pueden tener efectos indeseables sobre la ecología microbiana. Pudiendo producir cambios en las proporciones de las bacterias sensibles/resistentes a los antibióticos, tanto en el individuo sometido al tratamiento como en el medio y la comunidad en general (Stuart, 1998; Ruiz *et al.*, 2001).



Figura 7. Patologías humanas

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 (figura 8) 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 (Bedolla, 2011).



Figura 8. Alergia en humanos

## 9. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Los clínicos en cualquiera de las áreas de la salud, dependen ampliamente de los datos microbiológicos de laboratorio para el tratamiento de sus pacientes. Por esto la importancia de las pruebas de sensibilidad a antibióticos, ya que proveen una información valiosa para las decisiones terapéuticas; y deben ser realizados en condiciones óptimas para su eficiente interpretación (National committee for clinical laboratory standards. 1999). Algunas de éstas son las siguientes:

### 9.1 Pruebas de difusión en gel de agar o método de Kirby - Bauer

Este método consiste en el cultivo de los agentes patógenos en medios apropiados para su crecimiento, en el cual se colocan antibióticos en discos (figura 9 y 10) que dependiendo de la concentración del antibiótico en este y de la sensibilidad del microorganismo al antimicrobiano, da como resultado zonas donde el crecimiento bacteriano es inhibido luego de varias horas de incubación (NMC, 1999).



Figura 9. Medio de cultivo con disco de Antibiótico



Figura 10. Medio de cultivo con disco de Antibiótico

Este método da como resultado datos cualitativos ordinales (sensible, intermedio y resistente), dichos resultados son la conclusión de varias consideraciones como la especie de microorganismo, la clase de antibiótico, concentración del antibiótico en el disco, el halo de inhibición del crecimiento (medido en mm) (Bauer *et al.*, 1996).





## 9. 2. Pruebas de dilución o concentraciones inhibitorias mínimas (C.I.M.)

La determinación de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (C.I.M.), para los patógenos específicos, provee datos, que conjuntamente con los parámetros farmacocinéticos de los agentes antibacteriales en el animal, permiten predecir la eficacia “in vivo” del compuesto en el tratamiento de una enfermedad específica. Aunque existen regímenes terapéuticos para muchos agentes antibacteriales utilizados en el tratamiento de infecciones intramamarias, la sensibilidad del germen puede variar de tal manera que es necesario replantear el esquema terapéutico; de acuerdo al patrón de sensibilidades desarrollado, y para esto las C.I.M. permiten a los veterinarios monitorear la sensibilidad antimicrobial de las cepas en los hatos lecheros (Bedolla, 2011).

La selección de los antibióticos se hace teniendo en cuenta el microorganismo a evaluar y los diferentes grupos farmacológicos que serian de primera elección para la terapéutica (de acuerdo con el espectro) y los resultados de los C.I.M. que se reportan con criterios de interpretación definidos como: sensible, intermedio y resistente.

*2.1. Sensible:* Esta categoría aplica a las infecciones por cepas que pueden ser apropiadamente tratadas con dosis de antibióticos recomendadas para ese tipo de infección y especie infectada.

*2.2. Intermedio:* Ésta categoría incluye aislamientos bacteriales, evaluados con agentes antibacterianos, cuyas C.I.M. se aproximan a los niveles alcanzables en tejidos y sangre, y para los que la tasa de respuesta puede ser más baja que los de las cepas sensibles. La categoría intermedia implica aplicabilidad clínica en los sitios corporales en donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ejemplo, Quinolonas y B-lactámicos en orina) o cuando altas dosis de la droga pueden ser usadas (por ejemplo B-lactámicos).



2.3. *Resistente*: Las cepas no son inhibidas por las concentraciones sistémicas usualmente alcanzables de un agente con régimen terapéutico normal y/o fallas atribuibles a mecanismos de resistencias (por ejemplo B-lactamasa) y cuya eficacia clínica no es confiable en estudios terapéuticos (National committee for clinical laboratory standards. 1999).

La determinación de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas es una prueba con mejor poder predictivo de la eficacia “in vivo” que las pruebas de difusión en gel de agar (Salomon *et al.*, 1998).

Considerando pues lo anteriormente expuesto, el tratamiento de las mastitis bovina con antibióticos, es una práctica que debe hacerse con criterios profesionales debido a que son muchos los factores que intervienen no sólo para una eficiente terapéutica, sino también para la prevención en la generación de resistencia bacterial y la presencia de residuos de antibióticos en leche; problemas que competen no sólo a la salud animal sino también a la salud humana. Por tales motivos el desarrollo de un programa de control efectivo requiere un extenso conocimiento de la epidemiología de la mastitis bovina, incluyendo la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos de los microorganismos aislados de la glándula mamaria, así como programas de prevención (Bedolla, 2011).



## 10. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue determinar la resistencia antibiótica de Estafilococos Coagulasa Negativos aislados de leche de vacas con mastitis de Téjaro, municipio de Tarímbaro, Michoacán.



## 11. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó de marzo a agosto del 2011 en la comunidad de Téjaro, Municipio de Tarímbaro Michoacán, la cual se encuentra ubicada en las coordenadas 19°54' de latitud norte y 101°17' de longitud oeste, a una altura snm de 1900 metros (INEGI, 2011).



Figura 11. Téjaro, Municipio de Tarímbaro

Se muestrearon 16 hatos lecheros de la raza Holstein Friesian, explotados bajo el sistema de producción lechera en pequeña escala. Un total de 484 muestras de leche fueron recolectadas asépticamente de los cuartos de 122 vacas en ordeño (figura 13), de acuerdo con Wolter *et al.* (2004). Es decir, se procedió primeramente a lavar con agua los pezones sucios (figura 14), evitando así arrastrar las bacterias de la zona superior de la ubre hacia la piel del pezón.



Figura 12. Establo lecheros

Enseguida se realizó el secado de los pezones con toallas de papel desechable dejándolos limpios para tomar la muestra, se desecharon los primeros chorros de leche que tienen gran importancia, debido a que pueden contener bacterias; y se realizó la desinfección de las puntas de los pezones con alcohol de 70° y algodón.



Figura 13. Recolección de las muestras



Figura 14. Lavado de la ubre

Una vez hecho lo anterior, se procedió a realizar la prueba de California, para lo cual se utilizó una paleta de plástico depositando en ella una muestra de leche de cada cuarto (figura 15), se mezcló con un reactivo de nombre comercial Diagmastin (Alquil-Aril-Sulfonato más Púrpura de Bromocresol) (figura 16), haciendo movimientos rotativos, la leche de los cuartos infectados forman un gel (figura 17), el cual refleja la cantidad de células somáticas (leucocitos y células epiteliales) de la leche, por lo que los resultados se leyeron como negativos, traza, 1, 2 y 3, según la cantidad de gel que se formó en el recipiente.



Figura 15. Recolección de la muestra para la prueba de California



Figura 16. Se mezcló con el reactivo





Figura 17. Formación de gel por la presencia de mastitis

En seguida, se continuó con la toma de muestras de leche utilizando para ello tubos de ensayo esterilizados llenándolo en dos tercios como máximo, se identifican previamente con el número de vaca y pezón. La toma de muestra se hizo con la presión mínima y de ser posible con una sola presión del pezón. Posteriormente, los tubos se colocan los tubos en una gradilla colocada dentro de una hielera cerrada herméticamente para ser transportada al laboratorio de bacteriología de la USAD de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UMSNH, en donde se mantuvieron a 4° C hasta su procesamiento al día siguiente durante un tiempo inferior a 18 horas de su recolección.

### 11.1 Procesamiento de las muestras en el laboratorio

El procesamiento de las muestras de leche obtenidas se realizará el día del muestreo o al día siguiente en el laboratorio de la USAD de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UMSNH. Las muestras se sembrarán en agar 110 y en base de agar sangre (figuras 18 y 19), y la identificación de los estafilococos se llevo a cabo de acuerdo con Sears y McCarthy (2003), es decir, a través de su morfología colonial, prueba de catalasa, tinción Gram (figura 20), prueba de coagulasa, prueba de manitol gelatina y hemólisis. Enseguida, las placas de agar serán incubadas a 37 °C y examinadas después de 24 y 48 horas.



Figura 18. Procesamiento de las muestras en el laboratorio



Figura 19. Pruebas de Manitol y Gelatina



Figura 20. Pruebas de tinción gram

Los casos de mastitis que mostraron al momento de realizar la prueba de California un conteo de células somáticas arriba de 200.000 cel/ml, con o sin aislamiento de microorganismo, se los consideró como afectados por mastitis subclínica. Por otro lado, las vacas que presentaron signos clínicos, leche con presencia de coágulos o sangre, alteraciones de la ubre (enrojecimiento, hinchazón, calentamiento, dolor) elevado conteo de células somáticas y aislamiento de microorganismos se les consideró como afectados por mastitis clínica.

## 11.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos

Las cepas aisladas de *S. aureus* fueron analizadas con el método de difusión en disco de BIO RAD de acuerdo con Torutoglu *et al.* (2006). 3 a 5 colonias de cada cepa previamente identificada (figura 22), fueron suspendidas en 2 ml de solución salina estéril a una densidad aproximadamente igual a la densidad del estándar 0.5 de McFarland. Enseguida, la suspensión bacteriana se homogenizó y se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente, un hisopo estéril seco de algodón fue colocado en la suspensión, enseguida se quitó el exceso de caldo presionando y girando el hisopo contra el interior del tubo.

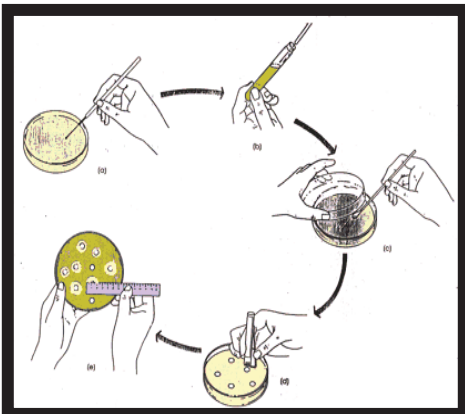


Figura 21. Inoculación de las muestras



Figura 22. Se toma una cantidad de colonia

La suspensión bacteriana fue inoculada sobre el agar Mueller-Hinton (Oxoid) (figura 21) con el hisopo estéril realizando estrías en todas direcciones con el fin de cubrirla completamente, de tal manera que la superficie entera del agar quedo cubierta. Posteriormente los discos que contenían los siguientes antibióticos: ampicilina (Bio-Rad, 10 µg), cefalotina (Bio-Rad, 30 µg), cefotaxima (Bio-Rad, 30 µg), ceftazidima (Bio-Rad, 30 µg), cefuroxime (Bio-Rad, 30 µg), Dicloxacilina (Bio-Rad, 1 µg), eritromicina (Bio-Rad, 15 µg), gentamicina (Bio-Rad, 10 µg), pefloxacina (Bio-Rad, 5 µg), penicilina (Bio-Rad, 10 UI), tetraciclina (Bio-Rad, 30 µg), y trimetoprim/sulfametoxazol (Bio-Rad, 25 µg) fueron colocados en condiciones de esterilidad en la superficie del medio haciendo





presión sobre estos cuidadosamente para asegurar el completo contacto con la superficie del agar e incubados aerobícamente a 37°C por 18 horas.

Los resultados fueron registrados como sensibles (S) o resistentes (R) por el diámetro del halo de inhibición de acuerdo a los estándares interpretativos de BIO-RAD (recomendaciones de la FDA y CLSI, 2008) (Cuadro 2). La cepa de referencia utilizada para los ensayos de susceptibilidad antibiótica fue la ATCC 25923 de *S. aureus*.

## Cuadro 2. Interpretación del diámetro de las zonas de inhibición para patógenos de interés veterinario

Agente antimicrobiano	Concentración	Zona de inhibición (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Ampicilina	10 µg	≥ 29	-	≤ 28
Cefalotina	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 28
Cefotaxima	30 µg	≥ 23	15-22	≤ 14
Cefepime	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefuroxima	30 µg	≥ 23	15-22	≤ 14
Dicloxacilina	1 µg	≥ 13	11-12	≤ 10
Eritromicina	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13
Gentamicina	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Levofloxacina	5 µg	≥ 17	14-16	≤ 13
Penicilina	10 UI	≥ 29	-	≤ 28
Tetraciclina	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
Trimetropim-Sulfametoxazol	25 µg	≥ 16	11-15	≤ 10

\* Diámetros del halo de inhibición según BIO RAD (recomendaciones de la FDA y CLSI), 2010.

Cuadro modificado de Pellegrino *et al.*, 2011.

## 12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los muestreos que se realizaron a los 16 hatos lecheros, se obtuvieron 484 muestras de leche (ya que 4 cuartos estaban ciegos y no se consideraron) de las cuales 102 cepas bacterianas corresponden al género *Staphylococcus*. De éstas, 61 (59.8%) fueron identificados como Estafilococos Coagulasa Negativos (Cuadro 2),



mientras que el resto 41 (40.2%) correspondieron a *S. aureus*, mismas que se obtuvieron de los casos de mastitis clínica y subclínica de los hatos lecheros de Téjaro Michoacán.

**Cuadro 3. Resistencia antibiótica de Estafilococos Coagulasa Negativos aislados de leche de vacas con mastitis.**

Antibiótico	ECN(n=61)			
	Susceptible		Resistente	
	n	%	n	%
Ampicilina	56	91.8	5	8.1
Cefalotina	61	100	0	0
Cefotoxina	60	98.3	1	1.6
Cefepime	60	98.3	1	1.6
Cefuroxina	60	98.3	1	1.6
Dicloxacilina	59	96.7	2	3.2
Eritromicina	48	78.6	13	21.3
Gentamicina	56	91.8	5	8.1
Levofloxacin	61	100	0	0
Penicilina	54	88.5	7	11.4
Tetraciclina	53	86.8	8	13.1
Trimetropim-Sulfametoxazol	59	96.72	2	3.27

En el presente trabajo se determinó la resistencia a antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento de la mastitis bovina de cepas de Estafilococos Coagulasa Negativos aislados de muestras de leche provenientes de 16 establos lecheros de la población de Téjaro, Michoacán correspondientes a un 12% de la población total de los hatos



lecheros. Los propietarios que colaboraron: Roberto Silva Martínez, Alfonso Mora Izquierdo, Luz María Mora Izquierdo, José Otón Aguilar Mora, Arturo Tapia Izquierdo, Jesús Mora, Arturo Pintor Mendoza, José Murillo Magaña, José Rodríguez Avalos, Francisco Mora González, María Izquierdo Vázquez, Abelardo Ayala Chávez, Pedro Izquierdo Gutiérrez, Néstor Mendoza Ojeda, Alberto Izquierdo Martínez.

Para evaluar la resistencia de las cepas de ECN, se realizaron ensayos de resistencia *in vitro* frente a 12 agentes antimicrobianos de uso frecuente para el tratamiento de la mastitis bovina. De las 61 cepas de ECN estudiadas, 45 (73.27%) fueron resistentes a diez antibióticos, de ellas el 100% fueron aisladas de vacas con mastitis subclínica. El 21.3% (13) del total de cepas aisladas de ECN fueron resistentes a la Eritromicina, 13.1% (8) a la Tetraciclina, 11.4% (7) a la Penicilina, 8.1% (5) a la Gentamicina y Ampicilina, 3.27% (2) a la Dicloxacilina y Trimetropim- Sulfametoxazol, mientras que el 1.6% (1) resultaron resistentes a la Cefotaxima, Cefepime y Cefuroxina, respectivamente (Cuadro 3).

El análisis del comportamiento de las cepas de ECN aisladas frente a los antimicrobianos de uso frecuente en mastitis bovina, mostró que el porcentaje de resistencia encontrado para Eritromicina (21.3%) fue superior a la encontrado por Myllys *et al.* (1998) en Finlandia; Gentillini *et al.* (2000) en Argentina (11.5%); Gooraninejad *et al.* (2007) en Iran (12.8%); Faría *et al.* (2005) en Venezuela, y Moniri *et al.* (2007) en Iran (17.7%).

Por otro lado, la resistencia observada en este estudio para tetraciclina (13.1%) fue similar a lo reportado por Myllys *et al.* (1998) en Finlandia, quienes encontraron un 15.09%, pero elevado en relación a los resultados obtenidos en Noruega por Hofshanger y Cols. en 1999 (Gooranijjad *et al.*, 2007).



En cuanto a los resultados de resistencia a penicilina el valor obtenido (11.4%) se encuentra por debajo de lo reportado en Argentina (30%) por Gentillini *et al.* (2002); en Finlandia (37.2%) por Myllys *et al.* (1998); Dinamarca (36.1%) por Aarestrup *et al.* 1995; en Uruguay por Giannechini *et al.* (2002); en Estados Unidos por Owens *et al.* (1997) y en Iran (57%) por Moniri *et al.* (2007) respectivamente.

Los resultados del presente estudio sobre la resistencia a Gentamicina del 8.1% (5/61 cepas), se encuentran por encima de lo obtenido en Argentina, Uruguay y Estados Unidos por Del Baglivi *et al.*, 1976; Frigerio *et al.*, 1995 y Owens *et al.*, 1997, los cuales no reportan resistencia alguna a la Gentamicina.

Respecto a la ampicilina, la resistencia observada en este estudio (8.1%) fue inferior a lo encontrado por Gentilini *et al.* (2002) en Argentina (18.1%) y por Moniri *et al.*, 2007) en Iran (17.7%).

En cuanto a Trimetropim- Sulfametoxazol, investigadores en Uruguay (Giannechini *et al.*, 2002) y en Irán (Gooraninejad *et al.*, 2007) y (Moniri *et al.*, 2007) observaron una resistencia a este antibiótico de un 6% y un 11.8% respectivamente, el cual se encuentra por arriba de lo obtenido en este estudio (3.27%).

Respecto a la sensibilidad de las cepas de ECN, se encontró que el 100% (61) de las cepas aisladas de ECN fueron sensibles a la cefalotina y a la levofloxacin.

Estas diferencias observadas en la actividad de los antibióticos utilizados contra los estafilococos muestran la importancia que tienen las pruebas de susceptibilidad antibiótica para la identificación de los agentes bacterianos. Por lo que en el tratamiento de los animales infectados por estas bacterias, es importante determinar el fenotipo de resistencia para aplicar el tratamiento adecuado.



### 13. CONCLUSIÓN

Se concluye que las cepas de Estafilococos Coagulasa Negativos aisladas en este trabajo mostraron mayor resistencia *in vitro* a los antibióticos de uso frecuente en la terapia de la mastitis bovina como son la Eritromicina, Tetraciclinas y Penicilina.

Estas diferencias observadas en la actividad de los antibióticos utilizados contra los estafilococos muestran la importancia que tienen las pruebas de susceptibilidad antibiótica para la identificación de los agentes bacterianos. Por lo que en el tratamiento de los animales infectados por estas bacterias, es importante determinar a través de un antibiograma la resistencia que estas presentan a los antibióticos y así aplicar el tratamiento adecuado.



#### 14. BIBLIOGRAFIA

Aarestrup, F. M., Wegwener, H. C., Roshdal, V.I. and Jensen, N. E. 1995. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.*, 36: 475-487.

Almeida R. A. and Oliver, S. P. 2000. Coagulase-negative *Staphylococcus* species promote their invasion into mammary epithelial cells by exploiting host cell mechanisms. In: Proceeding of the 39th Annual Meeting of the National Mastitis Council, Nashville, TN. Madison (WI): National Mastitis Council. pp. 193-194.

Ambros, L. 2010. Características de los agentes antimicrobianos utilizados para el tratamiento de mastitis Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. pp. 1-8

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherrisj, C. y col. 1996. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology*. 45 : 493 - 496.

Bedolla, C. C., Mejía, A. R., Pérez, C. J., Valdivia, V. O., Castañeda, V. H. y Wolter, W. 2006. Prevalencia de mastitis clínica en el ganado lechero de Tejaro, municipio de tarímbaro michoacàn. pp. 1-5

Bedolla, C. C., Bedolla, G. E., Mejía, A. R., García, C. E., Aguilar, M. A. M., Herrera, C. J., Castañeda, V. H. 2011. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos aislados de leche de vacas con mastitis subclínica de téjaro Michoacán. pp. 1-4



Bedolla, G. E. A. 2011. Resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* aislados de leche de vacas con mastitis de Téjaro, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Calvinho, L. F., AR Delgado, C. A. Vitulich, H. L. Occhi, V. R., Canavesio, M. A., Zurbriggen, H. D. 1991. Susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafesina. Vet. Arg. 8, pp. 677-680.

Chaves, C. y Javier, M. V. 2010. Calidad de leche y mastitis bovina. Comisión Directiva de APROCAL, Buenos Aires, Argentina. pp. 1-51

Delgado, C. A., Aubagna, B. M., Russi, F. N., Aguirre, S. N., Rejf, J. P., Calvinho, G. L. 1998. Identificación y sensibilidad a antibióticos de *Staphylococcus Coagulasa* negativos aislados de mastitis bovina en la cuenca lechera santa fecina. Vol. 13, No. 2. Chile. pp. 1-4

Faría, R. J. F., Valero-Leal, K., D'Pool, G., García, A., Allara, M. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito., Vol. XV, No. 003. Rev. Científica. FCV-Luz. Maracaibo. 15 (3): 227-234

Fedorka-Cray, P. J., Dargatz, D. A., Wells, S. J. y col. 1998. Impact of antimicrobial use in veterinary medicine. Journal American Veterinary Medicine Association. 213 (12): 1739 – 1741.



Frigerio, C., Bettera, S., Scalise, I., Giraudo, J. and Calzolari, A. 1995. Resistencia a antibióticos de cepas de estafilococos aislados en tres tambos de Córdoba, Argentina (Antibiotic resistant of staphylococci isolated from three dairy herda of Córdoba). Rev. Med. Vet., 76: 288-292.

Gentilini, E. G., Denamiel, A., Betancor, M., Rebuelto, M., Rodriguez, F. and R. A. De Torres. 2002. Antimicrobial susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 85: 1913-1917.

Giannechini, R.E., Concha C., Franklin, A. 2002. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. Acta vet. scand, 43, 31-41.

Gooraninejad, S., Ghorbanpoor, M. and Parviz A. S. 2007. Antibiotic Susceptibility of Staphylococci Isolated From Bovine Subclinical Mastitis. Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (16): 2781-2783.

Hofshager, M., Krus, H., Lassen, J. AND Essun, K. 1999. Resistance in Staphylococcus isolated from mastitic milk in Norway. Acta Vet Scand., 40:25-30.

Huxley, J. N. J. Green, and A. J. Bradley. 2002. The prevalence and significance of minor pathogen intramammary infections. Proc. World Buiatrics Congr., Hannover, Germany XXII: 129:130.





INEGI. (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). 2002. Anuario Estadístico del Estado de Michoacán. Censo General de Población y Vivienda.

Insua, A. D., Pérez, G. C. y Silveira, P. E. 2008. Evaluación epizootiológica de la mastitis bovina en cuatro Vaquerías. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Volumen IX Número 7. pp. 1-9.

Moniri, R. Dastehgoli, K. and Akramian, A. 2007. Increasing Resistant Coagulase Negative *Staphylococci* in Bovine Clinical Mastitis. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(15): 2465-2469

Myllus, V., Asplund, K., Brofeldt, E. Hirvela-kosky, V. Honkanen-bazalski, T., Jantilla, J. and Kulkas, L. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1998, changes in prevalence and antimicrobial resistance. Acta. Vet. Scand. 39: 119-126.

National Mastitis Council (NMC), INC, 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Revised Edition Walton Commons West Madison. pp. 222 .

Navarro, C. 2011. Mastitis bovina causada por ECN. Artículos rumiantes. Edita: Grupo Asís Biomedica, S.L. Andador del Palacio de Larrinaga, 2 50013 Zaragoza.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 2011. 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](http://www.who.int/emc/diseases/zoo/who_global_principles.html)



Owens, W. E., Ray C. H., Watts, J. L. and Yancey, R. J. 1997. Comparison on of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility test for bovine mastitis. J. Dairy Sci., 80: 313-317.

Patiño, S. N. 2008. Resistencia a antimicrobianos del *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis subclínica de tres municipios del estado de Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. pp. 37

Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., Bogni, C.I., 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche, REDVET - Revista electrónica de Veterinaria, Volumen 12 N° 7. pp. 1-14

Ruiz, J. D., Ramírez, N. F., Arroyave, O. 2001. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. Rev Col Cienc Pec Vol. 14(2): 143-154.

Sumano, L. H. S., y Ocampo, C. L. 1997. Farmacología Veterinaria, 2ª Ed, McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 95-189.

Salomon, S. A., Watts, J. L., Aarestrup, F. M. y col. 1998. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobialagents organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. Journal Dairy Science. 81: 570 - 578.



Sara, A., y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Editorial INTER-MEDICA. Buenos Aires, Republica Argentina. Pp. 11-16

Sears, P. M., Kate K. McCarthy, DVD. 2003. Management and treatment of *Staphylococcal* mastitis. Vet Clin Food Anim 19. pp. 177-185.

Smith K. L., World perspectives on mastitis. 2001. In: Proceedings of the Second Internacional Mastitis and Milk Quality Symposium. Madison (WI) Nacional Mastitis Council.

Stuart, B. L. 1998. La resistencia contra los antibióticos. Investigación y Ciencia.; 14-21.

Suvi, T. and Satu, P. 2007. The coagulase-negative staphylococci – not so different from *Staphylococcus aureus*?. pp. 36-185

Tomasinsig, L., De Conti, G., Skerlavaj, B., Piccinini, R., Maria Mazzilli, D'Este, F., Tossi, A., and Zanetti, M. 2010. Broad-Spectrum Activity against Bacterial Mastitis Pathogens and Activation of Mammary Epithelial Cells Support a Protective Role of Neutrophil Cathelicidins in Bovine Mastitis. Infect. Immun. Vol 78. pp. 1781 - 1788.

Tormo, M. A., Erwin, K., Friedrich, G., Inigo, L. and José, R. P. 2005. Bap- dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus* evidence of horizontal gene transfer?. Microbiology. pp. 2465-2466.



Vadillo, S. S., Piriz, E. Mateos. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 431-439.

Wolter, W., H. Castañeda, B., Kloppert, M., Zschöck. 2004. Mastitis Bovina, Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. Editorial Universitaria. Guadalajara, Jalisco. pp. 132-138.