



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

ESCUELA DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

**TIPIFICACION DE BACTERIAS AISLADAS DE LECHE
DE VACAS CON UN CUADRO DE MASTITIS CLINICA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE QUÍMICO
FÁRMACOBIOLOGO**

**PRESENTA
MARÍA GUADALUPE SÁNCHEZ VELÁZQUEZ**

**ASESOR
D. EN C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS.**

MORELIA, MICHOACÁN.

AGOSTO 2005.



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Microbiana de la división de estudios de Postgrado Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “DR. IGNACIO CHÁVEZ” y el Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología (CMEB), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Pertenecientes a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas.

INDICE DE FIGURAS

| | | PAGINA |
|-----------------|--|--------|
| FIGURA 1 | Fuentes de carbono de una microplaca GP2 (para bacterias Gram positivas). | 24 |
| FIGURA 2 | Microfotografía que muestra la tinción Gram de una de las muestras de estudio (aumento 10X). | 28 |
| FIGURA 3 | Porcentajes de distribución de las especies identificadas por el sistema BIOLOG. | 30 |
| FIGURA 4 | ADN total de los aislados bacterianos. | 30 |
| FIGURA 5 | Amplificación con oligos universales para bacterias. | 31 |
| FIGURA 6 | Amplificación con oligos específicos para el genero <i>Staphylococcus</i> . | 32 |
| FIGURA 7 | Amplificación con oligos específicos para <i>Staphylococcus aureus</i> . | 33 |
| FIGURA 8 | Patron de agrupamiento de las cepas de estudio generado a partir del patrón de utilización de sustratos obtenido mediante el sistema BIOLOG. | 37 |
| FIGURA 9 | Porcentaje de sensibilidad a antimicrobianos que mostrarón los aislados. | 40 |

INDICE DE TABLAS

| | PAGINA |
|--|---------------|
| Tabla I Fuentes más comunes de menor a mayor prevalencia y las formas de diseminación de las bacterias más comunes productoras de mastitis. | 4 |
| Tabla II Relación entre conteo de células somáticas (CCS) medido en la leche del tanque agranel, pérdida de la producción y prevalencia de las mastitis subclínicas en el hato. | 5 |
| Tabla III Rangos de recuento de células somáticas según el grado de reacción de la Prueba de Mastitis California. | 7 |
| Tabla IV Iniciadores empleados en los ensayos de amplificación de regiones específicas. | 27 |
| Tabla V Especies de las bacterias en estudio determinadas por el sistema BIOLOG | 29 |
| Tabla VI Patrón de utilización de fuentes de carbono de los aislados bacterianos en estudio. | 35 |
| Tabla VII Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. | 38 |
| Tabla VIII Porcentajes de sensibilidad a antibióticos. | 39 |

INDICE GENERAL

| | PAGINA |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| I.1 Mastitis | 1 |
| I.1.1 Impacto económico..... | 1 |
| I.1.2 Causas de mortalidad y concepción..... | 2 |
| I.2 Principales agentes etiológicos..... | 3 |
| a) <i>Staphylococcus aureus</i> | 3 |
| b) Otros agentes etiológicos. Microorganismos oportunistas..... | 4 |
| I.3 Detección..... | 5 |
| a) Conteo de células somáticas y pérdida en la producción en el hato | 5 |
| b) Detección de mastitis en vacas individuales..... | 6 |
| c) Examen físico de la ubre..... | 6 |
| d) Aspecto de la leche..... | 6 |
| e) La prueba de California de mastitis | 6 |
| f) Bacterias en la leche | 7 |
| I.4 Pruebas de identificación para <i>Staphylococcus aureus</i> | 8 |
| I.4.1 Morfología | 8 |
| I.4.2 Tinción gram positiva | 8 |
| I.4.3 Medios de cultivo | 9 |
| I.4.4 Pruebas bioquímicas en tubo | 9 |
| a) Catalasa | 10 |
| b) Coagulasa | 10 |
| I.4.5 Sistemas automatizados | 10 |
| I.4.6 Ensayos genéticomoleculares | 12 |
| I.5 Tratamiento | 14 |
| a) Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana | 15 |
| b) Resistencia a antibióticos | 16 |
| II. Justificación | 18 |

| | |
|--|-----------|
| III. Objetivos..... | 19 |
| IV. Estrategia experimental..... | 20 |
| V. Materiales y métodos..... | 21 |
| 5.1 Material biológico..... | 21 |
| 5.2 Medios de cultivo..... | 21 |
| 5.2.1 Agar francés o Stab agar | 21 |
| 5.2.2 Agar Luria Bertani (LBA)..... | 21 |
| 5.3 Conservación de cepas..... | 21 |
| 5.4 Identificación de especies bacterianas | 22 |
| 5.4.1 Tinción gram | 22 |
| a) Obtención de la muestra | 22 |
| b) Preparación de la tinción | 22 |
| 5.4.2 Sistema BIOLOG | 22 |
| a) Fluido de inoculación | 22 |
| b) Obtención de preinoculo | 23 |
| c) Preparación de la suspensión | 23 |
| d) Inoculación e incubación de las microplacas BIOLOG para bacterias gram positivas | 23 |
| 5.5 Ensayos de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos | 24 |
| 5.6 Técnicas de análisis genético molecular | 25 |
| 5.6.1 Extracción de ADN de alto peso molecular | 25 |
| 5.6.2 Visualización de ADN en geles de agarosa..... | 26 |
| 5.6.3 Ensayos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa | 26 |
| 5.7 Elaboración de dendograma | 27 |
| VI. Resultados..... | 28 |
| 6.1 Identificación de la especie bacteriana..... | 28 |
| 6.1.1 Tipificación morfológica | 28 |
| 6.1.2 Tipificación con el sistema BIOLOG | 28 |
| 6.1.3 Tipificación genético molecular | 30 |
| 6.2 Ensayos de diversidad fisiológica | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2.1 Diversidad metabólica BIOLÓGICA | 33 |
| 6.2.2 Susceptibilidad a compuestos antimicrobianos | 38 |
| VII. Discusión..... | 41 |
| VIII. Conclusiones..... | 47 |
| IX. Anexos | 48 |
| X. Bibliografía..... | 51 |

RESUMEN

En la producción lechera, la vaca es el elemento más importante, y la ubre constituye la compleja glándula que produce el preciado líquido alimenticio.

La mastitis se define como inflamación de la glándula o de la ubre mamaria del bovino, oveja o cabra. La mastitis del término es de los mastos griegos de la palabra, para el pecho, y de los itis, para la inflamación de. La mastitis es considerada la enfermedad más importante de la industria lechera a nivel mundial debido a una reducción en el volumen de producción de leche, altera la composición de la misma y puede influenciar su sabor.

Es una enfermedad causada por más de 137 especies bacterianas, siendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* los principales microorganismos responsables de la misma.

La identificación exacta de las bacterias patógenas causantes de la mastitis es importante para el diagnóstico, prevención y mando clínico en las manadas de la lechería.

En este presente trabajo nos propusimos obtener información tanto metabólica como genética, que permitiera tipificar con mayor precisión y rapidez los aislados clínicos de *Staphylococcus* presentes en la leche de reses con mastitis.

Se utilizaron 20 aislados microbianos de muestras de leche de reses con un cuadro de mastitis clínica y subclínica de 9 granjas diferentes del municipio de Tarímbaro, Mich. México.

La lectura de las placas (GP2) inoculadas con una suspensión de las cepas de interés, reveló que el género más abundante fue *Staphylococcus* con un 75%, seguido de *Macrococcus* con un 10% y de *Kocuria*, *Globicatella* y *Corynebacterium* con un 5%. Dentro del género *Staphylococcus* se identificaron 10 especies, siendo las más abundantes, *S. equorum*, *S. hemolyticus* y *S. saprophyticus*.

De las 20 muestras solo 5 no amplificaron con oligos específicos para el género *Staphylococcus*, relacionándose parcialmente con los datos obtenidos en BIOLOG. Dos de las muestras no amplificaron con los oligos específicos para *S. aureus* posiblemente por la baja temperatura de alineamiento.

El 100% de las bacterias mostraron resistencia a Penicilina y Ampicilina; el 95% a Cefalotina y Eritromicina; el 90% a Dicloxacilina, y el 75% a Trimetoprim-Sulfametoxazol. Muestran sensibilidad el 65% a Gentamicina y el 55% a Tetraciclina; muy sensibles a Cefotaxima son el 60%; el 55% y el 65% son sensibles en un nivel intermedio a los antibióticos Cefuroxima y Pefloxacina respectivamente.

I. INTRODUCCION

1.1 MASTITIS

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a un daño local que puede ser de origen infeccioso, traumático o tóxico (National Mastitis Council, 1996). Es una enfermedad infecciosa causada por más de 137 especies bacterianas, siendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* los principales microorganismos responsables de la misma. La mastitis se considera como una enfermedad compleja y es producto de la interacción de varios factores entre el animal, el medio ambiente y los microorganismos, jugando el hombre un papel decisivo. Se estima que un tercio de todas las vacas lecheras están afectadas por cualquier forma de mastitis en uno o más cuartos (Philpot, 1996).

1.1.1 IMPACTO ECONÓMICO

En todos estos años y a pesar del avance científico alcanzado en este campo, la mastitis permanece en la totalidad de los hatos lecheros (Philpot y col., 1992). Por tal motivo es considerada como la enfermedad más importante de la industria lechera a nivel mundial, debido a las grandes pérdidas en que esta ocasiona la producción láctea, fundamentalmente en su forma subclínica.

El Consejo Nacional de Mastitis de Estados Unidos, organismo regulador de este tema a nivel mundial, estimó que las pérdidas en este país y Canadá suman dos mil y mil millones de dólares al año, respectivamente, con un promedio de 200 dólares/vaca/año (National Mastitis Council, 1996).

En los últimos 10 años en América Latina no se cuenta con datos que reflejen el monto de las pérdidas totales, no obstante, estudios llevados a cabo en la década de los ochenta indican pérdidas del 12 % de la producción total y de 129.04 pesos/vaca/año (Fustes y col., 1993). Existen pocos datos de la situación actual de la enfermedad, aunque un estudio realizado en varios rebaños lecheros reporta pérdidas similares a las de los años ochenta, en algunos casos superiores. Dichas pérdidas están determinadas fundamentalmente por fallas e incluso ausencia de los programas de control contra la enfermedad (Armenteros y col., 1997).

En la producción lechera, la vaca es el elemento más importante, y la ubre constituye la glándula compleja que produce el preciado líquido alimenticio. La mastitis es una enfermedad infecciosa que afecta precisamente el buen funcionamiento de la ubre, y se presenta en la gran mayoría de las unidades de explotación ganadera dedicadas a la producción de leche. Todos los métodos comerciales de producción lechera, buenos o malos, proporcionan condiciones favorables para la propagación de los organismos causantes de mastitis de una vaca a otra. La mastitis trae como consecuencia una reducción en el volumen de producción de leche, altera la composición de la misma y puede influenciar su sabor. También provoca pérdidas por ordeño lento en las vacas enfermas, por mano de obra y tiempo dedicados a la aplicación de medicamentos y, por último, en recursos alimenticios por la ineficiencia de las vacas enfermas (Pinzón, 1989). El impacto de la mastitis va junto con la leche, más allá de las puertas de la explotación lechera. Los cambios en la composición de la leche (reducción de calcio, fósforo, proteína y grasa, e incrementos de cloro y sodio) reducen su calidad. Además, los antibióticos utilizados en el tratamiento de la mastitis son una preocupación industrial y de salud pública importante. La presencia de residuos de antibióticos en la leche interfiere con el proceso de fabricación de muchos productos lácteos (quesos y otros productos fermentados). Los sabores indeseables reducen el valor de los productos lácteos y la presencia de bajos niveles de antibióticos puede causar problemas de salud a los consumidores. (Philpot y col, 1992, NC 55-17, 1987, Asociación de productores Agropecuarios de Argentina. 2004).

1.1.2 CAUSA DE MORTALIDAD Y EFECTOS EN LA CONCEPCIÓN

La mastitis puede alterar la duración del ciclo estral. La multiplicación bacteriana y la liberación de endotoxinas, que puede estar asociada con mastitis clínicas provocadas por bacterias Gram-negativas, pueden causar la liberación de mediadores inflamatorios. Los niveles aumentados de estos mediadores inflamatorios pueden provocar una luteólisis. Se ha demostrado que los mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, las leucotrininas, la histamina y la serotonina se incrementan en casos de mastitis experimentales inducidas por medio de infusiones intravenosas de endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS) de

Gram-negativos o por infusiones intramamarias de endotoxina de *Escherichia coli* o de *Salmonella typhimurium* o de bacterias Gram-negativas vivas. Por lo tanto, la mastitis podría influir en los índices de concepción y en los índices de mortalidad embrionaria temprana (Cullor, 2002).

1.1.3 PRINCIPALES AGENTES ETIOLOGICOS

Aproximadamente del 90 al 95% de los casos de mastitis son provocados por cuatro microorganismos. Ellos son en orden decreciente: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis*, Estreptococos ambientales y Coliformes (Pinzón, 1989).

a) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva de forma esférica pequeña que crecen en racimos, de aquí el nombre Staphylo, que significa "racimos" y coccus, que quiere decir "esferas", un racimo de esferas. Estos microorganismos no son encontrados comúnmente en la piel sana del pezón, pero están preparados para colonizar o desarrollar en el canal del pezón. Este es especialmente el caso si una lesión o herida está presente en el orificio del pezón. El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en esos sitios, encuentra una localización ideal para infectar la ubre. Son transmitidos a los cuartos sanos a través de las pezoneras, trapos para lavar la ubre, y manos de los ordeñadores. Una vez que las infecciones se establecen en los tejidos productores de leche, resulta una inflamación crónica, junto con un elevado conteo de células somáticas. Áreas de tejido fibroso firme pueden encontrarse a la palpación. Más a menudo, las infecciones son subclínicas con periódicos episodios de síntomas clínicos. Los cuartos infectados clínicamente exhiben habitualmente moderada inflamación y coágulos. Tales infecciones son extremadamente difíciles de curar con terapia antibiótica. Esto se debe a la destrucción de los tejidos de la ubre por *Staphylococcus aureus* que lleva al desarrollo de tejido cicatrizal, el cual impide la distribución de los antibióticos después de que son infundidos y protege a los microorganismos de la acción de la droga. En los casos agudos, los cuartos están calientes e inflamados, y la vaca

exhibe una elevada temperatura corporal. Las infecciones pueden convertirse en gangrenosas, y el(los) cuarto(s) afectado(s) se torna(n) frío(s) al tacto, una condición a menudo referida como "bolsa azul". (Nickerson, 2001).

Las vacas crónicamente infectadas deben ser desechadas del rebaño (Pinzón, 1989).

b) Otros agentes etiológicos: Microorganismos Oportunistas

Este grupo de bacterias incluye más de 20 especies de estafilococos diferentes a *Staphylococcus aureus*. Son referidos comúnmente como *Staphylococcus spp.* o estafilococos coagulasa negativos, históricamente, fueron denominados *patógenos menores* (Nickerson, 2001). La vaca tiende a la autocuración de muchas de esas infecciones y la prevalencia desciende a medida que progresa la lactancia siendo más elevada en vaquillonas de primera lactancia con respecto a las vacas viejas.

Staphylococcus chromogenes y *Staphylococcus hyicus* son dos de las especies más comunes aisladas de muestras de leche y canales de pezones de muchos rodeos. Aunque *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus sciuri* se encuentran viviendo libremente en el medio ambiente, los restantes *Staphylococcus spp.* aparecen como flora normal de la piel del pezón (Nickerson., 2001).

Tabla I. Fuentes más comunes de mayor a menor prevalencia y las formas de diseminación de las bacterias más comunes productoras de la mastitis.

| Tipo de bacteria | Porcentaje de todas las infecciones | Causa primaria | Principales formas de difusión |
|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--|
| Streptococcus agalactiae | > 40% | Ubre infectada | De cuarto a cuarto; vaca a vaca durante el ordeño ¹ |
| Staphylococcus aureus | 30 - 40% | Ubre infectada, pezón lesionado | De cuarto a cuarto, vaca a vaca durante el ordeño ¹ |
| Streptococo ambiental ² | 5 - 10% | Cama, materia fecal | Medio ambiente de la vaca |
| Coliformes ³ | < 1% | Materia fecal | Medio ambiente de la vaca |

1.1.4 DETECCIÓN

a) Conteo de células somáticas y pérdidas en la producción en hato

Más del 98% de las células somáticas que se encuentran en la leche provienen de las células blancas que ingresan a la misma en respuesta a la invasión bacteriana de la ubre. Un alto conteo de células somáticas se asocia con la pérdida de la producción de leche (Poveda, 2004).

Cuando la leche de todas las vacas en el hato se mezcla, como en el tanque a granel, el conteo de células somáticas en una muestra compuesta es un buen indicador de la prevalencia de la mastitis en el hato. Un conteo de células somáticas mayor de 200,000 células/ml indica la presencia de mastitis subclínicas. Los conteos de células somáticas por debajo de 400,000 células/mL son típicos de los hatos que poseen buenas prácticas de manejo, pero que no hacen un particular énfasis en el control de la mastitis.

Los hatos que poseen un programa de control efectivo de la mastitis poseen en forma consistente conteos por debajo de las 100,000 células/mL. Conteos de células somáticas mayores de 500,000 células/mL indican que un tercio de las glándulas se encuentran infectadas y que la pérdida de leche debido a mastitis subclínica es mayor de 10%.

El conteo de células somáticas de una muestra compuesta no revela el tipo de infección, ni la identidad de las vacas infectadas (Wattiaux, 2004).

Tabla II: Relación entre conteo de células somáticas (CCS) medido en la leche del tanque a granel, la pérdida de la producción y la prevalencia de mastitis subclínica en el hato.

| Conteo de células somáticas | Cuartos infectados | Pérdida de producción (%) | Mastitis subclínica |
|-----------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| < 200.000 | 6% | 0-5 | Cerca de cero |
| 200.000 - 500.000 | 16% | 6-9 | Unos pocos casos |
| 500.000 - 1.000.000 | 32% | 10-18 | Diseminada |
| > 1.000.000 | 48% | 19-29 | Epidémica |

b) Detección de mastitis en vacas individuales

- **Examen físico de la ubre**

Los signos de mastitis aguda incluyen cuartos inflamados, con temperatura elevada y dolor al tacto. Los cambios en el tamaño y la presencia de tejido cicatrizal pueden ser detectados más fácilmente luego de la ordeña, cuando la ubre se encuentra vacía. (Wattiaux, 2004).

- **Aspecto de la leche**

La observación de los primeros chorros de leche permite la detección de leche anormal que debe de ser retirada del consumo. La leche anormal puede mostrar decoloración (aguado), descamaciones, o coágulos. Se debe tener la precaución, al remover esta leche de la ubre, de no salpicar esta leche contaminada en las patas, cola o ubre del animal (Wattiaux, 2004). El operador no debe de colectar estos primeros chorros de leche en la palma de su mano debido al riesgo de transferir bacterias de un cuarto a otro y de una vaca a otra. (Wattiaux, 2004).

- **La Prueba de California de Mastitis**

Para esta prueba, la leche de cada cuarto se mezcla con una solución detergente. La leche de los cuartos infectados forma un gel; la consistencia del gel es evaluada en forma visual. Esta reacción se relaciona en general con el número de células somáticas en la leche, y una reacción positiva indica mastitis (Wattiaux, 2004).

La Prueba de Mastitis California se fundamenta en la capacidad que tiene el reactivo Lauril Sulfato de sodio de formar un gel en presencia de DNA celular convirtiéndose en un recuento indirecto de Células Somáticas. La leche de una vaca sana tiene menos de 100.000 células somáticas/mL de las cuales menos del 10 % son polimorfonucleares, 66 a 88% macrófagos, 10 a 27 % linfocitos y menos de 7 % son células epiteliales. Cuando se produce el proceso infeccioso se da la migración de polimorfonucleares al sitio afectado como mecanismo de defensa, aumentándose el número de las células en la leche proporcionalmente a la severidad y extensión de la lesión, con un cambio muy importante como es la inversión de la relación de polimorfonucleares / macrófagos, alcanzando los primeros hasta un 75 % (Cetrino, 2004).

Un recuento celular de 250.000/mL ya puede ser considerado como indicador de inflamación. Las formas subclínicas severas pueden superar los 5.000.000 y las clínicas casi siempre superan los 10 millones de células por mL. (Cetrino, 2004).

Existen algunas diferencias entre el grado de contenido celular en mastitis ocasionadas por *Streptococcus* y *Staphylococcus*. (Cetrino, 2004).

La Prueba de Mastitis California tiene los siguientes rangos de recuentos de células somáticas según el grado de reacción.

TABLA III. Rangos de recuento de células somáticas según el grado de reacción de la prueba de Mastitis California.

| CMT | Tipo de Reacción | RCS |
|------------|--------------------------|---------------------|
| Negativo | Mezcla permanece líquida | < 200.000 |
| Trazas | Ligeramente Viscosa | 150.000 – 500.000 |
| 1 | Mezcla viscosa | 400.000 – 1.500.000 |
| 2 | Viscosidad franca | 800.000 – 5.000.000 |
| 3 | Gel adherido al fondo | > 5.000.000 |

La prueba no tiene reacciones falsas negativas pero puede presentar reacciones falsas positivas en vacas con menos de 8 días posparto o con lactancias superiores a los 10 meses. En estos casos la reacción de viscosidad es muy similar en los 4 cuartos y es producto del incremento de células epiteliales que fisiológicamente se da en estos dos períodos de la lactancia (Cetrino, 2004).

La prueba de Mastitis California debe ser considerada como prueba de Tamiz para el diagnóstico de Mastitis y serán los estudios bacteriológicos y citológicos los que determinen la necesidad de tratar un animal (Cetrino, 2004).

c) Bacterias en la leche

Los cultivos de bacterias en la leche pueden ser útiles para cuantificar las bacterias e identificar los organismos causantes de mastitis y altos conteos de células somáticas. Con más frecuencia, una mezcla de diferentes tipos de bacterias es encontrada, pero algunas veces, puede predominar una especie de bacteria (Wattiaux, 2004).

Si los conteos bacterianos se encuentran elevados (>50,000 bacterias/mL), un cultivo puede proveer claves para la fuente(s) de contaminación. Hatos bien manejados poseen conteos bacterianos de menos de 1,000 células/mL (Wattiaux, 2004).

El Cultivo bacteriano se desarrolla en vacas seleccionadas para las que los conteos de células somáticas de muestras compuestas revelan un problema persistente serio. Los cultivos de leche de una vaca individual identifican la especie bacteriana, por lo tanto es la forma más confiable para decidir un tratamiento óptimo con antibióticos para una vaca en particular (Wattiaux, 2004).

1.1.5 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PARA *Staphylococcus aureus*

a) Morfología

Las bacterias de la especie *Staphylococcus aureus* son microorganismos esféricos de 0.5-1.2 um de diámetro, se agrupan en racimos aunque pueden observarse en pares, cadenas cortas e inclusive solos. Son Gram positivos, no esporulados, generalmente sin cápsula, anaerobios facultativos, no móviles y poseen metabolismo fermentativo (Yamasaki, col, 2000).

La virulencia de esta especie se debe a la producción de sustancias extracelulares como la Proteína A, estafilokinasa, leucocidina, hialuronidasa, coagulasa, enterotoxina, hemolisinas alfa, beta y gamma y la toxina epidermolítica (Yamasaki, col, 2000).

b) Tinción Gram Positiva

La pared celular es responsable de lo que le sucede al colorante utilizado en la Tinción de Gram (1884). La propiedad de teñirse (Gram positivas) o no (Gram negativas) de violeta oscuro por esta coloración es un criterio de clasificación importante que se puede correlacionar con otras propiedades bacterianas. Unos pocos organismos son Gram-variables (Val Dani, 2005) .

Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas captan la misma cantidad de cristal violeta (**CV**) e iodo (**I**). El complejo **CV-I** sin embargo es atrapado dentro de la célula Gram positiva por la deshidratación y la reducción del tamaño de los poros de la pared resultante del proceso de lavado con solvente. En contraste en

las Gram negativas, la fina (y probablemente discontinua) capa de peptidoglucano no impide la extracción por el solvente del complejo. (Val Dani, 2005).

Las paredes celulares de las bacterias grampositivas son muy gruesas y consisten sobretodo en peptidoglucano. El colorante es fijado a nivel del protoplasto y la pared celular de las bacterias Gram positivas es la que impide la extracción del colorante. (Val Dani, 2005).

c) Medios de cultivo

Las bacterias de este grupo crecen en los medios comunes que contienen peptonas y extractos de carne, pero crecen mejor si el medio contiene sangre, ácido nicotínico, tiamina y biotina. Entre los medios adecuados para este grupo bacteriano están el Agar manitol sal (medio selectivo y diferencial), en el que la sal inhibe la mayor parte de la flora normal pero no al *Staphylococcus aureus*, Chapman Stone, (Yamasaki, col, 2000). Staphylococcus 110 (medio selectivo y diferencial) contiene 7.5% de NaCl, este compuesto evita el desarrollo de casi todas las demás bacterias, cambia de color el medio. Agar sangre (medio básico y mejorado) se le agrega una sustancia enriquecedora como sangre, suero, etc. Es de uso universal y esta orientado especialmente al buen desarrollo de la bacteria, por exigente que sea. (Montealegre J. R., 2002).

Crecen con mayor rapidez a 37°C pero el pigmento se forma mejor a temperatura ambiente (20 a 25°C). Sobre medios sólidos las colonias son redondas, lisas, prominentes y brillantes. Habitualmente forma colonias de color gris o amarillo dorado intenso y en ocasiones puede producir hemólisis de grado variable (Jawetz y col, 1999).

d) Pruebas bioquímicas en tubo

La prueba Bioquímica de Catalasa es positiva para todo el género y las pruebas de coagulasa, crecimiento en manitol, acetoina y trealosa así como la producción de pigmento y el patrón de hemólisis, son pruebas para identificación de especies (Yamasaki, col, 2000).

- **Catalasa**

Staphylococcus aureus produce catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Se coloca una gota de solución de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos y sobre esa solución se vierte una cantidad de las bacterias en crecimiento. La formación de burbujas (liberación de oxígeno) indica la prueba positiva (Jawetz y col, 1999).

De esta manera las bacterias se protegen del efecto tóxico del peróxido de hidrógeno, que es un producto final del metabolismo aerobio de los azúcares (Sejia, 2000).

- **Coagulasa**

Los *Staphylococcus aureus* producen coagulasa, posee una endocoagulasa o coagulasa ligada que está unida a la pared celular. Esta actúa directamente sobre el fibrinógeno provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado (test en lámina) (Sejia, 2000).

Esta especie también posee una exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un factor (CRF), formándose un complejo coagulasa-CRF, el cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina (test en tubo) (Sejia, 2000).

Se considera que la producción de coagulasa es sinónimo de patógeno potencial invasor (Jawetz y col, 1999), ya que evita la cascada de la coagulación normal del plasma.

e) Sistemas automatizados.

Estos sistemas contienen una batería de reactivos deshidratados y la adición de inóculos estandarizados del microorganismo a identificar inicia la reacción (crecimiento, producción de actividad enzimática, etc.). Las pruebas fenotípicas deben realizarse bajo condiciones perfectamente estandarizadas para obtener resultados reproducibles (Vandamme y col., 1996).

Los sistemas comerciales de identificación de microorganismos se han utilizado comúnmente para detectar bacterias. Estos sistemas incluyen el Sistema **API** (Truu y col., 1999) y el **BIOLOG**, el cual se basa en pruebas que logran

identificar hasta un 90% de las bacterias presentes en diferentes tipos de muestras ambientales y clínicas (Klingler y col, 1992).

El sistema BIOLOG es considerado equipo de punta en sistemas de diagnóstico e identificación de microorganismos patógenos en animales, plantas, humanos, alimentos, ecología, etc. y su utilidad abarca muy diversas áreas relacionadas con servicios de laboratorio en distintas ramas de la salud pública, la agricultura y la industrial. La Microestación BIOLOG es un sistema semiautomatizado y está conformada por un lector de microplacas compatible que puede leer automáticamente los patrones desarrollados de oxidación y de asimilación en las microplacas con 95 fuentes carbohidratos, nitrógeno y azufre, en unos cuantos segundos y obtener la identificación del microorganismo Gram Positivo (GP), Gram Negativo (GN), Anaerobio (AN), Levadura (YT) u hongo filamentoso (FF) y crear una base de datos propia. Las reacciones positivas de las bacterias se ponen de manifiesto por el vire de un indicador (violeta de tetrazolio) y las reacciones positivas de hongos se ponen de manifiesto por una reacción de turbidez.

El sistema BIOLOG posee una base de datos sobre características fisiológicas de aproximadamente 2000 microorganismos tanto procariotes como eucariotes. En dicha base de datos se encuentran los registros de 500 especies de bacterias Gram negativas, 300 especies de bacterias Gram positivas, 350 especies de bacterias anaeróbicas, 500 especies de hongos filamentosos y 250 especies de levaduras, dicha base de datos se expande año con año debido al interés de la casa comercial que fabrica y distribuye el BIOLOG por cubrir un rango de microorganismos cada vez más amplio.

Un aspecto clave del estudio microbiológico involucra la determinación de características fenotípicas de las células microbianas. El sistema BIOLOG es una tecnología apropiada para tales estudios denominada Microarreglo de Fenotipos (MFs). Con esta tecnología de punta se pueden analizar miles de fenotipos de manera simultánea en un formato bastante sencillo, eficiente y adecuadamente estandarizado. La tecnología de MFs ha sido desarrollada para ser utilizada en diversas células microbianas incluyendo hongos y bacterias. Los MFs del sistema BIOLOG son capaces de analizar el metabolismo del carbono, del nitrógeno, del fósforo y del azufre en una cepa microbiana (Klingler y col., 1992).

Aunque por definición el fenotipo refleja genotipo, los métodos de biotipificación tienen problemas fundamentales que los hacen en ciertas instancias inadecuados para discriminar entre cepas de una especie. Los métodos de Odds y el de asimilación de carbohidratos pueden ser muy sensibles a las condiciones de crecimiento, de aquí la diferencia entre los reportes de un laboratorio a otro (Odds y Abbot, 1983). Además, algunas especies sufren cambios espontáneos de alta frecuencia entre un limitado tipo de fenotipos generales que afectan una variedad de características fenotípicas incluyendo la antigenicidad (Anderson y col., 1990).

Las tecnologías basadas en el DNA han producido avances reales para el cuidado del paciente generando métodos avanzados para la identificación y tipificación de cepas que se conviertan en rutina. La detección de DNA bacteriano es un método de diagnóstico independiente del cultivo que requiere cierto refinamiento antes de que pueda ser utilizado de manera rutinaria (Odds, 2003). No obstante el uso cada vez más frecuente de técnicas genético- moleculares en diversas áreas de la Microbiología, el BIOLOG representa un complemento imprescindible a dichas técnicas en el área del diagnóstico y taxonomía de microorganismos, debido a que puede describir la diversidad fisiológica (uso de substratos), complementaria de la diversidad genética.

f) Ensayos genético moleculares

Entre las disciplinas dedicadas al estudio de diferentes formas de vida en nuestro planeta, la microbiología fue la última en ser establecida. Restando del conjunto de organismos aquellos que pueden ser estudiados por las técnicas clásicas de botánica y zoología, la gran mayoría son estudiados por los microbiólogos. Dichos organismos son aquellos que solo pueden ser visualizados a través de equipo especializado o microscopios (Amann y col., 1995).

Los avances de la última década en el área de la Biología Molecular han abierto una nueva frontera para la caracterización e identificación genotípica de microorganismos. Estos descubrimientos han afectado a muchas áreas dentro de las Ciencias de la Salud (Tang y Persing, 1990)

Las metodologías de biología molecular se basan en la característica de complementariedad que hay entre las cadenas del ADN de los ácidos nucleicos

(Figuroa, 1994). El ADN, es una molécula de doble cadena helicoidal compuestas por pares de residuos de adenina y timina (A-T) y guanina y citosina (G-C) unidos por enlaces puentes de hidrogeno entre un azúcar y un fosfato. La molécula de ADN puede ser desnaturalizada en cadenas sencillas por calor o por la adición de agentes químicos como NaOH. El ARN, otro ácido nucleico, siempre es encontrado en cadena sencilla; excepto los retrovirus que tienen RNA de doble cadena (Tenover, 1988).

Las metodologías moleculares nunca van a sustituir al cultivo bacteriano, sobre todo en la epidemiología, ya que la obtención de un microorganismo vivo nos permite estudiarlo cuidadosamente en cuanto a sus características genéticas y fenotípicas, como son las cualidades bioquímicas, antigénicas, la expresión de factores de patogenicidad como adhesinas, enterotoxinas, hemolisinas y hemaglutininas (Figuroa, 1994).

Un método para la tipificación genético molecular del genero *Staphylococcus* es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con el advenimiento de dicha técnica ha sido posible identificar los genes específicos de cada grupo en aislados bacterianos, ofreciendo la posibilidad de un diagnóstico rápido de infecciones específicas de *Staphylococcus aureus* (Pass y col., 2000).

La PCR es una hibridación en fase líquida, la cual se realiza entre el ADN blanco presente en la muestra y un par de iniciadores, que son secuencias conocidas de un fragmento específico de un gen involucrado en la patogenicidad de cepas de *Staphylococcus aureus* (Rodríguez-Ángeles, 2002).

Las secuencias de ADN que codifican para las distintas subunidades de RNAr es la mejor molécula blanco para estudiar las relaciones filogenéticas debido a que se encuentra presente en todos los microorganismos, es funcionalmente constante y se compone de dominios tanto altamente conservados como variables (Stackebrandt y col., 1994).

La comparación de las secuencias de gen 16S de RNAr, ha facilitado la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, permitiendo la elucidación de sus relaciones naturales. Consecuentemente, estas pueden ser utilizadas para determinar relaciones taxonómicas entre especies que presentan poca interrelación en su DNA (Pace, 1996).

Inicialmente se comenzaron a realizar estudios de secuenciación del gen 16S de rRNA, posteriormente, los estudios se extendieron al gen 23S. Las secuencias nucleotídicas constantes del gen 16S presentan la ventaja de proporcionar un sitio de iniciación adecuado para la elongación de los cebadores y así aplicar de forma más fácil la técnica de secuenciación (Dams y col., 1988).

La secuenciación completa del gen 5S de RNAr, debido a su pequeño tamaño, es más rápida y económica que las anteriores, e incluso la secuenciación de determinados fragmentos del gen 5S de RNAr puede proporcionar una información adecuada. Dos miembros pertenecientes a un mismo género pueden poseer entre 114-116 pb comunes de 118-120. Actualmente existe un debate sobre cual es el análisis mas adecuado para establecer relaciones filogenéticas. El análisis del gen 16S parece ser el mas adecuado con organismos procariotes, ya que contiene aproximadamente 1550 pb frente a los 75-120 del 5S, por lo que pequeñas diferencias en los nucleótidos del 5S afectan mucho mas al resultado final que en el caso del 16s (Lane y col., 1985).

Además de su utilidad en los estudios taxonómicos, la secuenciación del RNAr se ha aplicado en identificación bacteriana. Mediante el análisis de las secuencias parciales del RNAr 16S es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos (Lane y col., 1985).

1.1.6 TRATAMIENTO

Las mastitis agudas, tales como las causadas por las bacterias *coliformes*, ponen en peligro la vida de la vaca. Un veterinario debe ser llamado inmediatamente cuando la vaca muestra signos de una reacción generalizada a una infección en la ubre (incapacidad de pararse, pulso acelerado, fiebre, etc.). El ordeño del cuarto afectado cada tres o cuatro horas ayuda a eliminar toxinas (Wattiaux, 2004).

Un tratamiento rápido de la mastitis clínica limita la duración y la posible de diseminación de la enfermedad. Un veterinario familiarizado con la historia de la enfermedad en el hato debe de prescribir el mejor tratamiento terapéutico. Cuando se recomienda el tratamiento con antibióticos, es crítico seguir las instrucciones, especialmente cuando se trata de la duración del mismo (Wattiaux, 2004).

Únicamente las mastitis causadas por *Streptococcus agalactiae* pueden tratarse en forma exitosa con antibióticos durante la lactancia (más del 90% se curan). Aún así, cuando la mastitis es causada por *Staphylococcus aureus*, *coliformes* y muchos otros organismos, el grado de éxito del tratamiento con antibióticos rara vez excede 40 a 50% y algunas veces es tan bajo como 10% (Wattiaux, 2004).

La infusión intramamaria de antibióticos de liberación lenta en el momento del secado (tratamiento de secado) es un componente esencial del programa de control de mastitis en el establecimiento (Wattiaux, 2004).

El tratamiento de secado ayuda a curar cerca del 50% de las mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* y 80% de los estreptococos ambientales (*Strep uberis*, *dysgalactiae*, etc.). Un cuarto infectado que es tratado y curado al secado, producirá cerca del 90% de su potencial durante la nueva lactancia. Si un cuarto permanece infectado o es infectado durante el período de seca, ese cuarto producirá solamente el 60 a 70% de su potencial (Wattiaux, 2004).

a) Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana

Los fenómenos de transferencia genética y la aparición de mutantes en las bacterias gram-positivas y gram-negativas, han dado lugar a la aparición de cepas resistentes a uno o varios agentes antimicrobianos, tanto en población general como en el ambiente hospitalario. Esto lleva a la necesidad de conocer el patrón de susceptibilidad de las cepas aisladas en los casos clínicos frente a los antimicrobianos disponibles, teniendo en consideración que tal patrón varía ampliamente, dependiendo del género, la especie y aun el sitio donde se aísla el microorganismo. Entre los grupos de bacterias que presentan patrones variables de susceptibilidad se encuentran las enterobacterias, bacilos gram negativos no fermentadores, *Estafilococos*, *Enterococos* y *Pseudomonas*.

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* pueden ser cuantitativas (se mide la mínima concentración capaz de inhibir el desarrollo de las bacterias) o semicuantitativas (las cepas se clasifican en resistentes o sensibles). Para propósitos prácticos, las pruebas semicuantitativas de difusión en agar proporcionan la información suficiente para servir de guía en el tratamiento (Barry y col., 1985). Las combinaciones de antimicrobianos que tienen los multidiscos gram positivos, multidiscos gram

negativos y multidiscos combinados incluyen tanto las sustancias que han sido usadas hace algunos años y cuya utilidad permanece vigente (penicilina, ampicilina, gentamicina) como antimicrobianos de reciente introducción en nuestro medio (ceftriaxona, ceftazidima, cefuroxima, pefloxacina, enoxacina y netilmicina). Esta prueba se fundamenta en que al colocar un disco impregnado con determinada cantidad de antimicrobiano sobre un medio sólido inoculado con bacterias, el antimicrobiano difundirá formándose un gradiente de concentración, el cual inhibirá o permitirá el crecimiento de la bacteria. Una vez que se coloca el disco de papel filtro en contacto con el medio de cultivo, el antibiótico difundirá hacia el interior. Las cepas se clasificaran en resistentes (R), intermedias (I), moderadamente sensible (MS) o susceptibles (S), dependiendo del diámetro del halo de inhibición.

b) Resistencia a antibióticos

La resistencia adquirida a algunos fármacos es muy frecuente en las bacterias patógenas de origen animal, debido a la gran facilidad con que ocurren mutaciones cromosómicas después de unos pocos días de iniciado el tratamiento (Prescott y Baggot, 1993).

Para seleccionar adecuadamente un agente antimicrobiano, el medico veterinario no sólo necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también su susceptibilidad a los antibióticos o sulfonamidas disponibles en el mercado nacional. Dentro de los más utilizados en la mastitis clínica, tanto en el ámbito internacional como nacional están los betalactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos y sulfonamidas (Watts y col, 1995).

El uso indiscriminado de estos fármacos a través de los años, ha inducido la aparición de microorganismos patógenos multiresistentes, ocasionado, en algunos casos, fracaso terapéutico que puede incluso causar la muerte del animal (WHO, 2000).

La Organización Mundial de la Salud, señala que la resistencia a antibióticos debe ser considerada un problema grave, complejo y de repercusión internacional, recomendando poner en marcha un sistema globalizado de vigilancia de la resistencia bacteriana tanto en medicina humana como en veterinaria (WHO, 2000).

En el caso particular de los patógenos mamarios, a nivel internacional se ha informado un aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos de uso habitual en la mastitis (Myllys y col., 1998).

Las bacterias Gram positivas (*Streptococcus spp*, *S.aureus*) presentan elevada resistencia frente a ampicilina, amoxicilina y penicilina, determinándose los valores mayores en las cepas *Staphylococcus aureus* esto es a nivel internacional (Watts y col., 1997; Myllys y col., 1998; Costa y col., 2000; Gentilini y col., 2000) y corroboran que las bacterias, mediante inactivación enzimática, pueden generar resistencia no sólo a un antibiótico sino a un grupo de ellos con estructura química común, como es el caso de los betalactámicos, cuya estructura básica es el anillo tiazolidina unido a otro anillo β -lactámico (Goodman y Gilman, 1996).

La aparición de estas cepas resistentes es preocupante, ya que su tratamiento es complicado. La resistencia a la penicilina aumentó de aproximadamente un 20% en 1965 hasta un 40% a mediados de los 70, aunque se produjo una reducción del 30% en la década de los 90. Por otro lado, la resistencia a la lincomicina y a la eritromicina se constató más frecuentemente en muestras de *S. aureus* resistentes a la penicilina respecto a las sensibles. Entre 1970 y 1973 la resistencia a la lincomicina era baja, aumentando en 1987 y reduciéndose a partir de 2000. Tan sólo una muestra de *S. aureus* entre cerca de 1.000 recogidas en 1999 y 2000 resultó resistente a la oxilina (Riberio, 2002).

Existen suficientes antecedentes que demuestran que las bacterias son capaces de generar mecanismos de defensa frente a una exposición permanente a un determinado antimicrobiano, cuando se dejan de exponer las bacterias a este fármaco, por la presión selectiva dejan de crecer las resistentes, exacerbándose las bacterias sensibles a otros antimicrobianos (Aarestrup y col, 1998; Bager, 2000; Caprioli y col, 2000; Martel y col, 2000).

II. JUSTIFICACIÓN

La identificación exacta de las bacterias patógenas causantes de la mastitis es importante para el diagnóstico, prevención y mando clínico en los hatos lecheros. La mayoría de los laboratorios identifican las bacterias que causan la mastitis mediante la caracterización de fenotipos analizando cualquier tipo de pruebas convencionales, como la utilización de pruebas bioquímicas, serotipos, y los perfiles enzimáticos o sistemas de rápida identificación; esto puede ser tiempo consumido, caro y lo más importante sujeto a variables, por estas razones no parecen ser confiables para identificar bacterias de origen bovino.

Los adelantos en las técnicas de genética molecular han permitido el desarrollo de técnicas moleculares para analizar el ADN bacteriano.

Existen numerosas técnicas para la identificación, tipificación y/o monitoreo de bacterias y según el problema es preferible la utilización de un método respecto a otro. Generalmente, la mayor dificultad que existe es la de establecer la justa estrategia para la solución de un problema específico.

La identificación de un marcador genético asociado con la resistencia o susceptibilidad de la mastitis permitiría a los productores disminuir costos asociados con la mastitis, mejorando la salud del ganado a través de la selección animal.

El desarrollo de técnicas como la PCR mantiene una opción muy prometedora para la rápida identificación de bacterias. Con esta técnica, la identificación de las bacterias puede hacerse en horas, en lugar de los días requeridos por los métodos convencionales. Debido a su alta sensibilidad el PCR también puede mejorar el nivel de detección. Así, la presencia de los patógenos puede ser identificada antes de la fase de infección de los animales portadores cuando el número de bacterias en la leche puede ser muy bajo.

La región más específica que se ha determinado para la identificación de los patógenos causantes de la mastitis es la sucesión en los genes 16S a 23S rRNA. Por todo lo mencionado anteriormente, en este trabajo se propone una estrategia polifásica, es decir una combinación de técnicas para obtener información tanto fisiológica como genética, que permitan tipificar con mayor precisión a aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

III. OBJETIVOS

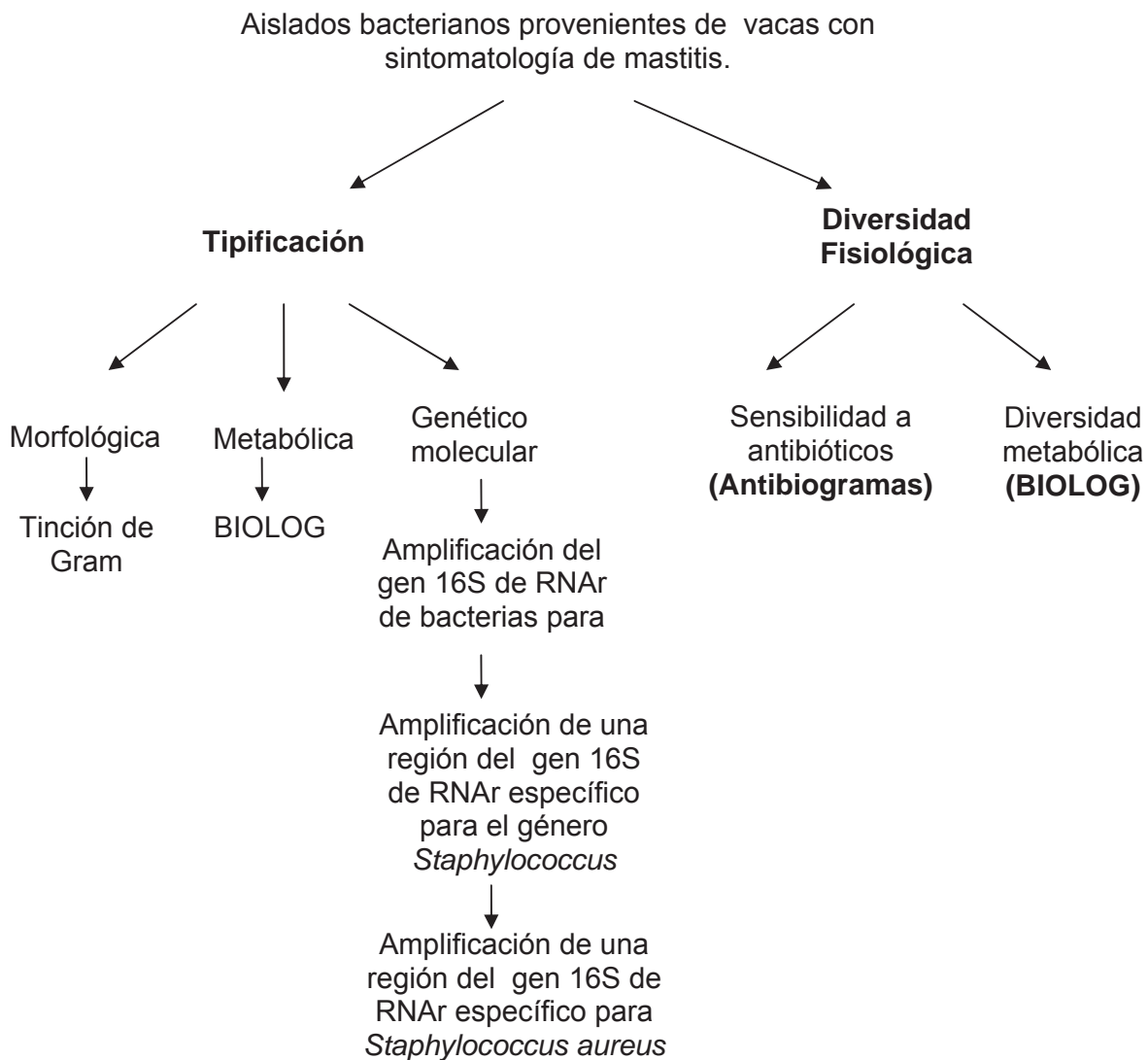
III.1. Objetivo General.

Caracterizar los aislados bacterianos presentes en muestras de leche de vacas con un cuadro de mastitis clínica

III.2. Objetivos Específicos

- Identificar las especies bacterianas presentes en la leche de vacas con mastitis
- Determinar el grado de diversidad fisiológica que presentan los aislados bacterianos obtenidos.

IV. ESTRATEGIA



V. MATERIAL Y METODOS

5.1. Material Biológico

En este trabajo se utilizó como control una cepa de referencia de *Staphylococcus aureus sp aureus* (ATCC 27543) y 20 aislados microbianos obtenidos de muestras de leche de la glándula mamaria de vacas con un cuadro de mastitis clínica y subclínica de 9 granjas diferentes del municipio de Tarímbaro, Michoacán; México. Proporcionadas por Dr. Juan José Valdez Alarcón (Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, FMVZ-UMSNH).

5.2. Medios de cultivo

5.2.1 Agar francés o stab agar

Se prepara agregando a un litro de agua desionizada, caldo nutritivo (BD Bioxon^{MR}), 10 g, cisteína (SIGMA[®]), 10 mg, NaCl (J.T. Baker[®]), 5 g, timina (SIGMA[®]), 10 mg y agar bacteriológico (BD Bioxon^{MR}), 6 g. Posteriormente se esteriliza a 121°C/15lb /pulg² durante 15 min y se vacía en viales de 2 mL.

5.2.2 Medio Luria-Bertani (LB)

Se prepara agregando a 1 L de agua desionizada, Triptona (SIGMA[®]), 10g, Extracto de levadura (BD Bioxon^{MR}), 5 g y NaCl (J.T. Baker[®]), 10g. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 5M (~0.2mL). Si el medio se prefiere sólido se le agrega agar bacteriológico (BD Bioxon^{MR}) al 2% y se esteriliza a 121°C/15lb/pulg², durante 15 minutos.

5.3. Conservación de cepas

La conservación se realiza inoculando cada una de las cepas por picadura en agar francés e incubando a 37 °C durante 24 horas. Una vez que se desarrolla el crecimiento en la línea de picadura, los viales se guardan a temperatura ambiente.

5.4. Identificación de especies bacterianas

5.4.1 Tinción Gram

a) Obtención de la muestra

Se siembra la cepa de interés en medio LBA (Medio Luria-Bertani), estriando por cuadrantes para obtener colonias aisladas, se incuba 24 hrs a 37 °C, se toma una colonia y se realiza un frotis delgado con la misma y se deja secar a temperatura ambiente; posteriormente se fija a calor.

b) Preparación de la tinción

A la muestra que se encuentra en el frotis se le van agregando los reactivos de la siguiente manera 1) se cubre el frotis con cristal violeta (Sigma) se deja actuar durante un minuto y se lava con agua, 2) se cubre con lugol (Sigma) se deja actuar durante un minuto y se lava con agua, 3) decolorar con alcohol-cetona 50-50 (J.T. Baker) hasta que deje de salir color, lavar abundantemente, 4) se cubre con safranina (Sigma) dejándolo actuar durante un minuto y se lava con agua. Se deja secar un poco el frotis a temperatura ambiente y se observa en el microscopio a inmersión.

5.4.2 Sistema BIOLOG

a) Fluido de Inoculación

El sistema BIOLOG utiliza el fluido GP2 INOCULATING FLUID, el cual es proporcionado por BIOLOG (Hayward, CA 94545) que contiene: Cloruro de sodio (NaCl), 0.40%; Pluronic F-68 (Sigma #P7061), 0.03% y Gellan Gum (Phytigel™, Sigma #P8169), 0.02%. este fluido se prepara agregando Gellan Gum (Phytigel), 0.2 g a un litro de agua, se hierve agitando constantemente, hasta que el Gellan Gum esté completamente disuelto y se retira del calor continuando con la agitación, se agrega NaCl, 4 g y se continúa agitando, se agrega Pluronic. Dejar atemperar a 45 °C y distribuir el volumen apropiado de 16mL en tubos de 20 x 150 con tapa de rosca, se esteriliza con calor húmedo a 121°C/15lb/pulg² de presión durante 15 minutos.

b) Obtención del preinoculo

Se siembra la cepa de interés en medio LBA (Medio Luria-Bertani), estriando por cuadrantes para obtener colonias aisladas, se incuba 24 hrs a 37 °C, posteriormente se resiembra en el medio de crecimiento universal de Biolog, BUG™ Agar (Biolog, Inc.), se estria nuevamente por cuadrantes y se incuba durante 24 hrs a 37 °C.

c) Preparación de la suspensión.

Se prepara un inóculo líquido, usando el fluido de inoculación (FI) designado por el fabricante como GN/GP-IF, a dicho fluido se le agregan 3 gotas de tioglicolato de sodio concentrado (7.6%) quedando a una concentración final de 5mM, esto sirve como agente anticapsulante lo que permite el desarrollo de patrones más consistentes. El inóculo líquido se ajusta a una densidad de 61% de transmitancia (T) como se indica a continuación. El turbidímetro que viene con el sistema BIOLOG se calibra a 0% T, con un estándar de turbidez designado como GP-COCCUS, posteriormente se humedece un hisopo estéril en el FI y se levantan las colonias bacterianas del agar mediante un desplazamiento por rotación, cuidando de no arrastrar agar, se sumerge el hisopo en el FI para resuspender las colonias. Se tapa el tubo y se invierte cuidadosamente para no producir burbujas y para homogenizar el inóculo. Este procedimiento se repite hasta tener una densidad de 20% T ($\pm 2\%$).

d) Inoculación e incubación de las microplacas BIOLOG para bacterias Gram positivas

El inóculo preparado se vierte en un reservorio de pipeta multicanal estéril y se toma por medio de una pipeta de ocho canales colocando 150 μ L en cada uno de los 96 pozos de una microplaca Biolog, para bacterias aeróbicas Gram positivas designada como GP2, Fig. (1) y se incuba a 37 °C realizando una lectura con el lector y el software del aparato entre las 4 y 6 h posteriores a la incubación y una última lectura entre las 16 y 24 h posteriores a la incubación de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Los resultados de utilización de sustratos de cada uno de los pozos de la microplaca se reportan como 0 cuando no hay detección de

cambio de color en el pozo o como 1 cuando se ve cambio de color. Con estos datos se construye una matriz dicotómica de 0 y 1.

La microplaca GP2 tiene grupos de metabolitos de diferentes estructuras los cuales son Agua, Polímeros, Azúcares, Derivados de azúcares, Ácidos carboxílicos, Metil esterres, Aminoácidos, Péptidos, Alcoholes, Nucleótidos, Nucleósidos, Azúcares fosfatados y otros químicos relacionados.

MICROPLACA

GP

GP MicroPlate™

| | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| A1 water | A2 α--cyclodextrin | A3 β-cyclodextrin | A4 dextrin | A5 glycogen | A6 inulin | A7 mannan | A8 tween 40 | A9 tween 80 | A10 N-acetyl-D-glucosamine | A11 N-acetyl-D-mannosamine | A12 amygdalin |
| B1 L-arabinose | B2 D-arabitol | B3 arbutin | B4 cellobiose | B5 D-fructose | B6 L-fucose | B7 D-galactose | B8 D-galacturonic acid | B9 gentiobiose | B10 D-gluconic acid | B11 α-D-glucose | B12 m-inositol |
| C1 α-D-lactose | C2 lactulose | C3 maltose | C4 maltotriose | C5 D-mannitol | C6 D-mannose | C7 D-melezitose | C8 D-melibiose | C9 α-methyl D-galactoside | C10 β-methyl D-galactoside | C11 3-methyl glucose | C12 α-methyl D-glucoside |
| D1 β-methyl D-glucoside | D2 α-methyl D-mannoside | D3 palatinose | D4 D-psicose | D5 D-raffinose | D6 L-rhamnose | D7 D-ribose | D8 salicin | D9 sedoheptulosan | D10 D-sorbitol | D11 stachyose | D12 sucrose |
| E1 D-lagatose | E2 D-trehalose | E3 turranose | E4 xylitol | E5 D-xylose | E6 acetic acid | E7 α-hydroxybutyric acid | E8 β-hydroxybutyric acid | E9 γ-hydroxybutyric acid | E10 p-hydroxyphenyl acetic acid | E11 α-keto glutaric acid | E12 α-keto valeric acid |
| F1 lactamide | F2 D-lactic acid methyl ester | F3 L-lactic acid | F4 D-malic acid | F5 L-malic acid | F6 methyl pyruvate | F7 mono-methyl succinate | F8 propionic acid | F9 pyruvic acid | F10 succinamic acid | F11 succinic acid | F12 N-acetyl L-glutamic acid |
| G1 alaninamide | G2 D-alanine | G3 L-alanine | G4 L-alanyl-glycine | G5 L-asparagine | G6 L-glutamic acid | G7 glycyl-L-glutamic acid | G8 L-pyrogutamic acid | G9 L-serine | G10 putrescine | G11 2,3-butanediol | G12 glycerol |
| H1 adenosine | H2 2-deoxy adenosine | H3 inosine | H4 thymidine | H5 uridine | H6 adenosine-5'-monophosphate | H7 thymidine-5'-monophosphate | H8 uridine-5'-monophosphate | H9 fructose-6-phosphate | H10 glucose-1-phosphate | H11 glucose-6-phosphate | H12 D-L-α-glycerol phosphate |

Figura I. Fuentes de carbono de una microplaca GP2 (para bacterias Gram Positivas)

5.5. Ensayos de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos

La susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos probados fue determinada por el método de difusión con disco, recomendada por el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1990), con multidiscos

antimicrobianos comerciales (Multidiscos Gram positivos, BIO-RAD). Los multidiscos usados en el estudio contienen: Ampicilina (10 mcg), Cefalotina (30 mcg), Cefotaxima (30 mcg), Ceftazidima (30 mcg), Cefuroxima (30 mcg), Dicloxacilina (1 mcg), Eritromicina (15 mcg), Gentamicina (10 mcg), Pefloxacina (5 mcg), Penicilina (10 U), Tetraciclina (30 mcg) y Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 mcg).

Con un hisopo estéril de algodón, se toca una colonia previamente aislada y a continuación, en una placa nueva, se estría en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar, para obtener un inóculo uniforme; al finalizar se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar, cuando el inóculo se ha secado (de 3 a 5 min) se procede a colocar el multidisco el cual se toma con pinza estéril y se coloca presionando ligeramente en el medio en un tiempo menor de 15 min después de haber inoculado la placa. Después de 15 min de haber colocado el multidisco, la caja de Petri se invierte y se incuba a 37 °C por un tiempo de 16 a 18 horas. Las cepas se clasificaron en Resistentes (R), Intermedias (I) o Susceptibles (S), (MS) Moderadamente sensible, dependiendo del diámetro del halo de inhibición (incluyendo los 6 mm del disco)

5.6. Técnicas de análisis genético- molecular

5.6.1 Extracción de ADN de alto peso molecular

Las colonias bacterianas crecidas en LB sólido y cosechadas con ayuda de una espátula previamente esterilizada, se colocan en 400 µL de regulador de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, SDS 2%, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, agitando vigorosamente durante 10 minutos. A continuación se agregan 400 µL de cloroformo y se agita en el vórtex durante 5 minutos. Se centrifugan durante 10 minutos a 10 000 rpm y se transfiere el sobrenadante (fase acuosa) a otro tubo limpio cuidando de no arrastrar la fase orgánica. Se extrae con un volumen de fenol-cloroformo, centrifugando durante 5 minutos a 10 000 rpm y transfiriendo el sobrenadante a otro tubo. El ADN se precipita con 1 volumen de isopropanol frío incubando 10 minutos a -20 °C y centrifugando durante 10 minutos a 10 000 rpm. El sobrenadante se desecha y la pastilla se lava con 250 µL de etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en un volumen mínimo de agua, aproximadamente 20

µL. La integridad del DNA obtenido se visualiza desarrollando una electroforesis en gel de agarosa al 1% como se indica en el punto V.5.2. El ADN aislado se guarda a una temperatura de -20 °C hasta su utilización.

5.6.2 Visualización de ADN en geles de agarosa

La calidad y la cantidad del DNA obtenido, se visualiza en geles de agarosa. Se preparan 100 mL de agarosa en porcentajes del 1 o 1.5 % (p/v) según el experimento con TAE 1X (Tris acetato 0.04M, EDTA 0.001 M), calentándolo en el horno de microondas, para disolver, agregando 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). El gel se prepara vaciando la agarosa en una cámara de electroforesis horizontal y colocando el o los peines adecuados. Se deja solidificar y se retiran los peines. Se agrega TAE 1X a la cámara hasta cubrir el gel. Las muestras de DNA se mezclan con regulador de carga (Azul de bromofenol, 0.25%, Ficoll 15% en agua) y se aplican en los pozos del gel. La cámara se conecta a la fuente de poder y se aplica un voltaje de 80 V. Una vez terminada la electroforesis, se visualiza el DNA colocando el gel en un transiluminador UV (ChemiDoc de Bio-Rad) y la imagen se digitaliza con ayuda del software QUANTITY ONE 4.4.1.

5.6.3 Ensayos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la determinación de especie, se amplificó una región del gen 16S de rRNA con los iniciadores descritos en la tabla (IV), utilizando la metodología siguiente.

En un tubo de microcentrífuga de 0.2mL (*MicroAmp Reaction Tubes*, USA) se prepara una mezcla para ensayo PCR de 25 µl totales con la siguiente composición: 5 µl de DNA (aproximadamente 25 ng), 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM de cada nucleótido (A, G, T, C), 0.5 µM de cada oligonucleótido y 0.5U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Cat. No. 10342-020, *Gibco-BRL®*, *Life Technologies*, USA, 5U/mL).

Después de mezclar perfectamente los tubos se centrifugan a 12,000 rpm durante 20 segundos, desarrollando el siguiente programa de amplificación en un termociclador *GeneAmp® PCR System 2700* de *Applied Biosystems*: 5 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos 45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto a

72 °C. Completados los 35 ciclos se realiza una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Los productos de amplificación obtenidos se visualizan en un gel de agarosa al 1% como se indica en el punto 5.6.2.

TABLA (IV). Iniciadores empleados en los ensayos de amplificación de regiones específicas.

| ESPECIFICIDAD | GEN | CLAVE DEL OLIGO | SECUENCIA (5' → 3') | TAMAÑO DEL FRAGMENTO (pb) | REF. |
|------------------------------|------|-----------------|----------------------|---------------------------|------|
| Universales para bacterias | 16 S | SRV31 | CGGYCCAGACTCCTACGGG | 300 | 1 |
| | | SRV32 | TTACCGCGGCTGCTGGCAC | | |
| <i>Staphylococcus spp.</i> | 16 S | SAP1 | CTRTRACTTATAGATGGAYC | 650 | 1 |
| | | SAP2 | GCTGCAGCACTAAGGGGCG | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 S | SAU234 | CGATTCCCTTAGTAGCGGCG | 700 | 2 |
| | | SAU327 | GGACGACATTAGACGAATCA | | |

1 Aguilera –García y col., 2004

2 Riffon y col., 2001

5.7. Elaboración de Dendograma

A partir de los resultados de diversidad fisiológica obtenidos mediante las microplacas BIOLOG® se generó un dendograma utilizando el software FreeTree (Hampl y col., 2001). Con dicho paquete se calcularon las distancias genéticas mediante el algoritmo de Nei y Li y se generó un patrón de agrupamiento mediante el criterio de Neighbour-Joining. El análisis bootstratp se realizó mediante el mismo software utilizando 1000 réplicas.

VI. RESULTADOS

6.1. Identificación de la especie bacteriana

6.1.1. Tipificación morfológica.

Se realizó una Tinción de Gram a los 20 aislados en estudio, obteniéndose que la totalidad de ellos resultaran ser Gram Positivos ya que al microscopio se observaron cocos en forma de racimos de color violeta característicos del género *Staphylococcus* (Fig. 2)

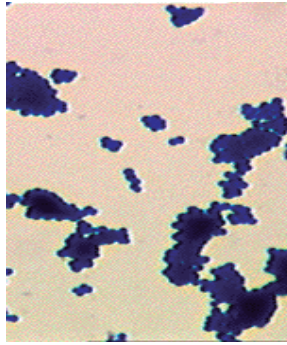


Figura 2 Microfotografía que muestra la tinción de Gram de una de las muestras de estudio aumento 10x.

6.1.2. Tipificación con el sistema BIOLOG.

Al analizar los aislados de interés con las placas del sistema BIOLOG se encontró que el género más abundante fue *Staphylococcus* con un 75%, seguido de *Macrococcus* con un 10% y de *Kocuria*, *Globicatella* y *Corynebacterium* con un 5%. Dentro del género *Staphylococcus* se identificaron 10 especies, siendo las más abundantes *S. equorum* con tres aislados, *S. hemolyticus* con dos aislados y *S. saprophyticus* también con dos aislados.(Tabla V y Figura 3).

TABLA V. Especie de las bacterias en estudio, determinada por el sistema BIOLOG

| AISLADO | ESPECIE IDENTIFICADA |
|----------------|--|
| ATCC | <i>Staphylococcus aureus</i> ss <i>aureus</i> |
| 2 | <i>Staphylococcus hemolyticus</i> |
| 3 | <i>Staphylococcus equorum</i> |
| 4 | <i>Corynebacterium xerosis</i> |
| 5 | <i>Staphylococcus hemolyticus</i> |
| 6 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| 7 | <i>Staphylococcus equorum</i> |
| 8 | <i>Globicatella sanguinis</i> |
| 9 | <i>Staphylococcus equorum</i> |
| 11 | <i>Staphylococcus xylosus</i> |
| 12 | <i>Staphylococcus pasteurii</i> |
| 20 | <i>Staphylococcus arlettae</i> |
| 29 | <i>Macrococcus bovicus</i> |
| 30 | <i>Staphylococcus scuri</i> ss <i>rodentium</i> |
| 31 | <i>Staphylococcus intermedius</i> A |
| 32 | <i>Staphylococcus cohnii</i> |
| 34 | <i>Macrococcus carouelicus</i> |
| 35 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| 36 | <i>Staphylococcus arlettae</i> |
| 37 | <i>Kocuria rosea</i> |

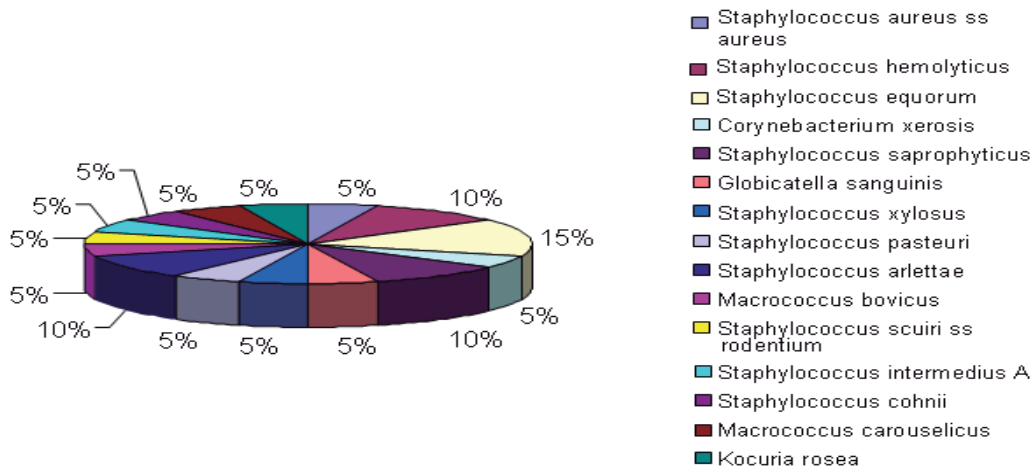


Figura 3. Porcentajes de distribución de las especies identificadas por el Sistema BIOLOG.

6.1.3. Tipificación genético-molecular

a) Calidad del ADN extraído

Se realizó la extracción del ADN tanto de las muestras recolectadas como de la cepa de referencia ATCC 27543, obteniéndose buenos rendimientos y una buena calidad del ADN aislado, ya que se observó un material de alto peso molecular. De la muestra de la bacteria numero 37 no se obtuvo ADN por lo tanto solo se hicieron los siguientes ensayos con las 19 muestras de bacterias restantes.

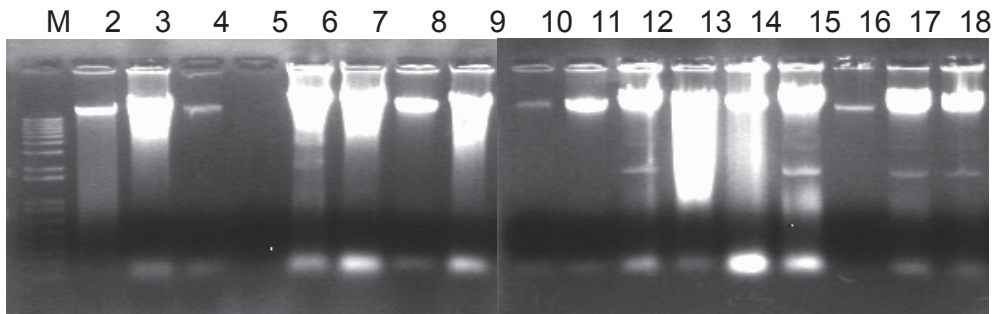


Figura 4. ADN total de los aislados bacterianos

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el ADN extraído de: Carriles M, marcador de ADN de 1 Kb; 2-18 aislados bacterianos: ATCC,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,20,29,30,31,32,34,35,36

Con la finalidad de comprobar que el ADN obtenido tenía la calidad necesaria para hacer ensayos de amplificación, se realizaron ensayos de PCR de las muestras problema y de la cepa de referencia utilizando oligos universales para el gen 16S de RNAr. Se obtuvo el fragmento esperado de aproximadamente 300 pb con las 18 muestras y la cepa de referencia (Fig. 5).

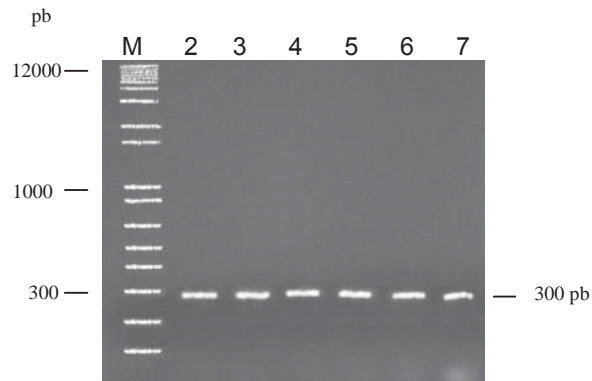


Figura 5. Amplificación con oligos universales para bacterias

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de amplificación del gen 16S de RNAr. Carriles: M, marcador de 1 Kb; 2, DNA de la cepa ATCC (27543); 3-7 DNA de los aislados bacterianos: 2, 4, 5, 8, 31.

Una vez comprobado de que el DNA era de buena calidad y que si se generaban productos de amplificaron con los oligos universales, se procedió a realizar ensayos de PCR ahora con los oligos específicos para el género *Staphylococcus* de los cuales no amplificaron las muestras 4, 5, 8,12 y 31. El resto de las muestras si generaron un producto de amplificación presentando un tamaño aproximado a los 650 pb, que era el esperado.

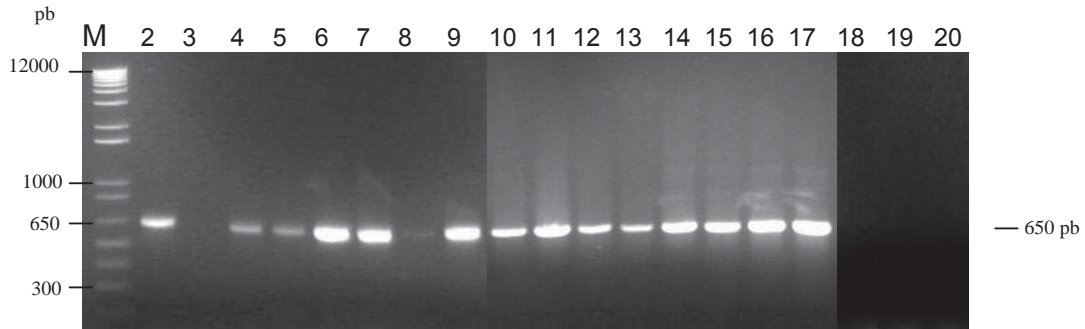


Figura 6. Amplificación con oligos específicos para el género *Staphylococcus*
Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de amplificación de un fragmento del gen 16S de RNAr específico de *Staphylococcus*. Carriles: M, marcador de ADN de 1Kb; 2, cepa ATCC (27543) de *Staphylococcus aureus*; 3-20, aislados bacterianos: 4, 2, 3, 6, 7, 5, 9, 11, 20, 29, 30, 32, 34, 35, 36, 8, 12, 31.

Con la finalidad de saber si las cepas que habían generado un producto de amplificación con los oligos específicos para en el género *Staphylococcus* pertenecían a la especie *aureus*, se realizó una amplificación con oligos específicos para *Staphylococcus aureus* en todos los aislados. En este ensayo se incluyeron también las muestras que no presentaron productos de amplificación con los oligos específicos para dicho género. En todas las cepas de estudio se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb, excepto para las muestras 31 y 34 las cuales no mostraron ningún producto de amplificaron con dichos oligos.

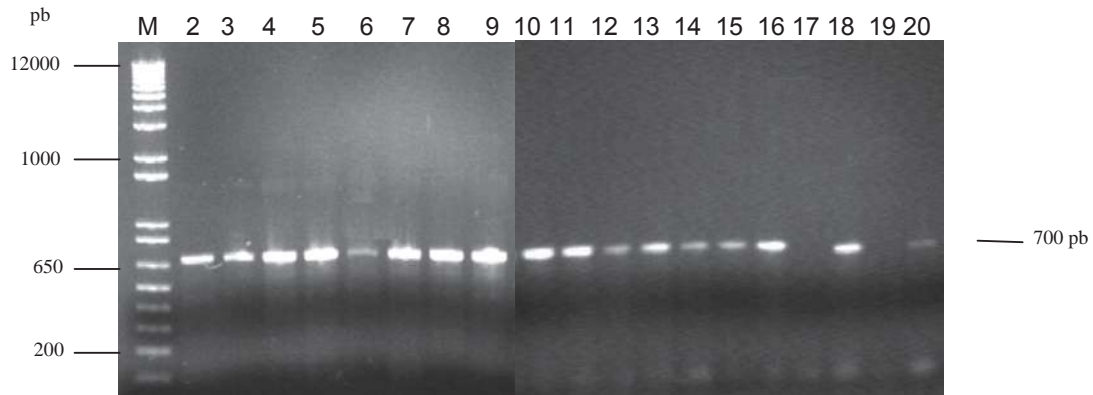


Figura 7. Amplificación con oligos específicos para *Staphylococcus aureus*
Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de amplificación del gen 16S rRNA. Carril: M, marcador de ADN de 1 Kb; 2, Cepa ATCC (27543); 3-20: aislados bacterianos: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11,12, 20, 29, 30, 32, 31, 35, 34, 36.

6.2. Ensayos de diversidad fisiológica.

6.2.1 Diversidad metabólica (BIOLOG)

Para determinar el nivel de diversidad metabólica de las cepas dentro del mismo género o pertenecientes a la misma especie, se analizó el patrón de utilización de fuentes de carbono obtenido de los ensayos con las placas BIOLOG. En la tabla (VI) se muestra una réplica de una placa BIOLOG GP2 (Gram positiva), cada cuadro corresponde a un sustrato y en cada cuadro se encuentra el número del aislado que logró utilizar ese sustrato específico. Se observó que todas las cepas estudiadas coincidieron en el metabolismo de 18 de los 96 sustratos de la placa: Dextrina, Glicógeno, D-Fructosa, α D-Glucosa, Maltotriosa, 3-Metil-Glucosa, Palatinosa, D-Psicosa, D-Ribosa, Sucrosa, D-Tetralosa, Turanosa, D-Xylosa, L-Ácido Láctico, Metil Piruvato, Ácido Piruvico, L-Alanin-glicina, L-Serina. Las bacterias a géneros diferentes al género *Staphylococcus* metabolizaron 32 de los sustratos restantes de la placa. La cepa de *Globicatella sanguinis* fue la que mostró una mayor capacidad fisiológica ya que algunos de los compuestos de la placa únicamente fueron metabolizados exclusivamente por dicha cepa.

Los 21 sustratos metabolizados por esta cepa fueron: α -Ciclodextrina, Twen 40, Twen 80, N-Acetil-D-Manosamina, Amigdalina, Arbutina, L-Fucosa, Gentobiosa, Lactulosa, D-Manitol, α -Metil-D-Galactosido, β -Metil-D-Galactosido, α -Metil-D-Glucosido, β -Metil-D-Glucosido, Salicina, Estaquiosa, D-Tagatosa, Xylitol, L-Alaninamida, Glicil-L-Ácido Gluconíco, Timidin-5'-Monofosfato. La bacteria identificada como *Kocuria rosea* metaboliza 1 sustrato diferente a todas las demás el cual es la β -Ciclodextrina. Por otra parte, las bacterias del género *Macrococcus* metabolizan 2 sustratos diferentes: N-Acetil-D-Manosamina y α -Ceto Ácido Valérico. La bacteria identificada como *Corynebacterium xerosis* metaboliza 2 sustratos diferentes a las otras bacterias que son p-Hidroxifenil Ácido Acético y L-Asparagina.

Los resultados obtenidos nos permitieron realizar la tabla (VI) donde se observa claramente qué sustratos metaboliza cada una de las bacterias.

Se generó un dendograma con los datos obtenidos del patrón de utilización de sustratos del sistema BIOLOG tabla (VI). El patrón de agrupamiento muestra la formación de dos grandes grupos fisiológicos. La separación entre los grupos I y II muestra un 100% de valor bootstrap. En uno de estos grupos se encuentran las cepas 4, 12 y 37 (grupo I) y en el otro la cepa ATCC junto al resto de los aislados estudiados (grupo II). Dentro del grupo II, la cepa ATCC se separa del resto de aislados, con un valor bootstrap relativamente alto de 49%. El aislado 8 también se separa del resto de aislados del grupo II con un bootstrap de 44%. El resto de aislados forman cuatro grupos más dentro del grupo II (Fig. 8) con valores bootstrap relativamente bajos.

TABLA VI. Patrón de utilización de fuentes de carbono de los aislados bacterianos en estudio.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|----------|---|---|---|---|--|---|---|--|---|---|---|---|---|
| A | | 8 | 2 5 20 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 5 32 | 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 31 32 34 36 37 | 5 8 32 35 | 5 8 31 32 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 5 7 8 9 29 31 32 34 36 | 8 | |
| B | 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 4 8 12 32 | 3 5 7 8 9 31 34 | 2 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 5 8 32 36 | 2 3 5 6 7 8 9 11 20 29 30 31 32 34 35 36 | 30 31 | 5 6 8 11 12 30 31 34 37 | 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 4 5 8 12 37 | |
| C | 3 6 7 8 9 11 29 30 31 32 34 36 | 6 7 8 9 11 30 31 32 34 36 | ATCC 2 3 5 6 7 8 9 11 20 29 30 31 32 34 35 36 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 3 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 30 31 31 32 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 4 5 7 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 8 9 12 20 29 31 32 34 35 36 37 | 5 8 30 37 | 2 8 31 | 2 8 30 31 34 36 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 5 8 20 29 31 32 36 |
| D | ATCC 5 6 8 30 31 34 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 4 5 7 9 11 12 20 29 30 31 32 34 36 37 | 2 5 6 7 8 12 31 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 5 7 8 9 30 34 | 2 4 5 7 8 9 12 20 29 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 5 6 7 8 9 11 12 20 29 31 32 35 36 37 | 2 8 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 |
| E | 3 6 7 8 9 12 20 29 32 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 5 8 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 3 4 5 6 7 8 11 12 20 29 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 4 5 8 6 7 8 11 12 29 31 32 34 36 37 | 2 5 6 20 29 36 | 2 3 5 6 7 9 | 2 4 12 37 | ATCC 2 3 12 20 31 34 | ATCC 2 5 6 20 29 30 31 32 34 35 36 | |
| F | 2 5 12 20 29 | 2 3 4 5 6 7 9 11 12 20 29 30 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 30 31 | 2 4 5 8 12 20 30 32 34 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 4 5 8 12 20 30 31 37 | 2 4 8 12 29 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 4 5 12 20 31 37 | 2 4 5 12 20 30 31 | 2 5 29 32 | |

TIPIFICACION DE BACTERIAS AISLADAS DE LECHE DE VACAS CON UN CUADRO DE MASTITIS CLINICA

| | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|--|---|--|---|--|---|--|--|--|----------------------|--|
| G | 8 9 36 | 2 3 4 5 6 7 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 3 4 5 6 7 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 4 5 12 31 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 5 6 7 8 9 29 30 31 32 35 36 | 2 5 37 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 37 | 2 5 29 | ATCC 2 5 20 32 | ATCC 2 3 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 |
| | H | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 20 29 30 31 32 34 35 36 | ATCC 2 3 5 6 7 8 9 11 20 29 30 31 32 34 36 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 1220 29 30 31 32 34 35 36 | ATCC 2 3 5 6 7 8 9 11 20 29 30 31 32 34 36 | ATCC 2 3 4 5 6 7 8 9 11 1220 29 30 31 32 34 35 36 | 5 11 32 | ATCC 2 5 7 8 9 11 20 29 31 32 34 35 36 | ATCC 2 5 11 31 | ATCC 2 3 4 5 8 12 29 30 31 32 36 37 | ATCC 2 5 30 31 | ATCC 2 5 30 31 32 |

Los cuadros de colores indican los patrones observados en el metabolismo de sustratos por parte de las muestras y la cepa control. Todas las cepas; *Globicatella sanguinis*; *Kocuria rosea*; Genero *Macrococcus*; *Corynebacterium xerosis*.

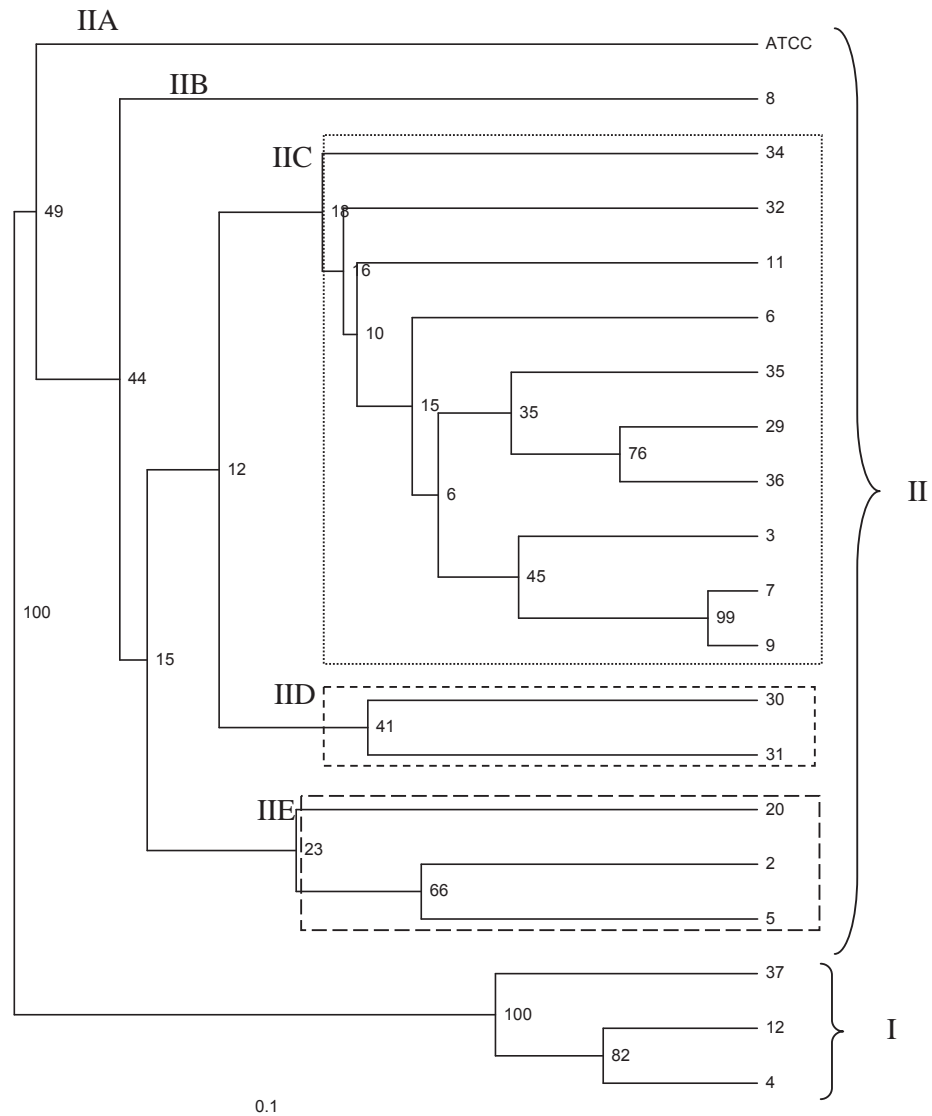


Figura 8. Patrón de agrupamiento de las cepas de estudio generado a partir del patrón de utilización de sustratos obtenido mediante el sistema BIOLOG.

6.2.2. Susceptibilidad a compuestos antimicrobianos.

Para determinar si la diversidad metabólica de los aislados se relacionaba con la susceptibilidad a antimicrobianos, se llevaron a cabo ensayos con multidiscos, los cuales contienen 12 antimicrobianos cada uno. La tabla (VII) muestra que todas las bacterias presentan una resistencia muy elevada a antibióticos como Cefalotina, Eritromicina, Ampicilina, Trimetroprim-Sulfametoxazol, Penicilina, Ceftazidima, Dicloxacilina y son particularmente sensibles a Cefotaxima.

La tabla VIII muestra que porcentaje de sensibilidad tiene cada uno de los aislados frente a cada uno de los antimicrobianos.

TABLA VII. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

| No. DE CEPA | ANTIBIOTICO | | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------|---|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|----|----|
| | CF | E | AM | SXT | CTX | CXM | PEF | PE | CAZ | DC | GE | TE |
| ATCC | R | R | R | R | MS | I | I | R | R | R | R | S |
| 2 | R | R | R | R | MS | I | I | R | R | R | S | S |
| 3 | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | S | S |
| 4 | R | R | R | I | MS | R | I | R | I | I | R | R |
| 5 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S |
| 6 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 7 | I | I | R | I | MS | I | R | R | R | R | S | S |
| 8 | R | R | R | R | R | R | I | R | I | R | R | R |
| 9 | R | R | R | I | MS | I | I | R | R | R | S | S |
| 11 | R | R | R | R | MS | I | I | R | I | R | S | S |
| 12 | R | R | R | R | MS | I | I | R | R | R | S | R |
| 20 | R | R | R | I | MS | R | I | R | S | I | S | S |
| 29 | R | R | R | R | R | I | R | R | S | R | S | S |
| 30 | R | R | R | R | MS | I | I | R | R | R | S | S |
| 31 | R | R | R | R | MS | I | I | R | R | R | R | S |
| 32 | R | R | R | R | R | I | I | R | R | R | S | R |
| 34 | R | R | R | R | MS | R | I | R | S | R | R | I |
| 35 | R | R | R | R | MS | R | R | R | R | R | S | I |
| 36 | R | R | R | R | R | R | I | R | S | R | S | I |
| 37 | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | R |

R= Resistente, S= Sensible, I= Intermedio, MS= Muy Sensible; CF= Cefalotina, E= Eritromicina, AM= Ampicilina, SXT= Trimetroprim-Sulfametoxazol, CTX= Cefotaxima, PEF= Pefloxacina, PE= Penicilina, CAZ= Ceftazidima, DC= Dicloxacina, GE= Gentamicina, TE= Tetraciclina.

TABLA VIII. Porcentajes de sensibilidad a antibióticos.

| No. DE CEP A | ANTIBIOTICO | | | | | | | | | | | |
|--------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | CF | E | AM | SXT | CTX | CXM | PEF | PE | CAZ | DC | GE | TE |
| ATC C | 18 | 40 | 46 | 31 | 90 | 100 | 79 | 0 | 0 | 18 | 41 | 86 |
| 2 | 29 | 47 | 39 | 54 | 90 | 88 | 90 | 70 | 59 | 46 | 68 | 86 |
| 3 | 24 | 40 | 54 | 62 | 58 | 88 | 58 | 50 | 36 | 18 | 73 | 96 |
| 4 | 0 | 53 | 100 | 85 | 100 | 41 | 100 | 70 | 77 | 100 | 46 | 46 |
| 5 | 18 | 27 | 31 | 62 | 47 | 77 | 68 | 50 | 46 | 0 | 64 | 77 |
| 6 | 18 | 20 | 31 | 15 | 47 | 53 | 53 | 50 | 46 | 0 | 55 | 46 |
| 7 | 100 | 100 | 77 | 92 | 95 | 100 | 74 | 100 | 41 | 18 | 91 | 86 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 23 | 68 | 12 | 84 | 0 | 73 | 0 | 50 | 32 |
| 9 | 29 | 27 | 46 | 92 | 90 | 94 | 84 | 90 | 41 | 27 | 100 | 86 |
| 11 | 12 | 13 | 77 | 39 | 90 | 100 | 90 | 50 | 68 | 27 | 86 | 86 |
| 12 | 12 | 20 | 39 | 23 | 79 | 88 | 79 | 100 | 27 | 27 | 82 | 59 |
| 20 | 18 | 0 | 0 | 100 | 100 | 59 | 100 | 0 | 91 | 100 | 82 | 91 |
| 29 | 41 | 27 | 77 | 31 | 74 | 88 | 63 | 60 | 86 | 0 | 91 | 86 |
| 30 | 12 | 27 | 31 | 15 | 90 | 100 | 79 | 40 | 0 | 27 | 91 | 100 |
| 31 | 0 | 33 | 23 | 54 | 79 | 100 | 100 | 20 | 0 | 55 | 50 | 91 |
| 32 | 24 | 27 | 31 | 0 | 68 | 100 | 100 | 70 | 36 | 0 | 77 | 50 |
| 34 | 24 | 13 | 54 | 69 | 84 | 71 | 79 | 50 | 100 | 55 | 46 | 73 |
| 35 | 18 | 13 | 15 | 39 | 79 | 65 | 63 | 50 | 46 | 0 | 73 | 68 |
| 36 | 29 | 27 | 77 | 39 | 63 | 71 | 90 | 70 | 82 | 0 | 86 | 77 |
| 37 | 47 | 67 | 92 | 92 | 74 | 82 | 63 | 70 | 32 | 0 | 86 | 59 |

CF= Cefalotina, E= Eritromicina, AM= Ampicilina, SXT= Trimetroprim-Sulfametoxazol, CTX= Cefotaxima, PEF= Pefloxacina, PE= Penicilina, CAZ= Ceftazidima, DC= Dicloxacina, GE= Gentamicina, TE= Tetraciclina.

La figura (9) muestra que el 100% de las bacterias muestran resistencia (R) a Penicilina (PE) y Ampicilina (AM); el 95% a Cefalotina (CF) y Eritromicina (E); el 90% a Dicloxacilina (DC), y el 75% a Trimetroprim-Sulfametoxazol (SXT). Muestran sensibilidad (S) el 65% a Gentamicina (GE) y el 55% a Tetraciclina (TE); muy sensibles (MS) a Cefotaxima (CTX) son el 60%; el 55% y el 65% son sensibles en un nivel intermedio (I) a los antibióticos Cefuroxima (CXM) y Pefloxacina (PEF) respectivamente.

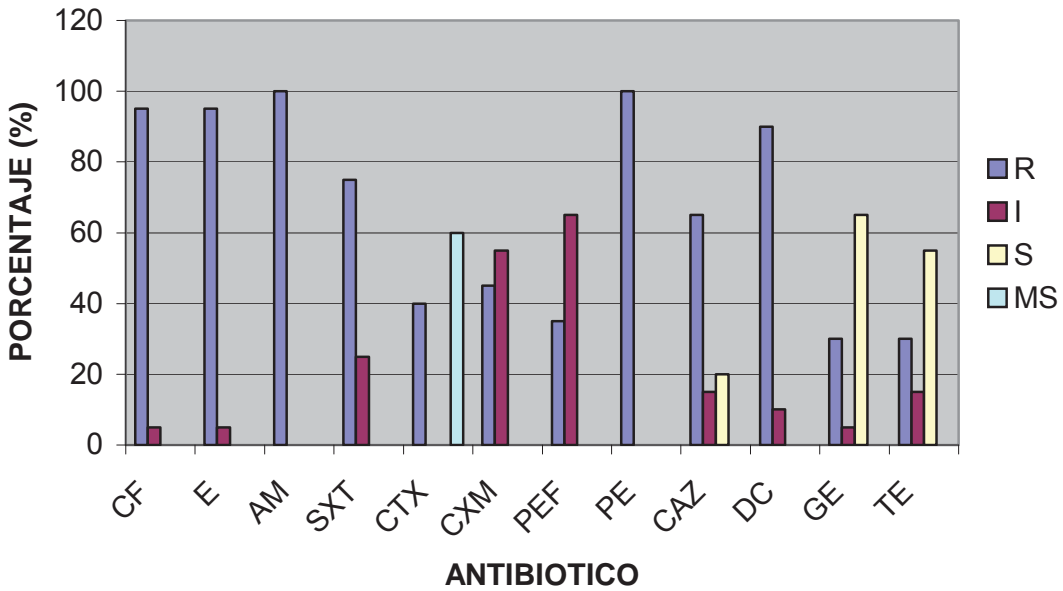


Figura 9. Porcentaje de sensibilidad a antimicrobianos que mostraron los aislados

R= Resistente, S= Sensible, I= Intermedio, MS= Muy Sensible; CF= Cefalotina, E= Eritromicina, AM= Ampicilina, SXT= Trimetroprim-Sulfametoxazol, CTX= Cefotaxima, PEF= Pefloxacina, PE= Penicilina, CAZ= Ceftazidima, DC= Dicloxacina, GE= Gentamicina, TE= Tetraciclina.

VII. DISCUSION

Los resultados del sistema BIOLOG muestran que la mayoría de las cepas analizadas en el presente trabajo pertenecen al género *Staphylococcus*, cuyas especies con las más comúnmente asociadas a procesos clínicos y subclínicos de mastitis bovina (Barkema y col., 1998; Osteras y col., 1999). No obstante, también se identificaron por este sistema otros géneros bacterianos cuya importancia en la mastitis bovina no está del todo clara, como lo son *Corynebacterium*, *Macrococcus*, *Globicatella* y *Kocuria*.

El sistema BIOLOG identificó al aislado 8 como *Corynebacterium xerosis*. Algunas especies del género *Corynebacterium* han sido asociadas a procesos de mastitis en ovejas (Las Heras y col., 1999; Fernández y col., 2001), cabras (Alawa y col., 2003; Ajuwape y col., 2005) y bovinos (Lidfors e Isberg, 2003; Busato y col., 2000). Para el caso particular de ganado bovino las especies mas frecuentemente reportadas en cuadros de mastitis clínica y subclínica son *C. bovis* (Busato y col., 2000) y *C. pyogenes* (Lidfors e Isberg, 2003). La correcta tipificación de las bacterias dentro de este género cobra interés ya que algunas especies se encuentran asociadas a procesos de mastitis en mujeres (Taylor y col., 2003), por lo que representa un género importante a nivel de salud pública.

El género *Macrococcus* es relativamente nuevo y cuenta en la actualidad con cuatro especies las cuales son *M. bovicus*, *M. caseolyticus*, *M. carouselicus* y *M. equipercicus* (Kloos y col., 1998). Este es un género taxonómicamente muy cercano a al *Staphylococcus*. De hecho, *M. caseolyticus* fue considerado hasta 1998 como *S. caseolyticus* (Kloos y col., 1998), lo cual refleja la gran cercanía bioquímica y genética entre estos dos géneros. Por lo anterior, no es raro que en animales se obtengan aislados de ambos géneros a partir de la misma muestra, como lo es el caso de la carne de cerdo (Olsson y col., 2003).

Globicatella sanguis fue una especie inicialmente descrita como patógena de humanos (Collins y col., 1992). No obstante, recientemente se ha descrito dicha especie como agente causal de meningoencefalitis en animales (Elsinghorst, 2003). A la fecha, el presente es el primer reporte en que dicha especie se asocia a procesos de mastitis bovina.

Aunque en este trabajo no se realizó la prueba de PCR con el aislado 37 identificado por el BIOLOG como *Kocuria rosea*, es importante a futuro corroborar dicha identificación mediante análisis genético. Lo anterior cobra relevancia ya que se ha reportado que el sistema automatizado Vitek 2, un sistema de identificación bacteriana semejante al sistema BIOLOG, identifica erróneamente a estafilococos coagulasa negativo como dentro del género *Kocuria* (Ben-Ami y col., 2005).

Al realizar el patrón de agrupamiento con base en los resultados del sistema BIOLOG se encontró que los aislados que no fueron identificados dentro del género *Staphylococcus* presentaban un patrón de distribución en concordancia con la sistemática de los géneros. Así, el aislado 37 (*K. rosea*) y el aislado 4 (*C. xerosis*) se agrupan conjuntamente con el aislado 12 y separados del resto de cepas. El aislado 8 (*G. sanguinis*) forma su propio grupo y las dos especies del género *Macrococcus* (aislados 29 y 34) se agrupan junto con otros aislados del género *Staphylococcus*, lo cual es un reflejo de su estrecha proximidad taxonómica.

No obstante, los resultados de la identificación bioquímica con sistemas automatizados deben ser acompañados de otro tipo de tipificación ya que la posibilidad de errores, como en el caso del sistema Vitek 2, deben ser considerados. Así, se ha reportado que el nivel de especificidad del sistema BIOLOG para identificar especies del género *Staphylococcus* es del 74.3% (Miller y col., 1993). En dicho estudio, el rango de error reportado para la identificación de especies de dicho género mediante el sistema BIOLOG varió entre 7.1 y 9.7%. Uno de los principales problemas detectados fue la incapacidad para identificar algunas cepas por parte del sistema. No obstante, en el presente trabajo fueron identificadas por el equipo BIOLOG todas las cepas de estudio, lo que muestra la mejoría de la base de datos y muy posiblemente del software utilizado por el sistema. No obstante, se ha reportado que los sistemas de identificación automatizada de microorganismos poseen distinta sensibilidad y precisión para distintos grupos microbianos (Odumeru y col., 1999). Así, sería interesante a futuro comparar los resultados aquí obtenidos del BIOLOG con los resultados obtenidos por algún otro tipo de análisis automatizado, para conocer cuanto se ha mejorado el sistema BIOLOG para la identificación de *Staphylococcus spp.* Es importante mencionar que hasta la fecha, el presente trabajo representa el primer reporte en el que se utiliza al sistema BIOLOG para la

caracterización de aislados bacterianos provenientes de vacas con mastitis clínica. Recientemente se ha reportado la utilidad de kits comerciales de uso común en diagnóstico clínico humano para la identificación de especies dentro del género *Staphylococcus* relacionadas con mastitis bovina (Zschock y col., 2005). Dichos kits están basados en métodos de aglutinación y sería interesante su uso en las cepas aquí estudiadas.

La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) a proporcionado nuevas técnicas de diagnóstico para la determinación de los agentes patógenos asociados a la mastitis bovina. Mediante dicha técnica se ha podido identificar tanto a *S. aureus* como a otros grupos bacterianos asociados a la mastitis (Phuektes y col., 2001; Rifon y col., 2001). Esto ha permitido aumentar la sensibilidad, la especificidad y la rapidez del diagnóstico. En el presente estudio se utilizaron iniciadores específicos del género *Staphylococcus* así como específicos de *S. aureus*. Los resultados de los ensayos de PCR con dichos oligos parecen contradecir algunos de los resultados de identificación mediante el sistema BIOLOG. El sistema BIOLOG identificó a los aislados 4, 8, 29 y 34 como *Corynebacterium xerosis*, *Globicatella sanguinis*, *Macrococcus bovicus* y *Macrococcus carouzelicus*, respectivamente. En el ensayo de amplificación mediante PCR se encontró que los aislados 29 y 34 generaron productos de amplificación con los iniciadores específicos del género *Staphylococcus*, mientras que los aislados 4, 8 y 29 generaron productos de amplificación con los iniciadores específicos de *S. aureus*. Dado que las reacciones de PCR se realizaron a baja temperatura de alineamiento (50 °C), es probable que esto influyera en los resultados de amplificación positivos de bacterias identificadas en otros géneros distintos al de *Staphylococcus* mediante el sistema BIOLOG. Es necesario también incluir otros sistemas de identificación molecular de las cepas aquí estudiadas, algunos de los cuales ya han sido probados para diferencias especies del género *Staphylococcus*, como es el caso de la multiplex-PCR (Morot-Bizot y col., 2004), el DGGE de regiones ribosomales (Blaiotta y col., 2003) y por supuesto, el análisis de secuencias (Kwok y col., 2003).

Sería interesante a futuro comparar las especies tipificadas en este estudio con aquellas de muestras clínicas humanas provenientes de la misma región. Esto podría ser útil para conocer el nivel de intercambio de cepas y especies entre el

ganado y el hombre. Kawamura y col. (1998) analizaron 1230 aislados de estafilococos provenientes de muestras clínicas humanas del Japón. En dicho estudio se encontró que el 31.3% de las cepas aisladas eran *S. epidermidis*, el 23.3% *S. aureus*, el 12.2% *S. haemolyticus*, el 10.7% *S. caprae*, el 4.4% *S. simulans*, el 4.0% *S. hominis*, el 3.9% *S. capitis*, el 3.6% *S. saprophyticus*, el 2.2% *S. warneri* y el 1.3% *S. lugdunensis*. Este estudio mostró una amplia distribución de *S. caprae* en muestras clínicas humanas. Kawamura y col. (1998) mencionan que *S. caprae* ha sido reportada como *S. haemolyticus* en muestras humanas. Esto debido a que las pruebas bioquímicas establecían que *S. caprae* no producía ácido a partir de fructosa y manitol, lo cual no es cierto, según los autores. Este trabajo muestra como el ser humano puede ser un factor de transmisión de cepas de ganado. Un estudio en el que se comparen aislados bovinos y de muestras clínicas humanas podría ayudar a establecer estrategias de control epidemiológico y sistemas de manejo de ganado que disminuyan la dispersión de mastitis en el ganado de la región.

Al realizar los ensayos de sensibilidad a antibióticos se encontró que todas las cepas estudiadas eran resistentes a penicilina y a ampicilina. De la misma forma el 90% o más de las cepas mostró resistencia a cefalotina, eritromicina y dicloxacilina. De hecho, prácticamente todas las cepas mostraron mutirresistencia a los antibióticos empleados.

La resistencia a penicilina parece ser un factor ampliamente distribuido en aislados de *S. aureus* provenientes de distintas partes del mundo. En un estudio reciente realizado en Ohio (EU) se aislaron bacterias de vacas jóvenes y viejas con mastitis, el 78% de las bacterias aisladas fueron estafilococos coagulasa negativos (ECN), de los cuales el 44% era resistentes al menos a algún antibiótico estudiado (Rajala-Schultz y col., 2004). El 39% de los ECN aislados de vacas adultas resultó resistente a penicilina, mientras que el 26% de los ECN aislados de vacas jóvenes resultó resistente a dicho antibiótico. Adicionalmente, la resistencia a tetraciclina fue más común en ECN aislados de vacas jóvenes. En otro estudio realizado en Hungría (Kaszanyitzky y col., 2003) se encontró que la resistencia a penicilina fue significativamente mayor que a cualquier otro antibiótico en aislados de *S. aureus* provenientes de humano (96.5% de los aislados estudiados), de vacas con mastitis (55% de los aislados) y de distintos alimentos (45% de los aislados). En este mismo

reporte se encontró que la combinación penicilina/tetraciclina era la menos efectiva para inhibir el crecimiento de las cepas aisladas de todas las fuentes. En concordancia con lo anterior, se ha encontrado que la resistencia a penicilina en *S. aureus* de mastitis bovina de Finlandia es relativamente alta, con un 52.1% de los aislados estudiados (Pitkala y col., 2004)

En contradicción con los reportes anteriores, Pengov y col. (2003) encuentran que el 65.2% de 92 aislados de *S. aureus* provenientes de infecciones intramamarias de bovinos y ovinos son susceptibles a penicilina, mientras que el 93.5% son susceptibles a kanamicina y cefalexina. Dichos autores también documentan que los aislados de *S. aureus* provenientes de ovinos son más sensibles a los antibióticos mencionados que los aislados provenientes de bovinos.

En trabajos siguientes sería interesante estudiar las bases genéticas de resistencia a antibióticos de los aislados aquí estudiados. La resistencia de *S. aureus* a penicilina G esta ligada principalmente a la producción de β -lactamasa. La detección de la actividad de β -lactamasa puede ser evaluada no solo por el ensayo de difusión de disco aquí empleado, sino también a través de cefalosporinas cromogénicas como la nitrocefina. De hecho, se ha observado que este último sistema de determinación de susceptibilidad a penicilina es más sensible que el ensayo de difusión en sensidiscos (Haveri y col., 2005). A futuro sería interesante analizar la sensibilidad a penicilina de aquellos aislados que en el presente estudio resultaron negativos y comparar los resultados obtenidos para saber si alguno de estos aislados es sensible o no a penicilina. La multirresistencia a antibióticos no puede explicarse únicamente por la actividad de la β -lactamasa. Recientemente se ha descrito en *S. epidermidis* el plásmido de 2391 pb denominado pSepCH, el cual contiene el gen *qacC* el cual codifica para una bomba de detoxificación (Fuentes y col., 2005). Las bacterias que llevan dicho plásmido presentan una multirresistencia a antibióticos. No obstante, también se ha documentado que la multirresistencia a drogas en *S. aureus* no esta determinada por genes codificados en plásmidos (Caddick y col., 2005). Sería interesante buscar plásmidos en las cepas de estudio para saber si llevan algún tipo de plásmido que este asociado a la multirresistencia a drogas o si dicha resistencia esta asociada a genes en el cromosoma.

Los resultados de tipificación genética, fisiológica y bioquímica mostrados en el presente trabajo pueden contribuir a conocer si es que existen genotipos prevalecientes como responsables de la mastitis bovina en el estado de Michoacán y cuales serían las posibles estrategias de prevención y tratamiento. Como ejemplo, se ha documentado que la mastitis bovina en distintas municipalidades de Sao Paulo, en Brasil, es provocada por dos genotipos principales, los cuales representan el 72.2% de todos los aislados obtenidos (Cabral y col., 2004). Los otros siete genotipos encontrados representan en conjunto solo el 27.8% del total de aislados. Además, la resistencia a penicilina esta asociada a los dos genotipos más abundantes. Dicho estudio muestra que un número limitado de clonas puede ser el responsable de mastitis bovina en distintas granjas de una misma región (Cabral y col., 2004). Otros aspectos del manejo de ganado bovino, como el tamaño del hato y la cantidad de producción de leche, también guardan relación con los resultados del presente estudio. Así, en Kenia se ha encontrado que la multirresistencia de *S. aureus* a antibióticos como penicilina, tetraciclina, eritromicina, etc., es más común en aislados provenientes de pequeños productores de leche (menos de 50 L/día) que en productores más industrializados (más de 200 L/día) (Shitandi y Sternesjo, 2004). Así, la diferencia en lo hábitos de manejo de acuerdo al nivel de producción puede ser un factor importante en la diseminación de la mastitis y la resistencia antibióticos.

VIII. CONCLUSIONES

1. El presente trabajo representa el primer estudio en el cual se utiliza el sistema BIOLOG para caracterizar bacterias asociadas a procesos de mastitis bovina.
2. En concordancia con lo esperado en cuadros de mastitis clínica y subclínica, la mayoría de las cepas tipificadas en este estudio pertenecen al género *Staphylococcus*.
3. Las dos especies bacterianas del género *Macrococcus* así como *Globicatella sanguis* y *Kocuria rosea* no han sido descritas como asociadas a mastitis bovina, por lo que es importante la identificación genético molecular de dichos aislados.
4. El patrón de agrupamiento muestra que las cepas estudiadas forman por lo menos 6 grupos de similitud fisiológica en los cuales las cepas ATCC de *S. aureus*, *K. rosea*, *C. xerosis* y *G. sanguinis* se separan prácticamente del resto de los aislados.
5. En concordancia con su cercanía taxonómica, las dos cepas de *Macrococcus* salen agrupadas con el resto de cepas clasificadas como *Staphylococcus*, lo cual muestra su gran similitud fisiológica.
6. Prácticamente todas las cepas estudiadas presentan mutirresistencia a los antibióticos probados, pero se desconoce el origen genético de dicha característica fenotípica.
7. Es importante a futuro incrementar el número de aislados en distintas regiones del estado de Michoacán, con la finalidad de determinar la importancia de cada especie y la diversidad genética intraespecífica.

ANEXO

Matriz dicotómica con los datos de utilización de fuentes de carbono.

| FUENTES DE CARBONO | AISLADOS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | A T C C | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 12 | 20 | 29 | 30 | 31 | 32 | 34 | 35 | 36 | 37 |
| Agua | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| αCiclodextrina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| βCiclodextrina | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Dextrina | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Glicógeno | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Inulina | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Manan | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tween 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Tween 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| N-Acetil-D-Glucosamina | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| N-Acetil-D-Manosamina | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Amigdalina | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| L-Arabinosa | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Arabitól | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Arbutina | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| D-Celobiosa | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Fructosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-Fucosa | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| D-Galactosa | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| D-Acido Galacturónico | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Gentobiosa | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| D-Acido Gluconico | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| αD-Glucosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| M-Inositol | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| αD-Lactosa | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Lactulosa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Maltosa | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Maltotriosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Manitol | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| D-Manosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Melecitosa | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Melobiosa | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| αMetil-D-Galactosido | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| βMetil-D-Galactosido | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 3Metil Glucosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| αMetil-D-Glucosido | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| βMetil-D-Glucosido | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| αMetil-D-Manosido | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

TIPIFICACION DE BACTERIAS AISLADAS DE LECHE DE VACAS CON UN CUADRO DE MASTITIS CLINICA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Palatinosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Psicosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Rafinosa | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| L-Ramnosa | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| D-Ribosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Salicina | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Sedoheptulosa | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Sorbitol | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Estaquiosa | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sucrosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Tagatosa | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| D-Tetralosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Turanosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Xylitol | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D-Xilosa | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Ácido Acético | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| αHidroxiácido Butírico | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| βHidroxiácido Butírico | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| γHidroxiácido Butírico | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| p-Hidroxifenil Ácido Acético | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| αCeto Ácido Glutámico | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| αCeto Ácido Valerico | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Lactamida | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D-Ácido Lactico Metil Ester | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-Ácido Lactico | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| D-Ácido Malico | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| L-Ácido Malico | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Metil piruvato | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mono-Metil Succinato | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Ácido Propionico | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Ácido Piruvico | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Ácido Succinico | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| N-Acetil L-Ácido Glutamico | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| L-Alaninamida | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| D-Alanina | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-Alanina | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-Alaninaglicina | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| L-Asparagina | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| L-Ácido Glutámico | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Glicil L-Ácido Gluconico | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| L-Ácido Piroglutamico | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| L-Serina | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Putrecina | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,3,Butanodiol | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

TIPIFICACION DE BACTERIAS AISLADAS DE LECHE DE VACAS CON UN CUADRO DE MASTITIS CLINICA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glicerol | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Adenosina | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2' Desoxiadenosina | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Inosina | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Timidina | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Uridina | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Adenosin 5' monofosfato | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Timidin 5' monofosfato | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Uridin 5' monofosfato | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fructosa 6 fosfato | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Glucosa 1 fosfato | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Glucosa 6 fosfato | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| D-L-αGlicerol fosfato | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

Clave: 1 = positivo (metabolizó la fuente de carbono); 0 = negativo (no metabolizó la fuente de carbono)

IX. REFERENCIAS

- **Aarestrup** F. M., F. Bager, N. E. Jensen, M. Madsen, A. Meilyng, H. C. Wegener, **1998**. Resistance to Antimicrobial Agents used of Animal Therapy in Pathogenic, Zoonitic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark; a baseline study for the Danish integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP) APMIS. 106:745-770.
- **Aguilera**, G.F., Higuera R. J. E., Baizabal A. V. M., López M. J. E., Valdez A. J. J.. **2005**. Caracterización Filogenético molecular de aislados de *Staphylococcus spp.* Asociados con mastitis en el municipio de Tarímbaro, Michoacán. Veterinary Microbiology 1-8.
- **Alawa**, J. P., Ngele M. B., Ogwu D. **2003**. Chronic caprine mastitis in Nigerian goat breeds: microbiological flora and histopathological findings. Science. Volume 35. pp. 203-207.
- **Ajuwape**, A. T. P., Roberts A. A., Solarin O. O., Adetosoye A. I. **2005**. Bacteriological and haematological studies of clinical mastitis in goats in Ibadan, OYO State, Nigeria. Science.
- **Amann**, R.I. Ludwig, W., Schleifer, K.H. **1995**. Phylogenetic Identification and In situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Review. 59:143-169.
- **Anderson** JM., Mihalik K., Soll DR. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. **1990**. J Bacterial 172, pp. 224-235.
- **Armenteros**, M., Peña, J.; Ginorio, C.; Linares, E. y Pulido, J. L. **1997**. Caracterización de la situación Actual de mastitis en varios rebaños del País (Cienfuegos Cuba). Rev. Salud.
- **Agrobit**. Asociación de productores agropecuarios de Argentina. **2004**.
- **Bager**, F. **2000**. Danmap. ; Monitoring antimicrobial resistance in Denmark. Int. J. Antimicrob. Agents 14:271-274.
- **Barkema**, H. W., Schukken, Y. H., Lam TJ. G. M., Beiboer M. L., Wilmsink H., Benedictus G., Brand A. **1998**. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell count. J. Dairy Sci. 1 81:41.
- **Barry**, Al, Thornsberry, C. **1985**. Susceptibility test Diffusion test procedures. In: E. Lennette (Ed) Manual of Clinical Microbiology 4th Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 978-987.
- **Ben-Ami**, R., Navon-Venezia S., Schwartz D., Schelezinger Y., Mekuzas Y., Carmeli Y. **2005**. Erroneous Reporting of Coagulase- Negative *Staphylococci* as *Kocuria spp.* by the Vitek 2 System . J.Clinical Microbiology. Vol.43 3. pp. 1448-1450.
- **Ben – Ami**, R., Navon-Venezia S., Schwartz D., Schelezinger Y., Mekuzas Y., Carmeli Y. **2003**. Infection of Ventriculoatrial Shunt with Phenotypically Variable *Staphylococcus epidermis* Masquerading as polymicrobial Bacteremia due to various Coagulase- Negative *Staphylococci* and *Kocuria varians*. J. Clinical Microbiology. Vol.41 6 pp. 2444-2447.

- **Blaiotta**, G., Pennacchia C., Ercolini D., Monschetti G., Villani F. **2003**. Combining Denaturing Gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 Region and 16S-23S rDNA Spacer Region Polymorphism Analyses for the Identification of *Staphylococci* from Italian Fermented Sausages. Science. Vol. 26 3 pp423-433.
- **Busato**, A., Trachsel P., Schällibaum M., Blum J. W. **2000**. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. Science. Vol. 44 3 pp.205-220.
- **Cabral**, KG., Lammler C., Zschock M., Langoni H., Victoria C., Da Silva A. **2004**. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from Sao Paulo State, Brazil. J. Microbiol. 50 (11) pp.901-909.
- **Caddick**, J. M., Hilton AC., Rollason J., Lambert PA., Worthington T., Elliott TS. **2005**. Molecular analysis of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* reveals an absence of plasmid DNA in multidrug- resistant isolates. Immunol Med. Microbiol. 44 (3) pp.297-302.
- **Caprioli**, A. L. Busani, J. L. Martel. R. Helmuth. **2000**. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin epidemiological methodologies. Int. J. Antimicrob. Agents 14:295-301.
- **Collins**, M. D., Aguirre M., Facklam, R. R., Shallcross, J., Williams, A. M. **1992**. *Globicatella sanguis* gen. nov. sp. nov. , a New Gram Positive catalase Negative bacterium from human sources. J. Appl. Bacteriol. 73 pp.422-437.
- **Costa**, E. O., N. R. Benites, J. L. Guerra, P. A. Melville. **2000**. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 47:99-103.
- **Cotrino**, B. **2004**. Diagnóstico de Mastitis. Rev. Científica. Colombia. 1-6.
- **Cullor** James. **2002**. Mastitis en vacas Lecheras. ¿Afecta el desempeño reproductivo? Instituto Babcock California.
- **Dams** E., Hendricks L., Van de Peer Y., Neefs J., Smits G., Vandembempt I., De Wachter R. **1988**. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Research. 16 , supplement: r87-r175.
- **Elsinghorst**, TA. **2003**. First cases of animal diseases Publisher since 2000. 5. Sheep. Vet. Q. 25 (4) pp.165-169.
- **Fernández**, E. p., Vela A. I., Las heras, A., Domínguez L., Fernández J. F., Moreno M. A. **2001**. Antimicrobial susceptibility of *Corynebacteria* isolated from ewes mastitis. J. Antimicrobial Agents. 18 (2) pp.571-574.
- **Figuroa-Arredondo**, P. **1994**. Técnicas de biología Molecular en el diagnostico de Infecciones Gastrointestinales. En: Diagnostico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Giono, S., Escobar, A., Valdespino, J.L. Ed. México. Secretaría de Salud.
- **Fuentes**, DE., Navarro CA., Tantalean J. C., Araya M. A., Saavedra C. P., Perez J. M., Calderon I. L., Youderian P. A., Mora G. C., Vasquez C. C. **2005**. The product of the qac C gene of *Staphylococcus epidermidis* CH mediates resistance to beta- lactam antibiotics in gram- positive and gram –negative bacteria. Rev. Microbiol. 156 (4) pp. 472-477.

- **Fustes**, E. Martínez Elsa. **1993**. Mastitis bovina. Estructura epizootica en rebaños lecheros típicos en las condiciones de Cuba. Rev.Cub. Cient. Vet. 18 (1y2), 1-10.
- **Gentilini**, E., G. Denamiel, P. Llorente, S. Godaly, M. Rebuelto, O. DeGregorio. **2000**. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 83:1224-1227.
- **Goodman**, L. A. Gilman. **1996**. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. McGraw – Hill Interamericana, México D.F. México. Vol. II. 1996 p.
- **Haveri**, M., Suominen S., Rantala L., Honkanen- Buzalski T., Pyorala S. **2005**. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G. resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. Vet. Microbiol. 106 (1-2) pp. 97-102.
- **Jawetz**, Melnick, Adelberg. **1999**. Microbiología Médica. 16ª ed. Manual Moderno. México D.F. México. Traducida de la 21ª ed. en ingles 1999. 241-247,41, 45, 799 p.
- **JM** Millar, JW Biddle, VK Quenzer and JC McLaughlin. **1993**. Evaluation of Biolog for identification of members of the family Micrococcaceae. J.Clin Microbiol. 12 (31), 3170-3173.
- **Kaszanyitzky**, E. J., Janosi S., Egyed Z., Agost G., Semjen G. **2003**. Antibiotic resistance of *Staphylococci* from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. Acta Vet. Hung. 51 (4) pp. 451-464.
- **Klingler** JM., Stowe RP, Obenhuber DC. Groves TO, Mishra SK., Pierson DL. **1992** Evaluation of the BIOLOG automated microbial identification system. Appl Environ Microbiol. 58, pp.2089-2092.
- **Kloos**, W. E., Ballard D. N., George C. G., Webster J. A., Hubner, R. J., Ludwigw, Schleirer K. H., Fiedler, F, Schubert K. **1998**. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equiperficus* sp. nov, *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. Int. J. Sust. Bacteriol. 48. pp. 859-877.
- **Lane** D., Pace B., Olsen G., Stahl D., Sogin M., Pace N. **1985**. Rapid determination of 16s Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82, 6955-6959.
- **Las Heras**, A., Domínguez L., Fernández- Garayzábal J. F. **1999**. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. Science. 32 (1) pp. 21-29.
- **Lidfors**, L., Lotta. Isberg. **2003**. Intersucking in dairy cattle-review and questionnaire. Science. 80 (3) pp. 207-231.
- **López-Meza**, J. E., Aguilera G. F., Higuera R. J., Vázquez G. Ma. S., Ochoa Z. A., Baizabal A. V. M., Bravo P. A., Valdez A. J. J. **2004**. Microbial diversity of *Staphylococci* isolates from dairy cows with mastitis in México. Veterinary Microbiology 1-10.
- **Martel**, J. L., F. Tardy, A. Brisabois, R. Lailier, M. Coudert, E. Chaslusdancla. **2000**. The French antibiotic resistance monitoring programmes. Int. J. Antimicrob. Agents. 14:275-283.

- **Montealegre** J. R., **2002**. Preparación de medios de cultivo para hongos y bacterias. Depto. Sanidad Vegetal , Chile. p.1-7
- **Morot- Bizot**, SC., Talon R., Leroy S. **2004**. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four Staphylococcal species isolated from food. J. Appl. Microbiol, 97 (5) pp. 1087-1094.
- **Myllys**. V., K. Asplud, E. Brofeldt. V. Hiruela-Koski , T. Honkanen-Buzalski, J. Junttila, L. Kulkas, O. Myllykangas, M. Niskanen, H. Saloniemi, M. Sandholm, T. Saranpaa. **1998**. Bovine mastitis in Finland in 1998 and 1995- changes in prevalence and antimicrobial resistance. Acta Vet. Scand. 39:119-126.
- **National Mastitis Council**. **1996**. Current Concepts of mastitis. Fourth Edition Cap. 1, 3, 8, 11:1.
- **NC**. 55-17 **1987**. Mastitis bovina procedimientos para su control. 1-12 p.
- **Nickerson** Sthephen. **2001**. Mastitis contagiosa vs. Ambiental. Lousiana Agricultural Experimental Station.
- **Odds** FC. y Abbot AB. Modification and extension of test for differentiation of Candida sp and strains, **1983**. Sabouraudia 21. pp. 79-81.
- **Odds** FC. Reflections on the question: what does molecular mycology have to do with the clinician treating the patient? **2003**. Med Mycol.41, pp.1-6.
- **Odumeru** J. A., Steele M. Fruhner L., Larkin C., Jiang J., Mann E., and McNab W. B. **1999**. Evaluation of Accuracy and Repeatability of Identification Systems. J. Clin. Microbiol. 37 (4) 944-949.
- **Olsson**, C., Ahrné S., Pettersson B., Molin G. **2003**. The bacterial flora of fresh and chillstored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. J. Microbiology. 83 (3) pp. 245-252.
- **Osteras**, O., Edge V. L., Martin S. W., **1999**. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. J. Dairy Sci. 82: 1221.
- **Pace** N. **1996** New Perspective on the Natural Microbial World: Molecular Microbial Ecology. ASM News. 62 (9), 463-470
- **Pass**, M.A., Odedra, R., Batt, R.M. **2000**. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* Virulence genes. Journal of Clinical Microbiology. 38:2001-2004.
- **Pengov**, A., Ceru S. **2003**. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. J. Dairy Sci. 86: 3157-3163.
- **Philpot**, N. y Nickerson, S. **1992**. Mastitis el contra ataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Babson Bros. Co. :10.
- **Philpot**, N. W. **1996**. La calidad de la leche y la mastitis. Disertación pronunciada en la 1ra exposición Latinoamericana de Producción e Industria Lechera; Mundo Lácteo, Argentina; 1.
- **Phuektes**, P., Mansell P. D., Browning G. F. **2001**. Multiplex polymerase Chain Reaction Assay for Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. J. Dairy Sci. 84: 1140-1148.
- **Pinzón** G. **1989**. Mastitis bovina. Tipos, Agentes causales y Diagnóstico. FONAIAP. Divulga N° 31. Estación Experimental Táchira.

- **Vandamme P.**, Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. And Swings J. **1996**. Polyphasic Taxonomy, A Consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiological Reviews. 60 2:407-438.
- **Wattiaux A.** Michel. **2004**. Mastitis: Prevención y Detección. Esenciales lecheras 93-96. Instituto Babcock.
- **Watts**, J. L., S. A. Salmon, R. S. Yancey, S. C. Nickerson, L. J. Weaver, C. Hoemberg, J. W. Pankey, L. K. Fox. **1995**. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. J. Dairy Sci. 78:1637-1648.
- **Watts**, J. L., S. A. Salmon. **1997**. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce betalactamase. J. Dairy Sci. 80: 788-791.
- **WHO**, World Health Organization. **2000**. Overcoming antimicrobial resistance, WHO. Geneva, Switzerland. 67p. (World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000).
- **Yamasaki M. A.**, Velasco Z. Ma. E. **2003**. Bacterias de Interés Veterinario. Art. Visión Veterinaria. Perú.
- **Zschock**, M., Nessler A., Sudarwanto I. **2005**. Evaluation of six commercial identification kits for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. J. Appl. Microbiol. 98 (2) pp.450-455.