



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN
AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* ASOCIADOS A
MASTITIS BOVINA EN UN HATO LECHERO**

Tesis que presenta:

PATRICIA NAYELI ALVA MURILLO

Como requisito parcial para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Director de tesis:

Dr. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

MORELIA, MICHOCÁN, NOVIEMBRE DEL 2008

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH: “Caracterización de la resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en sistemas de producción intensiva y de pequeña escala”.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
TABLA DE ABREVIACIONES	
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Mastitis bovina	2
2.2 Pérdidas económicas causadas por la mastitis bovina	3
2.3 Características de <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.4 Resistencia antimicrobiana y mecanismo de acción de los fármacos	4
2.5 Uso veterinario de agentes antimicrobianos	7
2.6 Resistencia antimicrobiana en <i>Staphylococcus aureus</i> asociados a mastitis bovina	9
2.7 Antecedentes de evaluaciones de la resistencia antimicrobiana en la región lechera de Morelia, Michoacán	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15

5.1 Objetivo general	15
5.2 Objetivos específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Colecta de muestras	16
6.2 Obtención de los aislamientos bacterianos	16
6.3 Conservación de los aislamientos	16
6.4 Reactivación de los aislamientos	17
6.5 Extracción de ADN genómico	17
6.6 Limpieza de ADN con bromuro de etidio	18
6.7 Identificación de los aislamientos	19
6.7.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	19
6.8 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	19
6.8.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a antibióticos	19
6.8.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a detergentes cuaternarios de amonio (CTAB)	20
7. RESULTADOS	22
7.1 Características del hato lechero de La Posta durante el periodo de evaluación	22
7.2 Incidencia de mastitis bovina en el hato lechero de La Posta	22
7.3 Colecta de las muestras y obtención de los aislamientos bacterianos	25
7.3.1 Aislamientos bacterianos asociados a mastitis bovina y su	26

identificación	
7.3.2 Aislamientos bacterianos provenientes de vacas sanas	27
7.4 Análisis de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	27
7.4.1 Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de <i>S. aureus</i> colectados en cada mes durante el periodo de evaluación	29
7.5 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a detergentes	35
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES	41
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	2

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Modelo de distribución y transferencia de antibióticos, genes de resistencia a antibióticos y microbios en la biosfera, producido en 1997 por la Unión Europea y Suiza. 8

Figura 2. Amplificación de una región del gen *nuc* para la identificación de *S. aureus* por medio de la PCR. 26

Figura 3. Antibiograma realizado a los aislamientos de *S. aureus* colectados en septiembre de 2007. 30

Figura 4. Antibiograma realizado a los aislamientos de *S. aureus* colectados en octubre de 2007. 30

Figura 5. Antibiograma realizado a los aislamientos de *S. aureus* colectados en noviembre de 2007. 31

Figura 6. Antibiograma realizado a los aislamientos de *S. aureus* colectados en diciembre de 2007. 32

Figura 7. Antibiograma realizado a los aislamientos de *S. aureus* colectados en enero de 2008. 2

Figura 8. Antibiograma realizado a los aislamientos de *S. aureus* colectados en febrero de 2008. 33

Figura 9. Análisis general de la resistencia antimicrobiana en los aislamientos de *S. aureus*. 34

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Sitios de acción de los fármacos.	5
Tabla 2. Interpretación de la Prueba de California (PC).	17
Tabla 3. Antibióticos usados en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.	21
Tabla 4. Relación de vacas muestreadas en el hato de la Posta Veterinaria, desde septiembre de 2007 hasta febrero de 2008.	23
Tabla 5.	24
Tabla 6.	25
Tabla 7. Identificación de los aislamientos correspondientes a vacas con mastitis	27
Tabla 8. Patrones de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> .	28
Tabla 9. Relación de los aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> y los patrones de resistencia antimicrobiana.	29

LISTA DE ABREVIACIONES

ATCC	American Type Culture Collection
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio
LB	Luria Bertani
PC	Prueba de California
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QAC	Compuestos cuaternarios de amonio

RESUMEN

La mastitis es una enfermedad que ocasiona pérdidas económicas fuertes a los productores de leche en el mundo debido a la disminución en el rendimiento de la producción de la leche y un aumento en el número de tratamientos clínicos, por lo que se ha reconocido como una de las enfermedades más costosas en los hatos lecheros. En esta enfermedad se presenta una inflamación de la glándula mamaria en respuesta a un daño local que puede ser de origen infeccioso, traumático o tóxico. *S. aureus* es el principal agente etiológico de la mastitis bovina, para su control se recurre al uso de agentes antimicrobianos lo que ha provocado un incremento en la selección de aislamientos resistentes. En México existen pocos estudios al respecto en aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis bovina y la En este trabajo se analizaron 26 vacas Holstein por un periodo de seis meses, mantenidas en un hato lechero de producción semi-intensiva. La incidencia de mastitis fue variable, al inicio del estudio se presentó un elevado porcentaje (68%), pero ésta disminuyó (47%) al final del mismo. A partir de la leche, se obtuvieron 50 aislamientos de *S. aureus*, de los cuales 39 se aislaron de vacas con mastitis y 11 de vacas sanas. En las pruebas de sensibilidad a 12 antibióticos se observó un alto porcentaje de resistencia hacia los fármacos de la familia de las penicilinas mientras que se obtuvo un bajo índice de resistencia hacia trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, pefloxacina y gentamicina. Todos los aislamientos fueron susceptibles a una concentración de 6 µg/l de CTAB. Se identificaron 24 patrones de resistencia antimicrobiana diferentes, lo que indica que existe diversidad de cepas causantes de la mastitis en el hato lechero de La Posta – FMVZ.

1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria causada principalmente por una infección bacteriana, esta puede cursar de manera clínica (signos visibles) o subclínica (ausencia de signos) (dos Santos *et al.*, 2002; Field, 2003). Esta patología es la más prevalente y costosa en la ganadería lechera a nivel mundial. Las pérdidas económicas que ocasiona comprenden la disminución de la producción, descarte de leche, costo de medicamentos, honorarios veterinarios, trabajo extra y pérdida de potencial genético (Halasa *et al.*, 2007).

Aunque existen diversos tipos de microorganismos asociados a esta enfermedad, *Staphylococcus aureus* es el patógeno contagioso que se aísla con mayor frecuencia de la leche de las vacas afectadas y es causante de mastitis clínica y subclínica (Kerro-Dego *et al.*, 2002; Sears y McCarthy, 2003). Para el control de esta bacteria se recurre frecuentemente al uso de antimicrobianos, lo cual ha provocado un incremento en la selección de bacterias resistentes que se ha constituido en un problema de salud pública (OMS 2003; Aarestrup, 2005). Con el fin de tener un control exitoso de la mastitis y evitar los problemas potenciales asociados con la resistencia bacteriana y con el tratamiento fallido, es importante tener en cuenta las características de resistencia antimicrobiana de los patógenos causantes de esta enfermedad (Srinivasan *et al.*, 2007).

Los programas de vigilancia de la resistencia antimicrobiana tienen como objetivo evaluar los fenotipos de resistencia los cuales pueden surgir a partir de diferentes determinantes genéticos y cada determinante puede presentar características epidemiológicas específicas. Por lo tanto, su evaluación a nivel genético es importante para entender y controlar la resistencia antimicrobiana (Srinivasan *et al.*, 2007).

Ante esta problemática, resulta relevante evaluar la resistencia antimicrobiana en aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis bovina en los hatos lecheros, durante un periodo prolongado, con el fin de establecer las resistencias prevalentes entre los aislamientos y determinar la variación que pueda presentarse.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Mastitis bovina

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a un daño local que puede ser de origen infeccioso, traumático o tóxico. Es enfermedad del ganado lechero debido al daño que ocasiona al animal, además de que tanto el valor nutricional de la leche como el sanitario, influyendo también en la calidad de los derivados lácteos (Armenteros *et al.*, 2002). Se estima que es una enfermedad compleja, producto de la interacción de varios factores jugando el un papel decisivo.

Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación intramamaria grave en uno o más cuartos de la ubre (Horter y Seegers, 1998). La constitución anatómica de la ubre la expone constantemente a lesiones y a los agentes de etiología diferente. Dependiendo de lo extenso de los daños, se puede manifestar de forma clínica o subclínica. La mastitis clínica puede presentarse en forma aguda o crónica. La forma aguda se caracteriza por su condición de aparición súbita, la leche es de apariencia anormal, con presencia de grumos e incluso hasta sangre y secreciones serosas, hay enrojecimiento, tumefacción y dolor en la ubre, con o sin signos sistémicos. La forma crónica se caracteriza por su aparición insidiosa, la leche es de apariencia normal, con presencia de grumos e incluso hasta sangre y secreciones serosas, hay enrojecimiento, tumefacción y dolor en la ubre, con o sin signos sistémicos. La forma subclínica de esta enfermedad no presenta signología (Schrick *et al.*, 2001).

Los microorganismos contaminantes en la leche cruda se originan principalmente de: 1) infecciones de la ubre o conducto del pezón; 2) exterior de la ubre y ambiente; 3) manejo de la leche y equipo de almacenamiento (Romero, 2004). El grupo de bacterias responsables de la mastitis bovina es diverso. Clásicamente se dividen en patógenos contagiosos y ambientales (Kerro-Dego *et al.*, 2002).

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp. (Riffon *et al.*, 2001; Kerro-Dego *et al.*, 2002; Rossitto *et al.*, 2002).

Los patógenos ambientales principales son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp.*, que son transmitidos a través de las ordeñas por el ambiente que sirve como su reservorio (Rossitto *et al.*, 2002).

Sin embargo, *S. aureus* es considerado el principal agente etiológico de la mastitis bovina clínica y subclínica, y la presencia de esta bacteria en la leche representa un riesgo para la salud pública (De Oliviera *et al.*, 2000). El reservorio principal de *S. aureus* está localizado en los cuartos de la glándula mamaria de la vaca y con frecuencia ocurre una transmisión horizontal de la bacteria entre el ganado durante la ordeña. que el patógeno ha causado un daño considerable al epitelio mamario, la patología suele complicarse por infecciones con microorganismos oportunistas (Sears y McCarthy, 2003).

2.2 Pérdidas económicas causadas por la mastitis bovina

La mastitis bovina es una patología reconocida mundialmente por causar pérdidas económicas tanto al productor como a la industria lechera (Watts *et al.*, 1995). El daño económico directo de la mastitis es debido a la disminución en el rendimiento de leche y un aumento en el número de tratamientos clínicos y desecho temprano de vacas (Cerón-Muñoz *et al.*, 2002). s tratada comúnmente con antibióticos intramamarios, representando una gran carga económica para los productores de leche en todo el mundo.

Las pérdidas mundiales anuales debido a la mastitis se han estimado en 35 billones de dólares americanos (Wellenberg *et al.*, 2002). En México, la presencia de la enfermedad arroja pérdidas económicas importantes. El promedio de gasto estimado por vaca en México es de \$1,700.00 a \$2,000.00 anuales (Wolter *et al.*, 2004). Es importante señalar que los estudios al respecto en el país están concentrados básicamente en los sistemas de producción intensivo y existe un gran desconocimiento respecto al impacto de la enfermedad en los sistemas de producción de pequeña escala.

2.3 Características de *Staphylococcus aureus*

S. aureus es el patógeno que con mayor frecuencia se aísla de casos de mastitis, llegando a representar un 70% de los (Kerro-Dego *et al.*, 2002). Pertenece a la familia Micrococcaceae, su morfología microscópica corresponde a cocos Gram positivos agrupándose en racimos, son anaerobios facultativos. En las placas de agar las colonias son lisas, opacas, redondas, convexas-bajas y de 1-4 mm de diámetro, el pigmento amarillo-dorado puede variar, así como la zona de β -hemólisis que se observa en agar sangre. Su distinción del resto de las especies de *Staphylococcus* se debe a los resultados positivos a la prueba de coagulasa (Lowy, 1998). Actualmente la identificación de esta bacteria se complementa con el análisis molecular de ADN mediante el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); para ello se utiliza frecuentemente la amplificación del gen *nuc* que codifica la termonucleasa producida por *S. aureus* (Depardieu *et al.*, 2004).

2.4 Resistencia antimicrobiana y mecanismo de acción de los fármacos

Los antimicrobianos son sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas, producidas por diversas especies de organismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos. Su empleo durante muchos años ha disminuido la mortalidad de las enfermedades infecciosas, pero no su prevalencia. Su uso indiscriminado e irracional ha provocado la selección de microorganismos resistentes a , debido al desarrollo de diferentes mecanismos, causando así la ineffectividad del fármaco y de la terapia (Goodman, 2003).

Los mecanismos de resistencia adquirida y transmisible son los más importantes, y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos, en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al o en la alteración del propio . Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado distintos mecanismos por diversas especies bacterianas (Goodman, 2003).

Se debe tener en cuenta que los antibióticos para poder actuar deben penetrar y por lo tanto ser capaces de llegar a la pared, a la membrana o a otras estructuras de la bacteria. Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo al sitio blanco de acción y el tipo de efecto metabólico que producen en la célula bacteriana: inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, alteración de la estructura de la membrana celular bacteriana, de la síntesis de proteínas o de la síntesis de ácidos nucleicos (Errecalde, 2004).

Las moléculas que atacan la pared celular bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis, interfiriendo principalmente en la formación de peptidoglucanos, que conduce a la lisis bacteriana por el defecto de la pared celular. Entre los fármacos que tienen esta acción se encuentran los β -lactámicos, como las penicilinas (penicilina, ampicilina, amoxicilina, dicloxacilina, carbenicilina y ticarcilina), las cefalosporinas (cefalotina, cefalexina, cefazolina, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima) y monobactamas y carbapenemes (Katzung, 2005).

Tabla. Sitios de acción de los fármacos.

Sitio de Acción	Fármaco
Pared Celular	β - lactámicos: penicilinas y cefalosporinas
Membrana Celular	Aminoglucósidos; Polimixina B
Síntesis de Proteínas	Subunidad 30S: Aminoglucósidos y tetraciclina Subunidad 50S: Macrólidos y Cloranfenicol
Síntesis de Ácidos Nucleicos	Ácido nalidíxico; Fluoroquinolonas

Las polimixinas (polimixina B y colistín) actúan a nivel de las membranas celulares causando su ruptura por un efecto surfactante, es decir, interfieren con la porción fosfolipídica de la membrana de las bacterias Gram negativas (Hayward y Griffin, 1994).

Los sitios blanco de los antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas pueden ser la subunidad ribosómica 30S o 50S. Las lincosamidas (clindamicina y lincomicina) y los macrólidos (eritromicina, azitromicina y claritromicina), actúan uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma de manera reversible e inhibiendo la

traslocación. El cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol también actúan en este nivel, pero inhibiendo la transpeptidasa, impidiendo así la formación de péptidos. Los aminoglucósidos (estreptomicina, neomicina, amikacina, kanamicina, tobramicina y gentamicina) se unen al ribosoma bacteriano en la subunidad 30S irreversiblemente, provocando que la lectura del mensaje contenido en el ARN sea equivocada y, en consecuencia, una síntesis de proteínas errónea. Las tetraciclinas inhiben de manera reversible la unión del ARNt (Ácido ribonucleico de transferencia) a los aminoácidos (Goodman, 2003; Katzung, 2005).

Las quinolonas (ácido nalidíxico) y fluoroquinolonas (pefloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina y norfloxacina) actúan inhibiendo la ADN girasa bacteriana, enzima que cataliza el superenrollamiento del ADN cromosómico que asegura una adecuada distribución del material genético durante la división (Katzung, 2005).

El trimetoprim y sulfametoxazol actúan al inhibir enzimas secuenciales que intervienen en la síntesis del ácido fólico bacteriano. El sulfametoxazol es estructuralmente parecido al ácido p-aminobenzoico (PABA) e inhibe de forma competitiva la formación del ácido fólico a partir del PABA. Por su parte, el trimetoprim se une a la enzima dihidrofolato reductasa, lo que impide la formación del ácido tetrahidrofólico a partir del dihidrofolato. El ácido tetrahidrofólico (THF) es la forma activa del ácido fólico sin el cual la bacteria no puede sintetizar timidina, lo que conduce a una interferencia en la síntesis de los ácidos nucleicos. Al actuar mediante estos dos mecanismos diferentes, la combinación trimetoprim-sulfametoxazol es sinérgica frente a un gran número de bacterias (Katzung, 2005).

El uso común de desinfectantes también ha promovido el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos (Bjorland *et al.*, 2001) Estos compuestos tienen un residuo hidrófobo que se balancea con un grupo hidrófilo con carga positiva (núcleo de amonio cuaternario). Cuando las bacterias se exponen a este tipo de agentes, el grupo con carga positiva se asocia con los grupos fosfato de los fosfolípidos de la membrana, mientras que la porción no polar penetra en el interior hidrófobo de la membrana. La distorsión resultante

provoca una pérdida de la semipermeabilidad de la membrana, entonces el puede penetrar en la célula y desnaturalizar sus proteínas (Joklik *et al.*, 1998).

La transferencia y consecuencias de la resistencia antimicrobiana en los patógenos y en bacterias comensales dentro de la población humana tienen diversas rutas potenciales (Figura 1).

2.5 Uso veterinario de agentes antimicrobianos

El uso veterinario de los antibióticos incluye a las mascotas, animales de granja e inclusive aquellos criados en acuicultura. En los animales de granja se utilizan en profilaxis y tratamiento, así como para ayudar en el crecimiento. Sin embargo, existen antibióticos aplicados en medicina tanto humana como veterinaria, y ellos son: penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucósidos, espectinomicina, lincosamida, macrólidos, nitrofuranos, nitroimidazoles, sulfonamidas, trimetoprim, polimixinas y quinolonas. Las principales enfermedades infecciosas tratadas en los animales son las entéricas y pulmonares, abscesos -en órganos y piel- y mastitis. La aplicación de antibióticos tanto en la agricultura como en veterinaria ha contribuido a la presión selectiva, reservorios resistentes y vías de transmisión de la resistencia (Teuber, 2001).

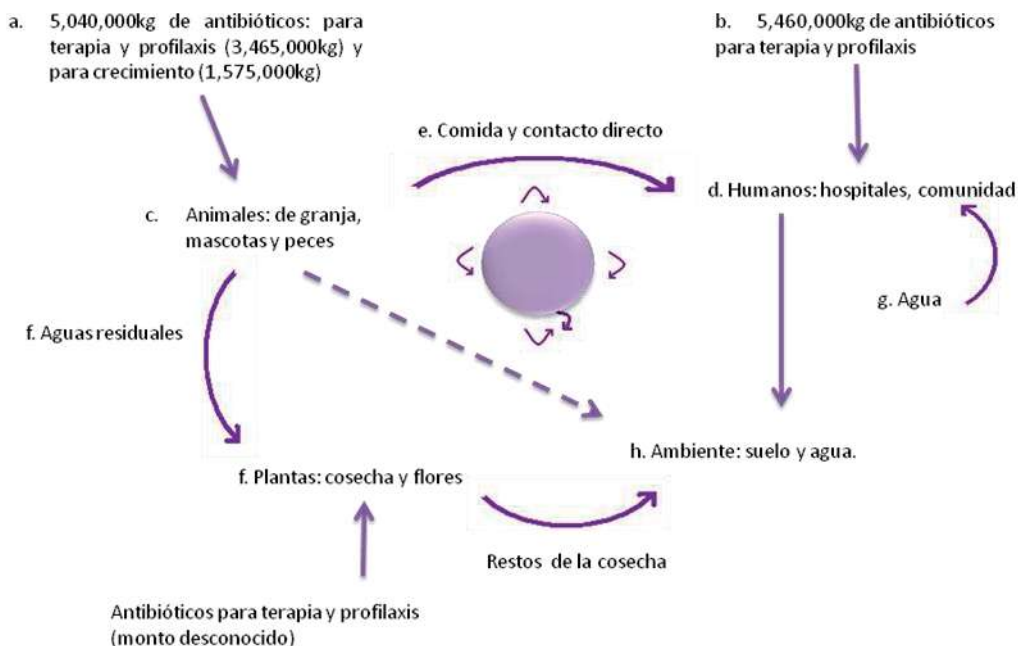


Figura . Modelo de distribución y transferencia de antibióticos, genes de resistencia a antibióticos y microbios en la biosfera, producido en 1997 por la Unión Europea y Suiza. La contaminación de la biosfera con antibióticos está representada por las flechas rectas, y el movimiento de la resistencia bacteriana y genes de resistencia están representados por las flechas curvas. El círculo en el centro simboliza el mundo microbiano en donde los genes de resistencia son transferidos entre diferentes microorganismos. El principal canal de entrada de los antibióticos a la biosfera es por medio de los tratamientos de animales y humanos. Las granjas y los hospitales son los campos cuantitativamente dominantes de entrada del modelo. La comida específica (hecha a base de carne cruda y leche) y el contacto directo inmediatamente enlazan la resistencia bacteriana en animales y humanos. La fertilización de las plantas con estiércol animal y las aguas residuales contaminan los vegetales con bacterias resistentes. animales y humanos arrojan antibióticos sin usar y bacterias resistentes al medio ambiente (ej. y tierra) (Tomado de Teuber, 2001).

En el caso particular de la mastitis bovina, en la actualidad hay una amplia gama de tratamientos de antibióticos, entre ellos están los siguientes: β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), aminoglucósidos (gentamicina, amikacina), macrólidos (eritromicina), tetraciclinas, quinolonas (ciprofloxacino) (Sumano *et al.*, 1996). Recientemente se ha autorizado el uso veterinario de una lincosamida, la clindamicina.

2.6 Resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina

La resistencia antimicrobiana es un problema cada vez más importante entre las especies bacterianas que causan infecciones en humanos y en animales. La complicación para algunas especies bacterianas es tan crítica que sólo hay pocas opciones disponibles de tratamiento (Hendriksen *et al.*, 2008). Los análisis de resistencia antimicrobiana de microorganismos asociados a mastitis en el ganado lechero se han enfocado esencialmente a *aureus*, por ser el principal agente causal de esta enfermedad (Turutoglu *et al.*, 2006).

Existe un gran número de trabajos que establecen de manera clara el incremento en de resistencia antimicrobiana en cepas de *S. aureus* a mastitis bovina a nivel mundial. En un análisis de la susceptibilidad antimicrobiana realizado con 811 aislamientos de *S. aureus* colectados en 11 países de Europa y

Estados Unidos, se detectó que los niveles de resistencia hacia antibióticos β -lactámicos se incrementaron de manera considerable, pasando del 18% reportado para estas zonas al 60% (de Oliveira *et al.*, 2000). Sin embargo, en este trabajo también se señala que uno de los problemas principales para el control de la emergencia de la resistencia es que los países no cuentan con políticas comunes de uso y registro de antimicrobianos para el control de la mastitis bovina. En este mismo sentido, en un estudio realizado en Turquía donde se evaluó la resistencia antimicrobiana de *S. aureus* aislados de muestras de leche de vacas con mastitis (de 1995 al 2004) se observó un 63.3% de resistencia hacia penicilina y ampicilina, y del 1.8% hacia trimetoprim - sulfametoxazol (Güler *et al.*, 2005). En este mismo país, pero en diferente región, se realizó otra investigación (del 2002 al 2004) que arrojó porcentajes de resistencia hacia penicilina, ampicilina, cefuroxima, trimetoprim-sulfametoxazol y gentamicina de 62.1%, 56.3%, 56.3%, 45.6% y 9.7%, respectivamente (Turutoglu *et al.*, 2006). Mientras que otro estudio realizado en 13 países europeos (del 2002 al 2004) mostró resistencia a penicilina en Holanda, Portugal, Italia, Dinamarca, Finlandia, Inglaterra, Suiza, Bélgica, Letonia y España, excepto en Francia, Noruega y Suecia (Hendriksen *et al.*, 2008). En este mismo estudio se reportó que la resistencia en España fue 0.9%.

El programa de monitoreo nacional en Alemania reveló, en un estudio realizado entre 1990-1994, un porcentaje de resistencia a penicilina y ampicilina del 38-57%. La resistencia mostrada a tetraciclina, kanamicina, neomicina y trimetoprim disminuyó durante este periodo y se detectó en menos del 15% de los aislamientos analizados en (Trolldenier, 1996). En Suiza se reportó resistencia a penicilina en el 14% de los aislamientos de *S. aureus*, solo el 5% fue sulfonamidas y el 3% a macrólidos y lincosamidas (Stephan *et al.*, 1999). En Dinamarca, la mitad de los del estudio fueron resistentes a sulfonamidas y un 25% a penicilina (Aarestrup y Jensen, 1998). En América Latina la situación no es diferente a lo reportado para Europa y Estados Unidos; en un estudio realizado en Brasil se observó una variación en resistencia a penicilina entre los aislamientos de *S. aureus*, fluctuó en el rango de 20 y 100% (Pereira y Siqueira-Junior, 1995). En Asia también se han reportado resistencias en *S. aureus* asociado a mastitis bovina; en China se

han porcentajes de resistencia hacia eritromicina, tilosina, lincomicina y clindamicina del 93.1%, 40.3%, 45.8% y 36.1%, respectivamente (Wang *et al.*,2008).

2.7 Antecedentes de evaluaciones de la resistencia antimicrobiana en la región lechera de Morelia, Michoacán

En México son escasas las evaluaciones de la resistencia en aislamientos bacterianos asociados a mastitis bovina. , se han realizado algunas investigaciones al respecto en la región de Morelia, Mich. Una investigación realizada por López-Meza *et al.* (2006) señala que en establos de traspatio del municipio de Tarímbaro, Mich. se observó un elevado porcentaje de resistencia a ampicilina, ceftazidima y dicloxacilina en aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de vacas lactantes con mastitis, mientras que éstos mostraron sensibilidad hacia cefalotina, cefuroxima y eritromicina. Otro estudio realizado por Ochoa-Zarzosa *et al.* (2008) que *S. aureus* es el principal agente causal de la mastitis subclínica en granjas de traspatio en Morelia, Mich., detectándose en aislamientos hacia los antibióticos del grupo de la penicilinas (ampicilina, penicilina, dicloxacilina y ceftazidima). Sin embargo, se observó sensibilidad hacia gentamicina, eritromicina y lincomicina, y no detectaron resistencia alguna hacia el detergente CTAB. No obstante, estos estudios se han realizado con colectas de hatos lecheros con diferentes grados de tecnificación, algunos con programas de control de la mastitis, pero la mayoría carente de ellos.

3. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad que genera las mayores pérdidas económicas en la ganadería lechera alrededor del mundo. a terapia antimicrobiana . . seis, ya que la fase de lactancia de una vaca raza Holstein es de aproximadamente 280 días y se pretende analizar a las vacas durante su periodo de lactancia

4. HIPÓTESIS

La resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en el hato lechero de La Posta es elevada y variable, debido a que infección es causada por más de una cepa de este microorganismo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en el hato lechero de La Posta de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, durante un período de seis meses.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer la incidencia de mastitis bovina clínica y subclínica en el hato lechero de La Posta, durante el periodo de septiembre de 2007 a febrero de 2008.
- Obtener una colección de aislamientos bacterianos asociados a mastitis bovina en el hato lechero de La Posta durante el periodo de evaluación.
- Identificar los aislamientos pertenecientes a *Staphylococcus aureus* dentro de la colección de aislamientos bacterianos asociados a mastitis bovina en el hato lechero de La Posta durante el periodo de evaluación.
- Determinar los patrones fenotípicos de resistencia en los aislamientos de *S. aureus* hacia un grupo de 12 antibióticos de relevancia veterinaria y humana.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta de muestras

Las muestras de leche se obtuvieron de vacas lactantes del hato lechero de La Posta, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo un sistema de producción semi-intensiva. vacas con manifestaciones subclínicas y clínicas de mastitis, así como de vacas sanas. El estudio se realizó por un período de seis meses, comenzando en septiembre de 2007 y terminando en febrero de 2008, realizando muestreos mensuales. Se analizaron 26 vacas, de las cuales 25 pertenecen a la raza Holstein y 1 a la Suiza.

La selección de la ubre de la vaca con mastitis, de la cual se obtuvieron las muestras, se realizó con ayuda de la PCT. Las muestras de las vacas sanas se escogieron de cuartos al azar. Antes de la toma de la muestra, se limpiaron las ubres con solución desinfectante (Zoolubac:). Se colectó la leche en tubos Falcon (15 ml) estériles y se almacenó a 4°C hasta su procesamiento (aproximadamente dos días).

Tabla 2. Interpretación de la Prueba de California (PC).

Interpretación*	
(-) NEGATIVOS	La mezcla permanece líquida, sin formación de precipitados, esta leche deberá contener de 50,000 – 200,000 células somáticas/mm ³ .
(+/-) DEBIL POSITIVO	Hay formación de un precipitado, sin la tendencia a la formación de un gel, si se mantiene el movimiento de rotación de la paleta por un poco más de tiempo, el precipitado puede desaparecer. Estas leches contienen regularmente de 200,000- 400,000 células somáticas/mm ³ .
(+) POSITIVAS Y FUERTE POSITIVAS	La mezcla se espesa inmediatamente con tendencia a formar gel, en las reacciones fuertemente positivas al formarse el gel se observa que la superficie de la mezcla es convexa y que la masa tiende a adherirse en el fondo de la paleta. Estas leches contienen arriba de 500,000 células/mm ³ .
(A) LECHES ALCALINAS	Las mezclas adquieren un fuerte color púrpura, en ocasiones muy intenso.

*Diagmastin-Laboratorios Sanfer, S.A. de C.V.

6.2 Reactivación de los aislamientos

La reactivación de los aislamientos se realizó a partir de los tubos de criocongelación mencionados en el apartado anterior, tomando una asada y sembrando por cuadrantes en cajas de Petri con agar LB. Se incubaron de 18 a 24 h a 37°C, y se observó el crecimiento en cada una de ellas. Posteriormente, se realizó el análisis microscópico para determinar si la morfología correspondía a la de *S. aureus* –cocos en racimos- y así poder continuar con la extracción de ADN.

6.3 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico bacteriano se llevó a cabo bajo la técnica de Pospiech y Neumann (1995). Primero se inoculó el caldo de cultivo (10 ml de medio LB) con una colonia del aislamiento bacteriano, luego se incubó 18 h a 37°C con agitación constante. Después se colectaron las células por centrifugación a 4,000 rpm durante 20 min, se resuspendieron en 600 µl de buffer SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 20 mM, pH 7.5). Posteriormente se adicionó lisozima (Sigma) para una concentración final de 1 mg/ml y se incubó por 1 h a 37°C. Se adicionó 1/10 de volumen de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10% y se incubó a 55°C por 2 h con agitación ocasional. A continuación se adicionó 1/3 de volumen de NaCl 5M y un volumen de cloroformo. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación frecuente. Se centrifugaron los tubos a 12,000 rpm por 15 min, luego se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos. El ADN se precipitó con un volumen de isopropanol frío, colocando la preparación por 5 min en hielo y el ADN se colectó por centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 200 µl de etanol frío al 70%, se dejó secando a temperatura ambiente. Se resuspendió el ADN en 200 µl de agua desionizada estéril, colocándolo 30 min a 55°C. Se revisó la integridad con ayuda de una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6.4 Limpieza de ADN con bromuro de etidio

6.5 La limpieza de ADN se realizó bajo la técnica de Stemmer *et al.* (1991). A una muestra de ADN inicial resuspendida en 200 µl de agua destilada y desionizada estéril, se le adicionaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), y

140 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló suavemente. Se agregaron 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min, obteniendo la separación de las fases, recuperando la fase acuosa (superior) en tubos Eppendorf nuevos. Posteriormente se adicionaron dos volúmenes de etanol frío y se dejó reposar en hielo por 5 min para obtener la precipitación de las hebras de los ácidos nucleicos. Luego se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm y se descartó el sobrenadante, cuidando que no se desprendiera la pastilla. Se adicionaron 200 µl de etanol frío al 70% para lavar la pastilla, eliminando el sobrenadante. Al final, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 200 µl de agua destilada y desionizada estéril. Se verificó la integridad del ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. **Identificación de los aislamientos**

La identificación de los aislamientos correspondientes a *S. aureus* se llevó a cabo por análisis molecular amplificando una región del gen *nuc* que codifica termonucleasa (Depardieu *et al.*, 2004). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Directo NUC5'SA 5'- GACTATTATTGGTTGATCCACCTG-3' (Invitrogen) y Reverso NUC3'SA 5'-GCCTTGACGAACTAAAGCTTCG-3' (Invitrogen), que amplifican un producto de 218 pares de bases (pb). Se utilizó como referencia la cepa certificada de *S. aureus* subsp. *aureus* (27543) aislada de un caso de mastitis clínica, obtenida de ATCC. Como control negativo se empleó agua en lugar de ADN en las reacciones.

6.5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación por PCR se llevó a cabo con 50 ng de ADN genómico (molde), el cual se mezcló con 2 µl de Buffer 10X (Tris-Cl 100 mM, KCl 500 mM); MgCl₂ 1.5 mM; 2 µl de dNTP's 2 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 1 µl de *Taq* ADN polimerasa cuya concentración fue de 1 U/µl y se adicionó agua destilada estéril hasta un volumen final de 20 µl. La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: para el paso inicial se usó una temperatura de 94°C por 3 min; posteriormente se realizaron 30 ciclos con el siguiente

programa: 1 min a 94°C para la desnaturalización del ADN, posteriormente 1 min a 54°C para el alineamiento de los oligonucleótidos, la extensión se llevó a cabo a 72°C durante 1 min. Al final se le dio una extensión de 7 min a 72°. Se revisó y analizó la integridad de los productos de PCR mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1%.

6.6 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

6.6.1 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a antibióticos

Una vez identificados los aislamientos de *S. aureus*, se realizaron las evaluaciones de susceptibilidad mediante el ensayo de difusión en disco; se sembró cada aislamiento en 2 ml de caldo LB, incubándolos a 37°C con agitación constante de 16 a 18 h; posteriormente se midió la absorbencia del cultivo con ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm, ajustando a una densidad óptica de 0.2, esto se realizó con caldo LB previamente esterilizado. De este cultivo se tomó una alícuota de 200 µl y se inoculó una caja de Petri con agar Mueller-Hinton (Bioxon, México), una vez que el inóculo se secó se procedió a colocar los sensidiscos para microorganismos Gram Positivos (Bio-Rad, México) con una pinza estéril. Se incubó a 37°C por 18 h. Después de este periodo se midieron los halos de inhibición y se determinaron los niveles de susceptibilidad según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 12 antibióticos para esta prueba (Tabla 3). Los aislamientos se clasificaron en Resistentes (R), Intermedios (I), Moderadamente Sensibles (MS) o Susceptibles (S), dependiendo del diámetro del halo de inhibición (incluyendo los 6 mm del disco). (Bjorland *et al.*, 2001) Se utilizó la cepa STA6 resistente a CTAB como control positivo.

Tabla 3. Antibióticos usados en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN µg	DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN* (mm)			
		R	I	MS	S
Ampicilina (AM)	10	≤28			≥29

Cefalotina (CF)	30	≤14	15-17	≥18
Cefotaxima (CTX)	30	≤14	15-22	≥23
Ceftazidima (CAZ)	30	≤14	15-17	≥18
Cefuroxima (CXM)	30	≤14	15-17	≥18
Dicloxacilina (DC)	1	≤10	11-12	≥13
Eritromicina (E)	15	≤13	14-17	≥18
Gentamicina (GE)	10	≤12	13-14	≥15
Pefloxacina (PEF)	5	≤14	15-16	≥17
Penicilina (PE)	10 U	≤28		≥29
Tetraciclina (TE)	30	≤14	15-16	≥19
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	25	≤10	11-15	≥16

6.6.2 *Multidiscos Gram Positivos- BioRad.Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a detergentes cuaternarios de amonio (CTAB)

Se cultivaron los aislamientos en cajas de Petri con agar LB previamente adicionado con el detergente CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio; SIGMA) en una concentración de 6 µg/ml se incubaron a 37°C por 24 h. Se consideraron resistentes aquellos aislamientos donde se observó crecimiento bacteriano en el detergente después de este periodo de cultivo.

RESULTADOS

7.1 Características del hato lechero de La Posta durante el periodo de evaluación

Se analizaron un total de 26 vacas lactantes, 25 de ellas pertenecientes a la raza Holstein y una a la raza Suiza, por un periodo comprendido desde septiembre de 2007 hasta febrero de 2008; se eligió este lapso de tiempo debido a que la fase de lactancia de una vaca Holstein es de aproximadamente 280 días y se pretendía analizar el mayor número de vacas lactando. No obstante, existió variación en cuanto a las vacas en estudio, sólo 14 de ellas se muestrearon todo el semestre, mientras que las 12 restantes fueron alternándose, como se muestra en la Tabla 4. A cada vaca se le asignó un código de identificación mediante un número y la inicial del mes. Las vacas que participaron durante todo el periodo de estudio correspondieron a los siguientes códigos: 1S, 2S, 4S, 5S, 7S, 8S, 9S, 10S, 12S, 13S, 17S, 18S, 19S, 21S y 22S. Mientras que las que se alternaron, ya sea porque dejaron de lactar o comenzaron a hacerlo, fueron: 3S, 6S, 11S, 14S, 15S, 16S, 20S, , , y .

7.2 Incidencia de mastitis bovina en el hato lechero de La Posta

Para diagnosticar la mastitis subclínica en el hato se realizó la Prueba de California (Diagmastin) a cada vaca durante el periodo de evaluación, la interpretación se llevó a cabo según las indicaciones del proveedor, como se describe en la Tabla 2. Cualquier cuarto de la ubre con el resultado de débil positivo, positivas y fuertes positivas, o leches alcalinas, fueron juzgadas como positivas para mastitis subclínica. Las vacas se consideraron como positivas para la Prueba de California, cuando al menos un cuarto dio positivo para dicho análisis. La mastitis clínica se diagnosticó en base a los signos visibles de inflamación, enrojecimiento y dolor al tacto.

Tabla 4. Relación de vacas muestreadas en el hato de la Posta Veterinaria, desde septiembre de 2007 hasta febrero de 2008.

CÓDIGO	NUM.	SEPT.	OCT.	NOV.	DIC.	ENE.	FEB.
1S	S/N	+	+	+	+	+	+
2S	20	+	+	+	+	+	+
3S	255	+	+	+	+	-	-
4S	272	+	+	+	+	+	+
5S	288	+	+	+	+	+	+
6S	429	+	+	-	-	-	-
7S	268	+	+	+	+	+	+
8S	259	+	+	+	+	+	+
9S	278	+	+	+	+	+	+
10S	279	+	+	+	+	+	+
11S	264	+	+	-	-	-	-
12S	260	+	+	+	+	+	+
13S	277	+	+	+	+	+	+
14S	280	+	+	+	-	-	-
15S	274	+	+	+	-	-	-
16S	283	+	+	+	+	-	-
17S	408	+	+	+	+	+	+
18S	16	+	+	+	+	+	+
19S	256	+	+	+	+	+	+
20S	287	+	+	-	-	-	-
21S	7	+	+	+	+	+	+
22S	261	+	+	+	+	+	+
23S	289	-	+	+	+	+	+
24S	4	-	-	-	-	+	+
25S	28	-	-	-	-	-	+
26S	301	-	-	-	-	-	+
Vacas analizadas por mes		22	23	20	18	17	19

+: vaca muestreada; - : vaca no muestreada

CT

Los resultados de la PC permitieron establecer que la incidencia de la mastitis subclínica fue superior al 38% durante todo el periodo, con una incidencia

del 68% al inicio y un 47% al final del mismo, llegando a ser mínima (38.88 %) en diciembre (ver Tabla).

Tabla . Incidencia de mastitis bovina durante el periodo del estudio.

Mes	Vacas analizadas por mes	% con mastitis subclínica*	% con mastitis clínica*	% de vacas sanas
Septiembre 2007	22	68.18 (15)	4.54 (1)	27.27 (6)
Octubre 2007	23	60.86 (14)	4.34 (1)	34.78 (8)
Noviembre 2007	20	45 (9)	5 (1)	50 (10)
Diciembre 2007	18	38.88 (7)		61.11 (11)
			0	
Enero 2008	17	41.17 (7)		58.82 (10)
			0	
Febrero 2008	19	47.36 (9)		52.63 (10)
			0	

* Entre paréntesis se indica el número de vacas con mastitis.

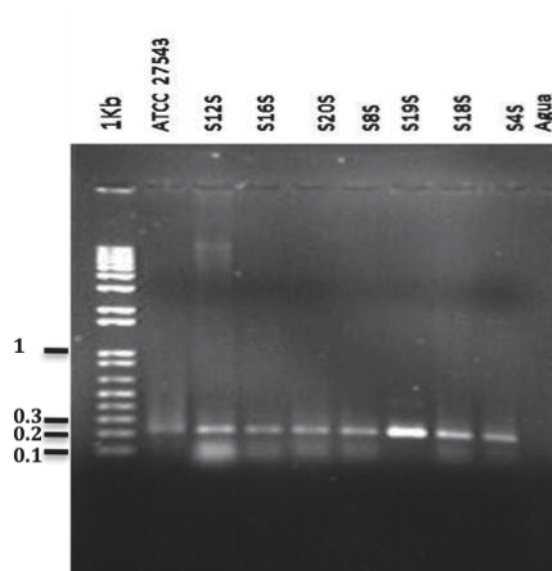
7.3 Colecta de las muestras y obtención de los aislamientos bacterianos

Con fines de obtener aislamientos bacterianos presentes en el hato lechero, se obtuvieron muestras de leche de las vacas que presentaron resultados negativos y positivos a la Prueba de California. Se obtuvieron 64 muestras de leche colectadas a partir de las vacas que dieron resultados positivos para la Prueba de California, y 55 provenientes de vacas sin mastitis. Para obtener el aislamiento preferencial de *Staphylococcus aureus* presentes en las muestras, éstas se inocularon en el medio selectivo de agar sangre. Posteriormente se seleccionaron las características morfológicas materiales y métodos.

7.3.1 Aislamientos bacterianos asociados a mastitis bovina y su identificación

64 muestras de leche provenientes de vacas con mastitis, se recuperaron 43 aislamientos bacterianos, 10 en septiembre, 10 en octubre, 7 en noviembre, 4

en diciembre, 6 en enero y 6 en febrero. De estos 43 aislamientos, se identificaron 39 pertenecientes a *S. aureus* por medio de PCR y la amplificación del gen *nuc* que codifica la termonucleasa producida por este microorganismo. En la figura 2 se muestra una fotografía representativa de la amplificación de esta región de ADN. Así, en el hato lechero de La Posta – FMVZ el 60% de los casos de mastitis probablemente son causados por *S. aureus* (Tabla 7). Los 4 aislamientos restantes (O8S, O11S, F2S y F13S) estudio al observarse una morfología bacilar



al microscopio. Se observa el producto de amplificación de 218 pb esperado para la región seleccionada. 1 kb= Marcador de tamaño molecular (1 kb ladder, Invitrogen); Agua= Control negativo de la reacción.

7.4 Análisis de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

En total se obtuvieron 50 aislamientos de *S. aureus* durante el periodo de evaluación, 39 a partir de las muestras de leche de vacas con mastitis y 11 de vacas sin mastitis. Los 50 aislamientos de *S. aureus* fueron sometidos a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a 12 antibióticos de uso humano y veterinario y un detergente (Tabla 8). Se identificaron 3 aislamientos (N8S, D9S y E4S) susceptibles a todos los antibióticos evaluados, mientras que se observaron 2 aislamientos bacterianos (S8S y S22S) con resistencia hacia todos los antimicrobianos usados en el estudio; sólo un aislamiento (N15S) fue resistente a

un antibiótico (pefloxacina) y los 46 restantes presentaron resistencia a dos o más antimicrobianos.

Se observó sensibilidad hacia gentamicina por parte de 46 aislamientos; sólo los aislamientos N8S, N15S, D9S y E4S fueron sensibles a la penicilina (8%), y únicamente los aislamientos S8S, S22S y O20S (6%) mostraron resistencia hacia trimetoprim–sulfametoxazol. Finalmente, 7 aislamientos (14%) presentaron patrones de resistencia a pefloxacina y 8 (16%) a tetraciclina. TT

Tabla 8. Patrones de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

PATRÓN	FENOTIPO DE RESISTENCIA												
1	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM	CTX	TE	PEF	SXT	GE	
2	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM	CTX	TE		SXT		
3	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM	CTX	TE	PEF			
4	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM	CTX		PEF			
5	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM		TE	PEF			
6	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM	CTX	TE				
7	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM		TE				
8	PE	DC	E	AM	CF	CAZ	CXM	CTX					
9	PE	DC	E	AM		CAZ	CXM	CTX					
10	PE	DC	E	AM		CAZ							
11	PE	DC	E	AM			CXM						
12	PE	DC	E	AM	CF								

13	PE	DC	E		CAZ	
14	PE	DC	E	AM		
15	PE	DC	E			TE
16	PE	DC	E		CF	
17	PE	DC		AM		
18	PE	DC	E			
19	PE	DC				
20	PE	DC			CF	
21	PE			AM		
22	PE		E			
23						PEF
24						

AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; PEF-pefloxacina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ- ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

FFTabla 9. Relación de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* y los patrones de resistencia antimicrobiana.

PATRÓN	 AISLAMIENTOS
1	S8S, S22S
2	O20S
3	S9S
4	S4S, S17S
5	S16S
6	S18S
7	S14S

8	S7S, S12S, S20S, O7S, O21S
9	D8S, E22S
10	E8S, F19S
11	F13S
12	F24S
13	N5S
14	S19S, O4S, N21S, D3S, D7S, D19S, E7S, E19S, F4S, F21S, F25S
15	O3S
16	D12S
17	O18S, O19S, N19S, N22S, D21S
18	O23S, N18S
19	N4S, E17S
20	E21S
21	E18S
22	F7S
23	N15S
24	N8S, D9S, F4S

7.4.1 Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de *S. aureus* colectados en cada mes durante el periodo de evaluación

Durante el mes de septiembre de 2007 se identificaron 12 aislamientos de *S. aureus*, de las cuales el 100% presentó resistencia hacia ampicilina, penicilina, dicloxacilina y eritromicina; y sólo 2 aislamientos (16%) fueron resistentes a gentamicina y trimetoprim–sulfametoxazol (figura 3).

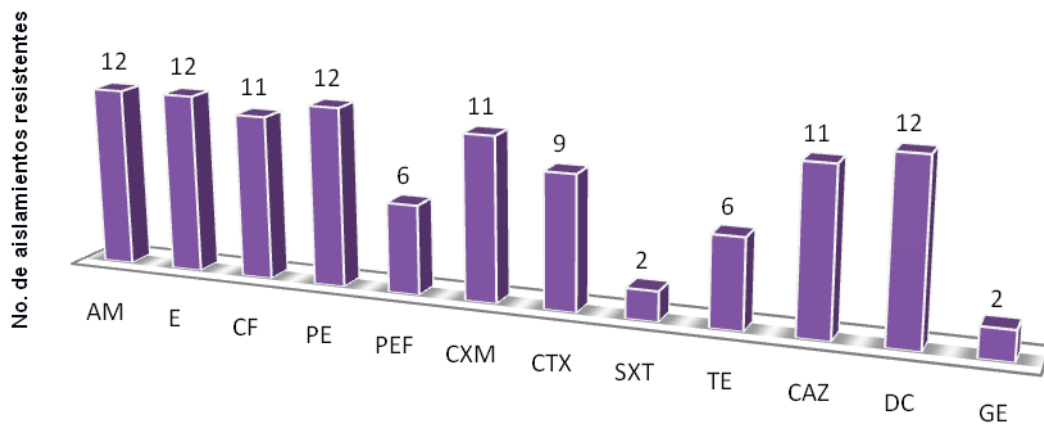


Figura 3. Antibiograma realizado a los doce aislamientos de *S. aureus* colectados en septiembre de 2007. AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; PEF-pefloxacina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ-ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

En octubre de 2007 se obtuvieron 8 aislamientos de *S. aureus*, los cuales mostraron resistencia hacia penicilina (100%), dicloxacilina (87%) y ampicilina (15%). Mientras que todos fueron sensibles a gentamicina y pefloxacina, sólo 1 (12%) presentó resistencia hacia trimetoprim-sulfametoxazol (figura 4).

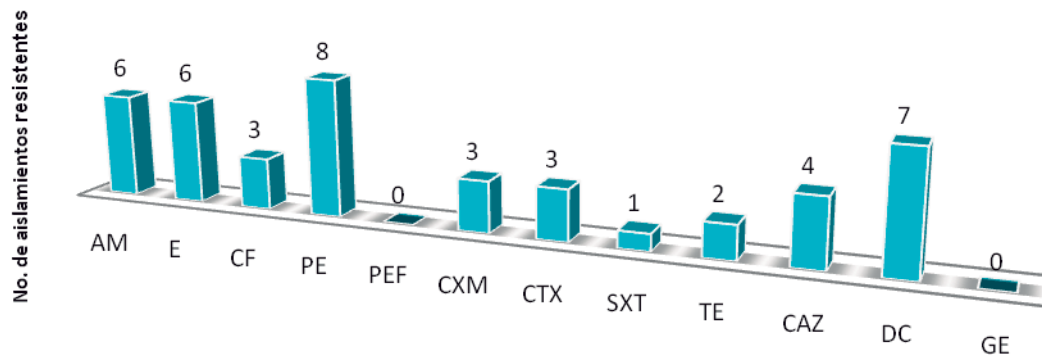


Figura 4. Antibiograma realizado a los ocho aislamientos de *S. aureus* colectados en octubre de 2007. AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; PEF-pefloxacina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ- ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

En noviembre de 2007 se identificaron 8 aislamientos de *S. aureus*, de los cuales el 100% mostró sensibilidad a cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, trimetoprim–sulfametoxazol, tetraciclina y gentamicina. Seis de estos aislamientos (75%) presentaron resistencia a penicilina y dicloxacilina (Figura 5).

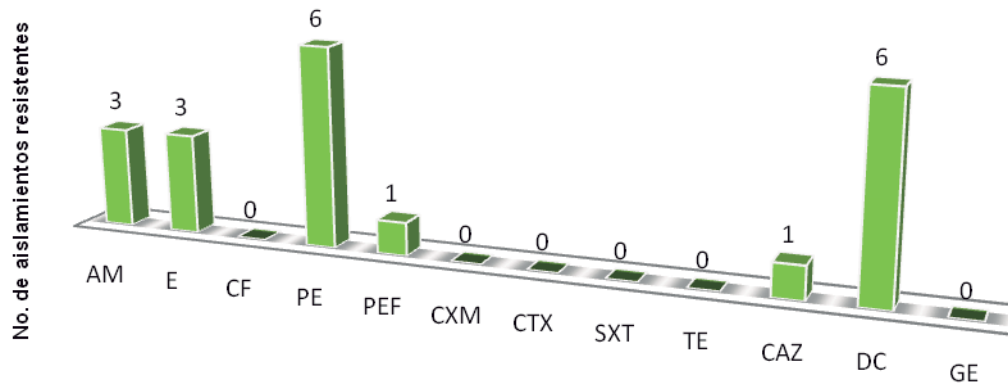


Figura 5. Antibiograma realizado a los ocho aislamientos de *S. aureus* colectados en noviembre de 2007. AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; PEF-pefloxacina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ- ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

En el mes de diciembre de 2007 se obtuvieron 7 aislamientos de *S. aureus*, presentando un alto índice de resistencia hacia ampicilina (71%), penicilina (85%), dicloxacilina (85%) y eritromicina(71%); todos los aislamientos fueron sensibles a pefloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y gentamicina (Figura 6). F

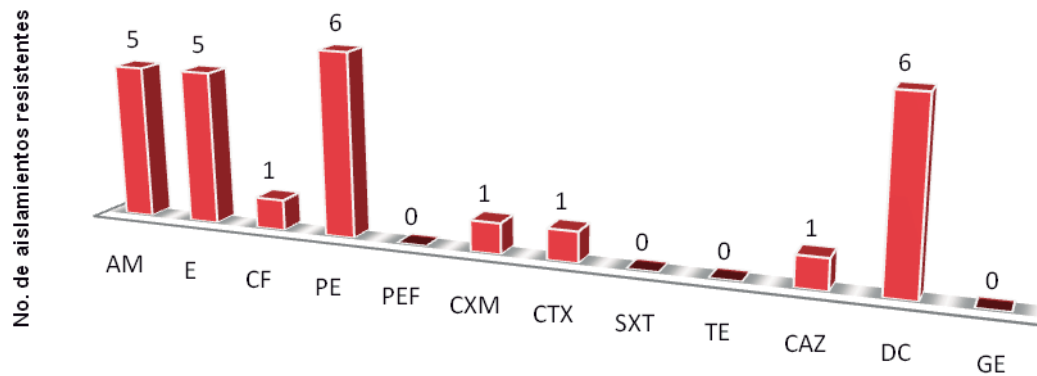


Figura 6. Antibiograma realizado a los siete aislamientos de *S. aureus* colectados en diciembre de 2007. AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; PEF-pefloxacina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ-ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

Se logró identificar 8 aislamientos como *S. aureus* en las muestras colectadas en enero de 2008, de los cuales todos mostraron sensibilidad a pefloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol y gentamicina. 7 aislamientos (87%) presentaron resistencia a penicilina, y 5 (62%) a dicloxacilina y ampicilina (figura 7).

ocho En febrero de 2008 se obtuvieron 7 aislamientos bacterianos identificados como *S. aureus*, donde todos mostraron resistencia a eritromicina, penicilina y dicloxacilina. Ningún aislamiento presentó resistencia a pefloxacina, cefotaxima, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina y gentamicina (Figura 8).

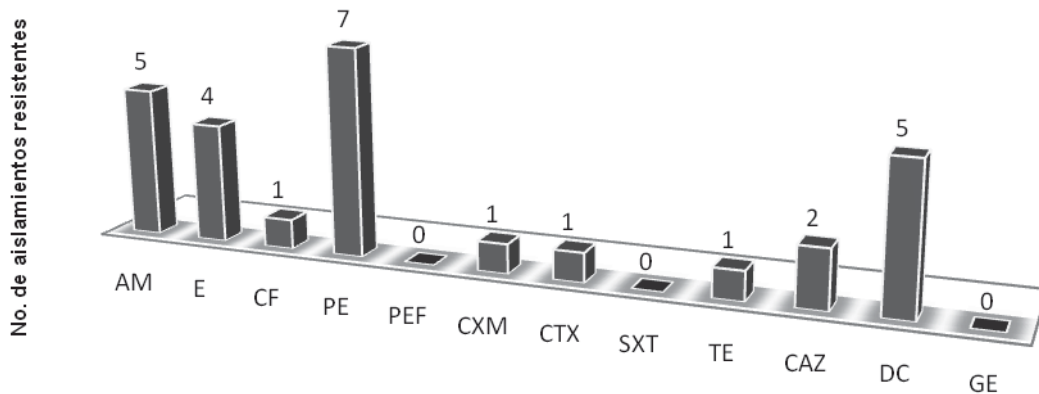


Figura 7. Antibiograma realizado a los aislamientos de *S. aureus* colectados en enero de 2008. AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; PEF-pefloxacina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ- ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

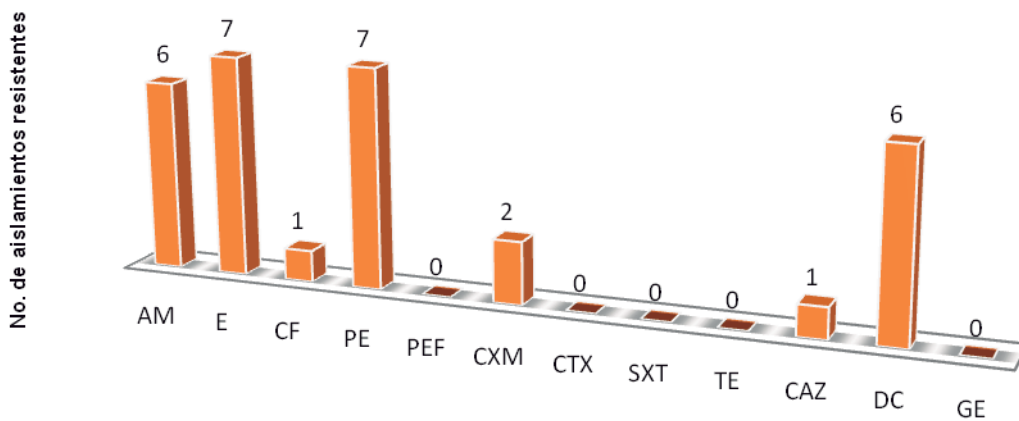


Figura 8. Antibiograma realizado a los siete aislamientos de *S. aureus* colectados en febrero de 2008. AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; PEF-pefloxacina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ- ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

Un análisis global de la resistencia antimicrobiana por grupo de antibiótico evaluado arrojó los siguientes resultados. Se presentó un 58% de resistencia hacia los antibióticos β -lactámicos: los aislamientos de *S. aureus* mostraron un índice alto de resistencia (84%) hacia el grupo de las penicilinas, en tanto hacia los antibióticos del grupo de las cefalosporinas éste fue de 33%. Mientras que hacia los macrólidos (eritromicina), tetraciclinas, quinolonas (pefloxacina), trimetoprim-sulfametoxazol y aminoglucósidos (gentamicina) fue de 74%, 16%, 14%, 6% y 4%, respectivamente.

Un análisis general de la resistencia antimicrobiana de los 50 aislamientos de *S. aureus* por antibiótico evaluado durante el periodo se muestra en la Figura 9. Se observaron índices de resistencia de 92%, 86% y 74% a penicilina, dicloxacilina y ampicilina, respectivamente. Mientras que la resistencia mostrada hacia cefalotina y cefuroxima fue de 34%, a cefotaxima del 28% y a ceftazidima del 38%. También se obtuvo un alto índice de resistencia (74%) a eritromicina. Los aislamientos fueron principalmente sensibles a gentamicina (92%), trimetoprim-sulfametoxazol (88%), tetraciclina (72%) y pefloxacina (50%).

Es importante señalar que en el análisis de los resultados no se incluyeron los valores de los porcentajes de aislamientos con resistencia intermedia, con el fin de facilitar el análisis.

7.5 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a detergentes

Todos los aislamientos de *S. aureus* fueron susceptibles a bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) a una concentración de 6 μ g/ml.

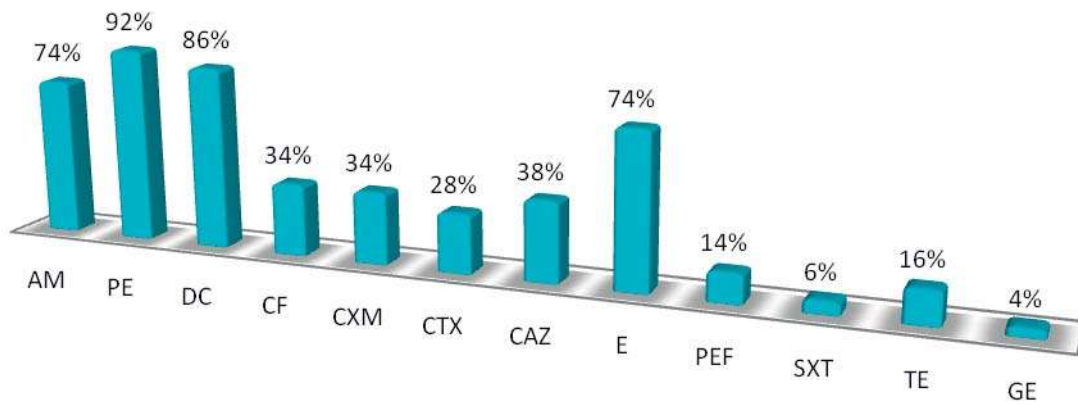


Figura 9. Análisis general de la resistencia antimicrobiana en los 50 aislamientos de *S. aureus* (Septiembre 2007-Febrero 2008). AM- ampicilina; E-eritromicina; CF-cefalotina; PE-penicilina; CXM-cefuroxima; CTX-cefotaxima; SXT-trimetoprim-sulfametoxazol; TE-tetraciclina; CAZ- ceftazidima; DC-dicloxacilina y GE-gentamicina.

8. DISCUSIÓN

La mastitis es la enfermedad con más alta prevalencia en el ganado bovino lechero y es responsable de pérdidas financieras severas a nivel mundial, por la disminución en la calidad y la producción de leche. La mayoría de los daños son atribuidos a la presentación subclínica de la enfermedad, que solamente es detectable con el empleo de pruebas diagnósticas aplicadas a la leche (Bramley 1992).

En este estudio se observó que el porcentaje de incidencia de la mastitis subclínica fue variable a través de los meses de evaluación, disminuyendo de un 68% al inicio del estudio hasta un 47% al final del mismo. Una explicación de la disminución de los valores de la incidencia, puede ser una consecuencia de la estrategia de control de la mastitis en el hato, debido a que se inicio un tratamiento con antibióticos por vía intramamaria a base de cefalexina y cefapirina, ambos pertenecientes al grupo de las cefalosporinas de primera generación.

La prevalencia de mastitis subclínica durante los seis meses de análisis fue de 51%, la cual es mayor que la reportada (29%) en la misma región (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008). Hay que señalar que el estudio de Ochoa-Zarzosa y col., se realizó en diferentes hatos lecheros y con heterogeneidad en el ganado que los conformaba (vacas raza Holstein y criollas) de este trabajo (vacas Holstein). Mientras que durante el semestre se obtuvo una incidencia de mastitis clínica del 2.52%, que concuerda con los resultados (2.75%) arrojados en un estudio realizado a vacas Holstein explotadas bajo el sistema de producción lechera en pequeña escala en la población de Tétraro, Municipio de Tarímbaro, Mich. (Bedolla-Cedeño *et al.*, 2006), así como los obtenidos en estudios mundiales (3.2%) (Getahun *et al.*, 2008).

Se obtuvieron 64 muestras de leche provenientes de vacas con mastitis, de donde se lograron recuperar 43 asilamientos bacterianos, de los cuales 39 fueron identificados como *S. aureus* (60%). Este resultado coincide con reportes previos que señalan que esta bacteria es responsable de más del 70% de los casos de

mastitis bovina (Getahun *et al.*, 2008; Ochoa-Zarsoza *et al.*, 2008). Por otra parte, se obtuvieron 45 muestras de leche obtenidas a partir de vacas sanas, es decir, que arrojaron resultados negativos a la Prueba de California, de las cuales se recuperaron 18 aislamientos, y 11 de ellos se identificaron como *S. aureus*. Este resultado no es extraño debido a que *S. aureus* es un patógeno oportunista y puede estar presente en el animal sin llegar a ocasionar la enfermedad solo hasta que existan factores que lo favorezcan (Kerro-Dego *et al.*, 2002).

La terapia antimicrobiana juega un rol fundamental en el control de la mastitis, reduciendo los niveles de la infección y previniendo su aparición. Se recomienda el uso de antimicrobianos para el tratamiento de la mastitis bovina en casos agudos, sub-agudos y recurrentes, así como en programas de control de esta enfermedad (Costa *et al.*, 2000). A menudo se ha empleado una amplia gama de antimicrobianos en forma indiscriminada e inapropiada, que conducen a la disminución de su eficacia y a que la infección se agrave; este uso indebido ha provocado que la resistencia microbiana aumente (Susamo y Ocampo, 1992).

Esta investigación arrojó un índice de resistencia de 50% por parte de los aislamientos de *S. aureus* hacia los antibióticos β -lactámicos, lo cual concuerda con los valores reportados (60%) en un estudio realizado en 11 países europeos y en Estados Unidos (de Oliveira *et al.*, 2000). En este estudio se detectó, de manera general, un alto índice de resistencia (84%) a los antibióticos de la familia de las penicilinas. Estos valores se pueden explicar debido a que en el hato lechero de La Posta, donde se realizó este estudio, han sido usados frecuentemente los antibióticos de la clase de las penicilinas para el control de la mastitis, lo cual ha expuesto a las bacterias a una alta presión de selección que probablemente ha conducido al desarrollo de la resistencia bacteriana. Sin embargo, se observó variación en cuanto a los índices de resistencia mostrada por parte de los aislamientos bacterianos hacia ampicilina (74%), penicilina (92%), dicloxacilina (86%) y ceftazidima (38%); estos índices son menores respecto a lo reportado en estudios previos (López-Meza *et al.*, 2006; Ochoa-Zarsoza *et al.*, 2008). En este mismo sentido, una investigación realizada con aislamientos de *S.*

aureus colectados en Turquía reporta índices de resistencia hacia penicilina (62.1%) y ampicilina (56.3%) que son menores a los arrojados en este estudio (Turutoglu *et al.*, 2006). De acuerdo a los índices de resistencia encontrados en este trabajo para los antibióticos de la familia de las penicilinas, es evidente que estos no son la opción para el control de la mastitis en el hato lechero de La Posta. No obstante, existen países europeos donde la penicilina todavía es una opción viable para el tratamiento de esta enfermedad, ya que el porcentaje de resistencia hacia este fármaco es poco: del 14% en Suiza (Stephanet *et al.*, 1999) y del 25% en Dinamarca (Aarestrup y Jensen, 1998).

El índice de resistencia de los aislamientos mostrado hacia las cefalosporinas fue de 33%. Esto difiere con respecto a los valores reportados para aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis en España (0.9%) (Hendriksen *et al.*, 2008). Asimismo, se detectaron porcentajes de susceptibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol del 88%, y se presentó un 34% de resistencia a cefalotina, 34% a cefuroxima y un 28% a cefotaxima. Estos resultados son similares a los arrojados por evaluaciones previas en la región donde se encontró un índice de resistencia del 29%, 29% y 35% hacia cefalotina, cefotaxima y cefuroxima, respectivamente (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008). Los índices encontrados para eritromicina (74%), pefloxacina (14%), tetraciclina (16%) y gentamicina (4%), mostraron un aumento con respecto a estudios previos (López-Meza *et al.*, 2006; Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008). El índice de tetraciclina es similar al reportado en un estudio de 4 años realizado en Alemania, donde los aislamientos de *S. aureus* presentaron valores de 15% (Trolldenier, 1996). En China, un estudio realizado con aislamientos de *S. aureus* colectados de casos de mastitis arrojó valores de resistencia a eritromicina del 93% (Wang *et al.*, 2008), existiendo una diferencia apreciable con el porcentaje (74%) de este estudio.

En la industria lechera se usan detergentes con acción bactericida derivados de compuestos cuaternarios de amonio, como el cloruro de benzalconio o el CTAB, para desinfectar los utensilios y maquinaria empleada en esta área. Este uso ha tenido como consecuencia el desarrollo de resistencia hacia estos

detergentes por parte de aislamientos de *S. aureus* (Bjorland *et al.*, 2001). Las pruebas de susceptibilidad realizadas a los 50 aislamientos bacterianos de *S. aureus* mostraron que todos ellos son sensibles a concentraciones superiores de 6 µg/ml de CTAB. Esto se debe probablemente a que en el hato lechero de La Posta se utiliza un antiséptico a base de ácido láctico (al 8%) para limpiar la ubre de la vaca, otro constituido por cloro activo (al 5%) y por ácido fosfórico (al 40%) con ácido sulfúrico (al 5%) para asear la máquina de ordeño, por lo cual las bacterias no han sido expuestas a la presión de selección.

El monitoreo de la resistencia antimicrobiana entre los aislamientos bacterianos de las vacas lactantes es significativo para el establecimiento de los perfiles de resistencia, los cuales son convenientes conocer para observar la diversidad de las cepas causantes de mastitis así como para identificar la multiresistencia que presentan los aislamientos y establecer una terapia adecuada. En el presente estudio la mayoría de los aislamientos de *S. aureus* son fenotípicamente resistentes a múltiples antimicrobianos. En los 50 aislamientos bacterianos de *S. aureus* se observaron 24 patrones fenotípicos de resistencia, lo cual puede llevar a suponer que son al menos 24 cepas distintas las causantes de la mastitis en el hato lechero de La Posta – FMVZ. Sin embargo, no podemos concluir esta aseveración ya que se necesitaría realizar el perfil genotípico de cada cepa para descartar equivocación alguna. Esta variabilidad de patrones de resistencia puede deberse al resultado de mutaciones cromosómicas, por expresiones inducidas de un gen cromosómico latente o por intercambio de material genético mediante eventos de transformación (captación de ADN, e incorporación del mismo, que está en el ambiente, hacia el genoma del huésped), transducción (por medio de un bacteriófago) o conjugación (transferencia de genes por contacto directo a través de un pelo sexual). Estos eventos se han caracterizado ampliamente en las bacterias; por ejemplo, la transducción es un evento importante en la transferencia de la resistencia antimicrobiana en cepas de *S. aureus*; así como la transformación es la base molecular de la resistencia a penicilina en neumococos y *Neisseria*, o bien la conjugación, que permite la transferencia de ADN plasmídico, es común entre *Enterobacteriaceae*,

Pseudomonas y especies anaerobias (Neu, 1992; Goodman, 2003). Adicionalmente, (*blaZ*) El desarrollo de la resistencia antimicrobiana hacia las fluoroquinolonas (PEF) se ha dado como resultado de mutaciones cromosómicas espontáneas, en donde se altera el punto diana del fármaco, afectando la topoisomerasa IV o DNA girasa, o por la inducción de una bomba de expulsión de fármacos. Existen reportes donde se indican que el gen que codifica para la β -lactamasa es parte de un transposón localizado en un plásmido que frecuentemente está constituido por genes de resistencia antimicrobiana (a gentamicina y eritromicina) (Lowy, 2003). También se debe considerar la transferencia horizontal de genes entre las bacterias, la cual ocurre principalmente por medio de eventos de transformación, conjugación y competencia (López-Meza *et al.*, 2006).

9. CONCLUSIONES

El principal agente etiológico de la mastitis bovina en el hato lechero de La Posta – FMVZ fue *Staphylococcus aureus*. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana mostraron que los aislamientos bacterianos de *S. aureus* tienen múltiples y variados patrones de resistencia, lo que indica que existe diversidad de cepas causantes de la mastitis en el hato lechero de La Posta – FMVZ. Se detectó un alto índice de resistencia hacia los fármacos del grupo de las penicilinas, mientras que se observó un bajo índice de resistencia hacia trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, pefloxacina y gentamicina. Estos últimos fármacos pueden constituir una buena opción como terapia antimicrobiana para combatir la mastitis en el hato.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

éA..

1. e.A Review. **Aarestrup**, F.M. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96 (4): 271–281.
2. **Aarestrup**, F.M. y Jensen, N.E. 1998. Development of penicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. *Microb. Drug Resist.* 4: 247-256.
3. **Armenteros**, A., Peña, J., Pulido, J.L. y E. Linares. 2002. Caracterización de la situación de la mastitis bovina en rebaños de lechería especializada en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 24 (2): 99-105.
4. **Bedolla-Cedeño**, C., Mejía-Afaro, R., Pérez-Contreras, J.G., Valdivia-Vázquez, O., Castañeda-Vázquez, H. y Wolter, W. 2006. Prevalencia de mastitis clínica en el ganado lechero de Tejaro, Municipio de Tarímbaro, Michoacán. *Avances de la Investigación Científica en el CUCBA.* 726-730 p.
5. **Bjorland**, J., Steinum, T., Sunde, M., Waage, S. y E. Heir. 2001. Plasmid-borne smrgene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3999-4004.
6. **Bramley**, A.J. 1992. Mastitis. En: Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boy, D.H. y Eddy, R.G. *Diseases and husbandry of cattle.* Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, U.K. 280-300 p.
7. **Cerón-Muñoz**, M., Tonhati, H., Duarte, J., Oliveira, J., Muñoz-Berrocal, M. y Jurado-Gámez, H. 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85: 2885-2889.
8. **Costa**, E.O., Benites, N.R., Guerra, J. L. y Melville, P.A. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J. Vet. Med.* 47: 99 – 103.

9. **De Oliveira**, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A. y Aarestrup, F.M. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* 83: 855-862.
 10. **Depardieu**, F., Perichon, B. y Courvalin, P. 2004. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5857–5860.
 11. **dos Santos**, J.N., Netto dos Santos, K.R., Gentilini, E., Sordelli, D. y de Freire Bastos, M.C. 2002. Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 85: 133 -144.
 12. **Errecalde**, J.O. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. FAO Producción y Sanidad Animal. Roma, Italia. 67 p.
- Field**, T.R., Ward, P.N., Pedersen, L.H., James, A. y Leigh, J.A. 2003. The hyaluronic acid capsule of *Streptococcus uberis* is not required for the development of infection and clinical mastitis. *Infection and Immunity.* 71 (1): 132-139.
- Getahun**, K., Kelay, B., Bekana, M. y Lobago, F. 2008. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. *Trop. Anim. Health. Prod.* 40: 261-268.
- Goodman**, A. 2003. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol. II. 10ma Edición. México, D.F. McGraw-Hill Interamericana ed. 2150 p.
- Güler**, L., Ok, U., Gunduz, K., Gulcu, Y. y Hadimli, H.H. 2005. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J. Dairy Sci.* 88: 3149–3154.
- Halasa**, T., Huijps, K., Osteras, O. y Hogeveen, H. 2007. Economics effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Quaterly.* 1: 18-31.
- Hayward**, C. y Griffin, G. 1994. Antibiotic resistance: the current position and the molecular mechanism involved. *Br. J. Hosp. Med.* 52: 473-478.
- Hendriksen**, R.S., Mevius, D.J., Schroeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Franco, A., Utinane, A., Amado, A., Moreno, M, Greko, C., Stärk, K., Berghold, C., Myllyniemi, A-L., Wasyl, D., Sunde, M. y Aarestrup, F.M. 2008. Prevalence of

antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Vet. Scand.* 50: 1-10.

Horter, P. y Seegers, H. 1998. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Reviem Prev. Vet. Med.* 37: 1-20.

Joklik, W.K., Willett, H.P., Amos, D.B., y Wilfret, C.M. 1994. *Zinsser Microbiología*. 20a Edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana. 1696 p.

Katzung, B.G. 2005. *Farmacología básica y clínica*. 9a Edición. México, D. F. Editorial El Manual Moderno. 1152 p.

Kerro-Dego, O., Van Dijk, J.E. y Nederbragt, H. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *A Review. Vet. Q.* 24: 181-198.

López-Meza, J.E., Higuera-Ramos J.E., Ochoa Zarzosa, A., Chassin-Noria, O., Valdez-Alarcón, J.J., Bravo-Patiño, A. y Baizabal-Aguirre, V.M. 2006. Molecular characterization of *Staphylococcus* spp. isolates associated with bovine mastitis in Tarímbaro, Michoacán, México. *Tec. Pec. Méx.* 44: 91-106.

Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339: 520-532.

Lowy, L.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111(9): 1265–1273.

Neu, H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science.* 257: 1064-1073.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Monitoring of antimicrobial resistance. Report of an Intercountry Workshop Vellore, Tamil Nadu, India. 14 – 17 October.

Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Lara, P.D., Torres-Rodríguez, F., Loeza-Ángeles H., Mascot-Chiquito, N., Sánchez-Baca, S. y López-Meza, J.E. 2008. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek.* 94: 199- 206.

Pereira, M.S. y Siqueira-Junior, J.P. 1995. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 391-395.

Pospiech, A. y Neumann, B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11:217-218.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. y Lagacé, J. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2584-2589.

13. **Romero**, A.T. 2004. Situación actual de la mastitis en México. Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. México D. F. 122-134 p.

14. **Rossitto**, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Ruiz, K., Watts, J. L. y Cullor, J.S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J. Dairy Sci.* 85: 132-138.

15. **Schrick**, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H. y Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84: 1407-1412.

16. **Sears**, P.M., y McCarthy, K.K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. Food Anim.* 19: 171-185.

17. **Srinivasan**, V., Gillespie, B.E., Lewis, M.J., Nguyen, L.T., Headrick, S.I., Schukken, Y.H. y Oliver, S.P. 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* 124: 319-328.

18. **Stephan**, R., Dura, U. y Untermann, F. 1999. Resistance situation and enterotoxin production capacity of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis milk samples, Schweiz. Arch. Tierheilkd. 141: 287-290.

19. **Stemmer**, W.P.C. 1991. A 20-minute ethidium bromide/high salt extraction protocol for plasmid DNA. *Biotechniques.* 10: 726.

20. **Sumano**, L.H., Brumbaugh, G.W. y T.G. Mateos. 1996. Bases farmacológicas del tratamiento de la mastitis bovina. *Vet. Méx.* 27: 63-81.

21. **Susamo**, H. y Ocampo, L. 1992. Pharmacological basis for treatment of bovine mastitis- review. *Int. J. Vet. Med.* 47: 127-235.

22. **Teuber**, M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 493-499.

23. **Trolldenier**, H. 1996. Development of resistance in infectious agents of agricultural animals in Germany (1990–1994) – a review [in German]. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 103: 256- 260.
24. **Turutoglu**, H., Ercelik, S. y Ozturk, D. 2006. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 50: 41-45.
25. **Wang**, Y., Wu, C. M., Lu, L. M., Na Ren, G. W., Cao, X. Y. y Shen, J.Z. 2008. Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. Vet. Microbiol. 130: 118-125.
26. **Watts**, J.L., Salmon, S.A., Yancey, R.S., Niclerson, S.C., Weaver, L.J., Hoemberg, C.J., Pankey, W. y L.K. Fox. 1995. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mastitis glands of dairy heifers. J. Dairy Sci. 78: 1637-1648.
27. **Wellenberg**, G. J., van der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Vet. Microbiol. 88: 27-45.
28. **Wolter**, W., Castañeda, H., Kloppert, B., y Zschock, M. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Mastitis Bovina. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16, 62-72.