

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**DETERMINACIÓN DE AGENTES PATÓGENOS QUE PROVOCAN MASTITIS
BOVINA EN ESTABLOS LECHEROS DE BAJA CALIFORNIA.**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

MVZ. JENNIFER BRISUELA RAYGOSA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

AGOSTO 2014

COMITÉ ASESOR

Determinación de agentes patógenos que provocan mastitis bovina en establos lecheros de Baja California. Tesis presentada por la MVZ. Jennifer Brisuela Raygosa como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias veterinarias.

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto.

DIRECTOR

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez

ASESOR

Dra. Sawako Oshima.

ASESORA

M.C. Lourdes Carolina Pujol Manríquez

ASESORA

Mexicali, Baja California., México

Agosto de 2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi director de tesis Gerardo Medina Basulto por aceptarme como tutorada, por su apoyo incondicional, por brindarme un poco de su sabiduría y orientarme durante la realización de este proyecto.

A mis asesores de tesis por ayudarme en todo lo que necesité y ofrecerme un poco de todos sus conocimientos.

A mis profesores Gerardo Medina, Sawako Oshima, Gilberto Valencia, Alberto Barreras, Carolina Pujol, Luis Tinoco y Martín Montaña que en cada materia conferida se empeñaron a que aprendiera lo que me servirá en mi presente y mi futuro.

A mis compañeros de posgrado Javier Palacios, Fernanda Bermúdez, Elizama Ponce, José Luis Rodríguez, Tomas Cárdenas, Gerardo Felipe, José A. Aguilar, Paola Gómez, José A. Guzmán y aún faltan más; que muchos de ellos ahora se convirtieron en mis amigos, que me ayudaron desde siempre, tanto dentro del Instituto como fuera de él.

A la coordinadora de la Maestría del IICV Maritza Manríquez Núñez por ayudarme siempre que lo requería y facilitarme las cuestiones administrativas y académicas.

A CONACyT por su apoyo económico durante mi formación.

Por último, a la 17ava convocatoria interna de proyectos de investigación que financió este proyecto.

DEDICATORIA

Se la dedico a mis padres, Enrique Brisuela y Luz Elena Raygosa, por su amor y su ayuda incondicional, por motivarme a seguir adelante, por apoyarme siempre en las decisiones que he tomado y por hacerme sentir tan afortunada de ser su hija.

También se la dedico al amor de mi vida, Saúl Saldate, por apoyarme en momentos de desesperación y por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas.

RESUMEN

La mastitis en ganado lechero es el problema de salud más importante en los establos dedicados a esta actividad debido a las pérdidas que provoca por la baja calidad de la leche, la merma en la producción, el aumento en la tasa de desecho de animales y el costo de los tratamientos. En el estado de Baja California no se han realizado investigaciones documentadas sobre la identificación y prevalencia de agentes etiológicos que provocan mastitis en bovinos. En el presente estudio se tomaron muestras de leche de vacas en producción positivas a mastitis en 4 establos lecheros de la región, se aislaron los agentes etiológicos, se identificaron por PCR y se determinó su perfil de resistencia a antibióticos. De un total de 2288 animales, el 7% (159) fueron positivos a mastitis, y de estos el 55.3% (88) presentaron infección bacteriana. Se encontraron 17 especies bacterianas, las más frecuentemente encontradas fueron *Staphylococcus aureus* (65.7%) seguido por *Staphylococcus chromogenes* (10%), *Streptococcus agalactiae* (5.7%), *E. coli* (2.8%) y *Streptococcus dysgalactiae* (2.1%). Finalmente se determinó que el 88.5% de los aislados fueron antibiótico multirresistentes, principalmente a penicilinas, cefalosporinas y aminoglucósidos. El presente trabajo está impactando en los tratamientos a aplicar dentro de los establos participantes, por lo que esperamos que la prevalencia y las pérdidas asociadas a mastitis puedan disminuir a mediano plazo.

ABSTRACT

Mastitis in dairy cattle is the most important health problem on farms engaged in this activity due to losses caused by the low quality of milk, the decline in production, the increase in the rate of animal waste and cost of treatments. In the state of Baja California have been no documented researches on the identification and prevalence of etiologic agents causing mastitis in cattle. In the present study, milk samples positive for mastitis in production cows, were taken in four dairy farms in the region, the etiologic agents were isolated, PCR identified and antibiotic resistance profile was determined. From a total of 2288 animals, 7% were positive for mastitis, and of these, 55.3% had bacterial infection. 17 bacterial species were encountered; the most frequently were *Staphylococcus aureus* (65.7%) followed by *Staphylococcus chromogenes* (10%), *Streptococcus agalactiae* (5.7%), *E. coli* (2.8%) and *Streptococcus dysgalactiae* (2.1%). Finally it was determined that 88.5% of the isolates were multidrug resistant, notably to penicillins, cephalosporins and aminoglycosides. This work is impacting treatments applied within participating cowsheds, so we expect that the prevalence and the losses associated with mastitis can decrease to the medium term in these sites.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	3
HIPÓTESIS	3
ANTECEDENTES	4
Clasificación de mastitis	4
Causas	4
Etiología	4
Patogénesis	5
Epidemiología	8
<i>Transmisión</i>	8
<i>Mastitis contagiosa</i>	8
<i>Mastitis ambiental</i>	8
<i>Prevalencia</i>	8
<i>Factores de riesgo</i>	9
<i>Factores del animal</i>	9

<i>Factores ambientales</i>	9
<i>Factores microbiológicos</i>	9
Diagnóstico de mastitis	9
<i>Recuento de células somáticas</i>	10
<i>Prueba de California para mastitis</i>	10
<i>Cultivo microbiológico</i>	12
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	13
<i>Secuenciación del gen 16S</i>	14
Prevención y control	15
Tratamiento	16
<i>Mastitis clínica en vacas en lactación</i>	18
<i>Tratamiento en el periodo seco</i>	18
<i>Grupos de antibióticos</i>	16
Resistencia a antibióticos	19
Importancia zoonótica de patógenos que provocan mastitis	20
<i>Streptococcus spp.</i>	20
<i>Staphylococcus spp.</i>	21
<i>Escherichia coli</i>	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Ubicación	23
Tipo de estudio	24
Criterio de inclusión	24
Recolección de muestras	24

Cultivo y aislamiento de las muestras	25
Identificación del aislado	25
Almacenamiento de aislamientos	26
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	26
Extracción de ADN bacteriano	27
<i>Preparación de ADN de Staphylococcus spp.</i>	27
<i>Preparación de ADN de Streptococcus spp.</i>	28
<i>Preparación de ADN de Gram negativos</i>	29
Reacción en cadena de la polimerasa	29
<i>PCR punto final para identificar S. aureus, Strep. agalactiae,</i> <i>Strep. dysgalactiae, Strep. uberis y Strep. parauberis</i>	29
<i>PCR punto final multiplex para identificar S. chromogenes, S.</i> <i>epidermidis, S. sciuri, S. haemolyticus, S. simulans y E. coli</i>	31
Secuenciación del gen 16S ribosomal	33
<i>Amplificación de 16SrARN</i>	33
<i>Purificación del ADN amplificado para secuenciar</i>	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	48
LITERATURA CITADA	49

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág
1	Lectura e interpretación de la CMT y su equivalencia con el RCS	11
2	Características generales de los principales patógenos que provocan mastitis bovina	14
3	Métodos de laboratorio para diferenciar las bacterias más comunes en casos de mastitis	15
4	Población de vacas por establo	25
5	Secuencias, especificidades y contenido de G+C de los oligonucleótidos	31
6	Combinación de oligonucleótidos, temperatura de alineación y longitudes de productos amplificados	32
7	Nombramiento, secuencias y temperatura de alineación de los oligonucleótidos, tamaño de los productos amplificados y los genes en que se basaron	33
8	Prevalencia de mastitis subclínica en vacas en periodo de producción por establo analizado	36
9	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de los patógenos Gram positivos aislados por establo y del promedio del total de aislados Gram positivos	41
10	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de los patógenos Gram (-) aislados por establo y del promedio del total de aislados Gram (-)	43
11	Porcentaje de aislados con resistencia antimicrobiana de cada una de las distintas especies Gram positivas aisladas por establo	45
12	Porcentaje de resistencia antimicrobiana de los patógenos Gram negativos aislados por establo	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Representación esquemática del desarrollo de mastitis en una ubre infectada	7
2	Especies aisladas en casos de mastitis subclínica y su porcentaje de presentación con respecto al total de casos por hato y en general	38
3	Porcentaje de presentación de leche anormal en los patógenos aislados	39
4	Porcentaje de aislados con resistencia antimicrobiana de los tres principales patógenos encontrados en el estudio	48

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad compleja que puede definirse como una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores (Riffon et al., 2001). Es causada por patógenos intramamarios principalmente, generalmente bacterias (Scaramelli y González, 2005) y con menor frecuencia debido a lesiones, alergias y/o neoplasias (Menzies y Ramanoon, 2001).

Se han identificado más de 130 especies, subespecies y serovariedades de bacterias causantes de la enfermedad, sin embargo, más del 75% de los casos se deben a microorganismos Gram positivos, particularmente especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Scaramelli y González, 2005).

Esta enfermedad reduce la producción del volumen de leche, altera su composición y eleva su carga bacteriana normal. De acuerdo a su duración, se puede clasificar en aguda o crónica y en cuanto a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica (Velasco, 2002). La mastitis subclínica es la principal forma en que se presenta la mastitis en los establos lecheros, afectando generalmente entre el 20 y el 50% de las vacas (Wilson et al., 1997 y Pitkala et al., 2004). Las pérdidas económicas por mastitis subclínica son muy difíciles de cuantificar, sin embargo muchos expertos coinciden en que cuesta en promedio más que la mastitis clínica. Asumiendo una prevalencia del 45%, el costo se ha estimado entre 180 a 320 dólares por caso de vaca con mastitis por año, en Estados Unidos, siendo aproximadamente 70% de estas pérdidas por la reducción en la producción de leche (Zhao X. y Lacasse P., 2007), y el resto por

el incremento en los costos del cuidado de la salud del hato y el desecho prematuro de animales (Bradley, 2002).

El uso generalizado de antibióticos ha conducido al incremento de patógenos ambientales con menor susceptibilidad al efecto antibacteriano, lo que ha dado como resultado que las infecciones sean más difíciles de curar. Así, la penicilina y otros antibióticos relacionados a la familia de los betalactámicos son la mejor opción contra *Staphylococcus aureus* y otros patógenos que provocan mastitis, sin embargo, el uso masivo de estos, ha conducido un drástico incremento de patógenos capaces de producir una enzima llamada betalactamasa que inactiva a estos últimos, resultando en resistencia antimicrobiana (Aarestrup y Jensen, 1998. Wilson et al., 1999).

En Baja California no se han realizado investigaciones documentadas sobre los agentes etiológicos que provocan mastitis bovina, sin embargo, habiendo una población ganadera de 46,617 bovinos de leche (SIAP, 2011), se espera la presencia de la enfermedad y de los principales microorganismos que la causan.

OBJETIVO

El objetivo de esta investigación es identificar las especies bacterianas presentes en casos de mastitis bovina, determinar su frecuencia relativa y su perfil de resistencia a antibióticos en 4 establos de Baja California. Esto con el fin de que productores en la región conozcan que agentes etiológicos los están afectando y puedan tomar mejores decisiones en cuanto al manejo de los animales en general, así como a los tratamientos a utilizar en particular.

HIPÓTESIS

La mastitis en la región es provocada por distintos patógenos con características diferentes, por lo que se requiere utilizar tratamientos específicos para disminuir su presencia.

ANTECEDENTES

Clasificación de Mastitis Bovina

La enfermedad tiene dos formas básicas de presentación: clínica y subclínica que, por lo general, no son más que fases del proceso inflamatorio. En la forma clínica se presentan evidentes signos de inflamación como tumefacción, rubor, dolor, cambios notables en la leche como presencia de grumos o coloración diferente y eventualmente, signos sistémicos como fiebre, pérdida del apetito y depresión. La forma subclínica se caracteriza por la existencia de inflamación sin los signos macroscópicos que permiten reconocerla, por lo que generalmente pasa desapercibida (Scaramelli y González, 2005).

Causas

La National Mastitis Council, estima que entre un 70 a 80% de los casos de mastitis son debidos a técnicas inadecuadas de ordeño, caracterizada por pobres condiciones higiénico-sanitarias, falta de desinfección pre-ordeño y ordeños prolongados, sumándose en el caso del ordeño mecánico, aspectos como diseño, manejo y mantenimiento inapropiado de las maquinas (Harmon, 1994; Mancilla et al., 2001).

Etiología

La glándula mamaria de la vaca está expuesta a diversas bacterias durante la lactancia y en período no lactante. Los patógenos comúnmente aislados de

leche con mastitis pueden clasificarse como microorganismos no contagiosos o contagiosos (la mayoría de los no contagiosos son ambientales). Los primeros incluyen *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativos (SCN), mientras que los segundos incluyen *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (Zhao y Lacasse, 2007).

Otros estreptococos ambientales (EA) causantes de mastitis bovina incluyen, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus canis*. *Streptococcus dysgalactiae* puede comportarse tanto como un patógeno ambiental como contagioso (Calvinho, 2005).

Algunos otros patógenos bacterianos ambientales aislados periódicamente de vacas con mastitis son *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leptospira* spp., *Manheimia haemolytica*, *Mycoplasma bovis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Quinn, et al., 2002).

Patogénesis

Normalmente el canal del pezón está firmemente cerrado por los músculos del esfínter, previniendo la entrada de patógenos. Está forrado con queratina, que obstruye la migración de bacterias y contiene agentes antimicrobianos, como ácidos grasos de cadena larga. Los fluidos se acumulan dentro de la glándula mamaria mientras se acerca el parto, resultando en un incremento de la presión intramamaria causando vulnerabilidad de la glándula por la dilatación del canal del pezón y derrame de secreciones mamarias.

Adicionalmente, durante la ordeña, la queratina es expulsada y el canal del pezón se distiende. El esfínter requiere ~ 2 h para regresar a su forma contraída (Capuco, 1992).

Una vez dentro del pezón, la bacteria generalmente elude los mecanismos de defensa celular y humoral de la ubre. Si estos microorganismos no son eliminados, comienzan a multiplicarse dentro de la glándula mamaria. Liberan toxinas e inducen a leucocitos y células epiteliales a liberar quimioattractantes, incluyendo citosinas tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF α por sus siglas en inglés), interleucina 8 (IL-8), IL-1, prostaglandina F2 α (PGF2 α), radicales de oxígeno y proteínas de fase aguda. Estos atraen células inmunes efectoras de la circulación, principalmente neutrófilos polimorfonucleares (PMNs por sus siglas en inglés), al sitio de infección (Giri, 1984., Paape, 2003., Zhao and Lacasse, 2008).

Los PMNs actúan fagocitando y destruyendo a la bacteria, ya que poseen gránulos intracelulares que contienen péptidos bactericidas, proteínas, enzimas y proteasas. Los factores oxidativos y proteasas destruyen a la bacteria y a algunas células epiteliales, resultando en una disminución de la producción de leche y liberando enzimas, como N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGasa) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Paape, 2003). La muerte y desprendimiento de células epiteliales mamarias, además de los leucocitos muertos, son secretados en la leche, resultando en un conteo elevado de células somáticas (Volter et al., 2004).

Si la infección persiste, puede formarse una inflamación interna dentro del epitelio mamario, normalmente no detectable mediante palpación externa. El alveolo de la glándula mamaria comienza a dañarse y empieza a perder su integridad anatómica. La barrera sangre-leche se rompe, provocando que los componentes del fluido extracelular entren a la glándula y se mezclen con la leche (Zhao y Lacasse, 2008), así como se observa en la Fig. 1.

Cuando en la barrera sangre-leche hay un daño excesivo, la sangre se puede notar en la leche. Esto conduce a cambios visibles en la ubre, tales como inflamación externa y enrojecimiento de la glándula. También hay cambios en la leche como aumento del pH, aumento del contenido de agua y la presencia de coágulos y copos (Lee, 1980., Kitchen, 1981., Milner 1996).

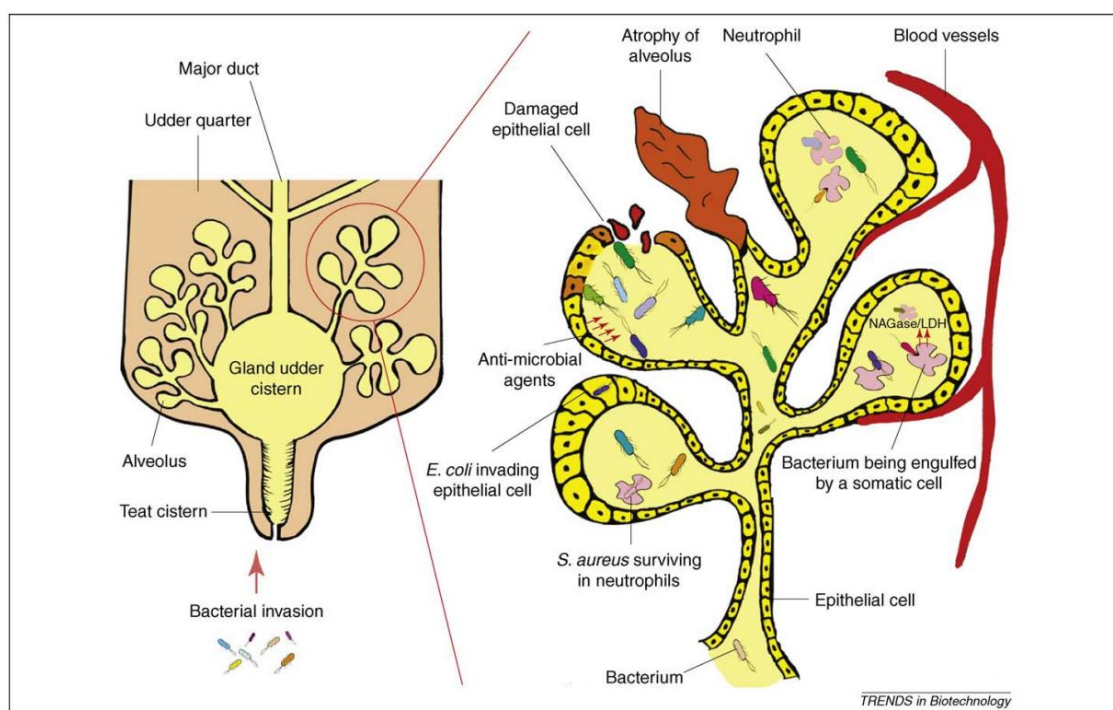


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo de mastitis en una ubre infectada. Viguier et al., 2009.

Epidemiología

Transmisión

Mastitis contagiosa: la ubre y pezones son el reservorio de la infección, en tanto, la transmisión ocurre durante el proceso de ordeña o la preparación de la ubre por manos, toallas o trapos contaminados. La infección se establece en la superficie y canal del pezón, pudiendo posteriormente penetrar la bacteria a la glándula mamaria. La mayoría de las infecciones son subclínicas y resultan en conteo de células somáticas elevado, generalmente por encima de 200,000cel/ml indicando que hay un problema de mastitis contagiosa (Edmondson y Bramley, 2004).

Mastitis ambiental: Las infecciones medioambientales son transmitidas a los pezones entre ordeñas o durante la preparación de la ubre. Los organismos son forzados a subir a través del canal del pezón durante el proceso de ordeña o al acostarse inmediatamente después de haber sido ordeñadas. La mayoría de las infecciones causan mastitis clínicas, aunque en algunos casos pueden causar infecciones subclínicas (Edmondson y Bramley, 2004).

Prevalencia

La prevalencia de mastitis bovina es relativamente alta. La mastitis subclínica es la forma más común de mastitis en los establos y su prevalencia oscila generalmente entre el 20 y 50% (Wilson et al., 1997 y Pitkala et al., 2004), En tanto la mastitis clínica es menos frecuente, presentando una prevalencia de entre el 2 y el 4% (Calderón, et al., 2007 y Trujillo et al., 2010).

Factores de riesgo

Factores de riesgo del animal: La incidencia de infección aumenta con la edad; la mayoría de las infecciones nuevas ocurre al principio de la lactación; el riesgo aumenta dependiendo del estado morfológico y físico de los pezones; las vacas con una producción láctea superior son más susceptibles (Radostis, et al., 2002).

Factores ambientales: Detilleux y colaboradores (2013), evaluaron más de 35 características del hato relacionadas con la presencia de mastitis, donde las más significativas fueron: Adición de urea a la ración, líneas de ordeña sucias, hiperqueratosis en pezón, mal funcionamiento de máquina de ordeño, no aplicar pre y post sellado y alojamiento de las vacas en cubículos.

Factores microbiológicos: La capacidad de los microorganismos para sobrevivir en el medio, los factores de virulencia y la susceptibilidad frente a los antimicrobianos (Radostis, et al., 2002).

Diagnóstico de mastitis

La inflamación de la glándula mamaria involucra una serie de cambios en la composición de la leche. Uno de los cambios más precoces es el aumento en el número de células somáticas, que son células epiteliales y células del sistema inmune (PMNs 15%, macrófagos 60% y linfocitos 25%) donde normalmente el número es menor a 200,000 cel/ml y que durante el proceso inflamatorio puede superar las 500,000 cel/ml (Scaramelli et al., 1988).

Este incremento es la base de muchos métodos de diagnóstico entre los cuales se encuentran el recuento de células somáticas (RCS), la prueba para mastitis de California (CMT, con sus siglas en ingles) y la prueba para mastitis de Wisconsin (WMT, con sus siglas en inglés) (Scaramelli et al., 1988).

Recuento de células somáticas (RCS)

El RCS es la medición más ampliamente utilizada para supervisar el estado inflamatorio de las glándulas mamarias y puede ser realizada en la leche de cuartos individuales, vacas individuales, el hato completo o en un grupo de hatos. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse, el organismo de la vaca tiende a reclutar leucocitos para combatir a dichos microorganismos (Philpot y Nickerson, 1992).

Prueba de California para mastitis (CMT)

La CMT es uno de los métodos más ampliamente utilizados para el diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de campo (Ferraro *et al.*, 1999; Faría *et al.*, 2005; Kivaria *et al.*, 2007 y Nunes *et al.*, 2007;). Es una prueba económica, sencilla y rápida, que cuenta con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93% (Bedolla, *et al.*, 2007). CMT detecta el estado de salud de la ubre mediante una estimación del contenido de células somáticas, como se observa en el cuadro 1, siendo su principal desventaja la subjetividad implícita en la lectura de los resultados.

El fundamento de la CMT es la estimación gruesa del contenido de células somáticas por medio de la gelificación que tiene lugar cuando el ADN es

liberado de las células somáticas presentes en la leche por la acción de un detergente aniónico como el alkyl-aril-sulfonato de sodio, por lo que a mayor contenido celular en la leche, mayor gelificación (Scaramelli y González, 2005).

Cuadro 1. Lectura e interpretación de la CMT y su equivalencia con el RCS.

Resultados CMT	Reacción	Equivalencia del RCS/mL	Porcentaje de neutrófilos	Interpretación
Negativo	La mezcla no presenta precipitado y/o gel	0 – 200.000	0- 25	Cuarto mamario sano
Traza	Se forma una traza de precipitado que desaparece pronto	150.000 – 500.000	30 – 40	Posible infección dependiendo del número de cuartos mamarios
1 +	Hay precipitado pero no se forma gel	400.000 – 1.500.000	40 – 60	Mastitis subclínica
2 +	El precipitado se vuelve gel y se concentra en el centro de la raqueta	800.000 – 5.000.000	60 – 70	Mastitis subclínica
3 +	Se forma un gel que se adhiere al fondo de la raqueta	> 5.000.000	70 - 80	Mastitis subclínica

(Kivaria *et al.*, 2007).

Cultivo microbiológico

La mayoría de los agentes patógenos asociados con mastitis se pueden aislar con facilidad utilizando métodos de cultivo rutinarios. Los medios de cultivo empleados generalmente para el aislamiento primario son agar sangre, medio de Edward selectivo para estreptococos y agar MacConkey. La identificación presuntiva se puede lograr habitualmente gracias a la morfología de las colonias, el patrón de hemólisis y las características del crecimiento en esos medios, en tanto la identificación definitiva de un agente patógeno sospechoso se puede alcanzar utilizando pruebas específicas para ese microorganismo (Quinn et al., 2002), en el cuadro 2 y 3, se muestran algunas características y pruebas que se utilizaron para identificar el género bacteriano.

Cuadro 2. Características generales de los principales patógenos que provocan mastitis bovina.

Patógeno	Morfología	Gram	Tamaño	Agrupación	Respiración	Colonia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos	+	1 µm	Racimos	Anaerobio facultativo	Mediana blanca/dorado
<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>	Cocos	+	1 µm	Racimos	Anaerobio facultativo	Mediana blanca/dorada
<i>Streptococcus spp.</i>	Cocos	+	1 µm	Cadenas	Anaerobio facultativo	Pequeña traslúcida
Enterobacterias	Bacilos	-	< 3 µm	Sin agrupación	Anaerobio facultativo	Grisácea redonda brillante

(Songer and Post, 2005)

Cuadro 3. Métodos de laboratorio para diferenciar las bacterias más comunes en casos de mastitis.

Patógeno	Hemolisis en agar sangre	Catalasa
<i>S. aureus</i>	α y β	+
<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos	Variable	+
<i>Streptococcus spp</i>	α / β o γ	-
Enterobacterias	Algunas cepas de <i>E. coli</i>	+

(Songer and Post, 2005)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Debido a que el cultivo microbiológico de las muestras clínicas, solo ofrece resultado en un 50% de los casos, y a que los métodos bioquímicos son tardados y laboriosos para identificar aislados (Koskinen *et al.*, 2009) la identificación por PCR es una alternativa.

Según varios autores, la sensibilidad y especificidad de la PCR es generalmente mayor que el aislamiento (Cremonesi *et al.*, 2006 y Park *et al.*, 2006). La aplicación de esta técnica, con un formato sencillo y rápido, es adecuada a la rutina diaria de un laboratorio de microbiología y contribuye a realizar un diagnóstico precoz. Si se detecta más temprano el microorganismo podría prevenirse la aparición de brotes y permitiría implementar controles previos a la ocurrencia de la enfermedad, sin embargo, la especificidad y la sensibilidad de los cebadores para el diagnóstico del patógeno se deben validar (Koskinen *et al.*, 2009).

Secuenciación del gen 16S

El uso de la secuencia del gen 16S ribosomal (16SrARN) para estudiar la filogenia bacteriana y la taxonomía ha sido por mucho el marcador genético más comúnmente utilizado por varias razones, las cuales incluyen: (i) su presencia en casi todas las bacterias, a menudo existente como una familia multigénica, u operon; (ii) la función del gen 16SrARN con el tiempo no ha cambiado, lo que sugiere que los cambios en la secuencia al azar son una medida más precisa del tiempo (evolución); y (iii) el gen 16SrARN (1500 pb) es lo suficientemente grande para los propósitos de bioinformática (Patel, 2001). En 1980, 1,791 nombres de microorganismos fueron reconocidos en el rango de especies por morfología y pruebas bioquímicas, en tanto hoy en día ésta cifra se ha disparado a 8,168 especies con el uso de la secuenciación del gen 16SrARN (Janda y Abbott, 2007).

El gen 16SrARN en las bacterias, consiste de secuencias conservadas intercaladas con secuencias variables que incluyen 9 regiones hipervariables, éstas oscilan entre 50 a 100 bases (Petrosino et al., 2009).

Los cebadores universales se eligen generalmente como complementarios a las regiones conservadas en el comienzo del gen y, ya sea en la región de 540 pb o al final de toda la secuencia (sobre la región de 1550 pb). La secuencia de la región variable que se encuentra en el medio se utiliza para la taxonomía comparativa (Chen et al., 1989 y Relman 1999).

Aunque entre 500 y 1500 pb son longitudes comunes para secuenciar y comparar, las secuencias en las bases de datos pueden ser de varias longitudes. La secuencia del gen 16SrARN se ha determinado para un gran número de cepas. En GenBank, el mayor banco de datos de secuencias de nucleótidos, se han depositado más de 20 millones de éstas, de las cuales más de 90,000 son del gen 16SrARN, para comparar la de una cepa desconocida (Clarridge, 2004).

Prevención y control

Principios de control

Eliminar las infecciones existentes, prevenir las infecciones nuevas y controlar el estado de salud de las ubres.

Programa de control de la mastitis según Radostis (2002) son:

1. Utilizar métodos de ordeño apropiados.
2. Instalaciones, función y mantenimiento adecuados del equipo de ordeño.
3. Manejo de las vacas en periodo seco.
4. Terapéutica apropiada de la mastitis durante la lactación.
5. Desechar las vacas crónicamente infectadas.
6. Mantener un ambiente apropiado.
7. Tener un buen registro de datos.
8. Controlar el estado de salud de las ubres.
9. Revisión periódica del programa de manejo de salud de la ubre.

Tratamiento

Mastitis clínica en vacas en lactación

Es posible que los casos leves de mastitis clínica no precisen de ningún tratamiento. Se debe realizar el cultivo microbiológico de la leche de los cuartos afectados y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana para determinar el fármaco a utilizar, ya sea por vía parenteral o infusión intramamaria. La mastitis aguda y fulminante se puede tratar con antimicrobianos y siempre se requiere una terapéutica de apoyo (líquidos y electrolitos) y agentes antiinflamatorios no esteroideos (Radostis, 2002).

Tratamiento en el periodo seco

En este periodo el mejor tratamiento para las mastitis subclínicas debidas a microorganismos patógenos contagiosos es utilizar una infusión intramamaria de antimicrobianos de larga duración. Es preciso cumplir los requisitos establecidos en cuanto a la retención del producto lácteo después del tratamiento con antimicrobianos para evitar la presencia de residuos en leche, pues puede ser un problema de salud pública (Radostis, 2002).

Grupos de antibióticos

Los antibióticos se clasifican según el espectro de acción, el mecanismo de acción, su farmacocinética (absorción, distribución y eliminación) y su farmacodinamia, es decir, de acuerdo a la forma en que producen la muerte o inhibición bacteriana en antibióticos tiempo-dependientes y concentración dependientes. En el caso de los tiempo-dependientes (betalactámicos y

macrólidos) el éxito de la terapéutica viene dado por mantener concentraciones por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el mayor tiempo posible inter dosis. En el caso de los microorganismos concentración dependientes el éxito terapéutico viene dado por lograr un buen pico sérico de concentración o un buen área bajo la curva, dependiendo del fármaco (Seija y Vignoli, 2006).

Betalactámicos: son un grupo de antibióticos que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes: penicilinas (penicilina, ampicilina, dicloxacilina), cefalosporinas (cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) monobactámicos y carbapenemes (Sumano, 1997).

Aminoglucósidos: Está definida por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Según los azúcares, se clasifican en familias: Estreptomicina, Kanamicina (Kanamicina, amicacina, trobamicina, dibekacina), Gentamicina (gentamicina, netilmicina) y neomicina. Los aminoglucósidos se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, interfiriendo la lectura correcta del código genético con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria. La incorporación de los aminoglucósidos en el interior de la bacteria, especialmente en los cocos Gram positivos, es mayor al administrarse con

antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana, como son los betalactámicos y los glicopéptidos (Sande, et al., 1993).

Macrólidos: Se unen a la subunidad 50S del ARN ribosómico en forma reversible. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólido y determinadas bases del ARNr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y translocación. Ejemplos de antibióticos de este grupo son: espiramicina, lincosaminas (clindamisina) y eritromicina (Goodman, et al., 1990).

Quinolonas: Se trata de un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Diferentes sustituciones, incluyendo la inclusión de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima que cataliza el desenrollamiento del ADN cromosómico, que asegura una adecuada división celular. Ejemplos: ciprofloxacina, pefloxacina (Varon, et al., 1999).

Tetraciclinas: Atraviesan la membrana externa de las bacterias a través de porinas mediante difusión pasiva y llegan al citoplasma gracias a un mecanismo dependiente de energía. Dentro del citoplasma se unen al ribosoma inhibiendo la síntesis de las proteínas. Este efecto se produce evitando la unión aminoacil de ácido ribonucleico de transferencia a la subunidad 30S ribosomal (Perez e Iglesias, 2003). Ejemplos: Tetraciclina, Doxiciclina, Oxitetraciclina (Rodríguez et al., 1998).

Sulfonamidas: Están estructuralmente relacionadas con el ácido para-aminobenzoico (PABA) y compiten con él por la enzima dihidropteroato sintetasa que interviene en el metabolismo del ácido fólico. El ácido fólico es imprescindible para la síntesis de precursores de los ácidos nucleicos bacterianos. Las células de los mamíferos requieren ácido fólico preformado, ya que no pueden sintetizarlo y, por lo tanto no se ven afectadas por la acción de las sulfonamidas. Las diaminopirimidinas (como la trimetoprima), al igual que las sulfonamidas, interfieren en el metabolismo del ácido fólico por lo que combinadas tienen efecto sinérgico (Remington, 2000). Ejemplos: Sulfametoxazol, sulfametazina, sulfamerazina.

Resistencia a antibióticos

Si bien existe una gran variedad de medidas de control de la enfermedad, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de la mastitis bovina (Zecconi y et al., 2003). La mayoría de las drogas antimicrobianas utilizadas son betalactámicos, aminoglucósidos y macrólidos (Owens y col., 1997).

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

de la acumulación de residuos de antibióticos en el animal y sus implicaciones en la salud humana. Por ello, existen presiones cada vez mayores por parte de las instancias reguladoras para limitar el uso de estos productos en el ganado destinado a consumo humano.

Importancia zoonótica de patógenos que provocan mastitis

Streptococcus spp

En el hombre se han presentado algunos casos por *S. acidominimus*, que se encuentra en la leche y en los tractos genital e intestinal del bovino; por *S. uberis*, que causa mastitis en el bovino y se encuentra en la leche, orofaringe, piel y tracto intestinal; por *S. lactis* y *S. cremoris*, que causan mastitis en bovinos y se encuentran en la leche de las vacas; por *S. equi* y su subespecie *S. zooepidemicus* que producen mastitis bovina y varias enfermedades en los animales. Por último está *S. canis*, de los grupos G, L y M (Gallis, 1991).

Los estreptococos del grupo C (*S. equi*) aparecen esporádicamente y rara vez en el hombre, sin embargo en 1983 hubo un brote epidémico debido al grupo C en Nuevo México, Estados Unidos, con 16 casos, debido a la ingestión de queso blanco casero, elaborado con leche no pasteurizada. El agente se identificó como *S. zooepidemicus*. La enfermedad en estos pacientes consistió en fiebre, escalofríos y síntomas vagos, pero en cinco de ellos se manifestó por sintomatología tan variada como neumonía, endocarditis, meningitis, pericarditis y dolores abdominales (Centers for Disease Control and Prevention, 1983). En

vacas, *S. zooepidemicus* puede causar mastitis aguda al penetrar por una herida de los pezones (Timoney et al., 1988).

S. pyogenes, un patógeno “humano” que ha provocado brotes epidémicos en el hombre puede infectar la ubre de la vaca y producir mastitis (Acha y Szyfres 2001).

El principal reservorio de los estreptococos B (*S. agalactiae*) que causan la sepsis neonatal es la madre, ya que los serotipos de *S. agalactiae* aislados de las madres y de los neonatos enfermos son siempre los mismos. En general, las cepas animales y humanas difieren en algunas propiedades bioquímicas, metabólicas y serológicas (Evenson et al., 1988).

Staphylococcus spp

Intoxicación alimentaria estafilocócica: es causada por una enterotoxina preformada en los alimentos por *Staphylococcus aureus*. Se conocen cinco tipos de enterotoxinas (A, B, C, D y E). En investigaciones realizadas en los años 90's en cinco países del norte de Europa se demostró que una gran parte de los estafilococos que se aíslan de las mastitis bovinas son toxigénicos, ya que de 174 cepas aisladas 41.4% producían enterotoxinas, y de estas, 48.6% eran A, 5.6% B, 29.2% C y 33.3% D, ya sea solas o combinadas (Evenson et al., 1988).

La leche procedente de ubres de vacas con infección estafilocócica puede dar origen a la contaminación de numerosos productos lácteos. Muchos brotes de intoxicación estafilocócica se han originado por el consumo de leche

cruda (o de quesos) inadecuadamente refrigerada. Hubo un brote en escolares de los Estados Unidos, en el que 850 alumnos se enfermaron después de ingerir leche con chocolate. La cantidad promedio de enterotoxina A en un envase de cartón con 280ml de leche fue de 144 ng (Evenson et al., 1988).

Escherichia coli

De nueve brotes en los Estados Unidos, seis se debieron a la ingestión de carne molida insuficientemente cocida y tres a la ingestión con roast beef (carne al horno semi cocida); en Canadá, un brote se debió a leche cruda. Estos hechos señalan al bovino como reservorio del agente ECEH (*E. coli* enterohemorrágica)(Dorn,1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El presente estudio se realizó en el estado de Baja California, México; en donde se recolectaron muestras de leche de cuatro hatos ganaderos con características semitecnificadas en cuanto a su producción, dos de éstos hatos se localizan en el municipio de Mexicali, uno hacia la parte sur y el otro en la zona oriente, en el municipio de Ensenada se ubicó uno en la zona de Ojos Negros y en el municipio de Tecate un establo ubicado en la zona del Florido; por razones de organización etiquetamos a los hatos en 1, 2, 3 y 4 respectivamente, en el cuadro 4 se muestra la población aproximada de vacas en producción por establo.

Cuadro 4. Población de vacas por establo.

Establo	Tamaño del hato (Vacas) *
1	40
2	550
3	360
4	170

*Se realizaron dos muestreos por establo, con un intervalo de 6 meses, por lo que el tamaño de cada hato tuvo una variación mínima, en el cuadro se muestra el promedio obtenido del número de vacas en el primer y segundo muestreo.

Tipo de estudio

Se realizó un estudio epidemiológico observacional del tipo transversal con un muestreo no probabilístico por conveniencia.

Criterio de inclusión

Se incluyeron a todos los animales en producción en el momento del muestreo que fueron positivos a la prueba CMT (Dairy research products inc.) en un grado 2 o mayor, o bien aquellas que presentaron un conteo de células somáticas superior a 400,000 por ml. Dicha prueba fue interpretada en una escala ordinal como menciona Kivaria y colaboradores (2007) en el cuadro 1.

Recolección de muestras

El periodo de muestreo fue de enero de 2013 a marzo de 2014, donde cada hato se muestreó 2 veces con intervalo de 6 a 9 meses. Las muestras de leche se tomaron siguiendo la metodología del Consejo Nacional de la Mastitis (NCM) de los Estados Unidos (2010).

Se tomaron 5 ml de leche en tubos estériles con tapa de rosca, previa limpieza, secado de la ubre y desinfección del pezón con torundas o papeles desechables individuales impregnados de cloruro de benzalconio al 0.1%, usando varias torundas por pezón, hasta que la última no presentó suciedad. Se eliminaron de 1 a 3 chorros de leche del pezón a muestrear para eliminar leche contaminada que está en la punta del pezón, se evitó tener contacto con otras partes del animal. Una vez tomada la muestra e identificada, se guardó sobre hielo para su transporte al laboratorio.

Cultivo y aislamiento de las muestras

Se procedió a cultivar 100µl de leche por muestra en agar sangre base Columbia con 5% de sangre bovina en toda la superficie de la caja con un triángulo de vidrio. Se incubaron entre 24 y 48 horas a 35°C para observar el crecimiento bacteriano. Solo se seleccionaron los microorganismos que presentaron al menos 10 colonias en cada caja de Petri (1000 UFC/ml de leche) (Dohoo et al., 2011).

Identificación del aislado: Tinción Gram, hemólisis y prueba de catalasa.

Se procedió a realizar la técnica de tinción Gram para determinar su morfología, agrupación y clasificarlos como Gram positivos o Gram negativos.

Se identificó el tipo de hemólisis y se elaboró la prueba de catalasa, que consiste en recoger el centro de una colonia pura de un cultivo de 18 a 24 horas con una aguja de inoculación y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio, se agrega una gota de H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) al 30% sobre los microorganismos en el portaobjetos, después se observa la producción inmediata de burbujeo si el agente es positivo o negativo en caso de no haber cambios (Huchin. 2009).

Almacenamiento de aislamientos

Todas las bacterias aisladas fueron sembradas en caldo de cultivo Todd Hewitt con glicerol al 10% para su almacenamiento a -80 °C y posterior utilización.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Para conocer la susceptibilidad de los aislados hacia los antibióticos se utilizó el método de difusión en multidiscos (Bio-Rad®) para Gram positivos y para Gram negativos, utilizando Agar Mueller-Hinton chocolate, el cual se preparó de acuerdo a las especificaciones del proveedor y se realizó el siguiente procedimiento: Entre una y cinco colonias dependiendo su tamaño se disolvieron en 100µl de PBS hasta que alcanzar una densidad comparable con el estándar 0.5 de MacFarland; se sembró cada muestra en el medio de cultivo antes mencionado, distribuyendo la totalidad de la mezcla en toda la superficie de la caja; se incubaron 18 horas a 35°C y los resultados se clasificaron como intermedio, sensible o resistente según el diámetro del halo de inhibición formado de acuerdo al rango de referencia de los sensidiscos.

Los sensidiscos cuentan con los siguientes antibióticos para gram positivos: ampicilina 10 µg, cefalotina 30 µg, cefotaxima 30 µg, cefuroxima 30 µg, ceftazidima 30 µg, dicloxacilina 1 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, pefloxacina 5 µg, penicilina 10 U, tetraciclina 30 µg y trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg, éstas concentraciones corresponden a la técnica estándar en los sensidiscos.

Los sensidiscos cuentan con los siguientes antibióticos para gram negativos: amikacina 30 µg, ampicilina 10 µg, carbenicilina 100 µg, cefalotina 30 µg, ceftriaxona 30 µg, cloranfenicol 30 µg, gentamicina 10 µg, netilmicina 30 µg, nitrofurantoina 300 µg, pefloxacina 5 µg y trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg, éstas concentraciones corresponden a la técnica estándar en los sensidiscos.

Extracción de ADN bacteriano

A todos los aislados se les extrajo ADN utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen®) con el protocolo para bacterias Gram positivas o Gram negativas, ya que la leche posee agentes que inhiben la reacción de PCR y las bacterias, principalmente Gram positivas no se lisan fácilmente. El protocolo para extraer ADN de bacterias Gram positivas fue modificado tanto para extraer ADN de bacterias del género *Staphylococcus* como para *Streptococcus*, ya que para ambas se agregó enzimas que ayudan a lisar la pared celular. A continuación se describen las modificaciones. Una vez obtenido el ADN de los aislados, se almacenaron a -20°C.

Preparación del ADN bacteriano de Staphylococcus spp.

Para cada aislamiento de *Staphylococcus spp.* se inocularon con una colonia del cultivo un tubo de ensayo conteniendo 5 ml de caldo Todd Hewitt y se incubaron con agitación por toda la noche a 36°C, se tomó solo 1 ml de este cultivo y fue centrifugado a 5000 X g (7500 rpm) durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante para obtener solamente la pastilla. A esta se le agregaron 100µl del buffer lisis enzimática (20 mM Tris-Cl- pH 8.0, 1.2% Triton

X-100, 2 mM sodium EDTA, lisozima 20mg/ml), más 5µl de lisostafina (Sigma L7386®) para incubar con agitación por una hora a 37°C, luego se le agregaron 105µl de agua grado molecular más 10µl de proteinasa K (Qiagen Inc.) se mezcló por 15 s y se agregaron 200µl del buffer AL sin etanol. Después de este paso se siguió con el protocolo original del paquete comercial, excepto en el paso donde se centrifuga el buffer AW2, en el que se repitió la centrifugación y se dejó abierto el tubo a temperatura ambiente por 3 min, finalmente se resuspendió el ADN en 150µl de agua grado molecular.

Preparación de ADN bacteriano de Streptococcus spp.

Con respecto a los aislamientos de estos microorganismos, se inocularon 4 colonias de cada uno de ellos en 5ml de caldo Todd Hewitt y se incubaron con agitación por toda la noche a 36°C, se tomó 1 ml de cada cultivo y fue centrifugado a 5000 X g (7500 rpm) durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, para obtener solamente la pastilla; a esta se le agregaron 180µl de buffer lisis enzimática, 10µl de mutanolisina y 20µl de agua grado molecular. Se agitó e incubó con agitación a 37°C por una hora y se le agregaron 10µl de proteinasa K, se agitó nuevamente y se le añadieron 200µl de buffer AL sin etanol. Finalmente se agitó de nuevo y se continuó con el protocolo original del paquete comercial, excepto en los pasos ya mencionados al final de la preparación del ADN bacteriano de *Staphylococcus spp.*

Preparación de ADN bacteriano de Gram negativas

Con este tipo de aislamientos, se tomó una colonia y se inoculó en 5 ml de caldo Todd Hewitt para cada una de las muestras, se incubaron con agitación por toda la noche a 36°C, se tomó 1 ml de cada cultivo y fueron centrifugados a 5000 X g (7500 rpm) durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, para obtener solamente la pastilla. Se continuó con el protocolo de extracción para Gram negativas del paquete comercial ya mencionado, excepto en los pasos antes anotados al final de la preparación del ADN bacteriano de *Staphylococcus spp.*

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PCR punto final para identificar *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus parauberis*

Se realizó la identificación y confirmación de que efectivamente se trata de estos patógenos utilizando los oligonucleótidos y la técnica propuestos por Riffon y colaboradores (2001). Técnica en la cual se amplifican los genes 16S y 23S, en el cuadro 5 y 6, se muestran las características de cada oligonucleótido utilizado.

Cuadro 5. Secuencias, especificidades y contenido de G+C de los oligonucleótidos.

Primer	Specificity	Sequence(5'-3')	G+C content (%)
Sau 327	<i>S. aureus</i>	GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA	45
Sau 1645	<i>S. aureus</i>	CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT	45
Sag 432	<i>S. agalactiae</i>	CGT TGG TAG GAG TGG AAA AT	45
Sag 1018	<i>S. agalactiae</i>	CTG CTC CGA AGA GAA AGC CT	55
Sdy 519	<i>S. dysgalactiae</i>	GGC TCA ACC ACT NTA CGC TT	50
Sdy 920	<i>S. dysgalactiae</i>	ATC TCT AGA CCG GTC AGG AG	55
Spa 2152	<i>S. parauberis</i>	TTT CGT CTG AGG CAA TGT TG	45
Spa 2870	<i>S. parauberis</i>	GCT TCA TAT ATC GCT ATA CT	35
Sub 1546	<i>S. uberis</i>	TGA TGG GGA GCG AAA ATA AG	45
Sub 2170	<i>S. uberis</i>	CCC AAC AAC GCC TCA AAC GA	55

Riffon, et. al., 2001.

Cuadro 6. Combinación de oligonucleótidos, temperatura de alineación y longitudes de productos amplificados.

Forward primer	Reverse primer	Annealing temp (°C)	Size of product amplified (bp)
Sau 327	Sau 1645	64	1,318
Sag 432	Sag 1018	65	586
Sdy 519	Sdy 920	57	401
Spa 2152	Spa 2870	57	718
Sub 1546	Sub 2170	59	624

Riffon, et. al., 2001.

De acuerdo a lo publicado por Riffon y colaboradores (2001), esta técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

Amplificación por PCR: Se utilizó el termociclador iCycler (BIO-RAD).

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 50µl. La mezcla

consistió de 100 ng de ADN templado extraído, 1µl de oligonucleótidos 2.5µM, 1.25 U de DNA *Taq* polimerasa, 5µl de buffer 10X - Mg, 1.5µl de MgCl₂ 50mM y 1µl de dNTP's 10mM. Esta mezcla se agregó a un tubo de microcentrifuga de 0.2 ml. Una pre etapa de la PCR se realizó a 94°C durante dos min, seguido de 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 45 s, alineación a la temperatura correspondiente durante 1 min y extensión a 72°C durante 2 min. Después del último ciclo la mezcla se mantuvo a 72°C por 10 min para completar la reacción.

Detección de productos de PCR: Se analizaron 10µl del producto amplificado por electroforesis en un gel de agarosa 1.5% con 0.5 µg de bromuro de etidio/ml. Los productos se corrieron en TAE 1X (4.8gr Tris, 11.4ml ácido acético glacial, 0.37gr EDTA, 1 litro de agua desionizada) a 100 V por 45min. El marcador de peso molecular de 100 pb y de 1 kb (Promega Inc.), se corrieron al mismo tiempo. El gel se visualizó en un sistema de fotodocumentación (UVP Inc.) y fue fotografiado.

PCR punto final multiplex para identificar *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* y *E. coli*.

Se realizó la identificación y confirmación de que efectivamente se trata de estos patógenos utilizando los oligonucleótidos y la técnica propuestos por Shome y colaboradores (2011). En esta técnica se utilizaron dos tubos por muestra, ya que cada tubo contiene un juego diferente de oligonucleótidos, en el cuadro 7 se muestran las características de éstos.

Cuadro 7. Nombramiento, secuencias y temperatura de alineación de los oligonucleótidos, tamaño de los productos amplificados y los genes en que se basaron.

Organisms	Gene Bank accession no.	Gene	Primer designation	Oligonucleotide primer 5'–3'	Location within gene	Amplicon size (bp)
<i>E. coli</i>	FJ546461	<i>phoA</i>	ECPF*	GGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTG	433–456	468
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	AJ343945	<i>sodA</i>	ECPR	CAGGGTTGGTACACTGTCATTACG	900–877	222
			SCHS1F*	GCGTACCAGAAGATAAACTC	134–157	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	EU652775	<i>sodA</i>	SCHS1R	CATTATTTACAACGAGCCATGC	355–334	214
			SHS1F*	CAAATTAATTTCTGCAGTTGAGG	63–85	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CP000029	<i>rdr</i>	SHS1R	AGAGCCCCATTGTTCTTTGA	276–257	130
			SERF*	AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG	400 016–400 039	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	EU659914	<i>gap</i>	SERR	TCGATACCATCAAAAAGTTGG	400 145–400 125	306
			SSCGF*	GATTCCGCGTAAACGGTAGAG	122–142	
<i>Staphylococcus simulans</i>	DQ321698	<i>gap</i>	SSCGR	CATCATTTAATACTTTAGCCATTG	427–404	472
			SSMF*	AGCTTCGTTTACTTCTTCGATTGT	171–194	
			SSMR	AAAAGCACAAAGCTCACATTGAC	642–621	

Primers: SAS2: ECP: *E. coli*; SCHS1: *Staph. chromogenes*; SER: *Staph. epidermidis*; SHS1: *Staph. haemolyticus*; SSCG: *Staph. sciuri*; SSM: *Staph. simulans*.

*This study.

†Dmitriev et al. (2006).

Shome et al.,2011

Amplificación por PCR: Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 50µl en el termociclador iCycler (BioRad Inc.) La mezcla constó de 200ng de ADN templado extraído, 3 U de *Taq* polimerasa, 5µl de buffer 10X - Mg, 1.5µl de MgCl₂ 50mM, 1µl de dNTP's 10Mm y una combinación de oligonucleótidos a concentraciones óptimas: SER 0.5 µmol/l, SHS1 0.45 µmol/l, SSM 0.55µmol/l para el primer tubo de reacción y SCHS1 0.5µmol/l, SSCG 0.45µmol/l, ECP 0.45µmol/l para el segundo tubo de reacción. Se llevó a cabo un ciclo a 94°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 s; 60°C por 30 s, 72°C por 45 s y después un ciclo a 72°C por 10 min.

Secuenciación del gen 16S ribosomal (16SrARN)

Las muestras de ADN que no fueron identificadas mediante los protocolos de PCR antes mencionados, se amplificaron con oligonucleótidos universales para el gen 16SrARN (Negoro et. al. 2012) y los fragmentos obtenidos se enviaron a secuenciar (Quimera biolabs S.A. de C.V) para su identificación definitiva.

Amplificación de 16SrARN

Se amplificó a partir de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos universales: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (sentido) y 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3' (reverso), que respectivamente corresponden a las posiciones 8-27 y 517-535 del gen 16SrARN de *E.coli*. La reacción constó de 35 ciclos: desnaturalización 94°C por 30 s, alineación a 55°C por 60 s y extensión a 72°C por 30 s. Finalmente un paso de extensión final a 72°C por 3 min. La detección de productos de PCR se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo de las otras reacciones de PCR.

Purificación del ADN amplificado para secuenciación

Una vez obtenido el producto de ADN para el gen 16SrRNA, se procedió a purificarlo mediante el uso de membranas de 0.025µm para diálisis en gota (Millipore Inc.). El proceso de purificación se llevó a cabo de la siguiente manera: en una caja Petri estéril con agua ultrapura Millipore®, se colocó una membrana sin que se cubriera de agua, en el centro de ésta se vertió la totalidad del producto amplificado, después de 10 min, se recuperó el producto

y se pasó a un nuevo microtubo de 0.5ml, éste se concentró a 30ng/μl y se mandaron 10μl junto con 25pmoles del oligonucleótido sentido por muestra ya que así lo indicó el laboratorio externo. Posterior a esto se compararon las secuencias obtenidas con las de la base de datos de Genbank mediante el algoritmo de la alineación en par “Basic Local Alignment search tool” (Blast N) del National Center for Biotechnology information. Se consideró un 98.5% de identidad como el mínimo aceptable para determinar que la secuencia obtenida de un aislado pertenece a una especie reportada en esta base de datos (Bou, et.al.2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 8. Prevalencia de mastitis subclínica en vacas en periodo de producción por establo analizado.

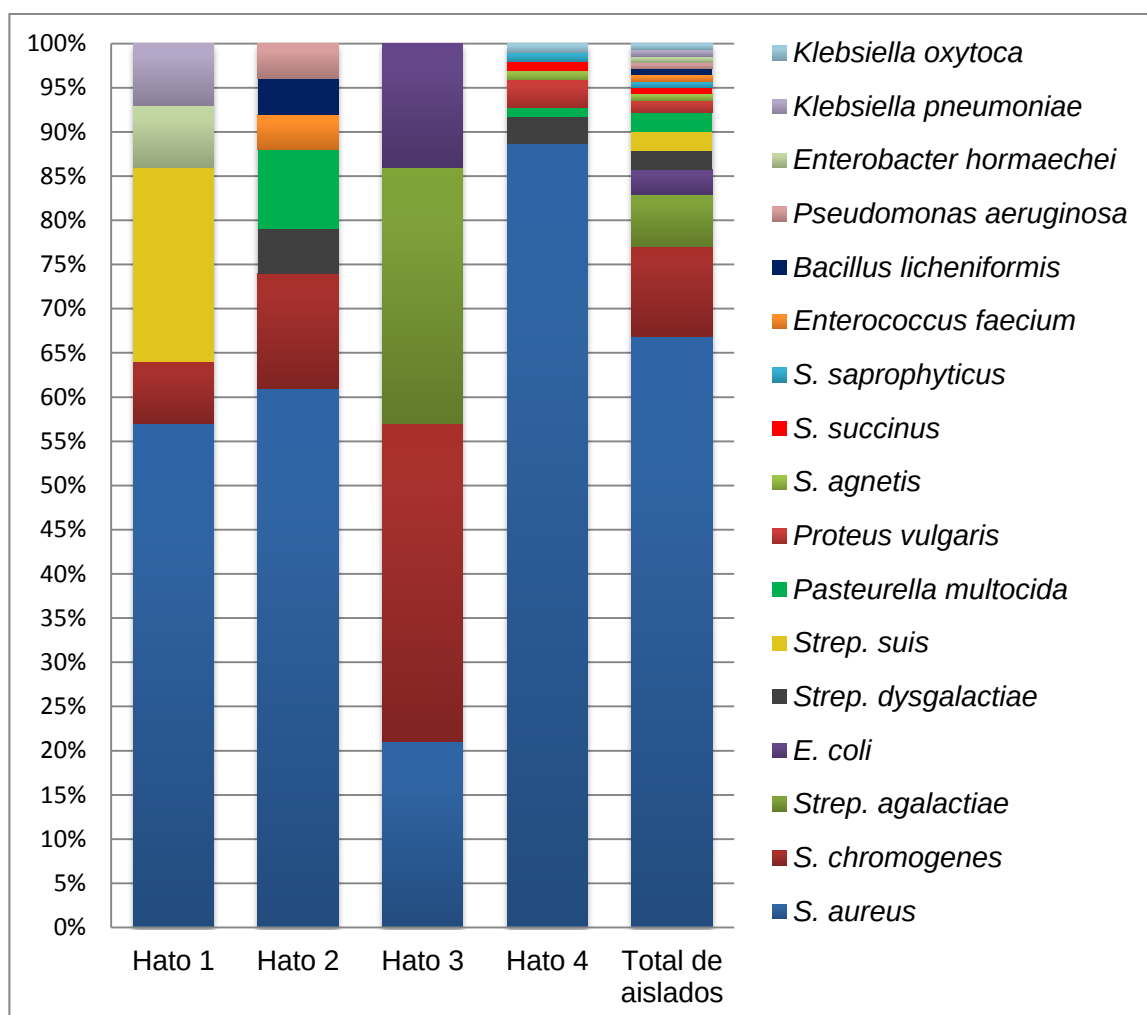
Hato	Muestreo	Vacas en producción	Vacas con mastitis	Cuartos muestreados	Total de aislados	Vacas con aislamiento	Cuartos con aislamiento	Prevalencia (%)
1	1	36	9	11	8	7	8	25
1	2	46	14	16	6	5	5	30
2	1	600	10	10	3	3	3	1.6
2	2	511	23	36	20	15	20	4.5
3	1	356	6	10	1	1	1	1.7
3	2	371	58	65	27	22	26	17.8
4	1	150	14	37	29	13	27	9.3
4	2	218	25	57	46	22	41	11.5
TOTAL		2288	159 (7%)	242 (38%)	140	88 (55.3%)	131 (54%)	X 12.675

En el cuadro 8 se observa el número de aislamientos obtenidos de cada establo y de cada muestreo, la prevalencia general de mastitis del total de animales en producción fue del 7%, sin embargo en algunos muestreos no se pudo analizar a la totalidad de vacas en producción mediante la prueba de tamiz CMT por cuestiones técnicas, por lo que la prevalencia es incierta, por ejemplo en el hato 2 que cuenta con aproximadamente 600 vacas en producción, solo se pudieron analizar con CMT a 10 y 23 vacas en cada muestreo respectivamente que el medico a cargo indico tenían mastitis con un RCS elevado, por lo que se arrojó una prevalencia muy baja. Entre los otros

hatos se detectó distinta prevalencia en cada muestreo, presentándose la mayor tasa de prevalencia en el segundo muestreo del hato 2. En el hato 1 y en el segundo muestreo del hato 3 si se pudo realizar el análisis del total de animales en producción resultando en prevalencias mayores. En cualquier caso se muestra que la mastitis es un problema importante en todos los hatos muestreados presentándose hasta en un 30% de las vacas en producción. Se observa también, que del total de cuartos positivos a la CMT el 46% no tuvo aislamiento bacteriano, lo que sugiere que las causas de mastitis en esos animales pudieron haber sido no infecciosas o que algún microorganismo no era cultivable mediante los métodos de rutina aquí utilizados, como por ejemplo *Mycoplasma spp*, *Mycobacterium bovis*, *Leptospira spp* y *Brucella spp* (Lafi, et. al., 1994).

El total de agentes bacterianos aislados fue de 140 con 17 especies distintas: *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. agnetis*, *S. succinus*, *S. saprophyticus*, *Streptococcus. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. suis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus licheniformis*, *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, dos aislados están pendientes de identificar.

Figura 2. Especies aisladas en casos de mastitis subclínica y su porcentaje de presentación con respecto al total de casos por hato y en general.

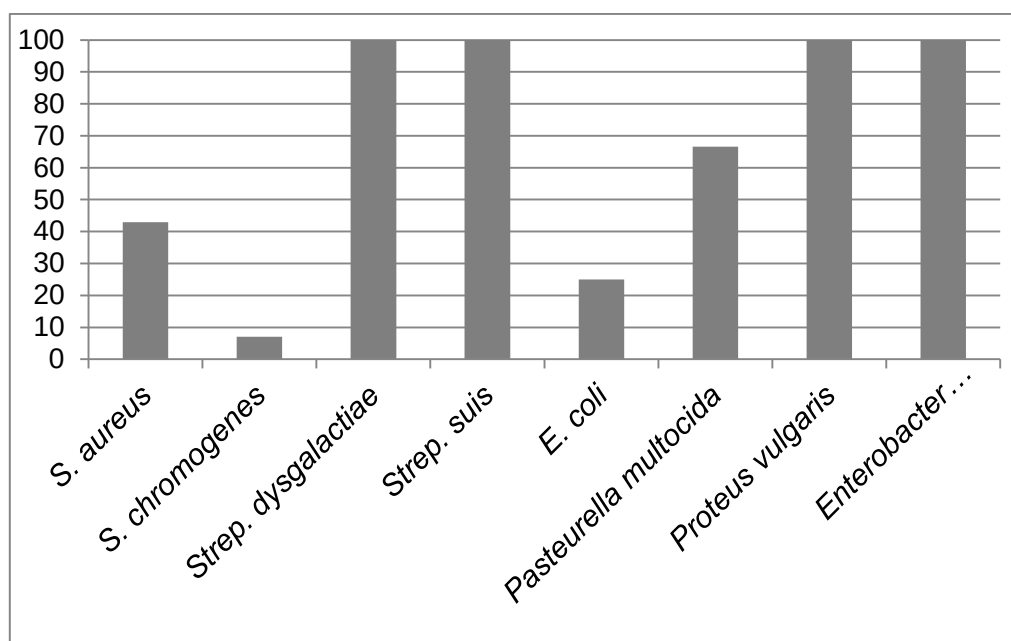


Como se observa en la figura 2, la bacteria más prevalente fué *S. aureus* con un 65.7% (92/140), lo que concuerda con lo reportado por Calderón y Rodríguez (2008) ya que fue el principal agente encontrado donde mostraron que del total de aislados el 29% (1143/2984) fue *S. aureus*.

S. aureus, *S. chromogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *E. coli* representaron más del 85% de los aislados obtenidos en el estudio, mostrando

ser los principales agentes causantes de mastitis en los establos muestreados. La totalidad de especies patógenas que se determinaron en el presente estudio, se han aislado de casos de mastitis en investigaciones realizadas en todo el mundo. Además se muestran las prevalencias de cada especie patógena aislada por hato. En el establo 3, *S. chromogenes* se presentó dos veces más que *S. aureus*. Este dato no se esperaba ya que en la mayoría de la literatura citada, los principales agentes aislados de casos de mastitis son *S. aureus* y *Streptococcus spp.*, sin embargo, también hay información sobre la reemergencia de los SCN (Satu y Suvi, 2009), donde *S. chromogenes* es el estafilococo más prevalente (Supre, et. al., 2011). En este mismo hato, *S. aureus* pasó a ser el tercer agente más prevalente, después de *S. agalactiae*, y antes que *E. coli*, siendo los únicos microorganismos aislados en este hato. También se observa que la alta frecuencia de *Strep. suis*, es una característica notable para el hato 1, ya que no se aisló en los demás hatos.

Figura 3. Porcentaje de presentación de leche anormal* en los patógenos aislados.



*Amarillenta, grisácea, acuosa, sanguinolenta, espesa, con grumos, coágulos o escamas.

Como se muestra en el cuadro 8, se analizó el aspecto macroscópico de la leche, encontrándose que en los casos de infección por *S. aureus* se presentaron cambios en alrededor del 40% de las muestras. Sin embargo mediante la prueba de X^2 de Pearson con un nivel de confianza del 95% no existió significancia con un valor P de 0.15 por lo que no existe evidencia estadísticamente significativa para asumir que *S. aureus* genera cambios en la leche. En el caso de *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus suis*, *Proteus vulgaris* y *Enterobacter hormaechei*, la totalidad de las muestras de las que se aislaron estos microorganismos presentaron cambios en la leche, en el resto de patógenos no se encontró ese hallazgo.

Cuadro 9. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de los patógenos Gram positivos aislados por establo y del promedio del total de aislados Gram positivos.

Hato	Total aislados	Cef	Eri	Am	TS	Cefo	Cefu	Pef	Pe	Ceft	Tet	Gen	Dicl
1	12	8.3	25	66.6	0	16.6	8.3	58.3	75	58.3	25	66.6	91.6
2	20	15	25	55	5	15	10	25	45	80	5	30	75
3	24	20.8	4.1	95.8	29.1	20.8	20.8	37.5	83.3	87.5	20.8	37.5	91.6
4	69	0	4.3	95.6	1.4	1.4	0	0	95.6	92.7	0	1.4	88.4
X	126	7	9.5	85.7	7	8.7	6.3	16.6	82.5	85.7	7	19	86.5

Cef= Cefalotina; Eri= Eritromicina; Am= Ampicilina; TS= Trimetoprima Sulfametoxazol; Cefo= Cefotaxima; Cefu= Cefuroxima; Pef= Pefloxacina; Pe= Penicilina; Ceft= Ceftazidima; Tet= Tetraciclina; Gen= Gentamicina; Dicl= Dicloxacilina.

En el cuadro 9 se observa la gran cantidad de multirresistencia presente en los 4 establos muestreados, donde destaca principalmente la resistencia a Ampicilina, Penicilina, Ceftazidima y Dicloxacilina, antibióticos que pertenecen al grupo de betalactámicos. También se muestra que existe diferencia en cuanto a sensibilidad a antibióticos de los aislados entre establos, en el hato 4 hay presencia de aislados que son sensibles a 4 antibióticos de distintos grupos y en el hato 1 hay sensibilidad a uno solo de los antibióticos probados. En los hatos 2 y 3 existe resistencia a todos los antimicrobianos utilizados en el estudio.

En el hato 3 donde utilizan sulfonamidas como tratamiento antibacteriano contra mastitis, existe una resistencia alta a Trimetoprima Sulfametoxazol, en comparación con el resto de los hatos.

Según también muestra el cuadro 9, la mejor opción terapéutica a utilizar en los establos muestreados, sería Cefuroxima, ya que no existe resistencia en el hato 4, y en el resto es menor al 21%. Otros antibióticos a utilizar serían Cefalotina, Trimetoprima-sulfametoxazol, Cefotaxima y Tetraciclina, aunque lo recomendado sería la rotación de estos antimicrobianos y utilizarlos solo como terapéuticos ya que su uso indiscriminado llevaría a la selección de cepas resistentes en un futuro cercano, como ya ocurrió con otros antibióticos ampliamente utilizados en los establos.

Los antibióticos más utilizados para tratar al ganado bovino, son fluorquinolonas (Enrofloxacin), penicilinas (Amoxicilina con ácido clavulánico, Penicilina G procaínica), Sulfonamidas (Sulfadiazina y Sulfametoxazol con trimetoprim), aminoglucósidos (dihidrostreptomycin), tetraciclinas (Oxitetraciclina) y Cefalosporinas (cefalotina, ceftiofur). Por lo tanto al observar la resistencia presente en estos hatos, podemos deducir que hay una leve resistencia a fluorquinolonas, solo se evaluó Pefloxacin, pero al ser muy similar a Enrofloxacin y del mismo grupo, probablemente también haya resistencia a este antibiótico. En el caso de penicilinas donde se utiliza principalmente Amoxicilina con Ácido clavulánico y Penicilina G procaínica, también existe gran resistencia en este grupo, por lo que no es recomendable utilizarlos, más sin embargo con ayuda del ácido clavulánico que es inhibidor de algunas

betalactamasas podría funcionar satisfactoriamente, por lo que se necesitaría realizar más estudios para corroborar su funcionamiento y averiguar si existe resistencia a estos compuestos. También observamos en el caso de Sulfonamidas con trimetoprim, que este conjunto de antibióticos son una buena opción en comparación con los demás, al presentar menor resistencia, utilizándolo de una manera adecuada para evitar que esta aumente. Otras dos opciones recomendables serían el utilizar Tetraciclinas y algunas Cefalosporinas como son Cefalotina, Cefotaxima y Cefuroxima ya que la resistencia fue baja en estos antibióticos. Sin embargo, la resistencia a Ceftazidima fue muy elevada, lo que sugiere que este antimicrobiano o uno muy similar fue utilizado indiscriminadamente. En el caso de aminoglucósidos la resistencia varía en los 4 hatos muestreados.

Cuadro 10. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de los patógenos Gram (-) aislados por establo y del promedio del total de aislados Gram (-).

Hato	Total aislados	Cef	Ceft	Am	TS	Cefo	Neti	Pef	Nitr	Clo	Ami	Gen	Carb
1	2	100	50	100	0	50	50	0	100	0	100	100	100
2	3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	0	0	33.3	33.3	66.6	0	0
3	4	50	25	75	25	25	0	50	75	25	0	25	75
4	5	60	20	80	20	60	0	20	20	0	40	40	20
X	14	57	28.5	71.4	21.4	42.8	7	21.4	50	14.2	42.8	35.7	50

Cef= Cefalotina; Ceft= Ceftriaxona; Am= Ampicilina, TS= Trimetoprima Sulfametoxazol; Cefo= Cefotaxima; Neti= Netilmicina; Pef= Pefloxacina; Nitr= Nitrofurantoina; Clo= Cloranfenicol; Ami= Amikacina; Gen= Gentamicina, Carb= Carbenicilina.

En el cuadro 10 se observa una clara multirresistencia de los aislados Gram negativos, principalmente a Cefalotina, Ampicilina, Carbenicilina y a Nitrofurantoina, aunque este último está prohibido para su uso en animales de producción (SAGARPA, 2012). También se observa que existe menor resistencia antimicrobiana en los aislados del hato 2, donde todos fueron sensibles a 4 de los antibióticos utilizados.

Según los resultados del antibiograma, la mejor opción para el tratamiento terapéutico en infecciones intramamarias por Gram negativos sería Netilmicina, excepto en el hato 1 donde existe resistencia en el 50% de los aislados pero 100% sensibilidad a otros antibióticos como Trimetoprima Sulfametoxazol, Pefloxacina y Cloranfenicol, aunque este último está prohibido para su uso en animales de producción (SAGARPA, 2012).

Cuadro 11. Porcentaje de aislados con resistencia antimicrobiana de cada una de las distintas especies Gram positivas aisladas por estable.

Patógeno	Cef	Erit	Am	TS	Cefo	Cefu	Pef	Pe	Ceft	Tet	Gen	Dicl
Hato 1												
<i>S. aureus</i>	12.5	37.5	100		25	12.5	75	100	75	12.5	87.5	100
<i>S. chromogenes</i>							100	100	100	100	100	100
<i>Strep. suis</i>										33.3		66.6
Hato 2												
<i>S. aureus</i>	7.1	28.5	57.1	7.1	7.1	7.1	28.5	50	100	7.1	28.5	78.5
<i>S. chromogenes</i>			33.3					33.3	33.3			100
<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	100		100	100	100	100	100		100	100
<i>Bacillus licheniformis</i>	100		100		100						100	
Hato 3												
<i>S. aureus</i>			100					66.6	100			83.3
<i>S. chromogenes</i>			90	10			10	80	90		10	90
<i>Strep. agalactiae</i>	62.5	12.5	100	75	62.5	62.5	100	100	75	62.5	100	100
Hato 4												
<i>S. aureus</i>		1.5	100	1.5	1.5			100	96.8			93.7
<i>S. saprophyticus</i>			100					100	100			100
<i>Strep. dysgalactiae</i>		50									50	

Cef= Cefalotina; Eri= Eritromicina; Am= Ampicilina; TS= Trimetoprima Sulfametoxazol; Cefo= Cefotaxima; Cefu= Cefuroxima; Pef= Pefloxacina; Pe= Penicilina; Ceft= Ceftazidima; Tet= Tetraciclina; Gen= Gentamicina; Dicl= Dicloxacilina.

En el cuadro 11 se muestra que los distintos aislados de *S. aureus* difieren en cuanto a la resistencia que presentan en los distintos hatos, ya que en tres de los hatos, el 100% de los aislados fueron resistentes a Ampicilina, de estos tres, dos hatos tenían el 100% de sus aislados resistentes a penicilina, y

ambos utilizan o las han utilizado como tratamiento contra mastitis, además de estos, Ceftazidima y Dicloxacilina son antibióticos que no se recomiendan contra *S. aureus* ni contra *S. saprophyticus* en ninguno de los hatos muestreados. También se observa que en el hato 2, por lo menos algunos aislados de *S. aureus* muestran resistencia a la totalidad de los antibióticos utilizados, en tanto en los hatos 1, 3 y 4 los aislados de *S. aureus* son sensibles a 1, 8 y 5 antibióticos respectivamente. En el hato 3 se muestra que los aislados de *S. agalactiae* en su conjunto presentaron resistencia a todos los antimicrobianos utilizados, lo que sugiere que éste patógeno ha estado presente por mucho tiempo en este hato y han sido seleccionadas cepas multirresistentes a través del tiempo, principalmente por llevar a cabo tratamientos inadecuados.

El SCN *S. chromogenes*, en los tres establos donde se aisló, fue altamente resistente a Penicilina, Ceftazidima y Dicloxacilina, en el hato 3, donde fue el patógeno mayormente aislado, también presentó resistencia elevada contra ampicilina, sin embargo fue altamente sensible al menos a 5 antibióticos.

Los datos anteriores muestran que aunque la especie patógena que se encuentre en un hato presenta generalmente unos pocos patrones de resistencia a antimicrobianos, es muy importante la historia de tratamientos en cada establo, ya que eso es lo que ha determinado la selección de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos que se han utilizado por establo.

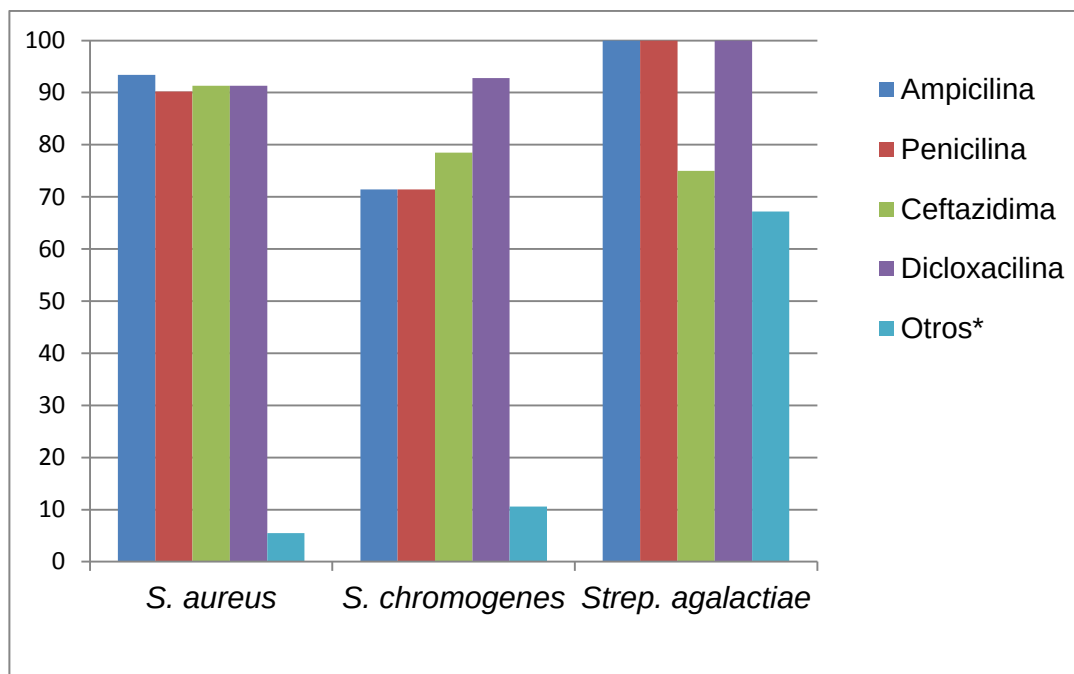
Cuadro 12. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de los patógenos Gram negativos aislados por establo.

Patógenos	Cefa	Ceft	Amp	T Su	Cefo	Net	Pef	Nit	Clo	Ami	Gent	Carb
Hato 1												
<i>Enterobacter hormaechei</i>	100		100					100		100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	100	100		100	100		100		100	100	100
Hato 2												
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	100	100	100	100			100	100			100
<i>Pasteurella multocida</i>										100		
Hato 3												
<i>E. coli</i>	50	25	75	25	25		50	75	25		25	75
Hato 4												
<i>Pasteurella multocida</i>			100							100	100	
<i>Proteus vulgaris</i>	100		100		100							

Cef= Cefalotina; Ceft= Ceftriaxona; Am= Ampicilina, TS= Trimetoprima Sulfametoxazol; Cefo= Cefotaxima; Neti= Netilmicina; Pef= Pefloxacina; Nit= Nitrofurantoina; Clo= Cloranfenicol; Ami= Amikacina; Gen= Gentamicina, Carb= Carbenicilina.

En el cuadro 12, se muestra que hay patógenos ambientales multirresistentes, principalmente *Enterobacter hormaechei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*, este último se recomienda tratar principalmente con Netilmicina y Amikacina, ya que posee resistencia a los demás antibióticos utilizados en el estudio.

Figura 4. Porcentaje de aislados con resistencia antimicrobiana de los tres principales patógenos encontrados en el estudio.



*cefalotina, eritromicina, trimetoprima sulfametoxazol, cefotaxima, cefuroxima, pefloxacina, tetraciclina, gentamicina.

En la figura 3, se muestra que existe una alta multirresistencia antimicrobiana en los patógenos que provocaron el mayor número de casos de mastitis en los establos analizados y además se muestra que la resistencia a los 4 antibióticos en la figura está muy extendida, por lo que deberían dejar de utilizarse al menos por un tiempo para dejar de hacer una presión selectiva que lleve a la total inutilidad de estos antimicrobianos y otros más. El microorganismo *S. agalactiae*, resultó ser el más resistente, pues no solo lo fue a Ampicilina, Penicilina, Ceftazidima y Dicloxacilina, si no que el 68% de los aislados fueron también resistentes a otros antibióticos, por lo que podría ser difícil el control de esta especie en el hato.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se determinó que existe una gran diversidad de microorganismos que provocan mastitis en la región, incluidos Gram positivos, Gram negativos y tanto contagiosos como ambientales, donde *S. aureus* y *S. chromogenes* fueron las principales especies aisladas, pero con diferente prevalencia en cada hato.

Los principales antibióticos a los que se presentó resistencia fueron Ampicilina, Penicilina, Ceftazidima y Dicloxacilina, a los que no se presentó alta resistencia fueron Trimetoprima Sulfametoxazol, Tetraciclina y algunas Cefalosporinas, por lo que es urgente determinar que otros fármacos o sustancias con actividad antibacteriana podrían ser utilizados en animales de producción láctea sin crear resistencia ni riesgo en salud pública.

Se observó que varió la resistencia que poseía una misma especie aislada en los distintos hatos y que algunos de estos presentaron resistencia a un mayor número de antibióticos, probablemente se deba a que se utilizan desde hace más tiempo y con mayor frecuencia propiciando que la incidencia de las cepas multirresistentes aumente, por lo que es necesario llevar un control terapéutico adecuado por cada patógeno y hato analizado y principalmente disminuir la prevalencia de mastitis mediante buenas prácticas de ordeño e higiene tanto de trabajadores como a nivel hato, ya que además existe riesgo zoonótico por la existencia de algunos de los microorganismos aislados.

LITERATURA CITADA

- Aarestrup, F. M. y N. E. Jensen. 1998. Development of penicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. *Microb. Drug Resist.* 4:247–256.
- Acha, P. y B. Szyfres. 2001. Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D. C. 3ª Ed. Vol. 1. Pp. 128-131, 155-157.
- Bedolla, C. C. 2004. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. No. 4. Pp 24-28.
- Bou, G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto y S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29(8):601-608.
- Bradley, J. y M. J. Green. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland. *Journal of Clinical Microbiology.* 39:1845 -1849.
- Calderón, A. y V. C. Rodríguez. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano de Colombia. *Revista colombiana de Ciencias pecuarias. Rev. Colomb Cienc Pecu;* 21:582-589.
- Calvinho, L. F. 2005. Jornada Técnica de Actualización en Mastitis. Montevideo, Uruguay.

- Calvinho, L. F., A. R. Delgado, C. A. Vitulich, H. L. Occhi, V. R. Canavesio, M. A. Zurbruggen y H. D. Tarabla. 1991. Susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera Santafesina. Vet. Arg. 8, 677-680.
- Capuco, A.V., S.A. Bright, J.W Pankey, D.L. Wood, R.H. Miller y J. Bitman. 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. J. Dairy Sci. 75, 2126–2130.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 1983. Group C streptococcal infections associated with eating homemade cheese-New Mexico. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 32(39):510,515-516.
- Clarridge, J. E. 2004, Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious. Diseases Clinical Microbiology Reviews, Vol. 17. Pp. 840–862.
- Cremonesi, P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati y P. Moroni. 2001. Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. Journal of Dairy Science 2006; 89(1):163-169.
- Chen, K., H. Neimark, P. Rumore y C. R. Steinman. 1989. Broad-range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. FEMS Microbiol. Lett. 57:19–24.
- Detilleux, J., L. Theron, J. Duprez, E. Reding, M. Humblet, V. Planchon, C. Delfosse, C. Bertozzi, J. Mainil y C. Hanzen. 2013. Structural equation

models to estimate risk of infection and tolerance to bovine mastitis. Genetics Selection Evolution. 45:6.

Dorn, C. R. 1993. Review of foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the western United States. J Am Vet Med Assoc 203:1583-1587.

Edmondson, P.W. y A.J. Bramley. 2004. Mastitis In: Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle (Eds.). Backwell Science, Oxford, UK, pp: 326-336.

Evenson, M. L., M. W. Hinds, R. S. Bernstein y M. S. Bergdoll. 1988. Estimation of human dose of Staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int J Food Microbiol 7:311-316.

Faría, R. J. F., K. Valero-Leal, G. D'Pool, A. García y M. Allara. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. Rev. Científica. FCV-Luz. Maracaibo. 15 (3): 227-234.

Ferraro, L., A. Scaramelli y H. Troya. 1999. Prevalencia de la Mastitis Subclínica Bovina en Venezuela y Evaluación de la Prueba de Mastitis de California (CMT) Prueba Diagnóstica. Revista científica, FCV-LUZ/ Vol. IX, 2, 81-90.

Gallis, H. A. 1991. *Streptococcus viridans* y beta-hemolíticos (No grupo A, B y D). En: Mandell, G. L., R. G. Douglas, Jr., J. E. Bennett, eds. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 3a edición. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.

- Giri, S. N., Z. Chen, E. J. Carroll, R. Mueller, M. J. Schiedt y L. Panico. 1984. Role of prostaglandins in pathogenesis of bovine mastitis induced by *Escherichia coli* endotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 45, 586–591.
- Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Res.* 77:2103-2112.
- Hogan, J., R. Gonzalez, R. Harmon, S. Nickerson, S. Oliver, J. Pankey y K. Smith. 1999. Laboratory Handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council. Estados Unidos. p. 34-89.
- Huchin, C. C. 2009. Instructivo para el procesamiento de muestras del área de Microbiología. Universidad Autónoma de Yucatán. I-FQUI-LAC-07. Disponible en:http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf.
- Janda, J. M. y S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 45. Pp. 2761–2764.
- Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Can vet J* volumen 38.
- Kitchen, B. J. 1981. Review of the progress of dairy science bovine mastitis milk compositional changes and related diagnostic-tests. *J.Dairy Res.* 48, 167–188.

- Kivaria, F., J. Noordhuizen y M. Nielen. 2007. Interpretation of California mastitis test scores using *Staphylococcus aureus* culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dares Salaam region of Tanzania. *Prev. Vet. Medicine*. 78: 274-285.
- Koskinen M, J. Holopainen, S. Pyörälä, P. Bredbacka, A. Pitkälä y H. Barkema. 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. 92(3):952-959.
- Lafi, S., O. Al-Rawashdeh, T. Na'Was, N. Hailat. 1994. National cross-sectional study of mastitis in dairy cattle in Jordan. *Trop Anim Health Prod*. 26(3):168-74.
- Lee, C. S., F. B. Wooding y P. Kemp. 1980. Identification, properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows. Secretions colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res*. 47, 39–50.
- Mansilla, A., C. Pedraza, P. Fajardo y H. Agüero. 2001. Métodos de estimación del nivel de mastitis en vacas lecheras a partir de la determinación del test de california para mastitis (CMT) de sus cuartos individuales. *Agric. Tec*. 6 (2):1-12.
- Milner, P., K. L. Page, A. W. Walton, J. E. Hillerton. 1996. Detection of clinical mastitis by changes in electrical conductivity of foremilk before visible changes in milk. *J. Dairy Sci*. 79, 83–86.

- Nacional mastitis council. 1990. Manejo del hato lechero. Una revisión comprensiva del control de la mastitis. Upjhon Company. Michigan, USA. Pp.1-15.
- Negoro E., H. Iwasaki, K. Tai, S. Ikegaya, K. Takagi, S. Kishi, T. Yamauchi, A. Yoshida, Y. Urasaki, M. Shimadzu y T. Ueda. 2013. Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. Elsevier. International Journal of Infectious Diseases. Volume 17, Issue 4, Pp e271–e276.
- Nunes, S., R. Bexiga, L. Cavaco y C. Vilela. 2007. Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. J. Dairy Sci. 90: 3242-3246.
- Owens, W. E., C. H. Ray, J. L. Watts, R. J. Yancey. 1997. Comparison of Success of Antibiotic Therapy During Lactation and Results of Antimicrobial Susceptibility Tests for Bovine Mastitis. J. Dairy Sci. 80, 313-317.
- Paape, M. J., D. B. Douglas, X. Zhao y J. Lee. 2003. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. Vet. Res. 34, 597–627.
- Patterson, M. J. y A. B. Hafeez. 1976. Group B Streptococci in human disease. Bacterial Rev. 40:774-792.
- Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux y C. Burvenich. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 7, 109–121.

- Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* 6:313–321.
- Petrosino, J. F., S. Highlander, R. A. Luna, R. A. Gibbs y J. Versalovic. 2009. Metagenomic pyrosequencing y microbial identification. *Clin Chem* 55: 856-866.
- Philpot, W. N. y S. N. Nickerson. 1992. Mastitis: el contra ataque: Una estrategia para combatir la mastitis. Estados Unidos: Babson Bros Co, Pp 147-234.
- Philpot, W. N. y S. N. Nickerson. 2000. Importancia económica de la mastitis. Ganando la lucha contra la mastitis. Westfalia-Surge. Estados Unidos de América: 1-13, 44-53.
- Pitkala, A., M. Haveri, S. Pyorala, V. Myllys y T. Honkanen-Buzalski. 2004. Prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.
- Quinn, P., B. Markey, M. Cartel, W. Donnelly y F. Leonard. 2002. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Ed. Acribia, España. P. 583.
- Radostis O., C. C. Gay, D. C. Blood y K. W. Hincheliff. 2001. Medicina veterinaria tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. McGraw-Hill interamericana de España. Tomo 1. Pp. 712-714.
- Relman, D. A. 1999. The search for unrecognized pathogens. *Science* 284: 1308–1310.

- Riffon R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, y J. Lagacé. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2584-2589.
- Ruiz J. D., N. Ramírez y O. Arroyave. 2001. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Col Cienc Pec*. Vol. 14: 2.
- SAGARPA. 2012. Diario Oficial. Acuerdo por el que se modifica el diverso por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos.
- Satu P. y S. Taponen 2009. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. 134: 3-8.
- Scaramelli A. 1988. Comparación de tres métodos indirectos para detección de Mastitis Subclínica bovina. Tesis de grado. Posgrado en Medicina Veterinaria. Universidad Central de Venezuela.
- Scaramelli, A. y Z. Gonzalez, 2005. Epizootiología y diagnóstico de mastitis bovina. *Manual de Ganadería doble propósito*. Venezuela. 9:329-332.
- Shome B. R., S. D. Mitra, M. Bhuvana, N. Krithiga, D. Velu, R. Shome, S. Isloor, S. B. Barbuddhe y H. Rahman. 2011. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology*.

- Songer, G. y W. K. Post. 2004. Veterinary microbiology, Bacterial and fungal agent of animal disease. Elsevier Science Health Science Division.
- Supré K., F. Haesebrouck, R. N. Zadoks, M. Vaneechoutte, S. Piepers, S. De Vliegher. 2011. Some coagulase-negative Staphylococcus species affect udder health more than others. J Dairy Sci. 94(5):2329-40.
- Timoney, J. F., J. H. Gillespie, F. W. Scott y J. E. Barlough. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th ed. Ithaca, New York: Comstock.
- Trujillo C. M., A. F. Gallego, N. Ramirez y L. G. Palacio. 2011. Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño. Revista colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 24, No 1.
- Velasco Z., y Y. Maza. 2002. Bacterias de Interés Veterinario. Med Vet; vol. 19 (1):1-11.
- Viguier C., A. Sushrut, N. Gilmartin, K. Welbeck y R. O'Kennedy. 2009. Mastitis Detection: current trends and future perspectives. Cel Press. doi:10.1016.
- Wellenberg G. J., W. H. M. Van der Poel y J. T. Van Oirschot. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology, Article 2361, pp. 2-21.
- Wilson, J. D., R. N. Gonzalez, K. L. Case, L. L. Garrison y Y. T. Gröhn. 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for

bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. J. Dairy Sci.82:1664–1670.

Wilson, D. J., R. N. Gonzalez y H. H. Das. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. J. Dairy Sci. 80:2593-2598.

Wolter, W., V. H. Castañeda, B. Kloppert y M. Zschoeck. 2004. La mastitis bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Zadoks, R. N., J. R. Middleton, S. McDougall, J. Katholm y Y. H. Schukken. 2011. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 16:357-372.

Zecconi A, R. Piccinini, L. K. Fox. 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during the program control in nine commercial dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223(5), 684-688.

Zhao X. y P. Lacasse. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. J Anim Sci. 86:57-65.