

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas

Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**FRECUENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
AISLADOS DE *Staphylococcus aureus* OBTENIDOS DE
CASOS DE MASTITIS EN ESTABLOS LECHEROS DE LA
PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA.**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

JAVIER PALACIOS TORRES

DIRECTOR:

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

La presente tesis "**Frecuencia y caracterización molecular de aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de casos de mastitis en establos lecheros de la península de baja california.**" realizada por el **C. Javier Palacios Torres**, dirigido por el **Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Comité Particular

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto.

Director

Dr. Gilberto López Valencia.

Asesor

Dra. Sawako Oshima.

Asesora

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez

Asesor

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Asesor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, por haberme dado la fuerza, la fe y el valor necesarios para culminar esta meta de mi vida.

Al Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto por brindarme su valioso tiempo, su experiencia y su apoyo incondicional para lograr finalizar este proyecto, por su orientación, amistad y crítica constructiva, con lo que siempre me alentó a seguir adelante y continuar superándome día a día.

Por todas sus atenciones, consejos y aportaciones tanto profesionales como personales, quiero agradecer a la Dra. Sawako Oshima, Dr. Gilberto López Valencia, Dr. José Carlomán Herrera Ramírez, Dra. Carolina Pujol Manríquez y Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez; quienes siempre me dieron un trato muy afectuoso.

A mis profesores por todas sus enseñanzas y experiencias compartidas que me ayudaron a crecer y madurar tanto el ámbito personal como el profesional.

A mis compañeros que me brindaron su amistad y apoyo incondicional tanto en los momentos de alegría y diversión como en los momentos de arduo trabajo, quiero agradecerles que siempre me hayan tratado con mucho cariño y respeto, siempre serán como parte de mi familia.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y al Instituto de Ciencias Agrícolas por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al CONACYT por el apoyo a través de los proyectos “Fortalecimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo de biotecnología enfocada hacia Una Sola Salud: Interfaz Animal-Hombre-Ecosistema (INFR-2014-01/225924); y Conservación y Aprovechamiento de la Biodiversidad de Microorganismos Marinos, fortalecimiento de la contribución de los mares al desarrollo económico nacional (PDCP-2014-01/248033).

DEDICATORIA

A mí querida esposa Alma y mi pequeño hijo Javier, por estar siempre a mi lado alentándome a seguir superándome y ser siempre una persona de bien.

A mis padres y a mi hermano por su apoyo firme y constante, por motivarme siempre a luchar por cumplir mis metas, respetando y apoyando cada una de mis decisiones, por inculcarme buenos sentimientos y valores con los cuales me he sabido abrir paso en la vida.

ÍNDICE

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1.....	1
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	2
CAPÍTULO 2.....	4
II. ANTECEDENTES	5
2.1. Mastitis bovina	5
2.2. Patogenia de la mastitis	6
2.3. Tipos de mastitis.....	7
2.3.1. Mastitis subclínica	7
2.3.2. Mastitis clínica	8
2.4. Estrategias para el control de mastitis	10
2.5. Pruebas para detección de mastitis	13
2.5.1. Conteo de células somáticas	13
2.5.2. Prueba de California para mastitis (CMT)	14
2.5.3. Recuento de células somáticas en tanque de leche (BTSCC)	16
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> en mastitis bovina	16
2.7. Patogenia y virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.8. Programa de control para <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.9. Otros aspectos a considerar para la prevención y control de <i>S. aureus</i>	22
2.10. Mecanismo de acción de los antibióticos	24
2.10.1. β -lactámicos	24
2.10.2. Cefalosporinas.....	24
2.10.3. Macrólidos.....	25
2.10.4. Aminoglucósidos	25
2.10.5. Quinolonas	25
2.10.6. Tetraciclinas.....	26

2.10.7. Sulfonamidas	26
2.11. Resistencia bacteriana hacia los antibióticos.....	26
2.12. Mecanismos de resistencia bacteriana	28
2.12.1. Resistencia por inactivación enzimática.....	28
2.12.1.1. Inactivación del antibiótico mediante hidrólisis	28
2.12.1.2 Inactivación del antibiótico mediante transferasas	29
2.12.1.3 Inactivación del antibiótico mediante mecanismos redox.....	29
2.12.2 Resistencia por alteración del sitio blanco del antibiótico.....	29
2.12.2.1 Alteración de la estructura del peptidoglicano	29
2.12.2.2 Interferencia en la síntesis de proteínas	30
2.12.2.3 Interferencia en la síntesis de ADN	30
2.12.3 Bombas de eflujo.....	31
2.13. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante PCR.....	31
2.14. Tipificación molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.15. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).	36
2.16. Tipificación por secuenciación de múltiples locus (MLST)	38
2.17. Tipificación <i>spa</i>	38
2.18. Tipificación <i>SCCmec</i> ,.....	38
2.19. Tipificación mediante el número variable de repeticiones en tándem (VNTR).	39
CAPÍTULO 3.....	65
III. ARTÍCULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO	66
3.1. Prevalence and resistance profiles of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from bovine mastitis cases in dairy farms in Baja California Peninsula, México.	66
3.2 Identificación Molecular de Patógenos que Provocan Mastitis Bovina en Establos de la Península de Baja California, México.....	78
CAPÍTULO 4.....	95
IV. CONCLUSIONES GENERALES	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Lectura e interpretación de la prueba CMT y su equivalencia con el recuento de células somáticas.....	15
2	Cebadores para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	33

RESUMEN

La mastitis en ganado lechero es el problema de salud más importante en 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. *Staphylococcus aureus* es una causa frecuente de infecciones intramamarias tanto subclínicas como clínicas en el ganado lechero, siendo responsable de cerca de un tercio de los casos de mastitis en los establos. La terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de infecciones, aun cuando esta práctica lleve a la selección de cepas resistentes que intervienen de manera negativa en el tratamiento. La genotipificación de *S. aureus* aislado de leche bovina, es una herramienta importante en estudios epidemiológicos de la mastitis y contribuye al entendimiento de la diseminación del patógeno. En el presente estudio se tomaron muestras de leche de vacas en producción positivas a mastitis en 7 establos lecheros de la región, se aislaron los agentes etiológicos, se identificaron mediante PCR, se determinó su perfil de resistencia a antibióticos y se genotipificaron mediante VNTR. Se observó una prevalencia general de mastitis del 17.80%, del total de vacas positivas a CMT el 29.60% (37/125) se vieron afectadas por *S. aureus*. De un total de 107 aislados de *S. aureus*, el 74.76% (80/107) presentaron multidrogorresistencia (MDR), principalmente al grupo de betalactámicos y cefalosporinas (74.76%), macrólidos (71.96%) y quinolonas (67.28%). Se identificaron 29 perfiles MLVA, los cuales se distribuyeron en 6 grupos genéticos que corresponden a los establos muestreados, algunos de los aislados no mostraron parentesco con los demás aislados de un establo, lo que sugiere que fueron microorganismos de reciente introducción. Los resultados obtenidos muestran que el problema de mastitis, la presencia de diferentes cepas de *S. aureus* y la resistencia a distintos antimicrobianos son un problema importante en los establos muestreados, por lo que es importante tomar las medidas necesarias, como mejores prácticas de ordeña y tratamientos adecuados previo antibiograma para un mejor control de la mastitis bovina.

ABSTRACT

Mastitis in dairy cattle is the health more important 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 the cost of treatments. *Staphylococcus aureus* is a frequent cause of subclinical and clinical intramammary infections in dairy cattle, thus being responsible for one third of mastitis cases in dairy farms. Antibiotic therapy plays a decisive role in the elimination of infections, even though this practice leads to the selection of resistant strains that intervene negatively in the treatment. Genotyping of *S. aureus* isolated from bovine milk is an important tool in epidemiological studies of mastitis and contributes to understanding of the pathogen's dissemination. In the present study milk samples were collected from cows in production positive to mastitis in 7 dairy herds of the region, etiological agents were isolated, identified by PCR, their antibiotic resistance profile was determined, and were genotyped by VNTR. A general prevalence of mastitis of 17.80% was observed, of the total of cows positive to CMT, 29.60% (37/125) were affected by *S. aureus*. From the total of 107 *S. aureus* isolates, 74.76% (80/107) presented multidrug resistance (MDR), mainly to the group of beta-lactams and cephalosporins (74.76%), macrolides (71.96%) and quinolones (67.28%). Furthermore 29 MLVA profiles were identified, which were distributed in 6 genetic groups corresponding to the sampled barns, some of the isolates were not related to the other isolates of a barn, suggesting that they were recently introduced microorganisms. The results obtained show that the problem of mastitis, the presence of different strains of *S. aureus* and resistance to different antimicrobials are an important problem in the sampled herds, so it is important to take the necessary measures, such as better milking practices and adequate treatments after antibiogram for a better control of bovine mastitis.

CAPÍTULO 1

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La mastitis es una inflamación del parénquima de la glándula mamaria, que se caracteriza por cambios físicos, químicos y usualmente bacteriológicos en la leche, así mismo se presentan cambios patológicos en los tejidos glandulares (Radostits *et al.*, 2000). Esta reacción inflamatoria es inducida cuando los microorganismos patógenos logran ingresar en la ubre vía el canal del pezón, superando los mecanismos defensivos y multiplicándose en el tejido mamario, dañando el órgano y alterando la composición normal de la leche (Hillerton y Barry, 2005; Castro *et al.*, 2006)

La mastitis es una de las enfermedades más importantes con alta prevalencia que afecta mundialmente la industria lechera, pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo, estimándose dichas pérdidas en alrededor de 35 mil millones de dólares (Wellenberg *et al.*, 2002) debido a la disminución en el rendimiento de leche, leche descartada, atención veterinaria, aumento en el número de tratamientos clínicos y eliminación temprana de vacas (Hogeveen y Osteras, 2005).

Una de las principales formas de mastitis que más afecta en los sistemas productivos lecheros, es la mastitis subclínica ya que entre el 20% y 50% de las vacas en producción se pueden ver afectadas por este tipo de mastitis (Wilson *et al.*, 1997; Pitkala *et al.*, 2004). Los costos de las mastitis subclínicas son muy difíciles de cuantificar, pero se considera que los costos promedios son mayores que los causados por la mastitis clínica. Existen estudios en los cuales, asumiendo una prevalencia del 45% de mastitis subclínica en un establo, los costos de las pérdidas oscilan entre 180 y 320 dólares por animal al año (Wilson *et al.*, 1997). En México la mastitis es endémica como en muchos otros países, de acuerdo con investigaciones realizadas por Wolter *et al.* (2004) la mastitis subclínica está presente en un 50% de los hatos lecheros de México siendo el costo promedio por vaca de entre \$1700 a \$2000 M.N. al año, por lo que las pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica se estiman en varios miles de millones de pesos.

Uno de los principales microorganismos patógenos causantes de la mastitis bovina es *Staphylococcus aureus*, el cual no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño y en muchas ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadenar una reacción inflamatoria (Capurro *et al.*, 2010; Piccinini *et al.*, 2008).

S. aureus es un microorganismo coco Gram-positivo, no móvil, no esporulado que puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos, siendo esta última la más común. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce las enzimas catalasa y coagulasa, con un crecimiento óptimo en un lapso de 24 horas en medio agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm de diámetro, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Wilkinson, 1997).

La presencia de este microorganismo patógeno en ganado bovino productor de leche como alimento, origina el riesgo potencial de transmitir clones específicos resistentes o determinantes de resistencia a antibióticos así como la transmisión de los animales a los seres humanos o viceversa (Haenni *et al.*, 2010; Cassone *et al.*, 2009).

La necesidad de conocer la evolución y la distribución de diferentes cepas de *S. aureus* para poder inferir algunos aspectos epidemiológicos, ha permitido el desarrollo y la estandarización de diversas metodologías para realizar la tipificación molecular (De Colsa, 2011). Los VNTR son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o sustracción de secuencias repetidas. Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas en sus flancos, permitiendo diferenciar aislados genotípicamente (Sabat, *et al.*, 2003; Ablordey, *et al.*, 2005).

CAPÍTULO 2

II. ANTECEDENTES

2.1. Mastitis bovina

La mastitis infecciosa bovina es una de las enfermedades más frecuente y costosa que afecta al ganado lechero. Esta enfermedad ocurre cuando las bacterias ingresan a la ubre y al superar las defensas inmunitarias de la vaca, establecen una infección y por consecuencia se produce una inflamación en el tejido secretor de la ubre (Ruegg, 2001). Esta respuesta inflamatoria de la glándula mamaria, puede deberse a una lesión con el fin de destruir o neutralizar los agentes infecciosos y recuperar la función normal de la ubre. No obstante, la inflamación puede ser causada por distintos tipos de lesiones incluyendo (además de los agentes infecciosos y sus toxinas), traumas físicos o bien irritación por sustancias químicas, dando como resultado una disminución en la producción y calidad de la leche, afectando sus características organolépticas (NMC, 1996). Así mismo la nutrición es otro factor importante a considerar en la mastitis bovina. La alimentación en el ganado lechero, siempre debe estar orientada en cubrir las necesidades nutricionales en las diferentes etapas del ciclo de lactancia. Por ejemplo; durante el período de transición las vacas pueden experimentar un balance energético negativo, que puede tener un impacto importante en la respuesta inmunológica y pueden presentar cetosis que aumenta dos veces el riesgo de presentar mastitis clínica (Oltenacu y Ekesbo 1994; Leslie *et al.*, 2000). De acuerdo a Suriyasathaporn *et al.* (2000) las vacas con un balance energético negativo muestran un deterioro de los mecanismos de defensa de la ubre que se debe a la reducción de fagocitosis por parte de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos; además de la reducción en la generación de quimio atrayentes para la migración de leucocitos hacia la glándula mamaria infectada.

La mastitis es una enfermedad difícil de controlar, ya que son diversos los agentes infecciosos que pueden infectar la ubre y provocar la enfermedad, dependiendo de su hábitat principal y de su forma de transmisión. Los microorganismos causantes de la mastitis han sido divididos en patógenos contagiosos (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp.*), los cuales se pueden propagar de vaca a vaca principalmente durante la ordeña; y patógenos ambientales

(*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y bacterias coliformes en las que se incluyen *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp) que con frecuencia se encuentran en el hábitat de las vacas lecheras. Esta clasificación se basa en la forma en que estos microorganismos interactúan con la glándula mamaria y, en consecuencia, en el tipo de mastitis que producen (Hogan *et al.*, 2011).

Los múltiples agentes bacterianos con sus diferentes mecanismos de virulencia y patogenicidad, la colonización transitoria del canal del pezón, el grado y duración de la reacción inflamatoria que es imperceptible al examen clínico visual son factores para considerarla de tipo subclínico y como una infección activa (Bedolla, 2004), así mismo la resistencia bacteriana de estos patógenos a la acción de los antibióticos se torna en una infección recidivante (Philpot, *et al.*, 1992). La transmisión de esta enfermedad ocurre de un animal enfermo a uno sano por medio de las pezoneras sucias de las máquinas ordeñadoras, moscas, estiércol de los corrales y falta de higiene del ordeñador entre otras (Rosas, 1992; Capurro *et al.*, 2010).

2.2. Patogenia de la mastitis

La infección de la glándula mamaria ocurre generalmente por vía ascendente, en donde los microorganismos pasan a través del canal del pezón hacia la cisterna del mismo y en consecuencia pueden establecerse en el tejido secretor (Anderson, 1983). En un inicio se verán dañadas solo pequeñas áreas del cuarto afectado, lo que incluye pérdida de la función de los alvéolos involucrados, las células epiteliales que revisten los alvéolos y pequeños conductos mamarios que se degeneran, mueren y se descaman. Este material, más leucocitos y la fibrina producen coágulos que bloquean los conductos mayores, impidiendo la remoción de la leche que proviene de áreas aun funcionales. La leche que no puede ser eliminada puede traer como consecuencia, una regresión prematura del tejido secretor por el aumento de la presión intramamaria y por efecto del factor proteico inhibidor de la secreción de leche y por consecuencia esta regresión puede ser permanente y el tejido no logra recuperar su funcionalidad por el resto de la lactancia. Aunado a esto, la leche residual estancada puede fungir como un medio de cultivo ideal para que progrese la enfermedad. Los conductos bloqueados pueden reabrirse, liberando bacterias a otras partes del cuarto infectado, este proceso

se repite una y otra vez en cuestión de días o semanas, perpetuando un ciclo continuo de infecciones en áreas vecinas. Durante los estadios tempranos, el daño tisular es mínimo y generalmente reversible. Si las bacterias logran sobrevivir, los micro abscesos aumentarán de tamaño hasta hacerse clínicamente palpables. El curso crónico de la mastitis por *S. aureus* implica la destrucción de alvéolos, oclusión de conductos galactóforos y regresión del epitelio alveolar que es reemplazado por tejido fibroso no funcional (Corbellini, 2002; Akers y Nickerson, 2011).

2.3. Tipos de mastitis

La mastitis bovina puede clasificarse de acuerdo al grado de la inflamación y a las lesiones locales e implicaciones sistémicas en la vaca. En términos generales, se clasifica en mastitis subclínica y mastitis clínica (Fernández *et al.*, 2012).

2.3.1. Mastitis subclínica

De acuerdo al Consejo Nacional de la Mastitis de los Estados Unidos, se puede definir como mastitis subclínica, la inflamación de la glándula mamaria que no genera cambios visibles en la ubre o en la leche. Las vacas afectadas con este tipo de mastitis producen menos leche y la calidad de ésta se ve reducida, pudiendo ser una fuente de infección para las otras vacas del hato. A pesar de que la leche obtenida de vacas con mastitis subclínica parece visualmente normal, ésta puede contener un excesivo recuento de células somáticas (SCC, del inglés Somatic Cell Count) con o sin la presencia de algún microorganismo patógeno. El recuento de células somáticas (SCC) en los cuartos mamarios sanos generalmente es menor de 100,000 células/ml, sin embargo un recuento menor de 200,000 células/ml se considera como un valor práctico para definir un cuarto mamario como sano. Por lo tanto cuanto mayor sea SCC mayor es el nivel de inflamación del tejido, lo que podría indicar una infección intramamaria. A su vez muestras bacteriológicamente negativas obtenidas de leche con un elevado SCC no necesariamente indica que sea una glándula mamaria saludable, ya que esto puede ocurrir debido a que la respuesta inmune ha reducido el número de bacterias por debajo de los niveles detectables en el laboratorio (100 UFC/ml). Lo anterior ocurre entre el 10 y 25% de los cuartos mamarios con un SCC >200,000 células/ml que son aparentemente negativos al crecimiento bacteriano. Cabe mencionar que un incremento

en el SCC es parte de una respuesta inmune con el fin de eliminar patógenos (Dohoo y Leslie, 1991; Schepers et al., 1997 y Pantoja et al., 2009).

La mastitis subclínica afecta entre el 20 y 50% de las vacas en producción dentro de los hatos lecheros, provocando pérdidas económicas por animal al año en rangos de 180 a 320 dólares en los Estados Unidos y Europa (Wilson *et al.*, 1997; Huijps et al., 2008) en tanto en México los costos se estiman en 100 dólares (Wolter *et al.*, 2004; Pech *et al.*, 2007). La mastitis Es una enfermedad de alta prevalencia en el ganado lechero como se ha mostrado en diferentes estudios realizados, Así, por ejemplo en México se han reportado prevalencias de mastitis entre los rangos de 35.64% a 61.80% (Pastor y Bedolla., 2008; Pastor *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2012 y Aguilar *et al.*, 2014), en tanto en algunos países de América del Sur se reportan prevalencias que varían entre el 36.20% y 65.60% (Castillo *et al.*, 2009; Ramírez *et al* 2011; Ruiz *et al.*, 2011; Giannechini *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2015); en países europeos, asiáticos y africanos se han reportado prevalencias en los rangos de 18.10 % a 86.20 % (Li *et al.*, 2009; Mekibib *et al.*, 2010; Hashemi *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012; Katsande *et al.*, 2013; Abrahmsén *et al* 2014; Bludau *et al.*, 2014; Kurjogi *et al.*, 2014; Iraguha *et al.*, 2015).

2.3.2. Mastitis clínica

La mastitis clínica se caracteriza por secreción de leche anormal ya sea que el animal muestre o no signos locales o sistémicos de inflamación. Se estima que más del 80% de los casos de mastitis clínica presentan algunos signos localizados (Oliveira y Ruegg, 2014). En el caso de mastitis clínica leve o moderada, los cambios en la ubre pueden incluir hinchazón, calor, dolor y enrojecimiento, en tanto en casos severos puede existir afectación sistémica, como fiebre, anorexia y shock (Harmon, 1994; Lago *et al.*, 2011). Se estima que la mastitis clínica causa pérdidas económicas de alrededor de 444 dólares en los primeros 30 días de lactación, debido a gastos en diagnóstico, tratamiento, eliminación de leche, servicios veterinarios, muerte de vacas, disminución en la producción de leche y eliminación temprana de animales (Rollin *et al.*, 2015).

El primer paso para manejar un caso de mastitis clínica es determinar el nivel de severidad, el cual se clasifica como leve, moderado o severo (Wenz *et al.*, 2006), enfocándose solo en la severidad de la misma. Roberson (2012) menciona que para medir la severidad se pueden tomar en cuenta parámetros como: la temperatura rectal, estado de hidratación, función ruminal y color de secreciones lácteas. Así mismo el autor menciona la siguiente clasificación para determinar la severidad de los casos de mastitis clínica:

- **Casos de mastitis clínica leve:** son aquellos en los que solo se puede observar leche anormal, la vaca no se ve afectada sistémicamente y la ubre no se observa hinchada o dura. Se estima que entre el 60% y el 90% de los casos clínicos presentan una severidad leve, por lo que es importante identificar este tipo de mastitis ya que puede existir suficiente tiempo para realizar un cultivo microbiológico y así determinar una manera eficaz para manejar el caso (Roberson, 2010; Wenz, 2005).
- **Casos de mastitis clínica moderada:** Lago *et al.* (2011) clasifican un caso de mastitis clínica como moderado al observar leche anormal en su color, consistencia o viscosidad, además si existe o no presencia de calor, dolor, enrojecimiento o inflamación ya sea de manera generalizada o bien solo en un cuarto mamario. Por otro lado Roberson (2010) indica que los casos clínicos moderados representan alrededor del 10% al 30% de los casos y que se pueden evaluar seis parámetros para determinar un caso de mastitis clínica moderada, que consiste en observar leche anormal y no más de uno de los siguientes signos: secreción de color sérico, disminución en la función ruminal, deshidratación, temperatura elevada, aumento en la frecuencia cardíaca o frecuencia respiratoria.
- **Casos de mastitis clínica severa:** las vacas con mastitis clínica grave, presentan secreción de leche anormal, pueden o no presentar signos de hinchazón de la glándula mamaria, y tienen dos o más signos de enfermedad sistémica como fiebre, taquicardia, taquipnea, deshidratación y disminución en la función ruminal. Así mismo, es probable que un solo sistema de medición de la

gravedad de los casos clínicos no funcione de manera similar en todos los hatos. Además los parámetros pueden ser sugestivos y mal definidos dependiendo de la persona encargada de realizar la evaluación clínica. Pero lo que queda claro es que una vez determinado el nivel de gravedad es importante siempre realizar un cultivo microbiológico con el fin de aplicar un tratamiento correcto y efectivo para cada patógeno encontrado y así controlar la mastitis.

2.4. Estrategias para el control de mastitis

Para reducir las pérdidas económicas y la presencia de agentes infecciosos y ambientales es importante seguir las buenas prácticas de manejo en la ordeña. El Consejo Nacional de Mastitis (NMC, 2008) de los Estados Unidos sugiere algunos principios básicos para la prevención de la mastitis:

1. **Mantener a las vacas con pezones limpios y secos.** Esto reducirá el número de bacterias y ayudará a prevenir la mastitis ambiental. Los pezones deben lavarse y secarse completamente antes de ser ordeñados. Es importante usar pre-sellador con solución bactericida que además es importante para estimular la secreción de leche.
2. **Prevenir la transferencia de patógenos entre vaca y vaca durante la ordeña.** Un método que se puede aplicar para controlar la transferencia de patógenos es utilizar una toalla secante (ya sea papel o tela) para cada vaca, que los ordeñadores utilicen guantes y ordeñar a las vacas infectadas por separado después de haber ordeñado a todas las vacas sanas.
3. **Prevenir lesiones en los pezones.** La prevención del daño a los pezones comienza con una apropiada técnica de ordeña y es recomendable revisar continuamente las funciones y mantenimiento del equipo de ordeña.
4. **Proporcionar un ambiente que permita que las vacas permanezcan limpias.** Las camas limpias y las áreas de descanso evitarán la contaminación de los extremos de los pezones y reducirán el tiempo de preparación antes de la ordeña. Es importante que en las salas de ordeña y corrales tengan buen drenaje, eliminar el estiércol rutinariamente y mantener una ventilación

adecuada. De igual manera es importante evitar el hacinamiento en los corrales y evitar el encharcamiento.

5. **Detección temprana de nuevas infecciones.** Esto incluye realizar la prueba de California para mastitis (CMT) periódicamente, observar el estado físico de los pezones, realizar recuento de células somáticas. Los ordeñadores deben estar capacitados para realizar estas pruebas.
6. **Uso apropiado de antibióticos.** El uso correcto de los antimicrobianos incrementa el éxito del tratamiento, previene infecciones crónicas, se mantiene el control en los costos por medicación y previene residuos de antibióticos en la leche. Así mismo se evita la aparición de resistencia bacteriana. Es importante que los protocolos de uso de antibióticos sean establecidos por Médicos Veterinarios.
7. **Control del tiempo de infección.** Las infecciones deben ser controladas lo más rápido posible. Las infecciones de larga duración provocaran daños al tejido secretor lo que provocará pérdidas en la producción de leche, además las vacas con infecciones crónicas son focos de infección para el resto de las vacas en el hato. El buen manejo en el secado de las vacas es una manera efectiva para controlar el tiempo que esté presente la infección.
8. **Monitoreo de la mastitis.** Es importante conocer y mantener el control de la prevalencia de mastitis en el hato. Se pueden implementar sistemas de vigilancia para identificar de manera temprana las áreas con problemas. Se debe monitorear el SCC, registrar los tratamientos utilizados, tomar muestras de leche del tanque de almacenamiento, de cuartos mamarios y de vacas con mastitis clínica y con un alto recuento de células somáticas. De igual manera se deben establecer programas y protocolos de acción para cada situación que se presente y así asegurar una respuesta rápida.
9. **Cuidado de las terneras de reemplazo.** Un elemento clave para evitar mastitis, es que los terneros no se amamenten directo del pezón, por lo que es necesario suministrarles leche libre de mastitis, proporcionarles un ambiente limpio y

mantener un control sobre las moscas. En caso de utilizar la leche de vacas que se encuentren en corrales de enfermería, ésta se debe de pasteurizar antes de ofrecerla a las terneras y así evitar el riesgo de infección.

10. **Asumir que todas las vacas de reemplazo están infectadas.** Antes de ingresar vacas de reemplazo en el hato, es importante conocer sus valores de SCC por vaca. Se deben hacer cultivos bacteriológicos de muestras tomadas de cada vaca y antes de entrar a la ordeña se debe repetir el análisis bacteriológico. Esto controlará la propagación de microorganismos provenientes de las vacas de reemplazo hacia la población del hato. Este monitoreo es indispensable, sobre todo si se compran animales rutinariamente.
11. **Proporcionar una alimentación adecuada.** Las dietas deben estar balanceadas adecuadamente con los nutrientes esenciales necesarios para mantener la resistencia contra las enfermedades. Es de suma importancia adicionar microminerales como el selenio, cobre, zinc, vitamina A y vitamina E, ya que si existe deficiencia de estos, hay una mayor probabilidad que aparezcan infecciones.
12. **Control de moscas.** Las moscas pueden llevar patógenos a la punta de los pezones de las vacas y pueden causar sitios de infección al morder los extremos del pezón. Para evitar la proliferación de moscas es importante mantener limpias las instalaciones eliminando el estiércol y los alimentos en descomposición, así mismo se pueden utilizar aretes y aerosoles insecticidas.
13. **Capacitación del personal.** El personal encargado de la ordeña deberá estar capacitado para realizar las técnicas apropiadas, el control de la mastitis y la calidad de la leche obtenida pueden utilizarse como un estímulo a un mejor salario. Así mismo se les debe proporcionar todo el material necesario para que desarrollen su actividad sin ningún contratiempo y deberán conocer el procedimiento para realizar prueba de CMT y realizar el SCC de tanque de almacenamiento.

14. Asignar responsabilidades para la prevención de mastitis. Es importante establecer por escrito responsabilidades en cada área de la explotación lechera. Todo el personal debe conocer y entender su papel en la prevención de la mastitis, de esta manera, cuando ocurra un brote de mastitis se puede identificar el eslabón más débil y tomar medidas correctivas.

2.5. Pruebas para detección de mastitis

El recuento de células somáticas (SCC, del inglés Somatic Cell Count), la prueba de California para mastitis (CMT, del inglés California Test Mastitis) y el recuento de células somáticas en tanque de leche (BTSCC, del inglés Bulk Tank Cell Count) son herramientas ampliamente utilizadas para diagnosticar mastitis en los establos lecheros (Suriyasathaporn *et al.*, 2000; Sargeant *et al.*, 2001).

2.5.1. Conteo de células somáticas

Las células somáticas están formadas por células epiteliales de descamación natural del interior de la ubre y leucocitos. Existe la renovación periódica del tejido (2%) y la migración de leucocitos (98%) que proceden de la sangre y linfa que acuden a la glándula mamaria en casos fisiológicos, como consecuencia del proceso de migración leucocitaria hacia los epitelios o en caso de una infección (Ruegg, 2003). La infección intra mamaria es el principal factor causante de cambios en el recuento de células somáticas presentes en la leche. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo de la vaca tiende a reclutar leucocitos para combatir a dichos microorganismos causantes de la mastitis. (Philpot y Nickerson, 1992).

El nivel de SCC de una vaca que no presenta mastitis usualmente se encuentra por debajo de 200,000 células por mililitro, y la mayoría de las vacas mantienen valores de SCC de menos de 100,000 células por mililitro. Al ocurrir la infección, los macrófagos inducen al sistema inmunológico de la vaca para que envíe neutrófilos a eliminar a las bacterias. Más del 90% de las células somáticas en las glándulas mamarias infectadas están compuestas por neutrófilos y el SCC es mayor a 200,000/ml, lo que es un fuerte indicador de mastitis. El umbral del SCC se utiliza para predecir infecciones

intramamarias ya sea a nivel de cuarto o a nivel de vaca. Existen algunos inconvenientes obvios con el uso de valores de SCC al identificar una vaca enferma ya que la leche de cuartos sanos está mezclada con leche de cuartos mamarios infectados (Ruegg, 2003). Estudios indican que valores de SCC en el rango de 200,000 y 300,000/ml aún se puede considerar como ausencia de infección, mientras que valores superiores a 800,000 células por mililitro pueden estar asociados a infecciones persistentes ya que se ha observado que en el proceso de inflamación el valor de SCC es superior a 500/000 células por mililitro (Blood y Radostits, 1992; Harmon, 1994; Ramírez *et al.*, 2001).

2.5.2. Prueba de California para mastitis (CMT)

La prueba de California para mastitis (CMT, por sus siglas en inglés California Mastitis Test), es uno de los métodos más ampliamente utilizados para el diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de campo (Faría *et al.*, 2005; Kivaria *et al.*, 2007; 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), la cual detecta el estado de salud de la ubre mediante una estimación del contenido de células somáticas. Su principal desventaja es la subjetividad implícita en la lectura de los resultados (Ruegg, 2003).

La prueba de California para mastitis se fundamenta en la lisis que ocasiona el detergente aniónico Alquil-Aril Sulfonato de sodio en las células somáticas presentes en la leche. La lisis produce la salida del ácido desoxirribonucleico (ADN) y los filamentos de ADN libres tienden a formar un gel cuando se unen, y finalmente el púrpura de bromocresol (incluido en el reactivo) facilita la visualización del gel formado. Por tanto, a mayor contenido celular en la leche, mayor gelificación, y el gel estima en forma indirecta el número de células somáticas existentes en la leche, permitiendo clasificar los cuartos mamarios en cinco categorías (Ruegg, 2003). Kivaria *et al.* (2007) (cuadro 1).

Cuadro 1. Lectura e interpretación de la prueba CMT y su equivalencia con el recuento de células somáticas.

Resultados CMT	Reacción	Equivalencia SSC/ml	Porcentaje de neutrófilos	Interpretación
Negativo	La mezcla no presenta precipitado y/o gel	0-200,000	0-25	Cuarto mamario sano
Traza	Formación de una traza de precipitado que desaparece pronto	150,000-500,000	30-40	Posible infección dependiendo del número de cuartos mamarios
1 +	Existe 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 +	Formación de un gel que se adhiere al fondo de la raqueta	>5,000,000	70-80	Mastitis subclínica

2.5.3. Recuento de células somáticas en tanque de leche (BTSCC)

El BTSCC permite definir valores mínimos de células somáticas permitidos en el tanque de la leche, asumiendo que un bajo porcentaje de las vacas en el hato presentan cuartos mamarios con prueba positiva al CMT y consecuentemente, bajos valores en SCC. Estos valores tienen una implicación de gran importancia para el control de calidad de la leche y son la base de los estándares internacionales para poderla comercializar. Por lo que, la estimación del BTSCC sirve como una herramienta para definir el porcentaje de vacas que pueden tener mastitis subclínica en una explotación lechera y, tanto sus valores como los factores que determinan un valor determinado de BTSCC (Cerón *et al.*, 2007). Se han estandarizado en diferentes países del mundo: en el caso de la Unión Europea, Australia, Nueva Zelanda y Canadá el límite de BTSCC es de 400,000 células por mililitro (APHIS Smith, 1998, Hillerton, 2004; USDA-APHIS, 2012), en Brasil el máximo permitido de BTSCC es de 1,000,000 células por mililitro (APHIS Rodrigues *et al.*, 2005) mientras que el valor permitido en los Estados Unidos es de 750,000 células por mililitro (USDA-APHIS, 2012).

2.6. *Staphylococcus aureus* en mastitis bovina

S. aureus es un coco Gram-positivo, no móvil, no esporulado que puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos, siendo esta última la más común, Sus colonias miden de 1 a 3 micrómetros, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas. Esta bacteria tiene todas las características típicas del género: es anaerobio facultativo, mesófilo, necesita aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa y el manitol con producción de ácido y tolera condiciones ambientales muy variables. Así, puede crecer a cualquier temperatura entre 6 y 46°C, con una temperatura óptima entre 30-37°C. En cuanto al pH, se desarrolla entre valores de 4.0 y 9.8 con el óptimo en torno a la neutralidad; y es bastante resistente a la desecación, congelación y calor, aunque no tanto como las endosporas de las bacterias esporuladas (Wilkinson, 1997; Fueyo, 2005).

S. aureus es uno de los principales microorganismos patógenos causantes de mastitis bovina. Su importancia radica en que no es un patógeno obligado de la ubre, ya

que se puede encontrar en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño; y en muchas ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadenar una reacción inflamatoria. Al ser un patógeno oportunista, puede colonizar tanto a seres humanos como a numerosas especies animales, y es responsable de aproximadamente un tercio de los casos de mastitis clínica y subclínica (Waage *et al.*, 1988; Roberson *et al.*, 1996; Bradley *et al.*, 2007; Botrel *et al.*, 2010; Capurro *et al.*, 2010). En México se han reportado prevalencias entre el 30% y 60% (Miranda *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2012), en Estados Unidos y Canadá se han reportado prevalencias del 43% y 40%, respectivamente (USDA-APHIS, 2007; Olde *et al.*, 2010), en Argentina se ha reportado una prevalencia del 27.9% (Pellegrino *et al.*, 2011), en Brasil del 48.14% (Ruiz *et al.*, 2011), en Suecia 18.64% (Persson *et al.*, 2011) y en Irán del 59.50% (Pourtaghi *et al.*, 2016).

2.7. Patogenia y virulencia de *Staphylococcus aureus*

La patogenia de las infecciones por *S. aureus* se produce al combinarse los factores de virulencia bacteriana con una disminución de las defensas del hospedero. En su acción patógena intervienen los componentes de la pared celular, la producción de enzimas y toxinas favorecedoras de la invasión tisular y su capacidad para diseminarse y multiplicarse en los tejidos del hospedero (Borraz, 2006).

Petersson *et al.* (2010) mencionan que la infección intramamaria causada por *S. aureus* inicia cuando el microorganismo logra ingresar a través del orificio del pezón hacia la glándula mamaria. Inicialmente la bacteria daña los tejidos que recubren a los pezones y las cisternas de la glándula dentro de los cuartos mamarios, estableciéndose en los alveolos y los conductos que forman el sistema secretor de leche. Una vez que *S. aureus* logra colonizar la glándula mamaria puede provocar ulceración y erosión de los senos y ductos lactíferos e infiltración del parénquima mediante células inflamatorias. En última instancia ocurre la destrucción de las células epiteliales secretoras de los alveolos y los conductos galactóforos (Anderson, 1983). Las células dañadas se pueden combinar con los leucocitos formando abscesos, lo que conduce a la oclusión de los conductos de la leche que drenan las áreas alveolares y por lo tanto

la bacteria queda atrapada dentro éstos. Los conductos pueden abrirse de nuevo, pero esto generalmente resulta en la liberación del patógeno, lo que conlleva a que la infección se pueda extender a otras porciones de la glándula mamaria. La propagación de *S. aureus* dentro de la glándula mamaria induce la formación adicional de abscesos que en ocasiones son masas bastante grandes y detectables dentro de la ubre (Petersson *et al.*, 2010).

La principal defensa de la ubre contra una infección intramamaria es la fagocitosis de *S. aureus* por parte de los neutrófilos, que son las principales células somáticas implicadas en la eliminación de patógenos en la glándula mamaria, sin embargo, la acción fagocitaria de los neutrófilos se ve impedida por la presencia de leche, del mismo modo las concentraciones de anticuerpos opsonizantes y factores del complemento son bajas en leche, lo que impide la captación de *S. aureus* por parte de los neutrófilos (Sutra y Poutrel, 1990). Aunado a lo anterior las bacterias pueden ocultarse dentro de los neutrófilos y otras células del hospedero a medida que los neutrófilos tratan de eliminarlas, logrando algunas sobrevivir volviéndose inactivas dentro de ellos y liberándose cuando los glóbulos blancos mueren continuando el proceso de infección. Aunque la mayoría de los casos de mastitis causada por *S. aureus* son subclínicos, las vacas con casos crónicos suelen tener un recuento de células somáticas elevado, tejido mamario anormal y casos recurrentes de mastitis clínica. Los cuartos mamarios clínicamente infectados, a menudo muestran hinchazón y grumos visibles en la leche. Las infecciones agudas de *S. aureus* generalmente se desarrollan avanzada la etapa de lactación, sin embargo los signos clínicos (hinchazón, ubres endurecidas, cambios en la apariencia de la leche) aparecen poco antes del parto o cerca de la siguiente lactancia. Se vuelve difícil tratar con éxito una infección debido a que los fármacos no son capaces de alcanzar todos los sitios de infección y a que las bacterias pueden evitar el contacto con los fármacos mientras residen dentro de los leucocitos. Además, muchas cepas de *S. aureus* son capaces de producir enzimas que inactivan la acción de los antibióticos haciendo que los tratamientos sean ineficaces (Petersson *et al.*, 2010).

S. aureus se caracteriza por presentar diversos factores de virulencia, algunos de los cuales están relacionados con la gravedad de la infección intramamaria desarrollada en el hospedero (Fournier *et al.*, 2008). Estos factores determinan su alto potencial patogénico ya que representan una gran variedad de exotoxinas y proteínas asociadas a la superficie celular que aumentan su habilidad de adhesión intercelular y su capacidad de colonizar células epiteliales y macrófagos de la glándula mamaria. Otras toxinas tales como las hemolisinas α , β , δ y γ pueden degradar tejidos y macromoléculas para obtener nutrientes para el crecimiento de la bacteria (Bubeck *et al.*, 2007; Kalorey *et al.*, 2007).

La mayoría de los factores de virulencia de *S. aureus* se han caracterizado bioquímicamente, sus genes han sido clonados y secuenciados, y se ha demostrado que no todas las cepas expresan los mismos (Baba *et al.*, 2002; Kalorey *et al.*, 2007). La adhesión a la membrana de las células epiteliales es una etapa crucial para que se establezca la infección por parte de *S. aureus*, expresando diversos genes, como los receptores de superficie que cuentan con las habilidades y propiedades de enlazarse a las inmunoglobulinas (proteína A), factores de aglutinación que son capaces de enlazarse al fibrinógeno (ClfA y ClfB) y proteínas de unión a la fibronectina (FnbA y FnbB). Así mismo, presenta un *locus* de adhesión intracelular (ica). Un gran número de cepas de *S. aureus* tienen genes que codifican para súper antígenos (SAGs), como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1) y enterotoxinas termoestables (SEs) de la A la Q, siendo estas causantes de la intoxicación alimentaria en humanos. Los súper antígenos SAGs son llevados y diseminados por elementos genéticos móviles tales como profagos, plásmidos e islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPis) (Dinges *et al.*, 2000; Schelin *et al.*, 2011), además provocan pirogenicidad y supresión del sistema inmune, lo que puede aumentar los efectos tóxicos de la endotoxina endógena (Kulhankova *et al.*, 2014). En humanos, las SAG tienen un efecto mitogénico, sobre las células T y pueden causar el síndrome del shock tóxico (Novick *et al.*, 2001), en tanto en vacas con mastitis se sugiere que también juegan un papel importante en el establecimiento de la infección proporcionando un ambiente idóneo para la colonización (Graber *et al.*, 2009; Piccinini *et al.*, 2010).

Distintos estudios muestran que existen cepas de *S. aureus* obtenidas de casos de mastitis bovina que expresan diferentes factores de virulencia, con los cuales logra colonizar y establecer la infección. Se ha documentado que la presencia de las proteínas de aglutinación (ClfA) y las proteínas de adhesión a la fibronectina (FnbpA) tienen una amplia relación con la alta patogenicidad de la bacteria así como el desarrollo y severidad de la mastitis bovina (Momtaz *et al.*, 2010, Ote *et al.*, 2011 y Yang *et al.*, 2012). Estudios realizados en México muestran la presencia de distintos factores de virulencia en aislados de *S. aureus* causantes de mastitis bovina, siendo los más prevalentes ClfA (73%) y hemolisinas (78%) (Franco *et al.*, 2008). El-Sayed *et al.* (2005) reportaron que las proteínas de aglutinación (ClfA) y de unión a la fibronectina (FnbpA), así como las hemolisinas, estuvieron presentes en el 100% de los aislados obtenidos. Estos hallazgos indican que las cepas de *S. aureus* circulantes en los establos lecheros, pueden tener un alto grado de virulencia, por lo cual es importante implementar las medidas y estrategias de prevención necesarias para tratar de controlar o eliminar este patógeno.

2.8. Programa de control para *Staphylococcus aureus*

Una vez que *Staphylococcus aureus* se establece en un hato lechero es muy difícil de eliminar, por lo que es muy importante iniciar un programa de control y prevención a largo plazo, lo que apoyará a disminuir la prevalencia de *S. aureus*. Mellenberger y Kirk (2001) proponen seguir el siguiente programa para el control de *S. aureus*:

Eliminación de vacas con infección crónica. En primer lugar se deben segregar aquellas vacas adultas que presenten las siguientes características:

- Mastitis clínica crónica y baja producción de leche en más de una lactación.
- Que presenten un SCC superior a las 400,000 células por mililitro al mes durante dos lactancias.
- Que hayan recibido más de tres tratamientos en la lactancia actual, sin haber mostrado un efecto positivo tanto en mastitis clínica como subclínica.

- Cultivo bacteriano positivo a *S. aureus* en más de un cuarto mamario en tres ocasiones.
- Que presenten problemas de mastitis, reproductivos, baja producción y cuartos mamarios no funcionales.

El número de vacas sacrificadas dependerá de la disponibilidad de reemplazos, la sustentabilidad económica de la explotación, el SSC en tanque de almacenamiento y la producción individual de las vacas en el hato.

Separación de vacas y enfermas durante la ordeña. El grupo de vacas a separar debe incluir aquellas que han sido tratadas en la lactación actual, vacas con cultivo bacteriano positivo a *S. aureus*, vacas que presenten un constante SCC arriba de 200,000 células somáticas por mililitro y aquellas que tengan un cuarto mamario con CMT +1 o mayor. Es necesario tomar en cuenta que en establos positivos a *S. aureus*, las vacas con cultivos negativos pero que presentan repetidamente un SCC mayor a 400,000 se deben considerar como infectadas, así mismo si en el hato el 30% de las vacas están infectadas con *S. aureus* valores de SCC superiores a 200,000 pueden predecir la presencia de este patógeno en uno o más cuartos. Para separar las vacas infectadas, se tienen tres opciones:

1. Agrupar por separado las vacas infectadas con *S. aureus*. Estas vacas se ordeñaran al final, a las vacas recién paridas se les debe hacer cultivo bacteriológico en el tercer o cuarto ordeño o bien realizar prueba de CMT en el sexto ordeño. Antes de asignar los grupos de vacas sanas y enfermas, se puede hacer cultivo bacteriano a las vacas que hayan salido CMT ≥ 1 , así mismo las vacas que estén recibiendo tratamiento se deberán incluir en el grupo de vacas enfermas. Las vacas enfermas podrán abandonar este grupo cuando tengan dos cultivos bacterianos negativos de manera consecutiva luego de la terapia de secado, estas vacas deberán mantener un SCC por debajo de 200,000 cel/ml al mes y es importante observar que no presenten signos de reinfección. Una vaca podrá pasar del grupo sano al grupo de vacas enfermas en caso de manifestar mastitis y si presenta cultivo bacteriano positivo a *S. aureus*.

2. Ordeñar por separado vacas en tratamiento y vacas con *S. aureus* si estas últimas son menos del 10%. Las pezoneras empleadas para ordeñar vacas infectadas no deben ser utilizadas para ordeñar otras vacas (sanas o en tratamiento), siguiendo esta opción las vacas enfermas no tienen que estar separadas físicamente de las vacas sanas, pero si deben estar claramente identificadas al momento del ordeño.
3. Enjuagar de forma eficiente el equipo de ordeño entre vaca y vaca. Durante el ciclo de lavado y enjuague las concentraciones de yodo deben mantenerse en 25 ppm o más, con el fin de remover *S. aureus*, sin embargo la mayoría de los materiales (silicón) de las pezoneras y el yodo no son compatibles, por lo que es importante consultar con los proveedores el sistema de enjuague y las soluciones yodadas a utilizar en la los equipos de ordeña.

2.9. Otros aspectos a considerar para la prevención y control de *S. aureus*.

- Efectuar manejo de secado en vacas infectadas y preñadas cuando estén dentro de los 80 días antes del parto y aplicar terapia de secado en todos los cuartos mamarios, se les debe realizar cultivo bacteriano durante la tercera y cuarta ordeña después del parto, para observar si existe la presencia de *S. aureus*. Las vacas infectadas que no reaccionen a la terapia de secado se deben ordeñar al final o con el grupo de vacas enfermas, estas vacas podrán ser candidatas al sacrificio cuando su producción láctea comience a descender por debajo del umbral prefijado.
- Evitar la compra de vaquillas o vacas de reemplazo si aún no se tiene un programa bien desarrollado para el control de *S. aureus*. Al momento de comprar reemplazos se debe verificar el estatus sanitario de la explotación de procedencia respecto a *S. aureus*, en caso de poder comprobar la situación sanitaria, las vacas se deberán considerar como infectadas con *S. aureus* hasta demostrar lo contrario.
- Ordeñar en primer lugar las vacas sanas de primera lactación.

- Realizar una evaluación completa del funcionamiento del equipo de ordeño, especialmente de la bomba de vacío, controlador y nivel de vacío, líneas de vacío y de leche, pulsador y los separadores automáticos. Las pezoneras deben ser reemplazadas luego de 1000 ordeñas (depende del fabricante).
- Evaluar las buenas prácticas de ordeño con la asesoría de un médico veterinario o un consultor, así mismo se debe capacitar periódicamente a todo el personal.
- Establecer un protocolo de desinfección, pre-sellado y sellado de pezones mediante la aplicación de soluciones yodadas. En los hatos en los que está presente *S. aureus*, los pezones deben pre-sellarse y sellarse después del ordeño mediante inmersión con una solución de yodo al 1% que contenga glicerina al 10%.
- Establecer un programa de tratamiento para el período seco, utilizando antibióticos específicos para esta etapa, el tratamiento se debe aplicar a todas las vacas y en todos los cuartos mamarios luego del último ordeño.
- Las vacas se deben ordeñar de dos a tres veces por día hasta la última ordeña antes del período seco. No es recomendable saltarse una ordeña, ya que esto puede conducir a la aparición de mastitis clínica en vacas con infecciones subclínicas.
- Administrar una nutrición a base de raciones balanceadas, con énfasis en las vitaminas, selenio y otros microminerales, ya que estos ayudan a la integridad de la piel y el sistema inmunológico.
- Evaluar la condición de las instalaciones en donde se alojan las vacas preñadas, vacas secas, vacas que están cercanas al parto y vacas en lactancia. Es necesario eliminar fuentes potenciales que puedan dañar las ubres, así mismo las vacas con ubres colgantes serán más propensas a las lesiones y a las infecciones por *S. aureus*.
- Los ordeñadores deben utilizar guantes desechables y lavarse frecuentemente las manos enguantadas, el uso de guantes previene la formación de fisuras y

escoriaciones en la piel de las manos, cultivos bacteriológicos han mostrado la presencia de *S. aureus* en las manos.

- Realizar prueba de CMT, muestreos y cultivos bacteriológicos para monitorear la presencia de *S. aureus*.

2.10. Mecanismo de acción de los antibióticos

Los antibióticos pueden ejercer su acción de forma bacteriostática (inhibiendo de forma temporal el desarrollo de la bacteria) o bactericida (destruyendo la viabilidad celular), mediante tres procesos, 1) Inhibiendo la síntesis de la pared celular, como los β -lactámicos y glucopéptidos que actúan inhibiendo distintos procesos implicados en la síntesis del peptidoglicano. 2) Inhibiendo la síntesis proteica a diferentes niveles en las subunidades ribosomales 30S y 50S. 3) Bloqueando las síntesis de los ácidos nucleicos (Borraz, 2006).

2.10.1. β -lactámicos

Actúan sobre el péptidoglucano de la pared celular bacteriana, inhibiendo la última etapa de su síntesis e induciendo su destrucción al unirse a las proteínas de unión a las penicilinas (PBPs), las cuales están situadas en la parte externa de la membrana citoplasmática. La inactivación de las PBPs se hace por formación de complejos covalentes con los β -lactámicos, por lo tanto, el efecto de un antibiótico de este grupo depende de la afinidad que tenga por las diferentes PBPs, ya que cada β -lactámico tiene una afinidad máxima para una PBP concreta (Jehl, 2004).

2.10.2. Cefaloporinas

Las cefalosporinas son antibióticos bactericidas y su mecanismo de acción es interferir con la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, a través de la *unión a la proteína fijadora de penicilina (PBP) e inactivación de los inhibidores de la autolisina endógena*. Esta autolisina rompe las paredes celulares bacterianas y produce la muerte del microorganismo por lisis microbiana. Las cefalosporinas, incluyendo las de tercera generación, al fijarse a sus proteínas-blancas en la membrana de la célula bacteriana, inactivan las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular (Dávalos, 1998).

2.10.3. Macrólidos

Ejercen su actividad antimicrobiana al obstaculizar la síntesis de proteínas en la bacteria alterando los ribosomas bacterianos. Se fijan a la subunidad ribosomal 50S e impiden la reacción de translocación en la cual la cadena del péptido en crecimiento se desplaza del sitio aceptor al donador. Su efecto bactericida o bacteriostático depende de su concentración, del microorganismo, del inóculo, de su sensibilidad y de la fase de proliferación en que se encuentren (Goodman, *et al.*, 1990; Kirst, *et al.*, 1983).

2.10.4. Aminoglucósidos

Su sitio intracelular de acción es la subunidad ribosómica 30s, que provoca error de lectura del RNAm con producción de una proteína anómala, lo cual aunado al efecto sobre la membrana celular (induce fuga de sodio, potasio y otros componentes esenciales) producen la muerte bacteriana (Sande, *et al.*, 1993; Delgado, 1990).

2.10.5. Quinolonas

El mecanismo de acción de las quinolonas es inhibir la acción de las enzimas topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV). En bacterias Gram-negativas la ADN girasa es el blanco principal, mientras que la topoisomerasa IV actuaría como sitio blanco secundario. La ADN girasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades, dos tipo A y dos tipo B codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente, y que está encargada de catalizar el superenrollamiento negativo del ADN. La topoisomerasa IV es el sitio blanco en las bacterias Gram-positivas y también está formada por cuatro subunidades codificadas por *parC* y *parE*, homólogas a *gyrA* y *gyrB* respectivamente (Mosquito *et al.*, 2011). Estas enzimas actúan pasando una región del ADN dúplex a través de otro y durante este proceso el antibiótico queda atrapado en una reacción intermedia que contiene quinolona, enzima y ADN roto, resultando un complejo que bloquea la replicación del ADN y debido a esto algunas bacterias mueren en cuestión de horas (Kreuzer y Cozzarelli, 1980; Mizuuchi *et al.*, 1980).

2.10.6. Tetraciclinas

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias, se fijan a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, por lo que impiden la unión del sitio aminoacil del ARN de transferencia a la subunidad 30S ribosomal, paralizando la incorporación de aminoácidos durante la síntesis proteica. Logran atravesar la membrana externa de las bacterias a través de porinas mediante difusión pasiva y llegan al citoplasma por medio de un mecanismo dependiente de energía. La fijación de todas las tetraciclinas a la subunidad ribosomal es reversible, lo que explica su efecto bacteriostático (Vicente y Pérez, 2009).

2.10.7. Sulfonamidas

Para obtener determinados elementos esenciales como los aminoácidos o las bases púricas y pirimidínicas de los nucleótidos, se requiere la síntesis de folatos, que algunas bacterias son incapaces de obtener del medio. La síntesis de ácido tetrahidrofólico se obtiene a partir de pteridina y de ácido paraaminobenzoico (PABA), que mediante la enzima dihidropteroato sintetasa forman el ácido dihidropteroico. Posteriormente, por adición de ácido glutámico se forma el ácido dihidrofólico (ácido fólico) que reducido por la dihidrofolato reductasa forma el ácido tetrahidrofólico (ácido folínico). Las sulfonamidas son análogos del ácido paraaminobenzoico, y por tanto compiten por la enzima dihidropteroato sintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico (Calvo y Martínez, 2009)

2.11. Resistencia bacteriana hacia los antibióticos

Aunque es difícil controlar *S. aureus* solo con el uso de antibióticos, distintos antimicrobianos son utilizados para tratar diferentes problemas infecciosos en el ganado, lo que puede resultar en el desarrollo de cepas resistentes. El uso de antibióticos se correlaciona con la aparición y el mantenimiento de factores que confieren resistencia a las cepas patógenas, los cuales están codificados por genes que pueden estar en el cromosoma bacteriano, plásmidos o casetes genéticos que se incorporan dentro de integrones lo que permite que se transfieran con facilidad entre aislados (Sears *et al.*, 2003; Shitandi y Sternesjo, 2004; Brouillette y Malouin, 2005; Rychlik *et al.*, 2006). Los principales grupos de antibióticos de primera elección para

tratar mastitis bovina y terapia de secado, son betalactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas entre otros (Gentilini *et al.*, 2000; USDA-APHIS 2000-2007; Saini *et al.*, 2012). Se ha reportado resistencia principalmente al grupo betalactámicos (penicilina y ampicilina) en Brasil (75.90% y 62.0%), Estados Unidos (38.4% y 60.9%), Irán (penicilina 86%) y China (penicilina 94.4%) (Erskine *et al.*, 2005; Jamali *et al.*, 2014; Kozerski *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015), indicando que este grupo de antibióticos se sigue utilizando como primer línea de tratamiento para la mastitis bovina.

La terapia prolongada con antimicrobianos, puede conducir al desarrollo de resistencia en un microorganismo que en un inicio era sensible pero posteriormente se fue adaptando y por consecuencia desarrolló resistencia. Cuando un antibiótico ejerce su acción ante las bacterias, aquellas que sean susceptibles a él morirán, pero las que presenten resistencia sobrevivirán. La aparición de una bacteria con un genotipo resistente a los agentes antimicrobianos, depende del grado de expresión de genes resistentes, así como la capacidad del microorganismo para evadir los mecanismos de defensa del huésped y el sitio inicial de colonización del microorganismo entre otros. En caso de que las determinantes de resistencia se encuentren en plásmidos, se propagarán rápidamente dentro del género e incluso en géneros bacterianos no relacionados y cuando la resistencia está asociada con genes en los cromosomas, los microorganismos resistentes se propagarán lentamente (Vaiciuvenas, 2005; Dzidic *et al.*, 2008).

Las bacterias pueden multiplicarse rápidamente y tienen una gran capacidad de adaptarse a los cambios en el medio, por lo que pueden sobrevivir en condiciones desfavorables, al seleccionarse diferentes mutaciones que les confieren protección. Así mismo, un factor importante que contribuye a su adaptabilidad, es que pueden acceder a una gran cantidad de genes itinerantes, como plásmidos y transposones, los cuales se pueden mover de una bacteria a otra y así propagarse a través de poblaciones bacterianas. La capacidad bacteriana para adaptarse a los cambios externos utilizando estos mecanismos se denomina desarrollo de resistencia frente a las presiones de selección. La resistencia puede ser intrínseca o adquirida, la resistencia intrínseca es

propia de cada familia, género o especie, siendo por lo tanto una resistencia predecible, donde la bacteria es naturalmente resistente a determinado antibiótico debido a que no posee la estructura de un sitio blanco o se le hace imposible al antibiótico penetrar la célula bacteriana. Por otro lado, la resistencia adquirida es cuando la bacteria que normalmente es sensible a un antibiótico en particular, se convierte en resistente, ya sea por una mutación cromosómica o por intercambio de material genético entre bacterias (Hernández, 2005).

2.12. Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para neutralizar la acción de los agentes antimicrobianos, los mecanismos principales en las bacterias Gram positivas son: inactivación enzimática del antibiótico, modificación del sitio blanco, expulsión del antibiótico por acción de una bomba de eflujo y protección del sitio blanco (Guardabassi y Courvalin, 2006).

2.12.1. Resistencia por inactivación enzimática

Consiste en la síntesis por parte de las bacterias, de ciertas enzimas que modifican la estructura del antibiótico provocando la anulación de su función (Gimeno y Ortega, 2005). Existen tres enzimas principales que pueden inactivar los antibióticos: β -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos y cloranfenicol acetiltransferasas (Dockrell *et al.*, 2004). Dentro de las reacciones bioquímicas que catalizan estas enzimas se encuentra la hidrólisis, transferencia de grupos y mecanismos redox.

2.12.1.1. Inactivación del antibiótico mediante hidrólisis

Algunos antibióticos poseen enlaces químicos hidrolíticamente susceptibles (enlaces ésteres y amidas), por lo que es bien sabido que distintas enzimas destruyen la actividad antibiótica degradando y cortando estos enlaces. Estas enzimas a menudo pueden ser excretadas por las bacterias inactivando al antibiótico antes de que alcance su sitio blanco dentro de las bacterias. Las enzimas hidrolíticas amidasas más comunes son las β -lactamasas que rompen el anillo β -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas. Muchas bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas producen tales enzimas, las cuales pueden pertenecer a distintos grupos funcionales y

ser codificadas tanto en cromosomas como en plásmidos transferidos desde diferentes bacterias (Kotra *et al.*, 1999; Poole, 2004; Bush *et al.*, 1995; Bonnet, 2004).

2.12.1.2 Inactivación del antibiótico mediante transferasas

La familia más diversa de enzimas que confieren resistencia es el grupo de las transferasas. Estas enzimas inactivan antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptogramina, macrólidos y rifampicina mediante sustituciones de grupos químicos (adenililo, fosforilo o acetilo) los cuales se adhieren a la periferia de la molécula del antibiótico, por lo tanto los antimicrobianos modificados se ven afectados en su unión a su sitio blanco (Dzidic *et al.*, 2008).

2.12.1.3 Inactivación del antibiótico mediante mecanismos redox

Las reacciones de oxidación y reducción son utilizadas por las bacterias patógenas como un mecanismo de resistencia contra los antibióticos. Un ejemplo de este mecanismo es la oxidación de las tetraciclinas por parte de la enzima TetX. *Streptomyces virginiae* es capaz de producir virginiamicina M1 que es una estreptogramina, y se puede proteger de su mismo antibiótico reduciendo un grupo cetónico a un alcohol en la posición 16 (Dzidic *et al.*, 2008)

2.12.2 Resistencia por alteración del sitio blanco del antibiótico

La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio blanco en el cual actúa el antibiótico consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales o el ARN ribosomal 23S o 16S entre otros (Fuchs *et al.*, 1994).

2.12.2.1 Alteración de la estructura del peptidoglicano

Por lo general, los antibióticos β -lactámicos pueden inhibir la síntesis de la pared celular impidiendo las funciones celulares vitales, sin embargo en ocasiones es posible que se produzcan mutaciones en este sitio blanco reduciendo la susceptibilidad a la inhibición y manteniendo las funciones celulares. En ocasiones la modificación a la estructura del sitio blanco para producir la resistencia, requiere otros cambios en la célula para compensar la modificación efectuada, tal es el caso de *Staphylococcus aureus*, el cual adquiere la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) que resulta en

la resistencia a la meticilina (MRSA) y a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. Para eficientar la biosíntesis del peptidoglicano, la proteína PBP2a necesita alterar la composición y estructura del peptidoglicano, en lo que están implicados una serie de genes adicionales (Enright, 2003; Leski y Tomasz, 2005).

2.12.2.2 Interferencia en la síntesis de proteínas

Existe una amplia gama de antibióticos que interfieren con la síntesis de proteínas en distintos niveles del metabolismo de la proteína, como aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, ácido fusídico, mupirocina, estreptograminas y oxazolidinonas. Otros, como las rifamicinas intervienen en la transcripción de ARN afectando a la ARN polimerasa (Happi *et al.*, 2005). El grupo de los macrólidos, lincosamida y estreptogramina B (MLS) bloquean la síntesis de proteínas en las bacterias al unirse con la subunidad ribosomal 50S y la resistencia a estos antibióticos ocurre al existir una modificación post-transcripcional en el componente 23S de la subunidad ribosomal 50S. Así mismo existen mutaciones en el sitio 23S ribosomal cerca de los sitios de metilación lo cual está asociado con la resistencia a macrólidos (Weisblum, 1998). En el caso de las oxazolidinonas (linezolid) que también actúan sobre la subunidad ribosomal 50S, inhiben la formación de los complejos de iniciación e interfieren con la translocación de peptidil-ARNt desde el sitio A al sitio P, la resistencia bacteriana a estos antibióticos está relacionada con mutaciones en el ARNr lo que resulta en la reducción de afinidad al sitio de unión (Wang y Taylor, 1998). Las mutaciones en el gen 16S ARNr confieren resistencia a los aminoglucósidos, algunos microorganismo resisten la acción de estos antibióticos mediante la metilacion post-trasncricional en el sitio de unión del aminoglucósido en el gen 16S ARNr (Suzuki *et al.*, 1998).

2.12.2.3 Interferencia en la síntesis de ADN

Este mecanismo de resistencia es por medio de una modificación en las enzimas ADN girasa (topoisomerasa II) en los genes *gyrA* y *gyrB* y la enzima topoisomerasa IV en los genes *parC* y *parE*. Las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* provocan un fallo en la replicación del ADN, por lo que los antibióticos no pueden unirse, como es el caso de las quinolonas y fluoroquinolonas (Drlica y Malik, 2003)

2.12.3 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas que se encuentran en la membrana celular y se encargan de internalizar y expulsar los antibióticos fuera de la célula manteniendo su concentración intercelular en niveles bajos. Una reducción en la permeabilidad de la membrana externa da como resultado una absorción reducida de los antibióticos, esta absorción reducida y el eflujo activo inducen una resistencia de bajo nivel en las bacterias (Nikaido, 1994). Las bombas de eflujo pueden afectar a la mayoría de las familias de antibióticos, especialmente a macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas, ya que estos antibióticos afectan la biosíntesis de proteínas y del ADN por lo que su acción es intracelular (Nikaido, 1999 y Webber; Piddock, 2003). Las bombas de eflujo varían en su especificidad y en su mecanismo de acción, aunque estos fármacos son específicos, existen sistemas de eflujo que pueden transportar múltiples fármacos y son capaces de bombear una amplia gama de antibióticos no correlacionados, lo que contribuye significativamente a generar multidrogo resistencia (MDR). Aunado a esto las mutaciones de elementos reguladores que controlan la producción de las bombas de eflujo puede conducir a un aumento de la resistencia a los antimicrobianos (Veen y Konings, 1997).

2.13. Identificación de *Staphylococcus aureus* mediante PCR

De acuerdo al Consejo Nacional de Mastitis de los Estados Unidos el cultivo bacteriológico se considera como una prueba de oro para la identificación de patógenos presentes en casos de mastitis bovina, sin embargo este método de identificación ofrece un resultado positivo solo entre el 50% y 70% de los casos (Makovec y Ruegg, 2003; Koskinen *et al.*, 2010 y Murai *et al.*, 2014), por lo que el diagnóstico por PCR, es una alternativa para mejorar la identificación de *S. aureus* ya que se ha reportado una sensibilidad superior al 90% (Restrepo *et al.*, 2012). 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). La identificación de *S. aureus* a nivel de especie, se basa en la

amplificación de genes altamente conservados dentro de la especie pero variables entre diferentes especies. El gen ARNr 16S es un gen blanco ya establecido para la identificación de especies bacterianas, las secuencias espaciadoras del gen ARNr 16S a 23S y el gen ARNr 23S han demostrado también ser muy útiles para la identificación de *S. aureus* a nivel de especie (Straub *et al.*, 1999; Akineden *et al.*, 2001; Phuektes *et al.*, 2003).

Se han diseñado diferentes tipos de cebadores para la identificación de *S. aureus*, los cuales amplifican diferentes regiones de su genoma (cuadro 2).

Cuadro 2. Cebadores para la identificación de *Staphylococcus aureus*.

Muestras evaluadas	Cebadores	Gen blanco y tamaño del fragmento	Autor	PCR <i>in silico</i>
30 muestras	F: 5'-AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG-3' R: 5'-TCG CTC GCT CAC CTT AGA A-3'	23S rRNA 499 pb.	(Cremonesi <i>et al.</i> , 2006).	Amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> , pero también <i>S. epidermidis</i> , <i>S. lungdunensis</i> y <i>S. pseudointermedius</i>
20 cepas de <i>Staphylococcus sp.</i>	F: 5'-ATG GTT TTG GTA GAA TTG GTC GTT TA-3' R: 5'-GAC ATT TCG TTA TCA TAC CAA GCT G-3'	<i>gap</i> 933 pb.	(Yugueros <i>et al.</i> , 2001).	Amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> y no las otras especies de <i>Staphylococcus</i> .
9 cepas aisladas	F: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' R: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	<i>nuc</i> 279 pb.	(Yang <i>et al.</i> , 2007).	Amplifica 8 cepas de <i>S. aureus</i> .

No reportada	F: 5'-GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3' R: 5'-CGC ACA TCA CGC TAC G-3'	<i>nuc</i> 228 pb.	(Manfredi, Leotta y Rivas, 2010)	No amplifica todas las cepas de <i>S.aureus</i> y amplifica otros <i>Staphylococcus</i> .
24 cepas mastitis clínica y 16 de mastitis Subclínica	F: 5'-ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC-3' R: 5'-AGC TCA GCC TAA ACG AGT AC-3'	23S rRNA 1251pb	(El-Sayed <i>et al.</i> , 2006).	El cebador reversa no amplifica.
113 muestras CMT positivas	F: 5'-CGG TCC AGA CTC CTA CGG G-3' R: 5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'	16S rRNA 204 pb.	(Granados, 2011).	Amplifica <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. haemolyticus</i> y <i>S. Seudointermedius</i> .

(Modificado de Restrepo *et al.*, 2012)

Riffon *et al.* (2001) desarrollaron dos conjuntos de oligonucleótidos específicos para identificar mediante PCR las principales especies de bacterias causantes de mastitis bovina, entre las que destaca *S. aureus* (Sau234 5'-CGATTCCCTTAGTAGCGGCG-3' Sau1501 5'-CCAATCGCACGCTTCGCCTA 3', Sau327 5'-GGACGACATTAGACGAATCA-3' y Sau1645 5'-CGGGCACCTATTTTCTATCT-3'), estos oligonucleótidos amplifican un producto de PCR de 1267 pb y 1318 pb respectivamente. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de regiones altamente divergentes y específicas del ADN que codifica para los RNA ribosomales 16S y 23S, tomando como base las secuencias previamente publicadas y disponibles en la base de datos GenBank.

2.14. Tipificación molecular de *Staphylococcus aureus*.

La tipificación molecular permite determinar si un grupo de cepas de una especie en particular es clonal; es decir provienen de un ancestro común (Blumberg *et al.*, 1992). La necesidad de conocer la evolución y la distribución de las distintas cepas de *S. aureus*, ha permitido el desarrollo y la estandarización de diversas metodologías para realizar la tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* (De Colsa, 2011).

Desde hace décadas se ha reportado la existencia de diferentes cepas de *S. aureus*, razón por la cual ha sido una de las primeras bacterias que ha requerido una diferenciación. La necesidad de tipificación ha estado en relación directa con su implicación en brotes por fuente común, tanto en infecciones hospitalarias como en intoxicaciones alimentarias. También se ha utilizado la tipificación para relacionar las cepas aisladas de origen animal con las de origen humano y para caracterizar las cepas productoras de mastitis y establecer de esta manera un programa de control efectivo mediante el desarrollo de vacunas e incluso para establecer la relación entre las cepas aisladas en una planta de procesamiento de alimentos con la fuente de contaminación (Tondo *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2004; Sabour *et al.*, 2004; Kérouanton *et al.*, 2007).

La dificultad para controlar la transmisión de *S. aureus* entre vaca y vaca, en ocasiones puede deberse a la obtención de falsos negativos en los cultivos bacteriológicos, lo cual puede resultar en casos no detectados que pueden causar

diseminación al resto del hato. Aunado a esto, está la pobre respuesta que tienen los tratamientos contra *S. aureus* en casos de mastitis bovina (Barkema, 2006). La presencia de *S. aureus* en los establos puede ser por numerosas cepas con baja prevalencia o incidencia, o bien, por algunas cuantas cepas con una alta prevalencia. La presencia de múltiples cepas muestra que no todas las infecciones son el resultado de una transmisión vaca a vaca, lo que sugiere que en algunos hatos *S. aureus* muestra una epidemiología molecular de un patógeno ambiental (Sommerhauser, 2003 y Zadoks, 2002).

Existen fuentes de *S. aureus* ajenas a la glándula mamaria, que incluyen la piel de la vaca y su entorno en el establo, como lo es el material de la cama, insectos, personal que labora en el establo, animales no bovinos, alimentos, equipo de ordeño y las manos de los ordeñadores (Zadoks, 2002 y Capurro *et al.*, 2010). Existe evidencia que en algunas ocasiones los humanos y bovinos pueden compartir una misma cepa de *S. aureus* e incluso se han reportado datos sobre cepas propias de bovinos encontradas en humanos y viceversa, esto es de gran importancia, ya que podrían ser cepas MRSA (Lee *et al.*, 2003; Juhász *et al.*, 2007; Hata *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011; Sakwinska *et al.*, 2011). En estudios realizados a partir de muestras obtenidas de veterinarios, ordeñadores, trabajadores de las granjas y alimento, se ha mostrado que efectivamente existe la propagación y agrupación de diferentes complejos clonales de *S. aureus* de origen humano en los animales (Juhász *et al.*, 2007; Hasman *et al.*, 2010; Sobral *et al.*, 2012; Bergonier *et al.*, 2014). De igual manera se ha observado la presencia de complejos clonales de *S. aureus* propios de ganado lechero en humanos, sin que estos hayan tenido contacto con este tipo de animales (Lozano *et al.*, 2011). Si las cepas de *S. aureus* de origen humano y bovino logran desarrollar la habilidad de propagarse fácilmente en ambas poblaciones, aumentan los riesgos zoonóticos y las implicaciones de resistencia antimicrobiana serán cada vez mayores (Zadoks *et al.*, 2011).

2.15. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

La electroforesis de campos pulsados (PFGE), permite su clasificación según el análisis de fragmentos generados por la enzima de restricción *SmaI*. La CDC (Por sus

siglas en ingles Center for Disease Control and Prevention) ha desarrollado un protocolo estandarizado para su proceso y una nomenclatura denominada “PFTs USA” que permite clasificar los diferentes patrones electroforéticos generados (McDougal *et al.*, 2003).

El principio de la electroforesis de campo pulsado se basa en que primero es aplicado un campo eléctrico (E1) al gel, entonces distintos fragmentos de ADN, el cual ha sido cortado previamente con enzimas de restricción, migran debido a cambios periódicos en un campo eléctrico. Este primer campo es entonces removido y un segundo campo (E2) en ángulo con el primer campo, es activado. El ADN debe cambiar la conformación y la reorientación antes de comenzar a migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación varía de acuerdo al peso molecular de la muestra. La PFGE separa fragmentos cromosómicos que no pueden ser separados por el método convencional uni-direccional de electroforesis. El límite de la electroforesis convencional es su ineficiencia para separar secuencias de ADN con un tamaño mayor de 50kb. Las técnicas moleculares para el análisis de ADN cromosomal como el PFGE han demostrado ser un método eficiente para observar divergencias entre las diferentes cepas y ha sido bastante utilizado en el estudio epidemiológico de las mismas. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es una de las técnicas más modernas utilizadas en estudios epidemiológicos, ya que es capaz de separar fragmentos de 10 kpb hasta 10.000 kpb y por esta razón ha demostrado ser altamente discriminatoria para estudios epidemiológicos por su habilidad para diferenciar intra-especies de aislados bacterianos en estudios epidemiológicos de zoonosis. Los estudios sugieren que PFGE es una técnica útil en la diferenciación de cepas provenientes de animales y del hombre y que puede complementar otras técnicas moleculares para propósitos epidemiológicos, así como para la prevención y control de importantes infecciones bacterianas. Este método es relativamente estable y rápido en comparación con métodos que requieren hibridación de ADN (Máttar, 2000).

2.16. Tipificación por secuenciación de múltiples locus (MLST)

Permite la tipificación basándose en el análisis de 7 secuencias derivadas de las variaciones alélicas de 7 genes conservados (*arc, aro, glp, gmk, pta, tpi, yqi*), lo cual genera un perfil alélico (denominado ST=Secuencia Tipo) específico para cada aislamiento bacteriano. Este método es altamente reproducible, además de que se cuenta con una base de secuencias en Internet, donde el usuario puede subir y comparar sus secuencias tipo y complejos clónales (<http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>) (Market *et al.*, 2000).

2.17. Tipificación *spa*.

El método de tipificación *spa* se basa en la secuencia de la región X polimórfica del gen de la proteína A (*spa*), presente en todas las cepas de *S. aureus*. La región X está constituida por un número variable de secuencias cortas repetidas de 24pb flanqueadas por regiones bien conservadas (Hallin *et al.*, 2009).

Para la clasificación de las secuencias cortas repetidas (SRR's) se utiliza una nomenclatura, en la cual cada repetido individual se le asigna un nombre (rX) y al conjunto de repetidos se le asigna un tipo o Type (Tx), de esta forma se logra un conjunto de datos, que son analizados utilizando el software Ridom StaphType y reportándolos a su base de datos mundial que cuenta con alrededor de 313 repetidos reportados y más de 100,000 tipos (o Types "T") encontrados (Harmsen, *et al.*, 2003).

2.18. Tipificación **SCCmec**,

Permite la diferenciación de clonas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina. El casete cromosómico de *S. aureus* contiene el gen *mecA*, los complejos genéticos *ccrA, ccrB* y *ccrC*, así como genes reguladores y secuencias de inserción, de manera que las mutaciones que se presenten en cualquiera de estas regiones, ofrecerán patrones diferentes (Ito *et al.*, 2007). Esta metodología no suele utilizarse en forma primaria, sino para diferenciar clonas y cepas estrechamente relacionadas previamente clasificadas por PFGE y/o MLST (De Colsa 2011).

2.19. Tipificación mediante el número variable de repeticiones en tándem (VNTR).

Estos marcadores genéticos, antes denominados minisatélites, se identificaron inicialmente en seres humanos, donde han tenido su mayor aplicación en pruebas forenses y de paternidad (Frothingham, *et al.*, 1998 y Gascoyne-Binzi, *et al.*, 2001). Los VNTR son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o eliminación de secuencias repetidas. Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por PCR con oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas en sus flancos, el tamaño del amplicón revela el polimorfismo del VNTR y puede expresarse como el número de secuencias repetidas que contiene, permitiendo almacenar códigos numéricos comparables entre diversos laboratorios y crear bases de datos de fácil acceso (Sabat, *et al.*, 2003; Ablordey, *et al.*, 2005)

La técnica VNTR o MLVA (Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis) por sus siglas en inglés, es utilizada en la genotipificación de varias especies bacterianas (Lindstedt, 2005 y Vergnaud y Pourcel, 2009). Se basa en una metodología básica y extendida de la medición de la longitud de fragmentos de ADN. El genotipo, en la forma y número de cadenas corresponden al número de repeticiones en cada locus (Grissa *et al.*, 2008).

Los avances más notables en la tipificación molecular se han obtenido mediante un análisis de un número variable de *loci* utilizando VNTR. El número de unidades de repetición en el mismo locus a menudo varía entre cepa y cepa y se puede detectar por PCR utilizando oligonucleótidos flanqueantes (Jeffrey *et al.*, 1992, Frothingham *et al.*, 1998; Farlow *et al.*, 2001; Keim *et al.*, 2000).

La secuenciación del genoma de *S. aureus* ha indicado la presencia de varios *loci* VNTR, entre ellos *sdr*, *clfA*, *ClfB*, *ssp*, *coa* y *spa*. El locus *sdr* está estrechamente relacionado y dispuesto en tándem con los marcos de lectura que contienen *sdrC*, *sdrD* y *sdrE*, los cuales codifican para la proteína serina aspartato (*sdr*) la permite la unión al fibrinógeno (Josefsson *et al.*, 1998).

Sabat (2003) describió un análisis múltiple-locus VNTR (MLVA) para discriminar entre diferentes aislados clínicos de *S. aureus* basándose en el análisis de cinco *loci* (*sdr*, *clfA*, *ClfB*, *ssp*, y *spa*) repetidos en tándem compuestos de siete genes individuales. Este método de exploración del polimorfismo VNTR permitió la tipificación de aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), determinó su diversidad y sus relaciones evolutivas con alto poder discriminatorio y mostró una reproducibilidad que coincidió con la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Se han desarrollado diferentes esquemas de MLVA para aumentar el poder de discriminación de la técnica y así diferenciar el mayor número de aislados, incluso existen ensayos en los cuales se ha demostrado que MLVA es ideal para tipificar aislados de *S. aureus* de origen humano, animal y de alimentos (Sabat *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2006; Pourcel *et al.*, 2009; Sobral *et al.*, 2012).

Pourcel *et al.* (2009) propusieron un esquema de genotipificación mediante MLVA formado por dos paneles complementarios con un total de 14 marcadores, comprendiendo 10 *loci* en un primer panel y 4 *loci* en el panel 2. Utilizando como referencia la cepa de *S. aureus* Mu50 proporcionaron un ensayo de genotipificación fácil de realizar y con un alto poder discriminatorio, así como con significado filogenético.

La técnica MLVA parece tener el potencial para proporcionar un método para estudios epidemiológicos a corto plazo ya que es rápido y fiable en comparación con otras técnicas para genotipificar. Aun no hay un consenso sobre el conjunto de marcadores de VNTR a ser utilizados para un protocolo eficiente y de uso general en genotipificación. Diferentes repeticiones en tándem varían en los diferentes tipos, y los niveles de homoplastia en VNTRs individuales pueden ser altos, debido a la variabilidad genética entre especies de *S. aureus*. Algunas combinaciones de oligonucleótidos pueden fallar para amplificar una fracción significativa de las cepas, por lo que los *loci* y los oligonucleótidos deben de ser seleccionados cuidadosamente (Pourcel *et al.*, 2009).

BIBLIOGRAFÍA

- Ablordey A, Hilty M, Stragier P, Swings J and Portaels F. 2005. Comparative nucleotide sequence analysis of polymorphic variable-number tandem-repeat Loci in *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, 43(10), 5281-5284.
- Ablordey, A., Hilty, M., Stragier, P., Swings, J. and Portaels, F. 2005. Comparative nucleotide sequence analysis of polymorphic variable-number tandem-repeat Loci in *Mycobacterium ulcerans*. *Journal Of Clinical Microbiology*, 43(10), 5281-5284.
- Abrahmsen M, Persson Y, Kanyima BM, Bage R. 2014. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 99-105.
- Aguilar, A. A., Bañuelos, P. J., Pimienta, B. E., Aguilar, F. A. and Torres, M. P. 2014. Prevalence of subclinical mastitis in municipalities in the region cienega Jalisco state. *Abanico Veterinario*. 4(1).
- Akers, R. M. y Nickerson, S. C. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia*, 16(4), 275-289.
- Akineden, O., Annemüller, C., Hassan, A. A., Lämmle, C., Wolter, W. and Zschöck, M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(5), 959-964.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169.

- Anderson, J. C. 1983. Veterinary aspects of Staphylococci in: Easmon, C. S. F. and Adlam, C. Staphylococci and Staphylococcal Infections. Academic Press. London- New York. P. 193-241.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T. Kuroda, H. Cui, L., Yamamoto, K. and Hiramatsu, K. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet (London, England), 359(9320), 1819-1827.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H. and Zadoks, R. N. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis. Journal Of Dairy Science, 89(6), 1877-1895.
- Bedolla, C. C. 2004. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos No. 41 febrero-marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp. 24-25.
- BEDOLLA, C. C., CASTAÑEDA, V. H. y WOLTER, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. Revista Electrónica de Veterinaria, 8(9), 1-17.
- Bergonier, D., Sobral, D., Feßler, A. T., Jacquet, E., Gilbert, F. B., Schwarz, S., Treilles, M., Bouloc, P., Pourcel, C. and Vergnaud, G. (2014). Staphylococcus aureus from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). Veterinary Research, 45:97, 1-8.
- Blood, D. C. and Radostits, O. M. 1992. Medicina Veterinaria. 7ª ed. Madrid: Interamericana-McGraw Hill. p.378-422.
- Bludau, M. J., Maeschli, A., Leiber, F., Steiner, A. and Klocke, P. 2014. Mastitis in dairy heifers: prevalence and risk factors. Veterinary Journal (London, England: 1997), 202(3), 566-572.
- Blumberg, H., Rimland, D., Kiehlbauch, J., Terry, P. M., Wachsmuth, I. 1992. Epidemiologic typing of Staphylococcus aureus by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes: elucidation of the clonal nature of a group

- of bacteriophage-non typeable, ciprofloxacin-resistant, methicillin-susceptible *S. aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, 30: 362-369.
- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1-14.
- Borraz, O. M. C. 2006. Epidemiología de la Resistencia a Meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aislada en Hospitales Españoles. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona. España.
- Botrel, M., Haenni, M., Morignat, E., Sulpice, P., Madec, J. and Calavas, D. 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne Pathogens And Disease*, 7(5), 479-487.
- Bradley, A. J., K. A. Leach, J. E. Breen, L. E. Green, and M. J. Green. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet. Rec.* 160(8), 253–258.
- Brouillette, E., and Malouin, F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 7(3), 560-568.
- Bubeck Wardenburg, J., Bae, T., Otto, M., Deleo, F. R. and Schneewind, O. 2007. Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nature Medicine*, 13(12), 1405-1406.
- Bush, K., Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Cabral, K. G., Lämmler, C., Zschöck, M., Langoni, H., de Sá, M. P., Victória, C. and Da Silva, A. v. 2004. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Canadian Journal Of Microbiology*, 50(11), 901-909.

- Calvo, J. y Martínez, M. L. 2009. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52.
- Capurro, A., Aspán, A., Unnerstad, H. E., Waller, K. P. and Artursson, K. 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *Journal Of Dairy Science*, 93(1), 180-191.
- Cassone, M. and Giordano, A. 2009. Resistance genes traveling the microbial internet: down the drain, up the food chain? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(6), 637-639.
- Castillo M, Suniaga J, Rojas G, Hernández J, Caamaño J, Urbina A, Tovar T. 2009. Estudio de la prevalencia de mastitis subclínica en la zona alta del estado Mérida. *Agric Andina* 16, 39-48.
- Castro, F. O., Rojas, P. P. and Rodríguez, L. 2006. New biotechnological approaches to treat mastitis. *Agro-Ciencia*, 22(1), 49-58.
- Cerón, M. F., Agudelo, E.J. y Maldonado, J. G. 2007. Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas leches del Departamento de Antioquia (Colombia). *Rev Colomb Cienc Pecu*; 20, 472-483.
- Corbellini, C. M. 2002. La mastitis bovina y su impacto económico sobre la calidad de leche. Medellín: Memorias III Seminario internacional sobre competitividad en carne y leche COLANTA; 2002; p. 251-265.
- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S. and Luzzana, M. 2006. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 163-169.
- Dávalos, M. M., 1998. Cefalosporinas de tercera generación. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 11(1).

- De Colsa, R. A. 2011. Staphylococcus aureus: De la genómica a la clínica. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría, 24 (95), 91-94.
- Delgado, R. A. 1990. Los aminoglucósidos. Rev Acta, 4(2),238-246.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M. and Schlievert, P. M. 2000. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology Reviews, 13(1), 16-34.
- Dohoo I.R. and Leslie K.E. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections, Prev. Vet. Med. 10, 225–237.
- Drlica, K. and Malik, M. 2003. Fluoroquinolones: action and resistance. Current Topics in Medicinal Chemistry, 3(3), 249-282.
- Džidić, S., Šušković, J., and Kos, B. 2008. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. Food Technology & Biotechnology, 46(1), 11-21.
- El-Sayed, A., Alber, J., Lämmner, C., Jäger, S., Wolter, W., Castañeda-Vázquez, H. and Zschöck, M. 2006. Comparative study on genotypic properties of Staphylococcus aureus isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. Veterinaria México, 37(2), 165-179.
- El-Sayed, A., Alber, J., Lämmner, C., Jäger, S., Wolter, W., Castañeda-Vázquez, H. and Zschöck, M. 2006. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. (Spanish). Veterinaria México, 37(2), 165-179.
- Enright, M. C. 2003. The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. Current Opinion In Pharmacology, 3(5), 474-479.
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. and Spratt, B. G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. Journal Of Clinical Microbiology, 38(3), 1008-1015.

- Erskine, R., J. Cullor, M. Schaellibaum, P. Yancey, and A. Zecconi. 2004. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. Page 400–414 in Proc. 43rd National Mastitis Council Mtg. National Mastitis Council, Verona, WI.
- Faría, R. J. F., Valero-Leal, K., D'Pool, G., García, A., Allara, M. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. Rev. Científica. FCV-Luz. Maracaibo. 15 (3), 227-234.
- Farlow, J., Smith, K.L., Wong, J., Abrams, M., Lytle, M. and Keim, P. 2001. Francisella tularensis strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. J. Clin. Microbiol. 39(9), 3186–3192.
- Fernández, B. O. F., Trujillo, G. J. E., Peña, C. J. J., Cerquera, G. J. y Granja, S. Y. T. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos. Revista veterinaria, 13(11), 1–11.
- Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T. and Graber, H. U. 2008. Bovine Staphylococcus aureus: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. Research In Veterinary Science, 85(3), 439-448.
- Franco, G. J. C., González, V. L., Gómez, M. S. C., Carrillo, G. J. M. y Ramírez, C. J. J. 2008. Análisis de los factores de virulencia de Staphylococcus aureus aislados de mastitis bovina en México. e-Gnosis, 6(7), 1-9.
- Frothingham, R. and Meeker-O'Connell, W. A. 1998. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology (Reading, England), 144 (Pt 5), 1189-1196.
- Fuchs, L. Y., Chihu, L. Conde, C., González, V. M., Noguez, A. H., Calderón, E., Avonce, N. y Ovando, C. 1994. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Salud Pública de México, 36(4), 1-12.

- Fueyo, M. J. M. 2005. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. (Tesis Doctoral). Universidad de Oviedo, España.
- García, Á., L., Holden, M. T., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F., Curran, M. D., Walpole, E., Brooks, K., Pickard, J.D., Teale, C., Parkhill, J., Bentley, D.S., Edwards, F.G., Girvan, K.E., Kearns, M.A., Pichon, B., Hill, L.R., Larsen, R.A., Skov, L.R., Peacock, J.S., Maskell, J.D and Holmes, M. A. 2011. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(8), 595–603.
- Gascoyne-Binzi, D. M., Barlow, R. E., Frothingham, R., Robinson, G., Collyns, T. A., Gelletlie, R. and Hawkey, P. M. 2001. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 39(1), 69-74.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Golaly, S., Rebuelto, M. and De Gregorio, O. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* 83:1224-1227.
- Giannechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil, J., Salvarrey, L. and Rivero, R. 2014. Bovine mastitis, distribution of pathogens and antimicrobial resistance in the Southern Dairy Basin of Uruguay. *Veterinarian*. 50 (196), 4-32.
- Gilbert, F. B., Fromageau, A., Gélinau, L. and Poutrel, B. 2006. Differentiation of bovine *Staphylococcus aureus* isolates by use of polymorphic tandem repeat typing. *Veterinary Microbiology*, 117(2-4), 297-303.
- Gimeno, O. y Ortega, C. 2005. Antibióterapia y salud pública veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos. 13 de enero de 2017, de SAPUVETNETII Sitio web: http://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/antib_portugal.pdf

- Gómez, Q. O. E., Oscar, E., Santivañez, B. C. S., Arauco, V. F., Espezua, F. O. H. and Manrique, M. J. 2015. Interpretation criteria for california mastitis test in the diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Rev. Inv. Perú.* 26 (1), 86-95.
- Goodman L. and Gilman A. 1990. *The pharmacological basis of therapeutics.* 8 ed. New York: Pergamon, Press.
- Graber, H. U., Naskova, J., Studer, E., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Brechbühl, M., Schaeren, W., Steiner, A. and Fournier, C. 2009. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1442-1451.
- Granados, B. E. 2011. Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en las localidades de Cotzio y Tajaró, mediante secuenciación del gen de arn ribosomal 16s. Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo.
- Grissa, I., Bouchon, P., Pourcel, C. and Vergnaud, G. 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90, 660–668.
- Guardabassi, I., and Courvalin, L. 2006. Modes and antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* Aarestrup, F. (Ed.). ASM. Press. Washington, DC. 1-19 pp. 2006.
- Guízar, F. P., Bedolla, C. J. I. y Luis, C. J. 2008. Determinación de la Prevalencia de Mastitis Bovina en el municipio de Tarímbaro, Michoacán, Mediante la Prueba de California. *Revista Electrónica Veterinaria*, 9 (10), 1-34.
- Haenni, M., Galofaro, L., Ponsin, C., Bes, M., Laurent, F. y Madec, J. 2011. Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 216-218.

- Hallin, M., Friedrich, A. W. and Struelens, M. J. 2009. spa typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology*, 551,189-202.
- Happi, C. T., Gbotosho, G. O., Folarin, O. A., Akinboye, D. O., Yusuf, B. O., Ebong, O. O., Sowunmi, A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D. F. and Oduola, A. m. J. 2005. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Tropica*, 95(3), 183-193.
- Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 2103-2112.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D. and Vogel, U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by use of novel software for spa repeat determination and database management. *J. Clin.Microbiol.* 41(12), 5442-5448.
- Hashemi M., Kafi M., Safdarian M. 2011. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. *Iranian J. Vet. Res.* 12, 236-241.
- Hasman, H, Moodley, A, Guardabassi, L, Stegger, M, Skov, R.L. and Aerestrup, F.M. 2010. Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Vet Microbiol* 141(3-4), 326–331.
- Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K. and Eguchi, M. 2010. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J. Clin. Microbiol.* 48(6), 2130–2139.
- Hernández, S. P. 2005. Responsible use of antibiotic in aquaculture. *FAO, Fisheries Technical Paper*, 469, 1-89.

- Hillerton, J. E. and Berry, E. A. (2005). Treating mastitis in the cow a tradition or an archaism. *Journal Of Applied Microbiology*, 98(6), 1250-1255.
- Hillerton, J. E. and Berry, E. A. 2004. Quality of the milk supply: European regulations versus practice. *Proceedings 43rd NMC Annual Meeting* p 207–214.
- Hogan, J. S., Berry, E., Hillerton, E., et al., Current concepts of bovine mastitis. 5th edition. Verona, WI, National Mastitis Council.
- Hogeveen H, Østerås O. 2005. Mastitis management in an economic framework. In: Hogeveen H (ed). 4th IDF International Mastitis Conference. Pp 41–52. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Huijps, K., Lam, T. J. and Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *The Journal Of Dairy Research*, 75(1), 113-120.
- Iraguha, B., Hamudikuwanda, H. and Mushonga, B. 2015. Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. *Journal of the South African Veterinary Association* 86(1), 1-6.
- Ito, T., Kuwahara, K. and Hiramatsu, K. 2007. Staphylococcal cassette chromosome mec(SCC mec) analysis of MRSA. *Methods in Molecular Biology*, 391,87-102.
- Jamali, H., Radmehr, B., & Ismail, S. 2014. Prevalence and antibiotic resistance of 284 *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 285 97, 2226-2230.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. 1992. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Biotechnology*, 24, 467–472.
- Josefsson, E., McCrea K. W., Ni Eidhin, D., O’Connell, D., Cox, J., Hook, M. and Foster, T. J. 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 144(Pt 12), 3387-3395.

- Juhász-Kaszanyitzky, É., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, Á., van Bloois, L. vanderGraaf, van Duijkeren, E. and Wagenaar, J. A. 2007. MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), 630–632.
- Kalorey, D. R., Shanmugam, Y., Kurkure, N. V., Chousalkar, K. K. and Barbuddhe, S. B. 2007. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *Journal Of Veterinary Science*, 8(2), 151-154.
- Katsande, S., Matope, G., Ndengu, M. & Pfukenyi, D.M., 2013, 'Prevalence of mastitis in dairy cows from smallholder farms in Zimbabwe', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 80(1),1-7.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J. and Hugh, J. M. E. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 182(10), 2928-2936.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J. A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. and De Buyser, M. L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal Of Food Microbiology*, 115(3), 369-375.
- Kirst, H. A. and Sides, G. D. 1989. New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(9), 1419-1422.
- Kivaria, F., Noordhuizen, J. and Nielen, M. 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 Dar es Salaam region of Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine*, 78(3/4), 274-285.
- Kotra, L. P. and Mobashery, S. 1999. Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 47(4), 211-216.

- Kozerski, N. D., De Oliveira, J. L. P., Moura, R. A., da Silva, D. R., De Oliveira, A. F., Mello, P. L., Agostinis, R. O., Gonçalves, D. D., Otutumi, L. K., and Martins, L. de A. 2014. Antimicrobial profile of multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis cases in the northwest region of Paraná State, Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 8(37), 3392-3397.
- Kreuzer, K. N. and Cozzarelli, N. R. 1980. Formation and resolution of DNA catenanes by DNA gyrase. *Cell*, 20(1), 245-254.
- Kulhankova, K., King, J. and Salgado-Pabón, W. 2014. Staphylococcal toxic shock syndrome: superantigen-mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. *Immunologic Research*, 59(1-3), 182-187.
- Kurjogi, M. M. and Kaliwal, B. B. Epidemiology of bovine mastitis in cows of Dharwad district. 2014. *International Scholarly Research Notices*. 2014, 1-9.
- Lago, A., Godden, S. M., Bey, R., Ruegg, P. L. and Leslie, K. 2011. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4441-4456.
- Lee, J. H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6489–6494.
- Łeski, T. A. and Tomasz, A. 2005. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1815-1824.
- Leslie, K. E., Duffield, T. F., Schukken, Y. H., LeBlanc, S. J. 2000. The influence of negative energy balance on udder health. *Proc. Natl. Mastitis Council Regional Meeting*, Madison, WI.

- Li, J., Zhou, H., Yuan, L., Hu, S. H. 2010. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B*.10(10), 753–60.
- Lindstedt, B. A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26(13), 2567–2582.
- Lozano, C., Sanz, G.E., Benito, D., Aspiroz, C., Zarazaga, M. and Torres, C. 2011. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol*.301(6), 500-505.
- Makovec, J. A, and Ruegg, P. L. 2003. Results of Milk Samples Submitted for Microbiological Examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal Of Dairy Science*, 86(11), 3466-3472.
- Manfredi, E. A., Leotta, G. A. and Rivas, M. 2010. Multiplex PCR for the detection of sea, seb, sec, sed and see genes of *Staphylococcus aureus*. Characterization of isolates from food. *Revista Argentina De Microbiología*, 42(3), 212-215.
- Máttar, V. S., 2000. Utilidad de la biología molecular en el estudio de las zoonosis. *MVZ-CORDOBA*, 5(1), 46-50.
- McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K., and Tenover, F. C. 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 5113-5120.
- Mekibib, B., M. Furgasa, F. Abunna, B. Megersa and A. Regassa. 2010. Bovine Mastitis: Prevalence, Risk Factors and Major Pathogens in Dairy Farms of Holeta Town, Central Ethiopia. *Vet. World*. 3(9), 397-403.

- Mellenberg, R. and Kirk, J. 2001. Mastitis Control Program for Staph. aureus Infected Dairy Cows. 20 de enero de 2017, de extensión.org Sitio web: http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/mastitis-control-program_staph.-aureaus.pdf.
- Miranda, M. R. E., Rojas, T. V., Segura, C. R., Carrillo, C. E. M., Sánchez, G. M.G, Castor, S. R. and Trigo, T. J. 2008. Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Ann N Y Acad Sci.* 1149(1), 300–302.
- Mizuuchi, K., Fisher, L. M., O'Dea, M. H. and Gellert, M. 1980. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States of America*, 77(4), 1847-1851.
- Momtaz H, E Rahimi and E Tajbakhsh, 2010. Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran. *Afr J Biotech*, 9 (25), 3753-3758.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L. and Ochoa, T. J. 2011. [Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*- associated diarrhea]. *Revista Peruana De Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648-656.
- Muñoz, S.J., Hernández, A. L., Ballesteros, Arrieta, B. E., Camacho, D. L. M. and Hernández, V. D. 2012. Bacterial isolation in dual purpose cattle with subclinical mastitis in the coast from Guerrero, México. *REDVET.* 13 (7), 1-11.
- Muñoz, S.J., Hernández, A. L., Ballesteros, Arrieta, B. E., Camacho, D. L. M. and Hernández, V. D. 2012. Bacterial isolation in dual purpose cattle with subclinical mastitis in the coast from Guerrero, México. *REDVET.* 13 (7), 1-11.
- Murai, K., Lehenbauer, T. W., Champagne, J. D., Glenn, K. and Aly, S. S. 2014. Cost-effectiveness of diagnostic strategies using quantitative real-time PCR and bacterial culture to identify contagious mastitis cases in large dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 113(4), 522-535.

- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5157), 382-388.
- Nikaido, H. and Zgurskaya, H. I. 1999. Antibiotic efflux mechanisms. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 12(6), 529-536.
- NMC, National Mastitis Council. 2008. Develop Strategies and Standards to Prevent Introducing Infections into a Herd. *Udder Topics* 31 (2) 1-6.
- Novick, R. P., Schlievert, P. and Ruzin, A. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes And Infection / Institut Pasteur*, 3(7), 585-594.
- Nunes, S. F., Bexiga, R., Cavaco, L. M. and Vilela, C. L. 2007. Technical note: Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3242-3246.
- Olde, R. R. G. M., Barkema, H. W., Scholl, D. T., Poole, D. E. and Kelton, D. F. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Prev Vet Med.* 97(1), 20–28.
- Oliveira, D. C., Tomasz, A. and de Lencastre, H. 2001. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements. *Microbial Drug Resistance*, 7(4), 349-361.
- Oliveira, L., and Ruegg, P. L. 2014. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5426-5436.
- Oltenu, P. A. and Ekesbo, I. 1994. Epidemiological study of clinical mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 25(2-3), 208-212.
- Ote, I., Taminiou, B., Duprez, J., Dizier, I. and Mainil, J. G. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 153(3-4), 285-292.

- Pantoja, J. F., Hulland, C. and Ruegg, P. L. 2009. Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. *Preventive Veterinary Medicine*, 90(1-2), 43-54.
- Pastor, G. F. J. I. and Bedolla, C. J. L. C. 2008. Determination of the prevalence of bovine mastitis in the municipality of Tarimbaro, Michoacan, by means of the California test. *REDVET*. 9 (10),1-34.
- Pastor, L. F. J., Valenzuela, J. N., Luna, E. A. L., Isidro, R. L.M., Palomo, R. M., Aguilar, M. C. U., Sánchez, H. M. A. and Salinas, G. H. 2010. Incident of Subclinical Mastitis and his Effect in Some Nutritional Characteristics of Milk in 4 Stables of the Comarca Lagunera. *Producción Pecuaria-AGROFAZ*. 10 (4), 339-346.
- Pech, M. V.C., Carbajal, H. M. and Motes, P. R. 2007. Economical impact of subclinical mastitis in dual purpose cattle herds of the central zone of Yucatan, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 7, 127-131.
- Pellegrino, M. S. Frola, I. D., Odierno, L. M. and Bogni, C. I. 2011. Bovine Mastitis: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk. *REDVET*. 12(7), 1-14.
- Persson Y, Nyman, A. K., Gronlund-Andersson U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand*. 53(1), 36.
- Petersson, W. C. S, Mullarky, I. K. and Jones, G. M. 2010. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. Virginia Cooperative Extension, 404-229, 1-7.
- Philpot, N. y Nickerson, S. 1992. Mastitis: el contra ataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Estados Unidos: Babson Bros Co, p 147-234.
- Philpot, W.N. and Nickerson S.C.. 1992. Mastitis: Counter Attack. Babson Bros. Co., Naperville, IL. 150 pp.

- Phuektes, P., Browning, G. F., Anderson, G. and Mansell, P. D. 2003. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *The Journal of Dairy Research*, 70(2), 149-155.
- Piccinini, R., Borromeo, V. and Zecconi, A. 2010. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Veterinary Microbiology*, 145(1-2), 100-105.
- Piccinini, R., Cesaris, L., Daprà, V., Borromeo, V., Picozzi, C., Secchi, C. and Zecconi, A. 2009. The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *The Journal Of Dairy Research*, 76(1), 36-41.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V. and Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2433-2441.
- Poole, K. 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(17), 2200-2223.
- Pourcel, C., Hormigos, K., Onteniente, L., Sakwinska, O., Deurenberg, R. H. and Vergnaud, G. 2009. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3121-3128.
- Pourtaghi, H., Ghasem, Azizi, G. H. and Sodagari, H. R. 2016. Antimicrobial resistance patterns of *staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Alborz province, Iran. *BJVM*. 19(2):169-174.
- Radostits, O. M., Clive, G., Hinchcliff, K. and Constable, P. 2000. Bovine mastitis, In: *A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 9 edn. Saunders, W.B. Co. pp. 563-618.

- Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B. y Benjumea, J. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Col Ciencias Pec*, 14,76-87.
- Ramírez, V. N., Arroyave, H. O., Cerón, M. M., Jaramillo, M., Cerón, J. and Palacio, L. G. 2011. Factors Associated to Mastitis in Cows from the Dairy Production Basin in the Northern Highlands of Antioquia, Colombia. *Rev. Med. Vet.* 22, 31-42.
- Restrepo, J., Ortiz, L., Cardona, X., y Oliv, M. 2012. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular del *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis. *Biosalud*, 11(2), 40-51.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(7), 2584-2589.
- Roberson, J. R. 2012. Treatment of clinical mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 28(2), 271-288.
- Roberson, J. R. and Kalck, K. A. 2010. Treatment of candidal mastitis in two Holstein cows: a case report and review. *Bovine Pract*, 44, 52–58.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. and Besser, T. E. 1996. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *American Journal Of Veterinary Research*, 57(1), 54-58.
- Rodrigues, C. O., Cassoli, L. D. and Machado, P. F. 2005. Milk quality and new regulations in Brazil. *J Dairy Sci* 88:272.
- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C. and Overton, M. W. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(3), 257-264.
- Rosas, R. B. 1992. Boletín informativo. Síntesis de investigación clínica. Mastitis y heridas del pezón. Vol. 37. No. 8. pp 15-23

- Ruegg, P. L. 2001. Mastitis Control. *Milking and milk Quality* 405, 1-10.
- Ruegg, P. L. 2003. Investigation of mastitis problems on farms. *The Veterinary Clinics Of North America. Food Animal Practice*, 19(1), 47-73.
- Ruiz, A.K., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R.A., Sampaio, E., Lucena, E.R. and Benone, S., 2011. Comparison of manual and mechanical milking: prevalence of subclinical mastitis and microorganisms associated with mastitis, in Pernambuco, Brazil. *Rev. Salud Animal*, 33 (1), 57–64.
- Ruiz, A.K., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R.A., Sampaio, E., Lucena, E.R. and Benone, S., 2011. Comparison of manual and mechanical milking: prevalence of subclinical mastitis and microorganisms associated with mastitis, in Pernambuco, Brazil. *Rev. Salud Animal*, 33 (1), 57–64.
- Rychlik, I., Gregorova, D., and Hradecka, H. 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*, 112(1), 1-10.
- Sabat A, Krzyszton, R. J, Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J. and Potempa, J. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol*; 41(4), 1801-1804.
- Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W. y Potempa, J. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41(4), 1801-1804.
- Sabour, P. M., Gill, J. J., Lepp, D., Pacan, J. C., Ahmed, R., Dingwell, R., & Leslie, K. 2004. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(8), 3449-3455.

- Saini, V., McClure, J. T., Leger, D., Dufour, S., Sheldon, A. G., Scholl, D. T. and Barkema, W. H. 2012. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 1209–1221.
- Sakwinska O, Morisset D, Madec, J-Y, Waldvogel, A., Moreillon P. and Haenni M. 2011. Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhone valley. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(10), 3428-3432.
- Sande, M. A. and Mandel, G. L. 1993. Los aminoglucósidos. en: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 8 ed. Editorial Médica Panamericana. 1993:1065-82.
- Sargeant, J. M., Leslie, K. E., Shirley, J. E., Pulkrabek, B. J. and Lim, G. H. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal Of Dairy Science*, 84(9), 2018-2024.
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M. T., Lindqvist, R., Barker, G. C. and Rådström, P. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6), 580-592.
- Schepers J.A., Lam T.J.G.M., Schukken Y.H., Wilmink J.B.M., Hanekamp W.J.A. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters, *J. Dairy Sci.* 80, 1833–1840.
- Sears, P. M., and McCarthy, K. K. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *The Veterinary Clinics Of North America. Food Animal Practice*, 19(1), 171.
- Sharma, N., Rho, G.J., Hong, Y.H., Kang, T.Y., Lee, H.K., Hur, T. and Jeong, D.K. 2012. Bovine Mastitis: An Asian Perspective, *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7, 454–476.

- Shitandi, A., and Sternesjö, A. 2004. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4145-4149.
- Smith, K. L. and Hogan, J. S. 1998. Milk Quality. A Worldwide Perspective. Proceedings 37th National Mastitis Council Annual Meeting p 3–9.
- Sobral D, Schwarz S, Bergonier D, Brisabois A, Fessler AT, Gilbert FB, Kadlec K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Treilles M, Pourcel C, Vergnaud G. 2012. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. *PLoS One*. 7(5). 33967.
- Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A. and Failing, K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary Microbiology*, 96(1), 91-102.
- Straub, J. A., Hertel, C. and Hammes, W. P. 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal Of Food Protection*, 62(10), 1150-1156.
- Suriyasathaporn, W., Schukken, Y. H., Nielen, M. and Brand, A. 2000. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1248-1255.
- Suriyasathaporn, W., Schukken, Y. H., Nielen, M. and Brand, A. 2000. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1248-1255.
- Sutra, L. and Poutrel, B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 40(2), 79-89.

- Suzuki, Y., C. Katsukawa, A. Tamaru, C. Abe, M. Makino, Y. Mizuguchi, and H. Taniguchi. 1998. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol*, 36 (5), 1220–1225.
- Tondo, E. C., Guimarães, M. C., Henriques, J. A., and Ayub, M. A. 2000. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Canadian Journal Of Microbiology*, 46(12), 1108-1114.
- USDA-APHIS. 2007. Prevalence of contagious mastitis pathogens on US dairy operations. APHIS Veterinary Services Info Sheet. #N533.1008. Washington, DC: APHIS, USDA; 2007.
- USDA-APHIS.2012. Determining U.S. Milk Quality Using Bulk-tank Somatic Cell Counts, 2011 APHIS Veterinary Services Info Sheet. #657.0812. Washington, DC: APHIS, USDA.
- van Veen, H. W. and Konings, W. N. 1997. Drug efflux proteins in multidrug resistant bacteria. *Biological Chemistry*, 378(8), 769-777.
- Vergnaud, G. and Pourcel, C. 2009. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *Methods Mol. Biol.* 551, 141–158.
- Vicente, D., and Pérez-Trallero, E. 2010. [Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(2), 122-130.
- Waage, S., Sviland, S. and Odegaard, S. A. 1998. Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1275-1284.
- Wang D., Wang Z., Yan Z., Wu J., Ali T., Li J., Lv Y. and Han B. 2015. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infect. Genet. Evol.* 31,9-16

- Wang, G. and Taylor, D. E. 1998. Site-specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 42(8), 1952-1958.
- Webber, M. A. and Piddock, L. V. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9-11.
- Wellenberg, G. J., Van Der Poel, W. H. M. and Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 88(1)27, 2-21.
- Wenz, J. R., Garry, F. B., and Barrington, G. M. 2006. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *Journal Of The American Veterinary Medical Association*, 229(2), 259-262.
- Wenz, J. R., Garry, F. B., Lombard, J. E., Elia, R., Prentice, D., and Dinsmore, R. P. 2005. Short communication: Efficacy of parenteral ceftiofur for treatment of systemically mild clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3496-3499.
- Wilkinson, B. J. 1997. Biology. In: Crossley, K. B, and Archer, G. L. 1997. *The staphylococci in human disease*. New York (N.Y.): Churchill Livingstone. pp 1-38.
- Wilson, D. J., Gonzalez, R. N., and Das, H. H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2592-2598.
- 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.
- Yang, F., Li, X., Liang, X., Zhang, X., Qin, G. and Yang, B. 2012. Detection of virulence-associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi.

- Yang, Y., Su, X.-d., Yuan, Y.-w., Kang, C.-y., Li, Y.-j., Zhang, W., Zhong, X.-y. 2007. Detection of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products by Polymerase Chain Reaction Assay. *Agricultural Sciences in China*, 6 (7), 857-862
- Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Luengo, J. M. and Naharro, G. 2001. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of gap gene. *Journal Of Clinical Microbiology*, 39(10), 3693-3695.
- Zadoks, R. N., van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H. and van Belkum, A. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *Journal Of Clinical Microbiology*, 40(11), 3894-3902.
- Zadoks, R., Middleton, J., McDougall, S., Katholm, J. and Schukken, Y. 2011. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Journal Of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 357-372.

CAPÍTULO 3

III. ARTÍCULOS DERIVADOS DEL ESTUDIO

3.1. Prevalence and resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in dairy farms in Baja California Peninsula, México.

Enviado a la revista: Austral Journal of Veterinary Sciences.

Javier Palacios Torres^a, Jennifer Brisuela Raygosa^a, Gilberto López Valencia^a, Sawako Oshima^a, Lourdes C. Pujol Manriquez^a, José C. Herrera Ramírez^a, Carlos E. Angulo Valadez^b, Gerardo E. Medina Basulto^{a*}

^aInstituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.

^bCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.

*Corresponding Author: Gerardo E. Medina Basulto

Tel: +52 (686)-563-69-06, Ext.131. Km. 3.5 Carretera a San Felipe S/N. Fracc. Laguna Campestre. CP. 21386. E-mail: gerardom@uabc.edu.mx

ABSTRACT

Bovine mastitis is a very common problem in dairy farms, having a serious negative impact in both milk production and quality. The aim of this study was to determine the prevalence of mastitis in 6 dairy farms located in the Baja California Peninsula and the antimicrobial susceptibility profiles of *S. aureus* isolates obtained. 213 milk samples were taken from 125 cows under milk production that tested positive to California Mastitis Test (CMT) out of 702 total dairy cows from the sampled herds. The etiological agents were isolated, identified by PCR and tested by diffusion method in agar to determine antimicrobial susceptibility. A general mastitis prevalence of 17.80 % (125/702) was observed, shifting from 11.46% to 60% between the different dairy farms. From the total number of cows positive to CMT, 29.60% (37/125) were affected by *S. aureus*, this being the isolate most frequently found. From a total of 107 *S. aureus* isolates, 74.76% (80/107) presented multi-drug resistance (MDR), mainly to groups of beta-lactams and cephalosporins (74.76%), macrolides (71.96%) and quinolones (67.28%). The results obtained show that mastitis, the presence of *S. aureus* and the antimicrobial resistance are important problems in the sampled dairy farms from the Baja California Peninsula.

Key words: Mastitis; *Staphylococcus aureus*; Antimicrobials; Resistance.

RESUMEN

La mastitis bovina es un problema muy común en los establos lecheros, teniendo un impacto negativo en la producción y calidad de la leche. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de mastitis en 6 establos localizados en la Península de Baja California y los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos de los aislados de *S. aureus* obtenidos. Se tomaron 213 muestras de leche de 125 vacas en producción positivas a California mastitis test (CMT), se aislaron los agentes etiológicos, se identificaron mediante PCR y se les realizó la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos por el método de difusión en agar. Se observó una prevalencia general de mastitis del 17.80% (125/702), variando desde 11.46% a 60% en los diferentes establos. Del total de vacas positivas a CMT el 29.60% (37/125) se vieron afectadas por *S. aureus*, siendo el aislado más frecuente. De un total de 107 aislados de *S. aureus*, el 74.76% (80/107) presentaron multidrogorresistencia (MDR), principalmente al grupo de los betalactámicos y cefalosporinas (74.76%), macrólidos (71.96%) y quinolonas (67.28%). Los resultados obtenidos muestran que el problema de mastitis, la presencia de *S. aureus* y la resistencia a distintos antimicrobianos son un problema importante en los establos muestreados en la Península de Baja California.

Palabras clave: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, Antimicrobianos, Resistencia.

INTRODUCTION

Bovine infectious mastitis is caused when bacteria enter the udder. These bacteria are capable of not only causing infection but also producing inflammation of the secreting tissue in the udder (Ruegg 2001). The economic losses are estimated as 35 billion dollars worldwide (Wellenberg et al 2002), primarily due to the decrease in milk production, increase in the number of clinical treatments and the early discarding of productive animals (Steeveveld et al 2011). Different studies carried out in Mexico have reported a prevalence of subclinical mastitis in ranges between 35.64% and 61.80% (Nuñez et al 2008, Aguilar et al 2014), as well as economic losses of about 100 dollars per animal each year (Wolter et al 2004, Pech et al 2007). In the United States it has been estimated that the average economic loss per year of a productive cow with subclinical mastitis is between 180 to 320 dollars while clinical mastitis can cost up to 444 dollars just in the first lactation month (Wilson et al 1997, Rollin et al 2015). *Staphylococcus aureus* is a frequent cause of subclinical and clinical intramammary infections in dairy cattle (Momtaz et al 2010) thus being responsible for one third of mastitis cases in dairy farms (Persson et al 2011). Currently various control strategies for bovine mastitis are being used such as good milking processes, equipment maintenance, frequent sampling for mastitis testing, segregation of sick animals and the use of antimicrobials. The last strategy is the one that has a decisive effect in the elimination of intramammary infections (Neave et al 1969, Zeconi et al 2003, Pol and Ruegg, 2007, Saini et al 2012), however, it has been observed that the use of antimicrobials as prophylactics during the dry period between lactation periods of dairy cattle encourage the selection of resistant strains and has a negative influence on intramammary infection treatment (Calvinho et al 1991). The main groups of antimicrobials used as treatment for bovine mastitis as well as for other diseases are beta-lactams, cephalosporins, aminoglycosides and fluoroquinolones among others (Gentilini et al 2000, USDA-APHIS 2007 and Saini et al 2012). Due to the fact that bovine mastitis is considered an endemic disease with high impact in the Baja California

Peninsula, hence the purpose of this work was to determine the prevalence of mastitis and *S. aureus* in 6 regional dairy farms and to identify the antimicrobial susceptibility profiles of each isolate obtained.

MATERIALS AND METHODS

All milk producing dairy cows in the study farms were analyzed by CMT test. Milk samples for isolating procedures were taken from all quarters with CMT level 2 or more. As a complement to this study, some information from each dairy farm was obtained by epidemiological survey, which included milking sequence, rinsing teat cups from cow to cow during milking, changing of towels or blotting paper from one producing animal to the next, as well as the application of pre-seal before milking. The obtained samples were cultivated at 35°C for 24 hours in Columbia blood agar. The isolated bacteria were identified as *Staphylococcus* genera based on the characteristics of the colony, Gram staining, hemolysis and catalase tests. *S. aureus* was identified by means of PCR amplifying the 23S ribosomal gene (Riffon et al 2001). A DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, USA) was used for the extraction of DNA after adding 5µl of 1mg/ml lysostaphin solution (Sigma, USA). The oligonucleotides forward (Sau 327 5'-GGACGACATTAGACGAATCA-3') and reverse (Sau 1645 5'-CGGGCACCTATTTTCTATCT-3') amplified to 1318pb product. The PCR reaction was formed by 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 25 pmol/µl of each oligonucleotide, 1 U of Taq DNA polymerase (PROMEGA) and 100 ng of template DNA, all of this reaction in a final volume of 25 µl. A reference strain of *S. aureus* (ATCC 33591) was used as positive control. The antimicrobial susceptibility tests were done using Kirby-Bauer method in a Muller-Hinton chocolate agar (CLSI, 2007) using multidiscs for Gram-positive bacteria (BIORAD, USA). The results were expressed as the percentage of non-susceptible isolates which represents resistant isolates or with intermediate resistance (Magiorakos et al 2011).

Statistical analysis

Data were statistically processed using Statistix 9® (©Analytical Software, Tallahassee FL, USA) software, including the Chi square (χ^2) estimation to establish

associations between prevalence of mastitis and good milking practices, and Odds Ratio (OR) with confidence intervals of 95%. Significance was declared as $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

2808 quarters of 702 dairy cows were analyzed by CMT test. Milk samples were taken from 213 quarters with CMT level 2 or more of 125 dairy cows. An average prevalence of 17.80% (125/702) of mastitis was found with a range of 11.46% to 60% between the different dairy farms (Table 1). The variation in the found prevalence ranges can be associated with the individual characteristics of each dairy farm as well as deficiencies or omissions in the milking processes. In accordance with the National Mastitis Council of the United States (NMC), these can influence the prevalence and incidence levels of bovine mastitis. For example, it was observed that none of the dairy farms had a sequence of milking in which healthy cows were milked first or the teat cups were rinsed between one use and the next, making infected cow transmits the infection by those same teat cups to the next cows to be milked. The Tecate dairy farm was the only one that changed blotting paper from one cow to the next and also did pre-sealing, which are important factors that have been reported to prevent infections from one dairy animal to the next during milking (NMC 2008). This was reflected in significant less prevalence of mastitis ($P < 0.05$) than those from dairy farms of Mexicali 1, La Paz and Constitucion 2. Another important finding was that in Constitucion 2 dairy farm, in which more prevalence (60%) was observed, no any kind of good milking practices were implemented, which was reflected in the fact that it is 11.58 times more likely to find mastitis in this dairy farm than the one sampled in Tecate. Regarding the causes of mastitis in the sampled dairy farms, it was observed that 8.11%, which corresponds to 45.60% of the cows with mastitis were of unknown cause, eventhough they could probably be due to injuries, neoplasms, presence of irritating substances, or non-cultivated microorganisms in the culture media used in this study. A total of 5.27% dairy cows were affected by *S. aureus*, which corresponds to 29.60% of the producing animals with mastitis. This data show that *S. aureus* is the main cause of mastitis due to a single factor in the sampled dairy farms and is similar to that found in other regions of

Mexico (Miranda et al 2008) and the United States (USDA-APHIS 2007). Finally, 4.41% of the total animals, which corresponds to 24.80% of the cows with mastitis, showed infections by microorganisms other than *S. aureus*, demonstrating that it is important to consider these etiologic agents in the prevention and treatment programs in the studied dairy farms.

To determine the antimicrobial susceptibility, 107 isolates of *S. aureus* were analyzed from 7 different dairy farms in the region (Table 2) 74.76% (80/107) of them were multi- drug resistant (MDR), as they showed resistance to three or more antimicrobial groups (Magiorakos et al 2011). Principally they include: beta-lactams and cephalosporins (76.76%), macrolides (71.96%) and quinolones (67.28%). These results were expected due to the fact that these antimicrobial groups are widely used against intramammary infections as well as other animals' health problems in the different dairy farms sampled, which have been reported to influence the resistance against one or more antimicrobial groups (Moon et al 2007, Kumar et al 2010). The antimicrobial groups that the isolates showed less resistant were Tetracyclines (9.34%) and Sulphonamide/Trimethoprim (5.60%), which are been used only recently in the dairy farms studied.

CONCLUSION

According to the obtained results, even though *S. aureus* was the main microorganism causing mastitis in the studied dairy farms, there are still other important pathogenic causes. The efforts to control mastitis in the dairy farms in the region of study must be directed primarily at implementing good milking practices in order to minimize the presence of the disease. In addition, due to high ratio of *S. aureus* MDR in the region's dairy farms, it is also important to implement antibiotic rotation protocols and antimicrobial susceptibility testing prior to any treatment in order to apply the only treatment that is adequate for each individual mastitis case.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the Universidad Autónoma de Baja California, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) by means of Javier

Palacios' graduate student scholarship and research grants (PDCPN2014-01/248033). Also, we thank Gerardo Felipe García, Ana Lilian Íñiguez, David Antonio López, Eslyn Isabel Solis and Nidia Elizabeth Vargas for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Aguilar-Aldrete A, Bañuelos-Pineda J, Pimienta-Barrios E, Aguilar-Flores A, Torres-Moran P. 2014. Prevalence of subclinical mastitis in municipalities in the region cienega Jalisco state. *Abanico Vet* 4, 24-31.
- Calvinho LF, Delgado AR, Vitulich CA, Occhi HL, Canavesio V, R Zurbriggen MA, Tarabla HD. 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.
- CLSI. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Approved Standards M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. CDC. USA.
- Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, DeGregorio O. 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci* 83, 1224-1227.
- Kumar RB, Yadav BR, Singh RS. 2010. Genetic Determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Curr Microbiol* 60, 379-386.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Liljequist BO, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18, 268-281.
- Miranda-Morales MR, Rojas-Trejo V, Segura-Candelas R, Carrillo-Casas EM, Sánchez-Gonzalez MG, Castor RS, Trigo-Tavera FJ. 2008. Prevalence of Pathogens Associated with Bovine Mastitis in Bulk Tank Milk in Mexico. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 300–302.

- Momtaz H, Rahimi E, Tajbakhsh E. 2010. Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran. *Afr J Biotech* 9, 3753-3758.
- Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC. 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci* 90, 1176–1185.
- NMC, National Mastitis Council. 2008. Principle-Based Mastitis Prevention. Udder Topics 31, 2-5.
- Neave, FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J Dairy Sci* 52, 696–707.
- Núñez DC, Morales-Salinas E, Martínez-Maya J, Hernández AL. 2008. Detection of subclinical bovine mastitis caused by mycoplasmosis by indirect ELISA test and isolation. *Vet Méx* 39, 161-171.
- Pech-Martínez VC, Carvajal-Hernández M, Montes-Pérez R. 2007. Economical impact of subclinical mastitis in dual purpose cattle herds of the central zone of Yucatan, Mexico. *Trop Subtrop Agroecosyst* 7, 127-131.
- Persson Y, Nyman JAK, Gronlund-Andersson U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand* 53, 2-8.
- Pol M, Ruegg PL. 2007. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci* 90, 249–61.
- Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, 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.
- Rollin E, Dhuyetter KC, Overton MW. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev Vet Med* 122, 257-64.
- Ruegg PL. 2001. Mastitis Control. *Milking and milk Quality* 405, 1-10.
- Saini V, McClure JT, Leger D, Dufour S, Sheldon AG, Scholl DT, Barkema HW. 2012. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci* 95, 1209–1221.

- Steeneveld W, van Werven T, Barkema HW, Hogeveen H. 2011. Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach. *J Dairy Sci* 94, 174-188.
- USDA-APHIS. 2007. Prevalence of contagious mastitis pathogens in US dairy operations. APHIS Veterinary Services Info Sheet. Washington, DC: APHIS, USDA; 2007. Report No. N533.1008.
- Wellenberg GJ, Van der Poel WHM, Van Oirschot JT. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet Microbiol* 88, 27-45.
- Wilson JD, Gonzales NR, Das HH. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J Dairy Sci* 80, 2592–2598.
- Wolter W, Castañeda VH, Kloppert B, Zschock M. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Mastitis Bovina. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16, 62-72.
- Zecconi A, Piccinini R, Fox LK. 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during the program control in nine commercial dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 223, 684-688.

Table 1. Prevalence and causes of mastitis in dairy farms studied

Dairy farm	Productive animals	Mastitis n (%)	<i>S. aureus</i> n (%)	Other microorganism n (%)	Unknown causes n (%)
Mexicali 1	46	14 (30.43)	2 (4.34)	2 (4.34)	10 (21.73)
Tecate	218	25 (11.46)	21 (9.63)	1 (0.45)	3 (1.37)
Ensenada	371	60 (16.17)	6 (1.61)	15 (4.04)	39 (10.51)
La Paz	33	15 (45.45)	5 (15.15)	8 (24.24)	2 (6.06)
Constitución 1	24	5 (20.83)	1 (4.1)	1 (4.1)	3 (12.5)
Constitución 2	10	6 (60)	2 (20)	4 (40)	0
Total	702	125 (17.80)	37 (5.27)	31 (4.41)	57 (8.11)

Table 2. Frequency of MDR isolates in dairy farms studied

Geographic zone	# Isolates	# MDR Isolates n (%)	Antibiotic group					
			A n (%)	B n (%)	C n (%)	D n (%)	E n (%)	F n (%)
Mexicali 1	11	11 (100)	11 (100)	10 (90.90)	9 (81.81)	10 (90.90)	1 (9.09)	1 (9.09)
Mexicali 2	14	9 (64.28)	9 (64.28)	6 (42.85)	8 (57.14)	7 (50)	1 (7.14)	3 (21.42)
Tecate	65	45 (69.23)	45 (69.23)	42 (64.61)	15 (23.07)	45 (69.23)	2 (3.07)	0
Ensenada	6	4 (66.66)	4 (66.66)	4 (66.66)	2 (33.33)	4 (66.66)	0	0
La Paz	6	6 (100)	6 (100)	5 (83.83)	4 (66.66)	6 (100)	1 (16.66)	4 (66.66)
Constitución 1	4	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	1 (25)	2 (50)
Constitución 2	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	0	0
Total	107	80 (74.76)	80 (74.76)	72 (67.28)	43 (40.18)	77 (71.96)	6 (5.60)	10 (9.34)

A, Beta-lactams/Cephalosporins; B, Quinolones; C, Aminoglycosides; D, Macrolides; E, Sulfonamide/Trimethoprim; F, Tetracyclines.

3.2 Identificación Molecular de Patógenos que Provocan Mastitis Bovina en Establos de la Península de Baja California, México.

Enviado a la revista: Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.

Autores:

Jennifer Brisuela, Javier Palacios, Gilberto López, Sawako Hori-Oshima, José C. Herrera, Lourdes C. Pujol, Carlos Angulo (Pendiente), Tomas Benjamin Rentería Evangelista, Gerardo E. Medina.

Resumen

La mastitis bovina es una enfermedad de alto impacto económico para la industria lechera y algunos de los agentes etiológicos que la provocan también son de interés en el ámbito de salud pública. El objetivo de este estudio fue identificar las especies bacterianas aisladas de casos de mastitis bovina, provenientes de siete establos lecheros ubicados en la Península de Baja California. Se tomaron 316 muestras de leche de igual número de cuartos, pertenecientes a 186 vacas en producción que a la prueba de California tuvieron reacción positiva. Se obtuvieron 182 aislados bacterianos de 163 cuartos pertenecientes a 106 vacas y se identificaron por PCR y secuenciación, dando un total de 20 especies diferentes. Además, se obtuvieron las frecuencias relativas. Siendo los agentes causales más frecuentes: *Staphylococcus aureus* (58.8%), *Streptococcus agalactiae* (13.2%), *Staphylococcus chromogenes* (8.8%), *Escherichia coli* (2.2%) y *Streptococcus uberis* (2.2%). El 6.13% (10/163) de los cuartos con aislamiento presentaron infección mixta, siendo la combinación más frecuente *S. aureus* con *S. agalactiae* 30% (3/10). Estos resultados indican una alta frecuencia y diversidad de patógenos de carácter contagioso y ambiental que provocan mastitis en ganado lechero en la región de estudio, siendo algunos de importancia para la salud pública. Los resultados observados, muestran que las causas de la mastitis son diversas, por lo que es indispensable mejorar las medidas de control y prevención, pero también establecer el diagnóstico de rutina para lograr controlar la mastitis.

Palabras clave: Mastitis bovina, Identificación molecular, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

Molecular Identification of Bovine Mastitis Pathogens in Dairy Herds of the Baja California Peninsula, Mexico.

Abstract

Bovine mastitis is a disease of high economic impact for the dairy industry and some of the etiological agents that cause it are also of interest in the field of public health. The purpose of study was to identifying the bacterial causes of bovine mastitis from seven dairy farms located in the Baja California Peninsula. A total of 316 milk samples were collected from the same number of quarters belonging to 186 cows in production that tested positive for California Mastitis test. We obtained 182 bacterial isolates from 163 quarters belonging to 106 cows and were identified by PCR, giving a total of 20 different species. Isolates were identified using specific oligonucleotides for the major mastitis pathogens and with universal oligonucleotides for the 16S ribosomal DNA gene with subsequent sequencing for those that did not amplify with the specific oligonucleotides and relative frequencies were obtained. The most frequent causal agents were: *Staphylococcus aureus* (58.8%), *Streptococcus agalactiae* (13.2%), *Staphylococcus chromogenes* (8.8%), *Escherichia coli* (2.2%) and *Streptococcus uberis* (2.2%). A mixed infection was found in 6.13% (10/163) of the quarters, being the most frequent combination *S. aureus* plus *S. agalactiae* 30% (3/10). These results indicate a high frequency and diversity of contagious and environmental pathogens causing mastitis in dairy cattle in the region of study, being some of importance for public health. The results show that the causes of mastitis are diverse, so it is essential to improve control and prevention measures, but also to establish a routine diagnosis to control mastitis.

Key words: Bovine mastitis, molecular identification, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

Introducción

La mastitis bovina es una inflamación de uno o varios cuartos mamarios que se debe con mayor frecuencia a una infección intramamaria (IIM) (1). La severidad de la inflamación se puede clasificar como subclínica o clínica. La mastitis subclínica es difícil de detectar debido a la ausencia de cualquier signo visible, pero tiene un alto impacto económico (2). El costo de esta enfermedad se ha estimado hasta en 320 dólares por vaca por lactación, siendo aproximadamente el 70% de estas pérdidas por la reducción en la producción de leche (3). Un método eficaz en campo para detectar mastitis subclínica en un establo es la prueba de California (CMT, abreviado en inglés). La prueba de California se basa en la cantidad de células somáticas presentes en la leche, ya que estas se elevan al haber inflamación en la ubre y se forma un gel por la mezcla del reactivo y el ADN que se expone al lisarse las células (4).

Se han identificado más de 135 especies de bacterias causantes de mastitis, las cuales se clasifican como microorganismos contagiosos y ambientales (5). Los patógenos contagiosos incluyen *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis* y *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) (6). Interesantemente los patógenos contagiosos sobreviven en la ubre de la vaca, donde la leche es la principal fuente de infección primaria para las vacas sanas y ocurre durante la ordeña (7). Los patógenos ambientales se encuentran comúnmente en el ambiente donde habitan los animales, e incluyen especies como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Streptococcus* spp. entre otras. La combinación de alta humedad y materia fecal incrementa el riesgo de exposición de la ubre a patógenos ambientales (1). Al identificar la especie que está provocando esta condición, se puede deducir y reducir la fuente de infección, diseñar programas de prevención y control, y orientar una estrategia terapéutica. Por otra parte, la leche y los productos lácteos elaborados con leche proveniente de vacas con mastitis, pueden provocar enfermedades en los seres humanos que los consumen (8), de hecho, algunas especies bacterianas aisladas de vacas con mastitis se consideran zoonóticas, tales como *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Leptospira* spp., *Mycobacterium bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis* (9) y *Pasteurella multocida* (10).

En los estados mexicanos de Baja California (BC) y Baja California Sur (BCS), no se han realizado investigaciones documentadas sobre los agentes que provocan mastitis bovina, a pesar de su importancia nacional en la producción de leche de vaca, y el hecho de que la prevalencia de mastitis es relativamente alta (11). Por ejemplo en BC existe una población de 43,300 bovinos de leche con una producción de 158 millones de L de leche anual, en tanto en BCS existen 14,200 bovinos de leche con una producción de 42 millones de L de leche anual, respectivamente (12). Considerando todo lo anterior, en el presente trabajo se identificaron las especies bacterianas aisladas de vacas en producción con mastitis con técnicas fenotípicas y moleculares, y se determinó su frecuencia relativa en establos lecheros ubicados en la Península de Baja California, México.

Materiales y Métodos

Ubicación del estudio

Se muestrearon siete establos lecheros tecnificados; cuatro del estado de Baja California y tres del estado de BCS.

Criterio de inclusión y recolección de muestras

Se tomaron muestras de leche siguiendo la metodología del Consejo Nacional de Mastitis de los Estados Unidos (13) de los cuartos afectados de todas las vacas en producción que tuvieron grado 2 o mayor a la prueba de California (CMT) utilizando el reactivo Mastitest® (México). La reacción de la CMT se registró en una escala de 0, 1, 2, o 3, con cero indicando que no hay reacción, 1 indicando trazas y una reacción ligeramente positiva, 2 una reacción positiva y 3 una reacción fuertemente positiva (14).

Cuestionario epidemiológico

Se recabó información relevante de cada establo mediante la aplicación de un cuestionario epidemiológico, con énfasis en el protocolo de ordeño que incluyó: uso de guantes, cambio de toallas de papel o tela por cuarto, pre-sello, post-sello y secuencia de ordeño.

Análisis bacteriológico

Se cultivó 0.1ml de cada muestra de leche en cajas de Petri agar Columbia con sangre de bovino al 5% y se incubó a 35°C por 24 a 48h (1). La muestra con al menos 10 UFC (unidades formadoras de colonia) con una misma morfología se consideró cultivo positivo a IIM (15), la muestra con distintas especies bacterianas con al menos 10 UFC cada una, se consideró IIM mixta y la muestra que tuviera menos de 10 UFC se consideró cultivo negativo (1). Para la identificación fenotípica de los aislados, se consideró la morfología colonial, tipo de hemólisis, tinción Gram y prueba de catalasa (16). Los aislados fueron cultivados en caldo Todd Hewitt e incubados a 35°C por 12 h a 200 rpm y se hicieron alícuotas con glicerol al 10% para su almacenamiento a -80 °C.

Análisis estadístico

De acuerdo a los datos obtenidos, se utilizó el software Statistix 9®, incluyendo la estimación de Chi cuadrada de Pearson para establecer la asociación entre las proporciones de muestras de leche que tuvieron cultivo positivo entre los dos estados y entre establos, además, se calculó la magnitud de asociación Odds ratio (OR) con un intervalo de confianza de 95% estableciendo un valor de $p < 0.05$ para indicar significancia estadística.

Extracción de ADN

Se extrajo ADN utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®, USA). Se realizó la extracción como recomienda el proveedor, adicionando 5µl de lisostafina de *S. staphylolyticus* 1mg/ml para lisar bacterias del género *Staphylococcus* y 10µl de mutanolisina de *Streptomyces globisporus* ATCC 21553 a 1000U/ml para lisar bacterias del género *Streptococcus*. Una vez obtenido el ADN se almacenó a -20°C.

Identificación molecular

Se realizó PCR a los aislados obtenidos siguiendo dos metodologías; en la primera se identificaron *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis* (17) y en la segunda se identificaron *E. coli*, y cinco SCN: *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. sciuri* y *S. simulans* (18).

A los aislados que no pudieron identificarse, se les realizó PCR del gen ribosomal 16S (19), y se mandaron a secuenciar utilizando los mismos oligonucleótidos (Quimera, Biolabs, México). Las secuencias obtenidas se introdujeron en la base de datos online GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en el programa BLAST[®] para compararlas con las secuencias depositadas y determinar la especie, el criterio fue que la secuencia tuviera un mínimo de 98.5% de identidad en comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia (20).

Resultados

Se colectaron 316 muestras de leche de 186 vacas con mastitis subclínica. Se aislaron bacterias en el 51.5% (163/316) de las muestras, correspondientes a 106 animales (Cuadro 2).

Se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de las muestras de leche que tuvieron cultivo positivo en Baja California (130/270) y B. C. S. (33/46), presentándose 2.7 veces más probabilidad de que una muestra tomada en B. C. S. tenga cultivo positivo, que una muestra tomada de establos en Baja California ($P=0.003$, IC 95%, 1.3-5.4). A nivel establo, el establo G, tiene 20 veces más probabilidad de que una muestra de leche tenga cultivo positivo con respecto al tomado como referencia (Cuadro 2).

Durante el proceso de ordeña, ninguno de los establos cumplía completamente con buenas prácticas de ordeño para evitar infecciones intramamarias, sin embargo, por lo menos cumplían con alguna de ellas. Así, se observó, que por ejemplo el establo D, cumplía con la mayoría de las buenas prácticas analizadas en el estudio, sin embargo la proporción de aislados por muestra positiva a mastitis fue alta. En el establo C, se observó una baja proporción de aislados, aún a pesar que no llevaban a cabo todas las buenas prácticas durante la ordeña. En este establo, sin embargo, se llevaba una secuencia al ordeñar dejando a las vacas enfermas a lo último, lo que sugiere que el ordeñar las vacas con mastitis al final, puede ser un factor importante para evitar la diseminación de la enfermedad. Los establos E, F y G, llevaban a cabo pocas

actividades para evitar la diseminación de la mastitis, observándose en los establos F y G una alta proporción de aislamientos (Cuadros 2 y 3).

Las especies aisladas más frecuentes fueron: *S. aureus* 59% (107/182), *S. agalactiae* 13% (24/182), *S. chromogenes* 9% (16/182), *E. coli* 2% y *S. uberis* 2% (4/182) (cuadro 4).

El 83% de los aislados (151/182) fueron clasificados como especies contagiosas en tanto el resto fueron especies ambientales (cuadro 5). De la misma manera, el 91.2% de los aislados fueron bacterias Gram positivas y el resto Gram negativas.

Del total de cuartos con cultivo positivo, el 6.1% (10/163) presentaron una infección mixta. Las combinaciones más frecuentes fueron *S. aureus* con *S. agalactiae* (30%) y *S. aureus* con *S. chromogenes* (20%). El 70% de las infecciones mixtas fueron provocadas por combinaciones entre agentes contagiosos.

Discusión

En el presente trabajo se obtuvo cultivo positivo en el 51.5% de las muestras, en tanto, en un estudio realizado en Egipto (5), se obtuvieron aislados en el 96% de sus muestras. La discrepancia en estos datos, además de las condiciones medioambientales, se puede deber a que en el trabajo mencionado se pre-incubó la muestra hasta por 24 hrs a 37°C y no se utilizó un criterio para considerar un cultivo positivo, lo que pudo predisponer el elevado porcentaje de aislamiento que tuvieron por muestra. En un estudio realizado en Uganda en 18 establos familiares, de los cuales el 84% de los establos tenían un sistema de pastoreo y realizaban ordeña manual, el 75.1% de las muestras tuvieron cultivo positivo (13). En estas condiciones puede ser que haya menos daño en la glándula mamaria y la inflamación se relacionaría más a una infección y no a causas no infecciosas. En nuestro estudio no se obtuvo aislamiento bacteriológico en el 48.5% de las muestras, lo que probablemente se debió a factores químicos, físicos o nutricionales, aunque también cabe la posibilidad de mastitis infecciosa por microorganismos no cultivables mediante los métodos de rutina aquí utilizados (p. ej. *Mycoplasma* spp, *M. bovis*, *Leptospira* spp. y *Brucella* spp.) En Baja California Sur hay más riesgo de que una muestra positiva a CMT tenga

crecimiento bacteriano que en Baja California (principalmente en el establo G), lo cual se puede deber a las medidas deficientes en el protocolo de ordeño que se observaron durante el estudio o a una menor frecuencia de bacterias no cultivables en los medios utilizados.

Todas las especies identificadas en el presente estudio, se han aislado de casos de mastitis en investigaciones realizadas en otras partes del mundo. En un estudio realizado en Suecia (21), del 31% de los cuartos se le aisló *S. aureus*, siendo este el agente más común, seguido por SCN con 27%, *S. dysgalactiae* 15%, *S. uberis* 14% y *E. coli* 4.8%. Los resultados anteriores son muy similares a los del presente trabajo, en ambos estudios se muestrearon establos pequeños y tecnificados, aunque en Suecia, el 17% de los establos eran sistemas robotizados. En otro estudio realizado en Egipto (5), los cuatro agentes principales fueron los mismos que los de nuestro estudio, solo que *E. coli* fue el agente más frecuente con 25.5%, seguido de *S. aureus* con 14.8% y SCN y *S. agalactiae* ambos con 12.7%. En ese estudio el 15% de las muestras provenían de vacas con mastitis clínica donde generalmente las bacterias coliformes son las principales causantes. En un estudio realizado en Guerrero, México (22) el 97.5% de los aislados fueron Enterobacterias, los establos presentaban malas condiciones de higiene tanto en los corrales como en el protocolo de ordeño ya que no pre-sellaban, post-sellaban, ni secaban pezones. Estas condiciones pudieron haber favorecido estos resultados, en cambio en la mayoría de los establos que analizamos post-sellaban cuartos, disminuyendo la infección por agentes ambientales post-ordeño.

En el establo D, fue muy alta la proporción de *S. aureus*, aun llevando buenas prácticas de ordeña, sin embargo, no contaban con un protocolo de ordeña en el que se contemplara primero ordeñar a las vacas sanas y después a las enfermas, lo que pudo provocar la diseminación de la enfermedad por el equipo o material utilizados. El establo A, donde se aisló *S. suis* de dos animales, se encuentra ubicado aproximadamente a 30 metros de un área de producción porcina, lo que sugiere que probablemente algún trabajador o material pudo haber actuado como diseminador. *S. suis* ha cobrado importancia debido a que puede causar infecciones graves en seres humanos (6). Otros microorganismos que pueden provocar enfermedades en humanos

transmitidas por ingestión de leche y que se aislaron en este estudio fueron: *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp y *P. mirabilis* (23, 24). Otro agente de carácter zoonótico y que fue el más comúnmente aislado después de *S. aureus* fue *S. agalactiae*. Al respecto, existen estudios donde demuestran que *S. agalactiae* de origen humano y bovino expresan de manera similar factores de virulencia (25) y sugieren una posible pero limitada diseminación interespecies.

En otro estudio similar realizado en Egipto (5), se observaron infecciones mixtas en un 35.8% de los cuartos con aislamiento, donde la combinación más común fue *S. aureus* con *E. coli* (18%). En nuestro estudio se observó una frecuencia menor de infecciones mixtas (6.1%), siendo *S. aureus* con *S. agalactiae* los más comunes (30%). Precisamente en ambos estudios las dos especies aisladas más frecuentes, presentaron la mayoría de las combinaciones implicadas en las infecciones mixtas.

Conclusiones e implicaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos, son muchos los agentes que provocan mastitis bovina en la región de estudio, siendo los más frecuentes considerados zoonóticos, lo que representa un alto riesgo, principalmente por la leche destinada como materia prima para la elaboración de quesos o subproductos no pasteurizados, los cuales pueden provocar enfermedades. En la actualidad existen medidas de prevención primaria que han demostrado efectividad en la prevención y control de la mastitis, sin embargo un denominador común en los establos analizados fue que estos no cuentan con protocolos adecuados ante, durante y post-ordena. Por lo anterior, es imperativo que se establezca un programa de capacitación que permita reducir sustancialmente este problema en la región de estudio.

Agradecimientos

Los autores queremos agradecer a los productores de los establos muestreados por su participación y accesibilidad, A CONACyT por el apoyo a becarios de posgrado, a las Convocatorias internas de investigación de la UABC y al apoyo técnico de parte de Gerardo Felipe, Fernanda Bermúdez, Elizama Ponce, Tomás Cárdenas y José Luis Rodríguez.

Literatura citada

1. Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J Dairy Sci* 2007;90(12):5798-5813.
2. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol* 2009;27(8):486-493.
3. Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J Anim Sci* 2008;86(1):57-65.
4. Lam TJ, Olde R, Sampimon OC, Smith H. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Irish Vet J* 2009;62(Suppl 1):34-39.
5. Sayed HR, Salama SS, Soliman TR. Bacteriological Evaluation of present situation of mastitis in dairy cows. *Global Veterinaria* 2014;13(5):690-695.
6. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. 1era ed. Zaragoza, España: Acribia; 2002.
7. Valero-Leal K, Valbuena E, Chacón F, Olivares Y, Castro G, Briñez W. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. *Rev. Cientif. FCV-LUZ* 2010;20(5):498-505.
8. Sztachańska M, Barański W, Janowski T, Pogorzelska J, Zduńczyk S. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairyherds in North-East Poland. *Pol J Vet Sci* 2016;19(1):119-124.
9. McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller RB, Gray GC. Humans and Cattle: A review of bovine zoonoses. *Vector-Borne Zoonot* 2014;14(1):1-19.
10. Kotton CN, Weinberg AN. Zoonoses. In: Mandell, Douglas, and Bennetts *Principles and Practice of infectious diseases*. 7th ed. London, England: *Churchill Livingstone*; 2010:4001.
11. Palacios TJ, Brisuela RJ, López VG, Hori-Oshima S, Pujol MLC, Herrera RJC, *et al*. Prevalencia y perfiles de resistencia de *Staphylococcus aureus* en casos de mastitis bovina en establos lecheros de la Península de Baja California. No publicado.

12. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Población ganadera bovino leche 2013. México. 2016.
13. Oliver SP, Gonzalez RN, Hogan JS, Jayarao BM, Owens WE. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4th ed. Wisconsin, USA: National Mastitis Council Inc.; 2004.
14. Dingwell TR, Leslie EK, Schukken HY, Sargeant MJ, Timms LL. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can Vet J* 2003;(44):413-416
15. Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima BM, Båge R. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod* 2014;(46):99-105.
16. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3era. ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana; 2003.
17. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39(7):2584-2589.
18. Shome BR, Das-Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R, *et al.* Multiplex pcr assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *J Appl Microbiol* 2011;(111):1349-1356.
19. Negoro E, Iwasaki H, Tai K, Ikegaya S, Takagi K, Kishi S, *et al.* Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. *Int J of Infect Dis* 2012;(17):e271-e276.
20. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infec Micr Cl* 2011;29(8):601-608.
21. Persson Y, Nyman AJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scan* 2011;(53):36.

22. Olivares-Pérez J, Kholif AE, Rojas-Hernández S, Elghandour YMMM, Salem MAZ, Zaragoza BA. Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. *Trop Anim Health Pro* 2015;(47):1497-1504.
23. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Estimates of Foodborne Illness in the United States. USA. 2011.
24. Dhanashekar R, Akkinapalli S, Nellutla A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *GERMS* 2012;2(3):101-9.
25. Corrêa ABA, Américo MA, Oliveira ICM, Silva LG, De Mattos MC, Ferreira AMM, *et al.* Virulence characteristics of genetically related isolates of group B streptococci from bovines and humans. *Vet Microbiol* 2010;(143):429-433.

Cuadros

Cuadro 1. Identificación de establos y su procedencia

Establo	Municipio	Estado
A	Mexicali	Baja California
B	Mexicali	
C	Ensenada	
D	Tecate	
E	Cd. Constitución	Baja California Sur
F	Cd. Constitución	
G	La Paz	

Cuadro 2. Frecuencia y Magnitud de asociación entre las muestras que presentaron aislamiento, tomando como referencia el establo con menor proporción de aislamientos.

Establo	Muestras CMT+ (n)	Muestras con aislamiento	Muestras sin aislamiento	OR	95% IC	P
A	27	13	14	2.8	1.1-6.7	0.02
B	46	23	23	3	1.4-6.2	0.002
C	104	26	78	Referencia		
D	93	68	25	8.2	4.3-15.4	0
E	6	2	4	1.5	0.2-8.67	1
F	17	11	6	5.5	1.8-16.3	0.001
G	23	20	3	20	5.5-72.8	0
Total	316	163 (51.5%)	153 (48.5%)			

Cuadro 3. Protocolo de ordeño por establo

Actividad	A	B	C	D	E	F	G
Uso de guantes	+	-	+	+	-	-	-
Cambio de toallas de papel o tela	-	+	-	+	-	-	-
Pre-sello	+	-	-	+	+	+	-
Post-sello	+	+	+	+	-	-	-
Secuencia de ordeño	-	-	+	-	-	-	+

Cuadro 4. Especies identificadas y su frecuencia relativa.

Especies	Numero de aislados (%)
<i>S. aureus</i> *	107 (58.8)
<i>S. agalactiae</i> *	24 (13.2)
<i>S. chromogenes</i> *	16 (8.8)
<i>E. coli</i>	4 (2.2)
<i>S. uberis</i>	4 (2.2)
<i>S. saprophyticus</i> *	3 (1.6)
<i>S. dysgalactiae</i>	3 (1.6)
<i>Streptococcus suis</i>	3 (1.6)
<i>P. multocida</i>	3 (1.6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (1.6)
<i>Proteus vulgaris</i>	2 (1.1)
<i>Bacillus cereus</i>	2 (1.1)
<i>S. agnetis</i> *	1 (0.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (0.5)
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1 (0.5)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (0.5)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (0.5)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (0.5)
<i>Bacillus licheniformis</i>	1 (0.5)
<i>Bacillus altitudinis</i>	1 (0.5)
Total de aislados	182 (100)

*Especies contagiosas

Cuadro 5. Frecuencia relativa de las especies contagiosas y ambientales aisladas por establo (%)

Establo Especies	A	B	C	D	E	F	G	Total
Contagiosas	11 (68.75)	17 (74)	24 (85.7)	68 (90.65)	1 (50)	9 (64.3)	21 (87.5)	150 (83)
Ambientales	5 (31.25)	6 (26)	4 (14.3)	7 (9.35)	1 (50)	5 (35.7)	3 (12.5)	30 (17)

CAPÍTULO 4

IV. CONCLUSIONES GENERALES

- *Staphylococcus aureus* es el principal microorganismo causante de mastitis bovina en la región de estudio, por lo que los esfuerzos para controlar esta enfermedad deben ser dirigidos principalmente contra este patógeno.
- Es de suma importancia implementar protocolos de buenas prácticas de ordeña, para disminuir la presencia de la enfermedad y así mismo evitar la propagación de *S. aureus* dentro de los establos.
- Se encontró un gran número de aislados de *S. aureus* multidroga resistentes (MDR), lo cual puede estar relacionado con el uso inapropiado de los antimicrobianos utilizados dentro de los hatos participantes en el estudio, por lo que es importante implementar protocolos de rotación de los antibióticos, así mismo es indispensable realizar antibiogramas antes de empezar un tratamiento, con el fin de utilizar el antibiótico adecuado para cada caso de mastitis.
- Utilizando un esquema MLVA con un panel de 10 loci se pudo observar que los aislados de diferentes establos son genótipicamente diferentes y se logra apreciar que la diversidad genética es baja dentro de un establo pero alta al comparar diferentes establos, lo que puede ayudar a inferir el origen de nuevos brotes o introducción de nuevas cepas de *S. aureus*.
- Existen perfiles dominantes en cada establo, lo que podría indicar que una vez presente en un establo, una cepa permanece largo tiempo pasándose de animal a animal dentro del mismo establo y divergiendo genéticamente.
- Se encontraron 6 grupos genéticos mediante el análisis MLVA, los cuales corresponden a los establos muestreados, sin embargo, se encontraron perfiles que se distribuyen fuera de su grupo genético lo cual coincide en que están poco

representados en los establos y sugiere que estos perfiles son de reciente ingreso en los establos, ya sea por medio de un trabajador, ganado recién ingresado al hato, algún alimento contaminado, animales de compañía o fauna silvestre.