

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas
Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PATÓGENOS AISLADOS
DE CASOS DE MASTITIS BOVINA**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

JENNIFER BRISUELA RAYGOSA

DIRECTOR

GERARDO E. MEDINA BASULTO

CO-DIRECTOR

JOSÉ LUIS STEPHANO HORNEDO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

ABRIL DE 2019

La presente tesis "Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata en patógenos aislados de casos de mastitis bovina" realizada por la C. Jennifer Brisuela Raygosa, dirigida por el Dr. Gerardo E. Medina Basulto, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias Agropecuarias

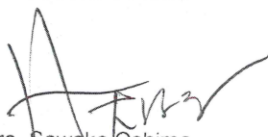
Comité Particular



Dr. Gerardo E. Medina Basulto
Director de tesis



Dr. José Luis Stephano Hornedo
Co-Director de tesis



Dra. Sawako Oshima
Sinodal



Dr. Gilberto López Valencia
Sinodal



Dr. José Carlomán Herrera Ramírez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Gerardo Medina por aceptarme como su tutorada, por todo el tiempo, disponibilidad y apoyo brindado durante la realización de este estudio y de los artículos generados. Por incitarme a participar en Congresos y Reuniones afines al tema de investigación. Por compartir un poco de su sabiduría. Por la confianza y el apoyo dedicado en situaciones personales que fueron muy importantes para mi durante la estancia doctoral.

Gracias a mis compañeras de posgrado Elsa Hernández y Joelly Espinoza por su participación y apoyo desinteresado durante la realización del experimento. Gracias por su amistad que se desarrolló en el laboratorio entre bacterias y nanoplasta.

A mi Co-Director de tesis, José Luis Stephano, gracias por el apoyo y disponibilidad brindada para la realización del proyecto, por permitir realizar una estancia en su laboratorio.

A mis asesores Sawako Oshima, Gilberto López y José Carlomán Herrera por todo el tiempo, disponibilidad y dedicación en las clases impartidas y en general durante toda mi estancia doctoral y por su aporte científico en los artículos generados.

También a Javier Palacios, Lourdes Carolina Pujol y Carlos Eliud Angulo por su participación en los experimentos y aporte científico en los artículos generados.

A CONACyT por la beca otorgada para mi formación.

ÍNDICE

INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Mastitis Bovina.....	3
Etiología.....	3
Prevalencia.....	4
Factores de riesgo.....	4
Implicaciones económicas.....	5
Prevención y control.....	5
Tratamiento.....	6
Zoonosis.....	6
Resistencia a los antimicrobianos.....	8
Uso de la plata como agente microbicida en la antigüedad.....	10
Uso de las AGNPs como agente microbicida en la actualidad.....	11
Características físico-químicas de las AGNPs como agente antibacteriano.....	12
Mecanismos antibacterianos de las AGNPs.....	13
Medición de actividad microbicida de las AGNPs, in vitro.....	14
BIBLIOGRAFIA CITADA.....	15
ARTÍCULOS GENERADOS.....	22
CONCLUSIONES.....	47

RESUMEN

La mastitis bovina es una de las principales enfermedades que afectan al ganado lechero. Al ser provocada principalmente por bacterias, el tratamiento más utilizado son los antimicrobianos, sin embargo se ha demostrado que bacterias aisladas de mastitis presentan resistencia a estos. En este trabajo se determinó el efecto microbicida de nanopartículas de plata (AgNPs) esféricas de 10 a 40 nm de diámetro contra 10 distintas especies bacterianas incluidas cepas multidrogarresistentes (MDR) aisladas de casos de mastitis bovina en diversos establos de la península de Baja California, México. Las AgNPs inhibieron al 100% y lisaron al 82% de los aislados a una concentración $\leq 12\mu\text{g/ml}$, siendo efectiva tanto en especies Gram positivas como Gram negativas. Los datos obtenidos en el presente trabajo, sugieren que el uso de nanopartículas de plata puede ser una buena alternativa para tratar infecciones provocadas por una gran diversidad de especies y géneros bacterianos, incluyendo cepas MDR.

Palabras clave: nanopartículas de plata, actividad antibacteriana, resistencia antimicrobiana, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the most common diseases that affect dairy cattle. Usually caused by a microbial infection, the most used treatment are the antimicrobials, however it has been shown that many bacteria isolated from mastitis have resistance to them. In this work, the antibacterial effect of spherical silver nanoparticles (AgNPs) of 10 to 40 nm in diameter was determined against 10 different species of bacteria including multidrug-resistant strains (MDR), isolated from cases of bovine mastitis in several herds from Baja California peninsula in Mexico. The AgNPs inhibited 100% and lysed 82% of the samples at a concentration $\leq 12\mu\text{g/ml}$, being effective in both Gram positive and Gram negative species, suggesting that the use of these AgNPs can be a good alternative to treat infections caused by a diversity of species and bacterial genera, including MDR strains.

Key words: silver nanoparticles, antibacterial activity, antimicrobial resistance, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una inflamación de uno o varios cuartos mamarios, principalmente debido a una infección bacteriana. En algunos casos, esta inflamación se acompaña de signos clínicos (rubor, hinchazón, dolor, calor en la ubre y enfermedad sistémica), diagnosticándose como mastitis clínica. En otros casos, los signos de mastitis son imperceptibles por observación directa, siendo entonces diagnosticada como mastitis subclínica, basando el diagnóstico en la presencia de bacterias y cambios en la citología de la leche (Djabri et al., 2002).

Existen más de 135 especies bacterianas causantes de mastitis bovina, pero la mayoría de las infecciones son provocadas por especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* y bacilos Gram negativos (Sayed et al., 2014). Los agentes etiológicos se clasifican como contagiosos o ambientales, siendo los primeros principalmente *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) y *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) en tanto los segundos son *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) (Zhao y Lacasse, 2008).

La mastitis es una de las enfermedades más prevalentes y costosas en la industria láctea con pérdidas atribuibles a la reducción en la producción de leche, leche descartada, sacrificio temprano, servicios veterinarios y costos laborales (Thompson-Crispi et al., 2014).

En la industria láctea, más allá de los costos del uso de antimicrobianos, la aparición de resistencia y la falta de respuesta del ganado a estos, se han convertido en un tema muy delicado. El uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos en mastitis bovina puede representar un problema grave relacionado con la aparición de resistencia y la entrada de bacterias resistentes en la cadena alimentaria (Gomes y Henriques, 2016). Además existen una gran cantidad de reportes donde identifican especies multidroga-resistentes (MDR) aisladas de mastitis bovina (May et al., 2013; León et al., 2015) que son en su mayoría zoonóticas.

Debido a lo anterior, hay un elevado interés en utilizar otras alternativas contra infecciones bacterianas, como el uso desde tiempos remotos de sales de plata, las cuales

son efectivas contra agentes bacterianos. En particular, debido a las investigaciones recientes en nanopartículas de metal, las nanopartículas de plata (AgNPs) con diámetro de 100 nm o menos han recibido especial atención debido a su actividad antibacteriana (Habibian et al., 2011).

El método de dilución en agar o en caldo como prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Stela y Marin, 2009). La CMI se ha establecido como la prueba de oro frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Andrews, 2001).

Debido a lo anterior el objetivo de esta investigación es determinar la CMI y CMB de AgNPs de 10 a 40 nm de diámetro, en 10 especies bacterianas, incluidas MDR, tanto ambientales como contagiosas aisladas de mastitis bovina.

REVISIÓN DE LITERATURA

Mastitis Bovina

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria y se caracteriza por cambios físicos, químicos, microbiológicos y celulares en la leche así como cambios patológicos en la ubre (Sayed et al., 2014), y es provocada principalmente por infección intramamaria (IIM) bacteriana ya sea en uno o varios cuartos mamarios (Djabri et al., 2002). La severidad de la inflamación se puede clasificar como subclínica y clínica, dependiendo de la naturaleza del agente causal y de la edad, raza, salud inmunológica y etapa de lactación del animal. La mastitis subclínica es difícil de detectar debido a la ausencia de cualquier signo visible y es la que tiene mayores costos (Viguiet et al., 2009). Los signos de la mastitis clínica son muy variados, desde presencia de coágulos al principio de la ordeña hasta inflamación y enrojecimiento de los cuartos, además del aumento en la mortalidad de las vacas enfermas (Ruegg, 2011).

Etiología

Más de 135 microorganismos diferentes (bacterias, algas y hongos) se han aislado de IIM bovina, pero la mayoría de las infecciones son provocadas por *Staphylococci*, *Streptococci* y Enterobacterias y se clasifican como microorganismos contagiosos y ambientales basado en el reservorio primario y en el modo de transmisión (Bogni et al., 2011). La glándula mamaria de vacas con mastitis subclínica sirve como reservorio principal para los patógenos contagiosos y la transmisión ocurre cuando los pezones de vacas sanas se exponen a microorganismos presentes en la leche de cuartos infectados. Las gotas de leche infectada en fómites como equipo de ordeño, toallas utilizadas para secar los pezones de vacas infectadas y las manos de los ordeñadores, son mecanismos comunes para la propagación de mastitis contagiosa (Ruegg, 2011). Los patógenos ambientales se encuentran comúnmente en las áreas donde habitan los animales, la combinación de alta humedad y materia fecal incrementa el riesgo de exposición de la ubre a estos (Ferguson, et al. 2007). *S. aureus* y *S. agalactiae* son los patógenos contagiosos más comunes y tienen importancia particular porque causan la mayoría de

las IIM subclínicas, en cambio, los principales patógenos ambientales incluyen diferentes tipos de bacterias, como especies de *Streptococci*, coliformes (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) y *Pseudomonas* spp. principalmente (Bogni et al., 2011).

Prevalencia

La prevalencia de la mastitis bovina es relativamente alta. La mastitis subclínica es la forma más común de mastitis en los establos y su prevalencia oscila generalmente entre el 20 y el 50% (Pitkala et al., 2004), en tanto la mastitis clínica es menos frecuente, según encuestas nacionales de EUA (USDA, 2008) y Canadá (Olde et al., 2008), donde se ha reportado que aproximadamente el 16% de las vacas experimentan mastitis clínica cada año.

Factores de riesgo

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

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

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

Implicaciones económicas

La mastitis es considerada la enfermedad más frecuente y costosa en los establos lecheros en los países desarrollados (Seegers et al., 2003). Existen dos tipos de pérdidas económicas provocadas por la mastitis; las pérdidas directas e indirectas. Las primeras incluyen los costos de tratamiento (consulta del veterinario y costo de los fármacos empleados), leche descartada (durante el curso del tratamiento y tiempo de retiro), tiempo del ordeñador, mortalidad y costos asociados a mastitis recidivantes. Las pérdidas indirectas incluyen la disminución en la producción y en la calidad de la leche, principalmente en el caso de mastitis subclínica por la disminución de producción láctea a largo plazo; además incremento de sacrificios, secado temprano y otros problemas de salud asociados, principalmente falla reproductiva y pérdida de apetito (Petrovski et al., 2006). Existe una gran oportunidad para mitigar los costos cuidando la salud de la ubre durante el período de transición de la vaca para prevenir mastitis clínica ya que el costo de cada caso durante los primeros 30 días de lactancia es en promedio de 444 dólares. La mayoría de este costo (71%) se compone de costos indirectos que son más difíciles de ver porque no requieren desembolsos directos, sin embargo reflejan la pérdida de oportunidades e impactan la viabilidad económica del establo y por lo tanto es importante para los productores reconocer los mismos (Rollin et al., 2015).

Prevención y control

El control de la mastitis bovina debe formar parte del programa de salud del hato en los establos lecheros (Pyörälä, 2002).

Existe un plan de 10 puntos recomendado por el Consejo Nacional de Mastitis de E.U.A. (por sus siglas en inglés, NMC) para controlar tanto patógenos contagiosos como ambientales y son los siguientes: Establecer metas para la salud de la ubre, mantener un ambiente limpio, seco y confortable, seguir los procedimientos adecuados de ordeño, mantener y utilizar equipos de ordeño correctamente, mantener buenos registros, manejar la mastitis clínica durante la lactancia de manera adecuada, establecer un programa eficaz en el manejo de la vaca seca, seguir un programa de bioseguridad contra

patógenos contagiosos, monitorear con frecuencia el estado de salud de la ubre y revisar periódicamente cada programa de control de mastitis.

Tratamiento

Si bien existe una gran variedad de medidas de control de la enfermedad, la terapia con antimicrobianos desempeña un papel determinante en la eliminación de la mastitis bovina (Zecconi et al., 2003). Se puede aplicar tratamiento durante la lactancia para casos de mastitis clínica y en algunos casos específicos de mastitis subclínica. Una respuesta clínica debe ser perceptible dentro de 5-7 días, de otra manera el caso se considera falla terapéutica. Los tratamientos pueden administrarse vía intramaria y/o por ruta parenteral (Gruet et al., 2001). Las vacas en periodo seco son más susceptibles a adquirir nuevas IIM especialmente poco después de iniciar el periodo seco o cesar la lactancia, y cerca del parto (Hillerton, 2005), por lo que una opción es aplicar antimicrobiano de larga duración como profiláctico al comenzar el periodo seco. Las familias de antimicrobianos más utilizados contra mastitis bovina son los betalactámicos y los aminoglucósidos (Taponen et al., 2003).

El costo de los antimicrobianos y la emergencia de resistencia a ellos se ha convertido en un grave problema, además, el uso de estos tiene otras desventajas, como por ejemplo la presencia de sus residuos en la leche. Estas limitaciones aumentan la necesidad de buscar nuevos agentes antimicrobianos efectivos contra los patógenos de mastitis, como: el uso de bacteriófagos, vacunación, nanopartículas, citosinas, compuestos naturales, antimicrobianos derivados de los animales y antimicrobianos derivados de bacterias (Gomes y Henriques, 2016).

Zoonosis

La leche puede ser una fuente importante de patógenos transmitidos por los alimentos de importancia para la salud humana. La prevalencia de estos patógenos está influenciada por numerosos factores tales como tamaño del establo, cantidad de animales, higiene, prácticas de manejo, variación en el muestreo y tipos de muestras

evaluadas, diferencias en las metodologías de detección utilizadas, ubicación geográfica y estación. (Oliver, 2005).

Estudios epidemiológicos han demostrado que el ganado probablemente se infecta con el consumo de agua y forrajes contaminados con heces y otras secreciones / excreciones del ganado, sin embargo, algunos patógenos transmitidos por los alimentos pueden causar mastitis en la que el microorganismo se excreta directamente en la leche. La introducción de leche cruda contaminada con patógenos transmitidos por los alimentos en las plantas de procesamiento y la persistencia de estos en biofilms, representa un riesgo importante de contaminación posterior a la pasteurización que podría conducir a la exposición del consumidor a las bacterias patógenas. (Oliver et al 2005).

Existen 45 patógenos zoonóticos bovinos, conocidos por ser capaces de producir enfermedad en humanos y en ganado bovino, donde 19 son de origen bacteriano (McDaniel et al., 2014). De estos, los que se pueden aislar de leche de vaca con o sin mastitis son 17: *Actinobacillus lignieresii*, *Bacillus anthracis*, *Brucella abortus* y *mellitensis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetti*, *E. coli*, *Leptospira spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* y *bovis*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *enterocolítica*.

La glándula mamaria bovina puede ser un reservorio significativo de cepas de *S. aureus* que producen enterotoxinas, que se clasifican según los serotipos en A-H y toxina del síndrome de choque tóxico (TSST). La frecuencia de enterotoxigenicidad entre cepas estafilocócicas es muy variable. Estudios sobre aislados de *S. aureus* de vacas mostró una enterotoxigenicidad que varió de 0 a 56.5%. Los hallazgos de estos estudios concluyeron que la leche de tanque contiene conteos relativamente altos de *S. aureus* enterotoxigénico y puede constituir un peligro para la salud de los consumidores (Oliver et al., 2005).

Los estreptococos del grupo B representan otra causa conocida de mastitis bovina, un estudio reciente ha demostrado que tanto los de origen humano como los de origen

bovino parecen tener una virulencia similar, estando conectados con una posible pero limitada diseminación (Correa et al., 2010).

La contaminación por coliformes ocupa un lugar destacado entre los tipos de contaminación más comunes en la industria láctea. Microorganismos como *E coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *Proteus mirabilis* pueden multiplicarse en las temperaturas normales de verano y, por lo tanto, la leche no pasteurizada tiene altas probabilidades de contener estos patógenos (Dhanashekar et al., 2012).

Resistencia a los antimicrobianos

El uso excesivo e inadecuado de antimicrobianos puede representar un problema grave relacionado con la emergencia de resistencia y la entrada de bacterias resistentes en la cadena de alimentos (White, 2001).

Existe un gran número de estudios realizados en muchas partes del mundo donde han analizado la resistencia a los antimicrobianos en aislados de mastitis bovina con resultados muy variables, sin embargo casi ninguno ha tenido 100% de aislados sensibles a todos los antimicrobianos probados. En un estudio de casos en India (Bandyopadhyay et al., 2014), detectaron IIM en 3 vacas, en dos de ellas aislaron *Staphylococcus epidermidis* meticilina resistente (SEMR) y *E. coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), en tanto en uno de los animales, aislaron además de esos dos agentes, *S. aureus* meticilina resistente (SAMR). Los aislados meticilina resistentes contaban con el gen *mecA* (gen estructural que codifica para la PBP2a) y exhibían resistencia a varios antimicrobianos, tales como a amikacina, tetraciclina y glicopéptidos. Las *E. coli* productoras de BLEE fueron positivas a los genes *bla_{CTX-M}* y *bla_{TEM}*, y dos de ellas además a *bla_{SHV}* (genes que confieren resistencia a betalactámicos) y tenían genes para integron clase 1 (*int1*), de resistencia a sulfonamida (*su1*), resistencia a quinolona (*qnrS*) y otros factores de virulencia. Todas las *E. coli* productoras de BLEE exhibieron resistencia a diversos antimicrobianos incluyendo

cefalosporinas de tercera y cuarta generación y tuvieron resistencia intermedia a carbapenems.

Las barreras en la diseminación de bacterias MDR entre el humano y otros animales son cada vez más difusas, dos ejemplos representativos en los que esta transferencia se ha podido producir son: 1) SAMR de la línea genética ST398, y 2) *E. coli* productora de BLEE (Torres Carmen, 2012).

Una categoría de SAMR humano, SAMR asociado al ganado, está compuesta principalmente por cepas de SAMR complejo clonal 398 (CC398) donde predomina la secuencia tipo 398 (ST398) con cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec) tipos IV y V. Estas cepas se han establecido dentro de las poblaciones de animales de producción, principalmente cerdos, proporcionando un reservorio de infección zoonótica e infección de otras especies animales (Smith y Pearson, 2011). La epidemiología de SAMR encontrada en la leche bovina antes de la aparición de SAMR ST398 asociado a ganado parece ser el resultado del avance esporádico e infrecuente de cepas de SAMR adaptadas a humano que no parecen haberse establecido bien en la población de vacas lecheras. En 2010 hubo dos informes de que ST398 se estaba estableciendo en hatos lecheros (Holmes y Zadoks, 2011): 1), así, en un estudio en Bélgica (Vanderhaeghen et al., 2010), se encontraron 11 (9,3%) SAMR de 118 aislados de *S. aureus* de muestras de leche de vacas con mastitis de 118 establos. Las cepas fueron ST398, tipo spa t011 o t567 y tenían SCCmec tipo IVa o V, estableciendo que eran cepas SAMR asociadas a ganado de CC398 en un país donde esta cepa estaba presente en las poblaciones de cerdos, caballos y aves de corral. 2) En un estudio en Alemania (Fessler et al., 2010), analizaron la relación genética, resistencia antimicrobiana y genes de virulencia en 27 aislados SAMR, 25 de ellos aislados de leche bovina de casos clínicos de mastitis y el resto de SAMR aislados de personal de un establo. Las 27 muestras se seleccionaron de 17 establos, identificaron el tipo spa t011 con SCCmec tipo V en 23 aislados, coincidiendo con miembros del linaje clonal ST398. Los dos aislamientos humanos fueron indistinguibles en sus características genotípicas y fenotípicas de los aislamientos de mastitis del mismo establo.

En las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, la resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, las cuales son antimicrobianos clínicamente importantes, a menudo se asocia con la producción de BLEE. La bacteria *E. coli* productora de BLEE se está extendiendo en todo el mundo tanto en humanos como en animales de producción y su propagación está asociada con varios factores, incluyendo contenido de genes con alta virulencia, transferencia de plásmidos portadores de genes BLEE o intercambio de codificación de genes BLEE en elementos móviles (Valentín et al., 2014). En un estudio realizado en Alemania, de 490 aislados de *E. coli* de muestras de leche de vacas con mastitis detectaron 22 aislados productores de BLEE, de los cuales 15 (68.2%) también eran resistentes a fluoroquinolonas, enrofloxacin y marbofloxacin (Eisenberger, et al., 2017).

Uso de la plata como agente microbicida en la antigüedad

Cerca del año 1000 A. C. la plata fue utilizada para potabilizar el agua (Castellano et al., 2007). Por siglos la plata se ha utilizado como tratamiento para quemaduras y heridas crónicas. En 1700 por ejemplo, el nitrato de plata se utilizó como tratamiento de enfermedades venéreas, fistulas en glándulas salivales y abscesos perianales y óseos (Landsdown, 2002). En el siglo XIX tejidos de granulación se removían utilizando nitrato de plata para permitir la epitelización y promover la formación de costra en la superficie de las heridas (Castellano et al., 2007). En 1881, Carl S. F. Crede curó la oftalmia neonatorum utilizando gotas oftálmicas de nitrato de plata. En la década de 1940, después de que la penicilina fue introducida, el uso de plata como tratamiento microbicida disminuyó (Chopra, 2007).

En la década de 1960, Moyer utilizó una solución de nitrato de plata al 0.5% para eliminar bacterias patógenas en heridas por quemadura. El propuso que esa solución no interfería con la proliferación epidérmica y que eliminaba a *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* (Moyer et al., 1965). Ahora el ungüento de sulfadiazina de plata fue desarrollado para reemplazar soluciones salinas con plata y utilizada ampliamente en quemaduras en América (Atiyeh et al. 2007).

La plata en su estado metálico es inerte, pero esta reacciona con el agua provocando su ionización de manera inmediata. En este estado la plata es altamente reactiva y su efecto bactericida se debe principalmente a los cambios estructurales que provoca en la membrana bacteriana y a su interacción con los grupos fosforados y azufrados de varios compuestos (Rai et al., 2009).

Uso de las AGNPs como agente microbicida en la actualidad

Las AGNPs, son grupos de átomos de plata en un rango de tamaño de 1-100 nm. El uso de AGNPs ha ganado mucha atención en la actualidad, principalmente por sus propiedades antimicrobianas ya que pueden ser una alternativa al aumento del número de cepas resistentes a los antimicrobianos (Rai, 2009).

Existen muchos productos y aplicaciones utilizando AGNPs, estas aplicaciones actualmente tienen el grado más alto de comercialización, como aparatos médicos, accesorios para el hogar y tratamientos para el agua. De acuerdo al inventario de productos de consumo de nanotecnología (CPI, por sus siglas en inglés) del Project on Emerging Nanotechnologies (PEN, <http://www.nanotechproject.org>) hasta Octubre del 2013, enumera 1814 productos de consumo de 622 empresas en 32 países. La categoría salud y estado físico contiene la mayoría de los productos (762, o el 42% del total). La plata es el nanomaterial más utilizado (435 productos, o 24%); sin embargo, el 49% de los productos (889) incluidos en el CPI no proporcionan la composición del nanomaterial utilizado en ellos (Vance et al., 2015).

El potencial terapéutico de las AGNPs se ha analizado en modelos animales, por ejemplo en el estudio de Thota y colaboradores (2013), donde indujeron mastitis con *S. aureus* en ratones hembras y probaron dos tratamientos uno con AGNPs de 70nm de diámetro, de formas cúbicas, esféricas, rectangulares y triangulares y otro con cefepima; concluyeron que el efecto microbicida de las AGNPs fue superior al de la cefepima y que además exhibió un efecto antiinflamatorio.

Un estudio clínico piloto, realizado por Freire y colaboradores (2017) analizó las propiedades antimicrobianas de una nueva formulación que contiene AGNPs para inhibir

la formación de biofilm por *Streptococcus mutans* en el esmalte dental infantil. Utilizaron dos soluciones, una contenía AGNPs en forma esférica de 3 a 8 nm de diámetro (S1) y la otra fue una solución salina como control negativo (S2) en niños entre 7 y 8 años de edad. El biofilm dental adherido al esmalte tratado con S1 tuvo valores más bajos de viabilidad (absorbancia) de *S. mutans* y de unidades formadoras de colonias (CFU) que la muestra al comienzo del estudio y la muestra S2.

Características físico-químicas de las AGNPs como agente antibacteriano

Es evidente que las características fisicoquímicas de los nanomateriales juegan un rol fundamental en la interacción con bacterias, en general se sugiere que las partículas más pequeñas con mayor área superficial específica (radio superficie-volumen) tienen mejor actividad antibacteriana (Daima y Bansal, 2015).

Una de las principales diferencias que caracterizan a los nanomateriales, específicamente las nanopartículas coloidales, es el incremento de la relación entre superficie y volumen a medida que el tamaño de la nanopartícula se reduce. En las nanopartículas sólidas de unos pocos nanómetros de diámetro, el número de átomos que ocupan la superficie exterior es mayor que el número de átomos en el volumen encerrado. Esta superioridad de superficie favorece el incremento de la energía interfacial, la reactividad de la nanopartícula, la eficiencia en la absorción y la capacidad de hacerla funcional de forma eficiente con entidades moleculares de interés (Sperling y Parak, 2011). Sotiriou y Pratsinis (2011) han argumentado que entre más pequeñas las partículas, los iones de plata se liberan más rápido, lo que conlleva a una mayor toxicidad debido a una mayor concentración de iones de plata efectiva.

En condiciones experimentales y fisiológicas, muchos nanomateriales tienen la tendencia a aglomerarse debido a su alta reactividad intrínseca. Por lo tanto, cuando los nanomateriales están expuestos a células bacterianas en condiciones de reacción fisiológica, es muy probable que puedan crear agregados en lugar de ser unidades individuales. En consecuencia, las actividades antibacterianas observadas serán de una

forma aglomerada y pueden no proporcionar la misma actividad antimicrobiana (Adams et al., 2006).

Varios informes de investigación han demostrado que la forma de un nanomaterial puede influir enormemente en su tasa de captación por parte de las células. Las nanopartículas de forma esférica ilustran una mayor absorción que las de forma de varilla (Mahmoudi et al., 2011). Debido a la fuerte correlación entre la morfología de nanocristales de plata y sus propiedades físicas y biológicas (incluyendo su velocidad de disolución), la síntesis controlada de la morfología de tales partículas ha recibido creciente atención. Hoy en día, están disponibles una gran cantidad de estrategias para ello, por ejemplo Xia y colaboradores (2005) y otros investigadores han descrito la síntesis estructural de las AGNPs en forma de cubos, plaquetas, varillas, anillos y bipirámides (Helminger et al, 2016).

Mecanismos antibacterianos de las AGNPs

Hasta el momento, hay tres posibles mecanismos moleculares propuestos que pueden explicar las actividades antibacterianas de las AgNPs. El primer mecanismo sugiere una interacción directa de las AgNPs con la membrana celular bacteriana, lo que puede causar una deformación subsiguiente de la membrana, daños en la membrana y una formación compleja con componentes ubicados dentro las células. El segundo mecanismo sugiere una posible interacción de los AgNPs con los grupos tiol (- SH) presentes en las proteínas y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El tercer mecanismo sugiere la liberación de iones Ag que inhiben las enzimas respiratorias y también generan ROS. El ión Ag + liberado también puede interactuar con grupos tiol de proteínas para inactivar proteínas vitales y afectar la replicación del ADN, sin embargo, hasta ahora se sabe muy poco acerca de los objetivos moleculares exactos de las AgNPs en general (Sanyasi, 2016).

Los lipopolisacáridos (LPS), junto con los fosfolípidos que forman la membrana externa de las bacterias Gram negativas, son responsables de su superficie celular con carga altamente negativa que atrae a las AGNPs. En contraste con esto, en las bacterias

Gram positivas, los ácidos teicóicos unidos a la membrana plasmática o al peptidoglicano, imparten esta carga negativa a la superficie. El fosfato presente en los ácidos teicóicos atrae y distribuye AGNPs a lo largo de la cadena molecular del fosfato, evitando cualquier agregación (Zaidi, 2017).

Medición de actividad microbicida de AGNPs, in vitro

Para determinar la actividad farmacológica de las nanopartículas para usarlas como agentes antimicrobianos se requieren técnicas experimentales que miden la viabilidad del microorganismo después de haberlo expuesto a este y se pueden determinar las CMI y las CMB (Bueno, 2015).

Los métodos convencionales de microdilución en caldo basados en el manual del Instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), se han utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas, especialmente las de plata, tanto para bacterias como para fungi (Hwang et al., 2012). Es una prueba que se hace en una microplaca de 96 pocillos que expresa los resultados en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) para identificar la CMI, la cual es la concentración más baja detectada de manera visual del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento del microorganismo analizado (CLSI, 2012), y la CMB se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99.9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas), la CMB se lleva a cabo mediante el subcultivo de alícuotas de los pocillos sin crecimiento bacteriano visible y de los pocillos de controles positivos de crecimiento en placas de agar MH (NCCLS, 1999).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adams L. K., D. Y. Lyon and P. J. J. Alvarez. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res.* 40:3527-3532.
- Ahmed A. M. and T. Shimamoto. 2011. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiol. Immunol.* 55: 318–327.
- Andrews J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:5-16.
- Atiyeh B. S., M. Costagliola, S. N. Hayek and S. A. Dibo. 2007. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. *Burns* 33:139-148.
- Bandyopadhyay S., I. Samanta, D. Bhattacharyya, P. K. Nanda, D. Kar, J. Chowdhury, P. Dandapat, A. K. Das, N. Batul, B. Mondal, T. K. Dutta, G. Das, B. C. Das, S. Naskar, U. K. Bandyopadhyay, S. Ch. Das and S. Bandyopadhyay. 2015. Co-infection of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in bovine mastitis – three cases reported from India. *Vet. Q.* 35(1):56-61.
- Bogni C., L. Odierno, C. Raspanti, J. Giraud, A. Larriestra, E. Reinoso, M. Lasagno, M. Ferrari, E. Ducrós, C. Frigerio, S. Bettera, M. Pellegrino, I. Frola, S. Dieser and C. Vissio. 2011. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, Mendez-Vilas, A. (Ed.). World Scientific, Singapore, ISBN-13: 9789814354868, p. 483-494.
- Bueno, J. 2015. Antimicrobial models in nanotechnology: from the selection to application in the control and treatment of infectious diseases. in: M. Rai and K. Kon, Ed., *Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases*, 1st Ed. London: Rai M.; Kon K., pp.19-33.
- Castellano J. J., S. M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T. E. Wright and R. J. Mannari. 2007. Comparative evaluation of silver containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J.* 4(2):114–22.

- Chopra I. 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:587–90.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—9th ed. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Corrêa A. B. A., M. A. Américo, I. C. M. Oliveira, L. G. Silva, M. C. De Mattos, A. M. M. Ferreira, J. N. S. S. Couceiro, S. E. L. Fracalanza and L. C. Benchetrit. 2010. Virulence characteristics of genetically related isolates of group B Streptococci from bovines and humans. *Vet Microbiol.* 143:429-433.
- Daima H. K. and V. Bansal. 2015. Influence of physicochemical properties of nanomaterials on their antibacterial applications. in: M. Rai and K. Kon, Ed., *Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases*, 1st Ed. London: Rai M.; Kon K., pp. 151-164.
- Detilleux, J., L. Theron, J. Duprez, E. Reding, M. Humblet, V. Planchon, C. Delfosse, C. Bertozzi, J. Mainil y C. Hanzen. 2013. Structural equation models to estimate risk of infection and tolerance to bovine mastitis. *Genetics Selection Evolution.* 45:6.
- Dhanashekar R., S. Akkinepalli and A. Nellutla. 2012. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *GERMS.* 2(3):101-9.
- Djabri B., N. Bareille, F. Beaudeau and H. Seegers. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet. Res.* 33:335-337.
- Eisenberger D., A. Carl, J. Balsliemke, P. Kämpf, S. Nickel, G. Schulze and G. Valenza. 2017. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Milk Samples of Dairy Cows with Mastitis in Bavaria, Germany. *Microb. Drug Resist.* 24(4):505-510.
- Ferguson J. D., G. Azzaro, M. Gambina and G. Licitra. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J Dairy Sci.* 90(12):5798-5813.

- Fessler A., C. Scott, K. Kadlec, R. Ehricht, S. Monecke and S. Schwarz. 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:619-625.
- Freire P. L. L., A. J. R. Albuquerque, F. C. Sampaio, A. Galembeck, M. A. P. Flores, T. C. M. Stamford and A. Rosenblatt. 2017. AgNPs: The new allies against *S. mutans* biofilm - a pilot clinical trial and microbiological assay. *Braz. Dent. J.* 28(4):417-422.
- Gomes F. and M. Henriques. 2016. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Curr. Microbiol.* 72:377-382.
- Gruet P., P. Maincent, X. Berthelot and V. Kaltsatos. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 50:245-259.
- Habibian S. D., F. Hosseinpour and A. K. Ebrahimi. 2011. An in vitro evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Afr. J. Biotechnol.* 10(52):10795-10797.
- Helmlinger J., C. Sengstock, C. Groß-Heitfeld, C. Mayer, T. A. Schildhauer, M. Koller and M. Epple. 2016. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. *RSC Adv.* 6: 18490–18501.
- Hillerton J. E. and E. A. Berry. 2005. Treating mastitis in the cow—a tradition or an archaism. *J. Appl. Microbiol.* 98:1250-1255.
- Holmes M. A. and R. N. Zadoks. 2011. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 16:373-382.
- Hwang I., J. H. Hwang, H. Choi, K. Kim and D. G. Lee. 2012. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved. *J. Med. Microb.* 61:1719–1726.
- Landsdown A. B. G. 2002. Silver: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J. Wound Care.* 11:125–38.

- León G. M. F., J. E. C. Barboza, A. A. A. Lechuga, P. M. Valencia, D. D. Aguayo, P. C. Cedillo, et al. 2015. Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herd of central Mexico. *Biomed. Res. Int.* 2015:(615153)
- Mahmoudi M., K. Azadmanesh, M. A. Shokrgozar, W. S. Journeay, and S. Laurent. 2011. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem. Rev.* 111(5):3407-3432.
- McDaniel C. J., D. M. Cardwell, R. B. Moeller and G. C. Gray. 2014. Humans and Cattle: A review of bovine zoonoses. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14(1):1-19.
- Moyer C. A., L. Brentano, D. L. Gravens, H. W. Margraf and W. W. Monafó. 1965. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Arch Surg.* 90:812–67.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved Guideline. 1999. Document M26-A, in press. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- Olde R. R. G. M., H.W. Barkema, D.F. Kelton and D.T. Scholl. 2008. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 91: 1366–1377.
- Oliver S. P., B. M. Jayarao and R. A. Almeida. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* 2(2):115-129.
- Petrovski K. R., M. Trajcević and G. Buneski. 2006. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 77(2):52-60.
- Pitkala A., M. Haveri, S. Pyörälä, V. Mylly and T. B. Honkanen. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.
- Pyörälä S. 2002. New strategies to prevent mastitis. *Reprod. Dom. Anim.* 37:211-216.

- Quang H. T., V. Q. Nguyen and A. Le. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 4:1-20.
- Radostis O., C. C. Gay, D. C. Blood y K. W. Hincheliff. 2001. *Medicina veterinaria tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.* McGraw-Hill interamericana de España. Tomo 1. Pp. 712-714.
- Rai M., A. Yadav and A. Gade. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances.* 27:76-83.
- Rollin E., K. C. Dhuyvetter and M. W. Overton. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev. Vet. Med.* 122:257-264.
- Sanyasi S., R. K. Majhi, S. Kumar., M. Mishra, A. Ghosh, M. Suar, P. V. Satyam, H. Mohapatra, C. Goswami and L. Goswami. 2016. Polysaccharide-capped silver Nanoparticles inhibit biofilm formation and eliminate multi-drug-resistant bacteria by disrupting bacterial cytoskeleton with reduced cytotoxicity towards mammalian cells. *Sci. Rep.* 6, 24929.
- Sayed H. R., S. S. Salama and T. R. Soliman. 2014. Bacteriological Evaluation of present situation of mastitis in dairy cows. *Glob. Vet.* 13(5):690-695.
- Seegers H., C. Fourichon and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475-491.
- Smith T. C. and N. Pearson. 2011. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11(4):327-339. Ruegg P. L. 2011. Managing mastitis and producing quality milk. In: Wiley-Blackwell. *Dairy production medicine.* 1st ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Inc. pp. 207-232.
- Sotiriou G. A. and S. E. Pratsinis. 2011. Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor and bioimaging material. *Curr. Opin. Chem. Eng.* 1(1):3-10.
- Sperling R. A. and W. J. Parak. 2010. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc.* 368:1333-1383.

- Stella L. R. y D. C. Marin. 2009 Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 15(42):263-268.
- Taponen S., K. Dredge, B. Henriksson, A. M. Pyyhtia, L. Suojala, R. Junni, K. Heinonen and S. Pyorala. 2003. Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs procaine penicillin G plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria – a double blind field study. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 26:193-198.
- Thompson-Crispi K., H. Atalla, F. Miglior and B. A. Mallard. 2014. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front. Immunol.* 5(493):1-10.
- Thota V. C. K., M. Yegireddy, E. P. Pagadala, N. V. K. V. P. Tollamadugu and A. R. Mekapogu. 2013. Evaluation of therapeutic potential of nanosilver particles synthesised using aloin in experimental murine mastitis model. *IET Nanobiotechnol.* 7(3):78-82.
- Torres M. A. 2012. Influencia del tamaño de nanopartículas de plata sobre su potencialidad tóxica a dosis única por vía oral en ratas Sprague Dawley. IV Seminario internacional de nanociencias y nanotecnologías.
- United States Department of Agriculture. 2008. Dairy 2007, Part II: Changes in the U.S. dairy cattle industry, 1991–2007. USDA - APHIS - VS, CEAH Fort Collins, CO.
- Valentin L., H. Sharp, K. Hille, U. Seibt, J. Fischer, Y. Pfeifer, G. B. Michael, S. Nickel, J. Schmiedel, L. Falgenhauer, A. Friese, R. Bauerfeind, U. Roesler, C. Imirzalioglu, T. Chakraborty, R. Helmuth, G. Valenza, G. Werner, S. Schwarz, B. Guerra, B. Appel, L. Kreienbrock and A. Käsbohrer. 2014. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int. J. Med. Microbiol.* 304(7):805-816.
- Vanderhaeghen W., T. Cerpentier, C. Adriaensen, J. Vicca, K. Hermans and P. Butaye. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet. Microbiol.* 144 (1-2):166-171.

- Viguier C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck and R. O'Kennedy. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27(8):486-493.
- White D. and P. F. McDermott. 2001. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J. Dairy Sci.* 84:e151-155.
- Yuan Y., Q. Peng and S. Gurunathan. 2017. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 18:569.
- Zaidi S., L. Misba and A. U Khan. 2017. Nano-therapeutics: A revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine* 13(7):2281-2301.
- Zecconi A., R. Piccinini and L. K. Fox. 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during a control program in nine commercial dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223(5):684-688.
- Zhao X. and P. Lacasse. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J. Anim. Sci.* 86(1):57-65.

ARTÍCULOS GENERADOS

Identificación molecular y frecuencia de patógenos aislados de mastitis bovina en establos de la Península de Baja California, México

Molecular identification and frequency of isolated pathogens from bovine mastitis in dairy herds from Baja California Peninsula, Mexico



Jennifer Brisuela Raygosa^a

Javier Palacios Torres^a,

Gilberto López Valencia^a,

Sawako Hori-Oshima^a,

José Carlomán Herrera Ramírez^a,

Lourdes Carolina Pujol Manríquez^a,

Carlos Eliud Angulo Valadez^b,

Tomás Benjamín Rentería Evangelista^a,

Gerardo Enrique Medina Basulto^{a*}

^a Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Tel: +52 (686)-563-69-06, Ext.131. Km. 3.5 carretera a San Felipe S/N. Fracc. Laguna Campestre. 21386. Baja California, México.

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

*Autor de correspondencia: gerardom@uabc.edu.mx

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.

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 identify 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. It was 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.

Recibido: 13/02/2017

Aceptado: 09/11/2017

❖ 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 para mastitis (CMT) basada en la cantidad de células somáticas presentes en la leche⁽⁴⁾.

Se han identificado más de 135 especies de bacterias causantes de mastitis⁽⁵⁾, las cuales se clasifican como microorganismos contagiosos y ambientales de acuerdo a su reservorio primario y al modo de transmisión⁽⁶⁾. Los patógenos contagiosos incluyen *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis* y *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN)⁽⁷⁾. 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⁽⁸⁾. Los patógenos ambientales se encuentran comúnmente en los corrales y bebederos 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⁽⁹⁾; 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*, *Trueperella pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis*⁽¹⁰⁾ y *Pasteurella multocida*⁽¹¹⁾.

En Baja California (BC) existe una población de 43,300 bovinos de leche con una producción de 158 millones de litros anuales, en tanto en Baja California Sur (BCS) existen 14,200 bovinos de leche con una producción de 42 millones de litros anuales⁽¹²⁾; sin embargo, no se han realizado investigaciones documentadas sobre los agentes que provocan mastitis bovina, a pesar de su importancia nacional en la producción de leche y el hecho de que la prevalencia de mastitis es relativamente alta⁽¹³⁾. Considerando todo lo anterior, en el presente trabajo se identificaron las especies bacterianas aisladas de vacas en producción con mastitis, mediante técnicas moleculares, y se determinó su frecuencia relativa en siete establos lecheros participantes, ubicados en las principales zonas productoras de la Península de Baja California, México.

❖ Material y Métodos ❖

● Ubicación del estudio ●

Se muestrearon siete establos lecheros tecnificados representativos de las principales regiones productoras de leche; cuatro del estado de Baja California y tres del estado de BCS (Figura 1), los cuales se identificaron con la letra A hasta la letra G (A-D, Baja California; E-G, Baja California Sur), con un total de 1,302 vacas en lactación (Cuadro 1).

Figura 1: Distribución de los establos muestreados en la zona de estudio



*Los círculos con contorno en puntos indican las principales cuencas lecheras de la península, los círculos con contorno continuo representan los establos muestreados.

Cuadro 1: Identificación de establos, número de animales en lactación y su procedencia

Establo	Vacas en producción	Municipio	Estado
A	46	Mexicali	Baja California
B	600	Mexicali	Baja California
C	371	Ensenada	Baja California
D	218	Tecate	Baja California
E	24	Comondú	Baja California Sur
F	10	Comondú	Baja California Sur
G	33	La Paz	Baja California Sur

● Criterio de inclusión y recolección de muestras ●

Se tomaron muestras de leche siguiendo la metodología del Consejo Nacional de Mastitis de los Estados Unidos⁽¹⁴⁾ 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).

● Cuestionario sobre prácticas de ordeña ●

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

● Análisis bacteriológico ●

Se cultivó 0.1 ml 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 48 h⁽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 determinar diferencias entre los aislados se consideró morfología colonial, tipo de hemólisis, tinción Gram y prueba de catalasa⁽¹⁶⁾. Finalmente, los aislados obtenidos se cultivaron en 5 ml de caldo Todd Hewitt e incubados a 35 °C por 12 h a 200 rpm, y se hicieron tres alícuotas de 1 ml con glicerol al 10% para su almacenamiento a -80 °C y posterior identificación molecular.

Análisis estadístico

De acuerdo a los datos obtenidos, se utilizó el software Statistix 9®, incluyendo la estimación de Ji 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 juego de reactivos DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®, USA). Se realizó la extracción como recomienda el proveedor, adicionando 5 µl de lisostafina de *S. staphylolyticus* 1 mg/ml para lisar bacterias del género *Staphylococcus* y 10 µl de mutanolisina de *Streptomyces globisporus* ATCC 21553 a 1,000 U/ml para lisar bacterias del género *Streptococcus*. Una vez obtenido el ADN se revisó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría A260nm/A280nm (Genesys 10uv Thermo Spectronic, MA USA) y 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*, mediante la técnica de PCR punto final y en la segunda se identificaron *E. coli*, y cinco SCN: *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. sciuri* y *S. simulans*, mediante la técnica de PCR Multiplex también en tiempo final. En ambos casos, se utilizaron protocolos previamente publicados por otros autores y sin modificaciones^(17,18). Por último, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5% en buffer TAE 1X (Ph 8.0; 0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA), teñidos con 0.5 µg de bromuro de etidio/ml y corridos a 120 V por 1 h. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, EUA.) y el gel se visualizó y fotografió en un sistema de fotodocumentación (UVP, ALE.).

A los aislados que no pudieron identificarse por las pruebas de PCR mencionadas, se les realizó PCR punto final del gen ribosomal 16S, de acuerdo a Negoro *et al*⁽¹⁹⁾ y se mandaron a secuenciar utilizando esos mismos oligonucleótidos mediante el método de secuenciación de ciclo (terminación de cadena dideoxi/secuenciación de ciclo), en un equipo ABI 3730XL (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, como ya fue descrito⁽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 BCS. (33/46), presentándose 2.7 veces más probabilidad de que una muestra tomada en BCS 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: Frecuencia y magnitud de asociación (OR) 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	3.0	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%)			

CMT= prueba de California para mastitis.

Durante el proceso de ordeña, ninguno de los establos cumplía completamente con buenas prácticas de ordeña 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; aunque 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 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Protocolo de ordeña 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 ordeña	-	-	+	-	-	-	+

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).

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

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.

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 (74.0)	24 (85.7)	68 (90.65)	1 (50.0)	9 (64.3)	21 (87.5)	150 (83.0)
Ambientales	5 (31.25)	6 (26.0)	4 (14.3)	7 (9.35)	1 (50.0)	5 (35.7)	3 (12.5)	30 (17.0)

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-incubaron las muestras hasta por 24 h a 37 °C y no se utilizó un criterio para considerar un cultivo positivo, lo que pudo predisponer al elevado porcentaje de aislamiento que tuvieron por muestra. Una razón por la cual en el presente estudio solo se obtuvo aislamiento bacteriológico en el 51.5 % de las muestras, pudo ser que en los casos de cultivos negativos, la mastitis fue provocada por microorganismos no cultivables mediante los métodos de rutina aquí utilizados (p. ej. *Mycoplasma* spp, *Mycobacterium bovis*, *Leptospira* spp. y *Brucella* spp.), o debido a causas no infecciosas, tales como traumatismo, altas temperaturas o estrés en los animales.

En los establos muestreados en Baja California Sur se encontró que existe más riesgo de que una muestra positiva a CMT tenga cultivo positivo con respecto a los establos muestreados en Baja California, lo cual se puede deber a las medidas deficientes en el protocolo de ordeña en dichos establos, o a una mayor frecuencia de bacterias no cultivables en los establos muestreados en el estado de Baja California.

Todas las especies identificadas en el presente estudio, excepto *S. suis* y *Enterobacter hormaechei*, se han aislado de casos de mastitis en investigaciones realizadas en otras partes del mundo y, en algunos casos los resultados han sido muy similares; así por ejemplo en un estudio realizado en Suecia en establos pequeños y tecnificados⁽²¹⁾, del 31 % de los cuartos se aisló *S. aureus*, seguido por SCN con 27 %, *S. dysgalactiae* 15 %, *S. uberis* 14 % y *E. coli* 4.8 %. En otro estudio⁽⁵⁾, los cuatro agentes principales fueron los mismos, sólo 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 %; el 15 % de las muestras provenían de vacas con mastitis clínica donde generalmente las bacterias coliformes son las principales causales. En un estudio realizado en establos familiares de Guanajuato, México⁽²²⁾, también se identificaron especies bacterianas aisladas de mastitis mediante secuenciación del gen 16S rDNA, de 11 muestras de leche, de ellas, cinco muestras presentaron SCN, dos muestras presentaron *Streptococcus* spp. y una *S. aureus*, mostrando resultados muy similares a los del presente trabajo.

En los establos muestreados en Baja California Sur, se encontró que no post-sellaban, lo que pudo favorecer una alta incidencia de agentes ambientales con respecto a los establos muestreados en Baja California, lo cual concuerda con lo encontrado en un estudio realizado en Guerrero, México⁽²³⁾, en donde el 97.5 % de los aislados fueron Enterobacterias, presentando los establos malas condiciones de higiene tanto en los corrales como en el protocolo de ordeña, ya que no pre-sellaban, post-sellaban, ni secaban pezones.

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 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, de donde se aisló *S. suis* en dos animales, se encuentra ubicado a 30 m de un área de producción porcina, lo que sugiere que algún trabajador o material pudo haber actuado como diseminador. Al igual que *S. suis*, las demás especies que pueden provocar enfermedades en humanos transmitidas por ingestión de leche contaminada^(24,25,26) que se aislaron en este estudio fueron: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *P. mirabilis* y *Enterobacter hormaechei*.

En el presente estudio se observó una baja frecuencia de infecciones mixtas (6.1 %), siendo *S. aureus* con *S. agalactiae* la más común (30 %). En un estudio similar⁽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 ambos estudios las dos especies aisladas más frecuentes, presentaron la mayoría de las combinaciones implicadas en las infecciones mixtas.

❖ Conclusiones e implicaciones ❖

El presente trabajo es el primer reporte en Baja California, en el cual se hayan aislado e identificado, agentes etiológicos por medio de técnicas moleculares a partir de muestras de leche de vacas con mastitis, lo cual permitió la identificación de 20 especies bacterianas, 12 de las cuales no habían sido reportadas en México. Nueve de las especies identificadas son consideradas zoonóticas, lo cual representa un riesgo para el personal que está en contacto directo con los animales o que consume leche y subproductos no pasteurizados en la región. En general, las prácticas durante la ordeña fueron deficientes en los establos participantes, lo cual se vio reflejado en una alta diversidad y proporción de casos de mastitis debidas a agentes contagiosos, por lo que es importante su implementación y la identificación de agentes etiológicos, para llevar a cabo las medidas de control y prevención acordes al tipo de agente presente en cada caso, y así disminuir la incidencia de esta enfermedad.

❖ Agradecimientos ❖

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. Ruegg PL. Managing mastitis and producing quality milk. In: Wiley-Blackwell. Dairy production medicine. 1st ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Inc; 2011:207-232.
7. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. 1ª ed. Zaragoza, España: Acribia; 2002.
8. 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.
9. Sztachańska M, Barański W, Janowski T, Pogorzelska J, Zduńczyk S. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Pol J Vet Sci* 2016;19(1):119-124.
10. McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller RB, Gray GC. Humans and cattle: A review of bovine zoonoses. *Vector-Borne Zoonot* 2014;14(1):1-19.
11. Kotton CN, Weinberg AN. Zoonoses. In: Mandell D, *et al.* Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. London, England: Churchill Livingstone; 2010.
12. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Población ganadera bovino leche 2013. México. 2016.
13. Palacios TJ, Brisuela RJ, Oshima S, López VG, Herrera RJC, Rentería ETB, *et al.* Identificación y perfil de resistencia a antibióticos de *S. aureus* en casos de mastitis bovina en establos lecheros de la Península de Baja California. Reunión internacional sobre producción de carne y leche en climas cálidos. 2016:320-323.
14. 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.
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. 3^a. 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 per 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 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. León-Galván MF, Barboza-Corona JE, Lechuga-Arana AA, Valencia-Posadas M, Aguayo DD, Cedillo-Pelaez C, *et al.* Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herd of central Mexico. *Biomed Res Int* 2015;(2015):615153.
23. 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.
24. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Estimates of Foodborne Illness in the United States. USA. 2011.
25. Dhanashekar R, Akkinipalli S, Nellutla A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *GERMS* 2012;2(3):101-9.
26. Jackson EE, Flores JP, Fernández-Escarín E. Reevaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J Food Prot* 2015;78(6):1191-1196.

Antibacterial *in vitro* effect of silver nanoparticles on pathogens isolated from cases of bovine mastitis

Key words: silver nanoparticles, antibacterial activity, antimicrobial resistance, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

Jennifer Brisuela Raygosa, Molecular biology Laboratory, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Autonomous University of Baja California, Mexicali, B. C. México.

*Gerardo E. Medina Basulto, Molecular biology Laboratory, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Autonomous University of Baja California, Mexicali, B. C. México.

José L. Stephano Hornedo, Meredith Gould Laboratory, San Quintín, B. C. México.

Sawako Hori-Oshima, Molecular biology Laboratory, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Autonomous University of Baja California, Mexicali, B. C. México.

Gilberto López Valencia, Brucellosis and tuberculosis Laboratory, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Autonomous University of Baja California, Mexicali, B. C. México.

José C. Herrera Ramírez, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Autonomous University of Baja California, Mexicali, B. C. México.

Summary

Bovine mastitis is one of the most common diseases that affect dairy cattle. Usually caused by a microbial infection, the most used treatment are the antimicrobials, however it has been shown that many bacteria isolated from mastitis have resistance to them. In this work, the antibacterial effect of spherical silver nanoparticles (AgNPs) of 10 to 40 nm in diameter was determined against 10 different species of bacteria including multidrug-resistant strains (MDR), isolated from cases of bovine mastitis in several herds from Baja California peninsula in Mexico. The AgNPs inhibited 100% and lysed 82% of the samples at a concentration $\leq 12\mu\text{g/ml}$, being effective in both Gram positive and Gram negative species, suggesting that the use of these AgNPs can be a good alternative to treat infections caused by a diversity of species and bacterial genera, including MDR strains.

Introduction

Mastitis is an inflammation of one or several udder quarters, usually due to a bacterial infection by the genera *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. and members of the Enterobacteriaceae family (Gomes and Henriques, 2016). In some cases, this inflammation is accompanied by clinical signs (pronounced signs of inflammation and systemic disease), calling it clinical mastitis. In other cases, the signs of mastitis are imperceptible by direct observation, being then diagnosed as subclinical mastitis, based on the diagnosis in the presence of bacteria and changes in the cytology of milk (Djabri et al., 2002). Mastitis is considered to be the most frequent and most costly production disease in dairy herds of developed countries (Seegers et al., 2003), the costs include, costs of treatment (veterinarian's time and drugs), discarded milk (during both the course of treatment and withholding periods) herdsman's time, fatalities and the costs associated with repeated cases of mastitis, decreased production and quality of milk, mainly in the case of subclinical mastitis due to decreased milk production long-term; in addition increase of slaughter (Petrovski et al., 2006). The common treatment of this disease is the application of antimicrobials, however recent studies have shown multiresistance to these, mainly due to the selection of resistant bacterial pathogens (Szweda et al., 2013). Antimicrobial resistant bacterial pathogens in animals not only pose a risk with respect to animal health but are a growing concern regarding possible transmission to humans as foodborne pathogens (White and McDermott, 2001).

In the last 10 years, nanotechnology has gained significant momentum. Nanomaterials, as antibacterial agents appear very promising and have already achieved much attention and it is anticipated that these might fill those voids where traditional antibiotics recurrently fail (Zaidi et al., 2017). It has been shown that AgNPs can interrupt bacterial metabolic processes, interact with DNA and increase the permeability of the cytoplasmic membrane, among other effects. It is evident that the physicochemical characteristics of the AgNPs play a fundamental role in the interaction with bacteria, it is suggested that smaller particles with higher specific surface area (surface-to-volume ratio) must have greater antibacterial activity (Daima and Bansal, 2015). In addition to this, several research reports have shown that the shape of the nanoparticle can influence its rate of uptake by cells, with the spherical-shaped AgNPs being better absorbed than the rod-shaped ones (Mahmoudi et al., 2011).

Minimum inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration of an antimicrobial that will inhibit the visible growth of a microorganism after overnight incubation, and minimum bactericidal concentration (MBC) as the lowest concentration of antimicrobial that will prevent the growth of an organism after subculture on to antibiotic-free media. MICs are used by diagnostic laboratories mainly to confirm resistance, but most often as a research tool to determine the *in vitro* activity of new antimicrobials (Andrews, 2001). On occasion, it may be necessary to achieve bactericidal activity with an antimicrobial agent. This need has been well documented for endocarditis and has been suggested by some for meningitis, for osteomyelitis, as well as for infections in immunocompromised patients. Bactericidal activity against the patient's isolate allows eradication to be predicted based upon the usual dosing of the antimicrobial agent or based upon the results of an antimicrobial assay (CLSI, 1999).

Due to the multilevel mode of action of AgNPs and the current situation of antimicrobial resistance, the objective of the present study is to evaluate the effect of AgNPs *in vitro* on different bacterial species isolated from cases of bovine mastitis.

Material and methods

Nanoparticles

Commercial formulation of silver nanoparticles Argovit™ (Russia), 12 mg/mL metallic silver, spherical of 10-40nm, functionalized with poly(vinylpyrrolidone) (PVP).

Bacteria

Fifty-six Strains isolated from bovine mastitis that included 10 bacterial species (Table 1) were selected from a study conducted in 2012-2014 (Brisuela et al., 2018), in which they were isolated from bovine mastitis cases in dairy herds from Baja California Peninsula, Mexico isolated. Some of the isolates were identified by PCR with specific oligonucleotides and the rest were identified by the partial sequencing method of the 16S rRNA gene, the antimicrobial resistance was analyzed using the agar diffusion method according to the manufacturer's instructions.

Table 1. No. of isolates by bacterial species

Bacterial species	n
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	32
<i>Staphylococcus chromogenes</i> (<i>S. chromogenes</i>)	6
<i>Staphylococcus agnetis</i> (<i>S. agnetis</i>)	1
<i>Streptococcus agalactiae</i> (<i>Strep. agalactiae</i>)	10
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (<i>Strep. dysgalactiae</i>)	1
<i>Streptococcus uberis</i> (<i>Strep. uberis</i>)	1
<i>Enterococcus faecium</i> (<i>E. faecium</i>)	1
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	1
<i>Enterobacter hormaechei</i> (<i>E. hormaechei</i>)	1
Total	56

Cultivation medium

Muller Hinton broth (MHB) and cow milk sterilized in an autoclave were used.

MIC and MBC

Antibacterial efficacy of the AgNPs were tested using the standard microdilution method (CLSI, 2012) which enables to determine the MIC. The assay was carried out in 96-well microplates of 330 μ l. Bacterial inoculum were prepared by direct colony suspension method, and adjusted to a standard turbidity of 0.5 McFarland with saline and then diluted (1:20) with MHB. The corresponding medium (MHB or milk) was added to the wells, then different concentrations of AgNPs were added (4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 μ g / ml) and finally 10 μ l of the bacterial inoculum (5x10⁶cfu/ml) was added, the final volume in each well was 100 μ l with a final inoculum concentration of 5x10⁵ cfu/ml. In addition, positive growth control (free of AgNPs) and negative control (only medium) were included. The plates were immediately incubated for 20 hours, at 37°C with 200rpm, in a sterile environment. After incubation, the individual results were visually evaluated and compared with the positive growth control; the presence of turbidity indicated that there was no antibacterial activity by the AgNPs, the MIC was determined as the lowest concentration that inhibited the visible bacterial growth. For the determination of the MBC, 10 μ l of the well of the MIC and the wells of the 3 concentrations after the MIC were inoculated in Petri

dishes with Muller Hinton agar and incubated for 24 hours at 37°C, the MBC were recorded as the lowest concentration of AgNPs that produced a $\geq 99.9\%$ reduction in growth in comparison to the growth of the control (CLSI, 1999).

All samples were analyzed in triplicate, including the positive and negative controls in the study.

Results and discussion

Table 2. Antimicrobial activity of AgNPs on bovine mastitis pathogens

Species	MDR	MHB		Milk
		MIC	MBC	MBC
		$\mu\text{g/ml}$		
<i>S. aureus</i>	+	12	16	20
<i>S. aureus</i>	+	8	12	12
<i>S. aureus</i>	+	12	12	20
<i>S. aureus</i>	+	4	12	12
<i>S. aureus</i>	+	8	12	N
<i>S. aureus</i>	+	8	12	8
<i>S. aureus</i>	+	12	12	12
<i>S. aureus</i>	+	12	12	12
<i>S. aureus</i>	+	12	12	12
<i>S. aureus</i>	+	12	12	12
<i>S. aureus</i>	+	12	12	20
<i>S. aureus</i>	+	8	8	8
<i>S. aureus</i>	+	12	16	8
<i>S. aureus</i>	+	4	8	8
<i>S. aureus</i>	+	12	16	24
<i>S. aureus</i>	+	12	N	N
<i>S. aureus</i>	+	12	12	16
<i>S. aureus</i>	+	12	12	12
<i>S. aureus</i>	+	12	24	24
<i>S. aureus</i>	+	12	12	20
<i>S. aureus</i>	+	12	12	16
<i>S. aureus</i>	-	8	12	24
<i>S. aureus</i>	-	12	12	28
<i>S. aureus</i>	-	12	12	28

<i>S. aureus</i>	-	12	12	20
<i>S. aureus</i>	-	12	12	20
<i>S. aureus</i>	-	8	12	16
<i>S. aureus</i>	-	12	12	24
<i>S. aureus</i>	-	12	12	28
<i>S. aureus</i>	-	12	12	20
<i>S. aureus</i>	-	8	8	N
<i>S. aureus</i>	-	8	12	12
<i>S. chromogenes</i>	+	8	12	4
<i>S. chromogenes</i>	+	4	4	12
<i>S. chromogenes</i>	+	8	8	12
<i>S. chromogenes</i>	+	8	8	12
<i>S. chromogenes</i>	+	4	8	8
<i>S. chromogenes</i>	-	4	8	12
<i>S. agnetis</i>	-	4	8	8
<i>Strep. agalactiae</i>	+	8	24	N
<i>Strep. agalactiae</i>	+	8	24	N
<i>Strep. agalactiae</i>	+	4	4	8
<i>Strep. agalactiae</i>	+	4	4	8
<i>Strep. agalactiae</i>	+	4	4	12
<i>Strep. agalactiae</i>	+	8	24	N
<i>Strep. agalactiae</i>	+	8	8	N
<i>Strep. agalactiae</i>	+	8	12	N
<i>Strep. agalactiae</i>	+	8	20	N
<i>Strep. agalactiae</i>	+	4	4	12
<i>Strep. dysgalactiae</i>	-	8	20	N
<i>Strep. uberis</i>	+	8	12	N
<i>E. faecium</i>	+	8	12	N
<i>E. coli</i>	+	4	4	16
<i>E. coli</i>	-	8	8	8
<i>K. pneumoniae</i>	+	4	4	16
<i>E. hormaechei</i>	+	4	4	24

N= absence of lysis

Antimicrobial activity of the AgNPs were tested on 56 strains of bacteria. Table 2 shows the obtained experimental data in the form of MIC and MBC in both MHB and sterilized milk. All the isolates were inhibited at MIC of ≤ 12 $\mu\text{g/ml}$ when analyzed in MHB (Table 2 and 3), demonstrating that these AgNPs with their respective physicochemical characteristics possess a high antimicrobial activity. The MICs were comparable with some studies such as Suchomel et

al.(2015), who analyzed the microbicidal activity of AgNPs in reference strains and strains isolated from the blood of patients hospitalized, they also used PVP as a stabilizing agent and the diameter of the AgNPs was 20 nm, in their investigation the MICs in each bacterial species in common with those of our study were very similar.

In addition, it was observed that the AgNPs were slightly less effective against the isolates of *S. aureus* in comparison with the other bacterial species, since in most of the isolates of *S. aureus* the MIC was 12 µg/ml and the MICs of the rest of species were 4 and 8 µg/ml (Table 3).

The MBCs in which 82% (46/56) of microorganisms were lysed was ≤12 µg/ml when analyzed in MHB and only one isolate was not lysed at any concentration. These results are similar to those of Mirzajani et al. (2011) where the AgNPs they synthesized measured 18 nm in diameter and used PVA (polyvinyl alcohol) as a protective agent, the MBC was 4µg/ml in the strain of *S. aureus*, in the present study we had a MBC of 4µg/ml in one strain of *S. chromogenes*, in 40% of the isolates of *S. agalactiae* and in 75% of Enterobacteriaceae.

When the AgNPs were tested in cow's milk, the percentage of isolates lysed at concentration of ≤12 µg/ml was 43% (24/56) whereas 21.5% (12/56) of the isolates were not lysed at any concentration established in the study, therefore the AgNPs were less effective in cow's milk compared to the MHB, there is no previous study where they used sterilized cow's milk to compare these results.

The MBC was highly variable in both MHB and cow's milk, and in different isolates of the same species. In general, Enterobacteriaceae were the species most susceptible to AgNPs in MHB. In a study conducted by Zarei et al (2014), the MBC values of Ag NPs against four foodborne pathogens including three Enterobacteriaceae were 6.25 µg/ml, with similar results in the present study. A lower MBC in Gram-negative bacteria may be due to the cell wall structure, which is thinner than in Gram-positive ones. It has been shown how AgNPs form pores in the cell wall of *E. coli* (Sondi and Salopek, 2004)

Table 3. MICs of AgNPs on species with more than one isolate in MHB

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	No. isolates (%)				
	<i>S. aureus</i> MDR	<i>S. aureus</i> no MDR	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>
4	2 (9.5)	0	3 (50)	4 (40)	1 (50)
8	4 (19)	4 (36.5)	3 (50)	6 (60)	1 (50)
12	15 (71.5)	7 (63.5)	0	0	0
Total	21 (100)	11 (100)	6 (100)	10 (100)	2 (100)

The MICs obtained in the present study remain below the cytotoxic concentrations (30 $\mu\text{g/ml}$) reported in the literature (Panacek et al., 2009).

Conclusion

All the isolates included in this study were inhibited at concentration $\leq 12 \mu\text{g/ml}$ of AgNPs. Until now, the MICs of AgNPs have not been reported in *S. chromogenes*, *S. agnetis* and *Strep. dysgalactiae*. The MBCs of AgNPs were not reported using sterilized cow's milk medium, being this an alternative to observe the antibacterial activity of the AgNPs in physiological fluids. The AgNPs used in the present study could be a good alternative for treat cows with mastitis, since it was effective in vitro at low concentrations in 10 different bacterial species including MDR species.

The MICs of AgNPs were very similar to other studies that evaluated AgNPs with similar physicochemical characteristics, proving that there is a reproducibility of this type of studies, therefore this study provides another reference to compare it with AgNPs of different characteristics and look for the most feasible option depending on the objective of interest.

Acknowledgements

To Elsa Hernández and Joelly Espinoza for assist on experimental work.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Author contributions

JBR: Designed experiments, performed experiments, analyzed data, wrote the paper.

GEMB: Designed experiments, conducted experimental work, contributed reagents and analytical tools, analyzed data, contributed to the manuscript preparation.

JLSH: Designed experiments, conducted experimental work, contributed reagents and analytical tools, analyzed data, contributed to the manuscript preparation.

SHO: Contributed materials, analyzed data, contributed to the manuscript preparation.

GLV: Analyzed data, contributed to the manuscript preparation.

JCHR: Analyzed data, contributed to the manuscript preparation.

References

Gomes F, Henriques M. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Curr Microbiol.* 2016;(72):377-382.

Djabri B, Bareille N, Beaudeau F, Seegers H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet Res.* 2002;(33):335-357.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 2003;(34):475–491.

Petrovski KR, Trajcev M, Buneski G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *J. S.Afr. Vet. Assoc.* 2006;77(2): 52–60.

Szweda P, Schielmann M, Frankowska A, Kot B, Zalewska M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. *J Vet Med Sci.* 2014;76(3):355-362.

White D, McDermott PF. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J. Dairy Sci.* 2001;(84):e151-155.

Zaidi S, Misba L, Khan AU. Nano-therapeutics: A revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine.* 2017;13(7):2281-2301

Daima HK, Bansal V. Influence of physicochemical properties of nanomaterials on their antibacterial applications. in: Rai M, Kon K. Ed., Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases. London: Rai M, Kon K; 2015.

Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journeay WS, Laurent S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. Chem. Rev. 2011;111(5):3407-3432.

Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J. Antimicrob. Chemother. 2001;48:5-16.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved Guideline. Document M26-A, in press. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 1999.

Brisuela RJ, Palacios TJ, López VG, Hori-Oshima S, Ramírez HJC, Pujol MLC, et al. Identificación molecular y frecuencia de patógenos aislados de mastitis bovina en establos de la Península de Baja California, México. Rev Mex Cienc Pecu. 2018; 9(4):1-14

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard—9th ed. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. Res Microbiol. 2011;(162):542-549.

Zarei M, Jamnejad A, Khajehali E. Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. Jundishapur J Microbiol 2014;7(1):e8720.

Suchomel P, Kvitek L, Panacek A, Pucek R, Hrbac J, Vecerova R, et al. Comparative study of antimicrobial activity of AgBr and Ag nanoparticles (NPs). PLoS ONE. 2015;10(3):e0119202.

Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J. Colloid Interface Sci. 2004;275:177–182.

Panacek A, Milan K, Vecerova R, Pucek R, Soukupova J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. Biomaterials. 2009;(30):6333–6340.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos las AGNPs utilizadas mostraron buena eficacia antimicrobiana contra patógenos bacterianos tanto Gram negativos como Gram positivos, además contra cepas MDR, siendo una posible opción como tratamiento en casos de mastitis bovina, ya que en la actualidad la presencia de resistencia a los antimicrobianos sigue incrementándose y cada vez es más evidente el riesgo latente de que tanto la microbiota como los patógenos humanos, adquieran estas resistencias y se vuelva aún más difícil tratar cualquier infección bacteriana.

Existen muchos estudios donde analizan la eficacia de las AGNPs, sin embargo, al ser el tamaño, la forma y el agente utilizado para estabilizarlas, de las principales características que determinan su actividad microbicida, este estudio aporta una referencia más para compararlo con AGNPs de diferentes características y buscar la opción más factible dependiendo el objetivo de interés.