

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *Staphylococcus aureus* OBTENIDOS DE CASOS DE MASTITIS EN ESTABLOS LECHEROS DE BAJA CALIFORNIA.

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

M.V.Z JAVIER PALACIOS TORRES

DIRECTOR:

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

MEXICALI, BC. MÉXICO

ENERO 2014

COMITÉ ASESOR

Caracterización genética de aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de casos de mastitis en establos lecheros de Baja California. Tesis presentada por el MVZ. Javier Palacios Torres como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias veterinarias.

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto.
DIRECTOR

Dr. Gilberto López Valencia.
ASESOR

Dra. Sawako Oshima.
ASESORA

M.C. Laura Elena Silva Paz.
ASESORA

AGRADECIMIENTOS

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

A mi tutor: Dr. Gerardo E. Medina Basulto por su valioso tiempo, experiencia y apoyo incondicional que recibí de su parte en la realización de este trabajo, por su orientación, amistad y crítica constructiva para lograr finalizar este proyecto.

Al grupo académico de Salud Animal del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por todas sus atenciones, consejos y aportaciones profesionales que hicieron posible realizar el presente trabajo.

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

A mis compañeros que me brindaron su amistad y apoyo incondicional tanto en los momentos de alegría y diversión como en los momentos de arduo trabajo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar el presente trabajo a mis padres por su apoyo firme y constante por su gran motivación a siempre luchar por cumplir mis metas, respetando y apoyando cada una de mis decisiones, por inculcarme buenos sentimientos y valores con los cuales he sabido abrimme paso en la vida.

ÍNDICE

	Páginas
ABSTRACT.....	ix
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Mastitis bovina.....	5
2.2 Patogenia.....	6
2.2.1 Mastitis Clínica.....	7
2.2.2 Mastitis subclínica.....	7
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.3.1. Estructura celular de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.3.2. Patogenia y virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.3.3 Reservorios y transmisión de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.3.4. Prevalencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en mastitis subclínica.....	14
2.4 Susceptibilidad antimicrobiana.....	14
2.5 Mecanismos de acción de los antibióticos ante los agentes patógenos..	15
2.5.1 Antibióticos β -lactámicos.....	15
2.5.2 Cefalosporinas.....	16
2.5.3 Macrólidos.....	16
2.5.4 Aminoglucósidos.....	16
2.5.5 Quinolonas.....	17

2.5.6 Tetraciclinas	18
2.5.7 Sulfonamidas.....	18
2.6. Resistencia bacteriana hacia los antibióticos	18
2.7 Principales mecanismos de resistencia bacteriana	19
2.7.1 Resistencia por inactivación enzimática	20
2.7.2. Resistencia por modificaciones del sitio blanco	20
2.7.3. Resistencia por alteraciones en la membrana.....	21
2.8. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina (MRSA).....	21
2.9. Pruebas para detección de mastitis.....	22
2.9.1. Recuento de células somáticas.....	22
2.9.2 Prueba de California para mastitis (CMT)	23
2.10. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante pruebas bioquímicas	26
2.10.1. Tinción diferencial Gram.....	26
2.10.2. Prueba de catalasa.....	27
2.10.3. Prueba de DNAsa.....	27
2.10.4. Prueba de coagulasa.....	27
2.11. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante PCR.....	28
2.12. Tipificación molecular de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
2.12.1. Análisis de microorganismos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	32
2.12.2. Tipificación por secuenciación de múltiples locus (MLST)	33
2.12.3. Tipificación <i>spa</i>	33
2.12.4. Tipificación <i>SCCmec</i> ,	34
2.12.5. Tipificación mediante el número variable de repeticiones en tándem (VNTR).	34

III. HIPÓTESIS.....	39
IV. OBJETIVOS	40
V. MATERIALES Y MÉTODOS	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	49
VII. CONCLUSIONES.....	59
ANEXO 1	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Estructura de la pared celular estafilocócica.....	12
2	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante PCR.....	50
3	Dendrograma de los 27 aislados de <i>Staphylococcus aureus</i>	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Lectura e interpretación de la prueba de california para mastitis (CMT) y su equivalencia con el recuento de células somáticas (RCS).....	25
2	Cebadores para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3	Cebadores utilizados en este estudio para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4	Panel de oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
5	Porcentajes de vacas infectadas con <i>Staphylococcus aureus</i> y otros microorganismos.	51
6	Resistencia a antibióticos de los aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidos de casos de mastitis en los establos muestreados.....	53
7	Sensibilidad a antibióticos de los aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidos de casos de mastitis en los establos muestreados	55
8	Resultados de VNTR de los 27 aislados de <i>Staphylococcus aureus</i>	56

ABSTRACT

Mastitis in dairy cattle is the health more important problem on farms engaged in this activity due to losses caused by the low quality of milk, the decline in production, the increase in the rate of animal waste and the cost of treatments. The main pathogen found in bovine mastitis is *Staphylococcus aureus*, that is an opportunistic pathogen colonizing humans and many animal species. In recent years has become increasingly important because presents multiple resistance to antibiotics. In the state of Baja California had been no documented researches on the identification, characterization and prevalence of *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. In the present study, milk samples positive for mastitis in cows from four dairy farms in the region were taken, the etiologic agents were isolated, identified by PCR, the resistance profile to antibiotics was determined and genotyping was taken using the VNTR technique. From a total of 44 animals affected by mastitis, 43.18 % had isolated an infectious agent, being the most prevalent *S. aureus*, present in 34.09 % of the cases. A total of 27 *S. aureus* isolates were obtained from which we are able to identify 8 strains belonging to three genetic groups, each of which corresponds to a different dairy herd. Resistance to penicillin and ceftazidime were the most frequent, occurring in 100 % of cases, while the resistance to ampicillin and dicloxacillin was presented in 92.59 % and 88.88 % respectively. Work continues with the preparation and characterization of isolated and begins to help the herds in making decisions, as to the measures to be implemented to reduce the incidence of mastitis

RESUMEN

La mastitis en ganado lechero es el problema de salud más importante en establos dedicados a esta actividad, debido a las pérdidas que provoca por la baja calidad de la leche, la merma en la producción, el aumento en la tasa de desecho de animales y el costo de los tratamientos. Diversos patógenos se han identificado como etiologías de mastitis bovina, *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) que es un patógeno oportunista colonizador en seres humanos y numerosas especies de animales actualmente está recobrando importancia por reemerger con múltiple resistencia a antibióticos. En el estado de Baja California no se han realizado investigaciones documentadas sobre la identificación y caracterización de *S. aureus* en ganado lechero. En el presente estudio se tomaron muestras de leche de vacas en producción positivas a mastitis en 4 establos lecheros de la región, se aislaron los agentes etiológicos, se identificaron por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa por sus siglas en ingles), se determinó su perfil de resistencia a antibióticos y se genotipificaron mediante VNTR (Número Variable de Repeticiones en Tándem por sus siglas en ingles). De un total de 44 animales afectados por mastitis, el 43.18% presentaron algún aislado infeccioso, siendo el más prevalente *S. aureus*, presente en el 34.09% de los casos de mastitis. Se obtuvieron un total de 27 aislados de *S. aureus* de los cuales se pudieron identificar 8 cepas pertenecientes a tres grupos genéticos, cada uno de los cuales corresponde a un establo de origen. La resistencia a penicilina y ceftazidima fueron las más frecuentes, presentándose en el 100% de los casos, en tanto la resistencia a ampicilina y dicloxacilina se presentó en el 92.59% y el 88.88% respectivamente. Actualmente se continúa con la obtención y caracterización de aislados y se comienza a ayudar a los establos en la toma decisiones en cuanto a las medidas a aplicar para disminuir la frecuencia de la mastitis.

I. INTRODUCCIÓN

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos, que reduce la producción del volumen de leche y altera su composición tanto química como física, además de elevar su carga bacteriana por la presencia de microorganismos patógenos (Gasque, 2008). Esta reacción inflamatoria ocurre como consecuencia de la respuesta de los tejidos a lesiones traumáticas, a sustancias irritantes o la presencia de agentes infecciosos y sus toxinas que han logrado colonizar el tejido secretor (Miller, 2004).

Es una enfermedad de alta prevalencia en el ganado lechero y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera, pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo. Mundialmente al año se estiman pérdidas en 35 mil millones de dólares (Wellenberg *et al.*, 2002, O'Flaherty *et al.*, 2005 y Rabello *et al.*, 2005) debido a la disminución en el rendimiento de leche, aumento en el número de tratamientos clínicos y desecho temprano de vacas (Ceron-Muñoz *et al.*, 2002).

Las condiciones de higiene durante la ordeña y el control adecuado de la mastitis clínica y subclínica, son factores determinantes en la mayor rentabilidad de un establo, sin embargo la mastitis sigue siendo, económicamente, uno de los problemas más importantes hoy en día (Martínez *et al.*, 2000).

La mastitis bovina es muy persistente en el ganado lechero (Wellenberg *et al.*, 2002), siendo usualmente tratada o prevenida con el uso de antibióticos intramamarios, representando una carga económica muy alta a los productores de leche en todo el mundo.

Esta enfermedad, económicamente, es la más importante en la industria lechera de los Estados Unidos, ya que mitad de las vacas en un hato se pueden ver afectadas con algún tipo de mastitis. Se considera que esta enfermedad, de acuerdo a los costos de producción de leche en el hato, representa el 70% de los gastos totales en tratamientos y disminución de la producción, resultando en una pérdida de miles de millones de dólares cada año (Bradley y Green, 2001 y Dos Santos *et al.*, 2002).

La mastitis subclínica es la forma de mastitis que más afecta en los sistemas productivos lecheros modernos, afectando entre el 20 y el 50% de las vacas (Wilson *et al.*, 1997; Pitkala *et al.*, 2004). Los costos de las mastitis subclínicas son muy difíciles de cuantificar, pero muchos expertos coinciden en que los costos promedios son mayores que los causados por la mastitis clínica. En Estados Unidos, asumiendo una prevalencia del 45% de mastitis subclínica en un establo, los costos de las pérdidas han sido estimados en rangos de 180 a 320 dólares por animal al año (Wilson *et al.*, 1997).

La mastitis en México se presenta como en cualquier otro país, incluyendo los establos tropicales. De acuerdo con investigaciones realizadas en el estado de Jalisco, la mastitis subclínica está presente en un 50% de los hatos lecheros de México, siendo el costo promedio por vaca de entre \$1700 a \$2000M.N. al año (Wolter *et al.*, 2004). Así, las pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica se estiman en varios miles de millones de pesos, siendo críticas en los establos medianos y pequeños (Medina, 2002 y Romero 2004).

Son diversos los agentes infecciosos causantes de la mastitis dependiendo de su hábitat principal y de su forma de transmisión, las bacterias causantes de la mastitis, han sido divididas en patógenos obligados y ambientales. Esta clasificación se basa en la forma en que estos microorganismos interaccionan con la glándula mamaria y, en consecuencia, en el tipo de mastitis que producen (Chaneton, 2010).

Uno de los principales microorganismos patógenos causantes de la mastitis bovina es *Staphylococcus aureus*, el cual no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño y en muchas ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadenar una reacción inflamatoria (Waage *et al.*, 1988 y Roberson *et al.*, 1996).

S. aureus es un microorganismo coco gram-positivo, no móvil, no esporulado que puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos, siendo esta última la más común. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce las enzimas catalasa y coagulasa, con un crecimiento óptimo en un lapso de 24 horas en medio agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm de diámetro, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Howe *et al.*, 1996 y Kanafani *et al.*, 2006).

La presencia de este microorganismo patógeno en ganado bovino productor de leche como alimento origina el riesgo potencial de transmitir clones específicos resistentes o determinantes de resistencia a antibióticos así como la transmisión de los animales a los seres humanos o viceversa (Haenni *et al.*, 2003; Cassone *et al.*, 2009; y Hata *et al.*, 2010).

La necesidad de conocer la evolución y la distribución de los diferentes tipos de cepas de *S. aureus* y para poder inferir algunos aspectos epidemiológicos ha permitido el desarrollo y la estandarización de diversas metodologías para realizar la tipificación molecular (De Colsa, 2011). Los VNTR son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o sustracción de secuencias repetidas. Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos

complementarios a secuencias específicas en sus flancos. (Sabat, et al., 2003 y Ablordey, et al., 2005).

Tomando en cuenta lo descrito anteriormente y que en el estado de Baja California no existe información documentada sobre aislados de *S. aureus*, su genotipificación, ni información sobre resistencia a antibióticos, en este estudio se identificaron diferentes cepas de *S.aureus* que se encuentran circulando en los distintos establos, para contribuir en el control mastitis bovina causada por este microorganismo. Así mismo se podrá desarrollar un mejor manejo en la terapia clínica en animales con problemas de mastitis evitando con esto la aparición de cepas resistentes a los antibióticos y por lo tanto los tratamientos utilizados serán más efectivos.

Controlar la mastitis bovina causada por *S. aureus* con prevención y tratamientos adecuados puede garantizar que se obtendrá leche de buena calidad para el consumo humano.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Mastitis bovina

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos en respuesta a una infección comúnmente adquirida por invasión de agentes patógenos y sus toxinas que han logrado colonizar el tejido secretor a través del orificio y canal del pezón, elevando su carga bacteriana normal. De igual manera esta reacción inflamatoria puede ocurrir debido a sustancias irritantes, lesiones traumáticas, alergias y neoplasias. Este proceso inflamatorio afecta la producción de leche y altera su composición tanto química como física (Gasque, 2008, Miller, 2004, Barlow, 2009, Souto *et al.*, 2010 y Menzies y Ramanan, 2001).

Los múltiples agentes bacterianos, con sus diferentes mecanismos de infección, la epidemiología, grado y duración de la reacción inflamatoria y la colonización transitoria del canal del pezón son factores para considerarla de tipo subclínico y como una infección activa (Bedolla, 2004), así mismo sumado a esto la resistencia bacteriana que oponen estos gérmenes a la acción de los antibióticos presente en la mayoría de los casos, se torna en una infección reemergente y recurrente (Philpot, *et al.*, 1992). La transmisión de esta enfermedad es de un animal enfermo a uno sano por medio de las pezoneras sucias de las máquinas ordeñadoras, moscas, estiércol de los corrales y falta de higiene del ordeñador entre otras (Rosas, 1992).

La mastitis es una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero, y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera, ocasionando pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo por disminución en el rendimiento de la producción, aumento en el número de tratamientos clínicos así como desecho prematuro de vacas

Debido a esto la mastitis se ha reconocido como una de las enfermedades más costosas en los hatos lecheros (Correa *et al.*, 2002; Ceron-Muñoz *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2002 y Rabello *et al.*, 2005).

2.2 Patogenia

La infección de la glándula mamaria ocurre a través del conducto glandular, ya que los microorganismos patógenos pasan del exterior de la ubre para alojarse en el conducto, una vez que los patógenos proliferan e invaden en el tejido mamario ocurre una inflamación y se produce la mastitis clínica, dependiendo de la severidad y la duración, en uno o varios de los cuartos de la ubre se puede encontrar fibrosis, edema inflamatorio y atrofia del tejido mamario. Puede haber aumento difuso de tejido conjuntivo y en casos graves puede haber gangrena o abscesos en el tejido glandular. La etapa terminal de la mastitis crónica es la atrofia de la glándula mamaria (Gasque, 2008).

Philpot y Saran (2002) mencionan que de acuerdo a sus manifestaciones clínicas la mastitis se puede clasificar en mastitis clínica y subclínica:

2.2.1 Mastitis Clínica

Se caracteriza por anomalías visibles en la ubre o en la leche, donde el cuarto afectado se inflama, hay dolor y edema, en tanto en la leche se pueden observar coágulos y grumos y se puede tornar amarilla o rojiza por la presencia de pus o sangre. En casos severos hay fiebre, deshidratación, letargo y el animal se niega a comer, lo que repercute en la disminución de la producción láctea.

2.2.2 Mastitis subclínica

Se caracteriza por la ausencia de signos clínicos en la ubre y la apariencia normal de la leche, en este tipo de mastitis los agentes etiológicos aumentan el número de las células somáticas (principalmente neutrófilos) y mientras más alto es el nivel de recuento de células somáticas (RCS), más alto es el nivel de inflamación en el tejido, lo que trae como consecuencia una disminución de la producción y calidad de la leche. Los patógenos ambientales interactúan con la glándula mamaria y en consecuencia en el tipo de mastitis que producen. Los patógenos ambientales se encuentran en el ambiente donde vive la vaca, pasturas, cama y excremento pasan a la ubre en los períodos entre ordeña. Al no estar adaptados a la glándula mamaria algunos de estos patógenos producen respuestas inflamatorias importantes que se traducen en casos de mastitis clínica que suelen durar poco tiempo. (Chaneton, 2010).

Los patógenos obligados, por otro lado, tienen su hábitat fundamental en la glándula mamaria bovina y se transmiten de ubre a ubre principalmente durante la ordeña. Debido a su larga historia de interacción con la glándula mamaria, estos microorganismos se han adaptado a las condiciones de este nicho particular, desarrollando estrategias para evadir el sistema inmune y permanecer en la glándula mamaria (Guinane *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 1999; Leigh *et al.*, 1990; Bradley y Green 2001; Ward *et al.*, 2009).

2.3. *Staphylococcus aureus*

Uno de los principales microorganismos patógenos causantes de mastitis bovina, es *S. aureus* y su importancia radica en que no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas, en los equipos de ordeño y en muchas ocasiones, las prácticas de manejo pueden hacer que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadenar una reacción inflamatoria (Roberson *et al.*, 1996 y Waage *et al.*, 1988).

S. aureus es un patógeno oportunista colonizador tanto de los seres humanos como de numerosas especies de animales. En el ganado bovino, es responsable de aproximadamente un tercio de los casos de mastitis clínica y subclínica (Brandley *et al.*, 2007 y Bortel *et al.*, 2010).

S. aureus es un coco gram-positivo, no móvil, no esporulado, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos, siendo esta última la más común. Es un anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. El microorganismo produce las enzimas catalasa y coagulasa entre otras y crece rápidamente en el medio agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 milímetros, producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides y muchas cepas producen hemólisis a las 24-36 horas (Howe *et al.*, 1996 y Kanafani *et al.*, 2006).

S. aureus tiene todas las características típicas del género, es anaerobio facultativo, mesófilo, necesita aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa y el manitol con producción de ácido y tolera condiciones ambientales muy variables. Así, puede crecer a cualquier temperatura entre 6 y 46°C, con una temperatura óptima entre 30-37°C. En cuanto al pH, se desarrolla entre valores de 4.0 y 9.8 con el óptimo en torno a la neutralidad. Es igualmente tolerante con respecto a la sal, resistiendo concentraciones de hasta un 20% de NaCl, siendo ésta una propiedad utilizada para crear condiciones selectivas en medios de cultivo para su aislamiento y

propagación. Es bastante resistente a la desecación, congelación y calor, aunque no tanto como las endosporas de las bacterias esporuladas (Fueyo, 2005).

2.3.1. Estructura celular de *Staphylococcus aureus*

Desde el punto de vista estructural comparte las características morfológicas de las bacterias gram positivas (figura 1) como lo es la capsula para facilitar a adherencia a las superficies e interferir con la fagocitosis, poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano y ácidos teicoicos que puede tener actividad endotóxica y estimular la liberación de citoquinas por los macrófagos, activación de la vía del complemento y agregación plaquetaria, en el caso de *S. aureus* presenta proteínas de superficie como lo es la proteína A que tiene propiedades antifagocíticas que están basadas en su capacidad de unión a la porción Fc de las inmunoglobulinas, así mismo las proteínas de superficie se unen a moléculas de la matriz extracelular. La pared celular está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano. Se trata de un polisacárido compuesto por cadenas con uniones de tipo β (1-4) no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. Las cadenas laterales de pentapéptidos se hallan conectadas al residuo de ácido murámico y tienen unión cruzada por un puente de pentaglicina fijado a la L-lisina de una cadena y la D-alanina de la otra cadena. El polisacárido básico se halla también en muchos otros microorganismos, mientras la cadena de unión cruzada de pentaglicina parece ser específica de *S. aureus* y tiene como función mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. En la patogenia coadyuva al desencadenamiento de la inflamación por activación del complemento, es capaz de atraer leucocitos polimorfonucleares (PMN), estimula la producción de anticuerpos opsonizantes y tiene actividad similar a endotoxinas de gram negativos. El otro componente mayor de la pared son los ácidos teicoicos, que constituyen alrededor del 40%

del peso de la pared. Estos ácidos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces D-alanina que están unidos en forma covalente al peptidoglicano. Cuando están unidos a la membrana citoplasmática se les llama ácidos lipoteicoicos. *S. aureus* posee predominantemente ácidos de ribitol fosfato, mientras que en los *Staphylococcus* coagulasa negativos estos son de glicerol fosfato. La presencia de cápsula es variable pero es importante a nivel patogénico, ya que tiene propiedades antifagocíticas. Las cepas de *S. aureus* que poseen cápsula son más virulentas en modelos animales. No está claro si la cápsula de *S. aureus* juegue un papel importante en la adherencia, lo que sí se sabe es que la adherencia de *S. aureus* a los tejidos y cuerpos extraños está mediada, en parte, por receptores de fibronectina en su superficie.

La fibronectina es una glicoproteína importante en varias funciones de adherencia. Las cepas de *S. aureus*, que muestran grandes cantidades de receptores para la fibronectina, parecen ser más invasivas y más hábiles para adherirse. Además *S. aureus* puede presentar en su superficie receptores para el colágeno.

La pared celular de *S. aureus* posee una proteína característica llamada proteína A, esta tiene la habilidad de unirse a la fracción constante (Fc) de la inmunoglobulina G que interacciona con receptores celulares y que ejerce sus funciones efectoras tales como la activación del complemento y la opsonización, y por tanto la proteína A funciona como factor de virulencia, ya que interfiere con la opsonización y la ingestión de los microorganismos por los neutrófilos polimorfonucleares PMN, activando el complemento y dando lugar a reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía. Esta proteína es inmunogénica y se hallan anticuerpos contra ella en sujetos con infecciones graves por *S. aureus* (Machado *et al.*, 2008).

2.3.2. Patogenia y virulencia de *Staphylococcus aureus*

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

Otros factores importantes que intervienen en la patogenicidad de *S. aureus* son su habilidad de adhesión intercelular (Cucarella *et al.*, 2001), su capacidad de colonizar las células epiteliales y macrófagos de la glándula mamaria (Cucarella *et al.*, 2001 y Melchior *et al.*, 2006), así como a su habilidad de producir fibrosis y micro abscesos que dificultan el acceso de agentes antimicrobianos (Loeza-Angeles *et al.*, 2010). Produce mastitis crónicas recurrentes y cuando son agudas, generalmente se producen recidivas después del tratamiento (Sharma *et al.*, 2010).

El alto grado de patogenicidad del *S. aureus* se debe también a la importante producción de enzimas extracelulares que permiten la penetración e invasión de las células del huésped, (coagulasa, proteasas, metaloproteasas, hialurodinasas, lipasas y fosfolipasa C), así como también algunas toxinas tales como; hemolisinas α , β , δ y γ que degradan los tejidos y macromoléculas facilitando la obtención de nutrientes para el crecimiento de la bacteria (Bubeck *et al.*, 2007 y Gordon, 2008).

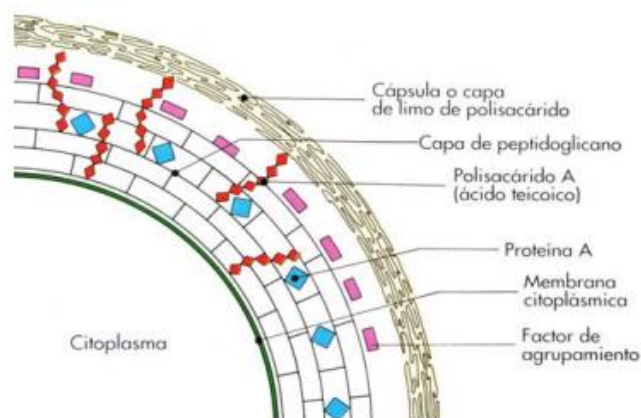


Figura 1. Estructura de la pared celular estafilocócica.

2.3.2.1 Biopelículas

Una biopelícula es una comunidad microbiana, dinámica y bien estructurada, adherida a una superficie sólida y englobada en una matriz extracelular que ofrece protección ante factores ambientales físico-químicos y facilita las funciones catalíticas extracelulares (al mantener las células próximas entre ellas) y favorece la concentración de nutrientes en la superficie (Hall, *et al.*, 2004).

La persistencia de *S. aureus* sobretodo en materiales sintéticos (ej. catéteres, equipo de ordeña), está predominantemente inducida por diferentes polisacáridos de adhesión que favorecen la producción de biopelículas (Bubeck *et al.*, 2007 y Gordon, 2008).

La formación de la biopelícula ocurre en dos pasos, en primer lugar las células bacterianas se adhieren a una superficie de manera específica o mediante interacciones físico-químicas. En este paso están involucradas proteínas de *S. aureus* que se unen a factores de la matriz extracelular del huésped, tales como las proteínas de unión a la fibronectina (FnBPA, FnBPB)

(O'Neill *et al.*, 2008), proteínas de unión al fibrinógeno (ClfA, ClfB) (McDevitt *et al.*, 1994), proteína de unión al colágeno (Can) (Patty *et al.*, 1992) o la proteína de unión a la sialoproteína del hueso (Bbp) (Tung *et al.*, 2000).

En un segundo paso, las células bacterianas adheridas se multiplican, interaccionan entre ellas y se acumulan en capas, quedando envueltas por una matriz extracelular secretada por la propia célula bacteriana. La contribución de la biopelícula a la patogénesis se atribuye a su resistencia a los antibióticos y a la fagocitosis, provocando infecciones crónicas. El desprendimiento de las células bacterianas de la biopelícula es causa de septicemia y nuevas colonizaciones, mientras que la producción de endotoxinas y exotoxinas producen inflamación y lesiones tisulares (Prenafeta, 2009).

2.3.3 Reservorios y transmisión de *Staphylococcus aureus*

S. aureus tiene un amplio reservorio animal, donde forma parte de la flora bacteriana normal a nivel de piel, superficies mucosas del tracto respiratorio y del sistema genitourinario en mamíferos y aves (Werckenthin *et al.*, 2001).

La distribución de *S. aureus* en la naturaleza es amplia; en establos se ha reportado el aislamiento de éste a nivel de las camas, alimentos concentrados, equipos, utensilios e insectos (Roberson *et al.*, 1994). El principal reservorio de esta bacteria en el ganado lechero es el cuarto mamario infectado, la piel de los pezones y la ubre, pudiendo ser transmitido fácilmente entre los animales del establo o entre los cuartos mamarios infectados a cuartos mamarios no infectados durante el ordeño, ya sea por medio de las máquinas de ordeño, las manos contaminadas de los ordeñadores y las toallas y/o esponjas que se usan para lavar o secar las ubres de más de una vaca. En los establos donde el ordeño es manual, los ordeñadores se convierten en vectores potenciales en la transmisión de *S. aureus* entre los animales (Gruet *et al.*, 2001 y Trovó *et al.*, 2005).

2.3.4. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en mastitis subclínica

S. aureus es clasificado como un patógeno mayor de las glándulas mamarias por el grado de inflamación que produce, lo que se evidencia con el incremento en el recuento de células somáticas (RCS) en la leche de los cuartos mamarios. Las células somáticas están conformadas por las células epiteliales alveolares producto de la descamación (0-7%) y las células de defensa (macrófagos 66-88%, linfocitos 10-27%, neutrófilos 1-11%) (Ruegg, 2003).

El RCS en la leche de cuartos no infectados se encuentra generalmente por debajo de 200.000 cel/ml, siendo una elevación indicativo de un proceso inflamatorio en la ubre (Harmon, 1994), razón por la cual, el RCS es un criterio muy importante de calidad siendo usado para distinguir un cuarto no infectado de uno infectado (Schukken *et al.*, 2003).

2.4 Susceptibilidad antimicrobiana

De acuerdo a Taroco y colaboradores (2008), los métodos para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos se clasifican en métodos cuantitativos y cualitativos, en lo que se refiere a los métodos cuantitativos los procedimientos permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM), que se define como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes), de igual manera se puede determinar la concentración mínima bactericida (CBM), que es la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población estandarizada. En lo referente a los métodos

cualitativos, se encuentran los discos de difusión, en cuyos procedimientos permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente.

Los métodos de susceptibilidad están estandarizados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (por sus siglas en inglés NCCLS), de manera que los resultados sean reproducibles y comparables. Los medios de cultivo para realizar las pruebas son el agar o caldo de cultivo Muller Hinton los cuales son los más apropiados para las pruebas de sensibilidad ya que muestran buena reproducibilidad, son económicos, contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, son adecuados para la mayoría de las bacterias patógenas en lo que a requerimientos nutricionales se refiere.

2.5 Mecanismos de acción de los antibióticos ante los agentes patógenos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, entre otros) o sintetizados por métodos de laboratorio que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Calderwood y Bowman, 1988).

2.5.1 Antibióticos β -lactámicos

Su mecanismo de acción interfiere con la síntesis de la pared celular bacteriana, siendo por tanto bactericida, es decir, interfiere con la síntesis de los polipéptidos necesarios para la pared celular. Determinadas cepas estafilocócicas producen β -lactamasas, que transforman a la penicilina en ácido peniciloico inactivo (Martin, 1991 y Sumano, 1997).

2.5.2 Cefalosporinas

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

2.5.3 Macrólidos

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

2.5.4 Aminoglucósidos

Su acción bacteriana principal está dirigida sobre bacterias gram negativas con muy poca acción sobre anaerobios y limitada sobre las gram positivas. A través de la difusión, atraviesan la membrana externa bacteriana y alcanzan el espacio periplásmico. Posteriormente y a través de un mecanismo activo oxígeno-dependiente, penetran la membrana interna citoplasmática y

provocan en ésta, alteraciones de su funcionamiento, se unen finalmente a polisomas e inhiben la síntesis proteica. Su sitio intracelular de acción es la subunidad ribosómica 30s, que provoca error de lectura del RNAm con producción de una proteína anómala, lo cual unido a las alternativas funcionales de la membrana (induce fuga de sodio, potasio y otros componentes esenciales) producen la muerte bacteriana (Sande, *et al.*, 1993 y Delgado, 1990).

2.5.5 Quinolonas

Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, por desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico. Las quinolonas actúan en el ADN cromosómico bacteriano, uniéndose a algunas de las topoisomerasas e inhibiendo su acción (Hooper, 2001 y Schmitz, *et al.*, 2002). En bacterias gram negativas, las topoisomerasas que inhiben, principalmente es la ADN-girasa, la función más importante de la ADN-girasa es mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción, también libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP (Drlica, *et al.*, 1997).

En la ADN-girasa las quinolonas interaccionan con aminoácidos de las α -hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del ADN. En bacterias gram positivas la principal diana de las quinolonas es la topoisomerasa IV, la cual se encarga de separar las hebras de ADN tras cada replicación, además tiene una actividad relajante sobre la cadena de ADN para que se realice de manera correcta el proceso de replicación (Varon, *et al.*, 1999 y Drlica, *et al.*, 1997).

2.5.6 Tetraciclinas

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

2.5.7 Sulfonamidas

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

2.6. Resistencia bacteriana hacia los antibióticos

La resistencia se define como la capacidad que tiene una bacteria de evadir la acción de un antibiótico, esta resistencia puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es propia de cada familia, género o especie siendo por lo tanto una resistencia predecible, donde la bacteria es naturalmente resistente a determinado antibiótico debido a que tiene carencia de la estructura blanco o se le hace imposible al antibiótico penetrar la célula

bacteriana. La resistencia adquirida es cuando la bacteria que normalmente es sensible a un antibiótico en particular se convierte en resistente ya sea por una mutación cromosómica o por intercambio de material genético entre bacterias (Hernández, 2005).

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

2.7 Principales mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos, existiendo una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en *Mycoplasma spp.* en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico ya que se debe a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética.

La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes, pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (García *et al.*, 1997 y Martínez, 1997).

2.7.1 Resistencia por inactivación enzimática

Consiste en la síntesis por parte de las bacterias de ciertas enzimas que modifican la estructura del antibiótico provocando la anulación de su función. El ejemplo más típico es el de la producción de β -lactamasas capaces de abrir el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos para dar ácido peniciloico que carece de actividad antibacteriana (Gimeno y Ortega, 2005).

Muchas bacterias son capaces de producir enzimas betalactamasas, en las bacterias gram positivas suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las bacterias gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas (Daza, 1998).

2.7.2. Resistencia por modificaciones del sitio blanco

El ribosoma es el orgánulo celular encargado de la síntesis de proteínas utilizando RNA de transferencia aminoacilado (aa-tRNA) como sustrato a partir del RNA mensajero (mRNA). El ribosoma está formado de una subunidad grande y una pequeña, que en bacterias se nombran 50S y 30S, de acuerdo a su velocidad de sedimentación (Ramakrishnan, 2002).

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, o las subunidades ribosomales 50S y 30S, entre otros (Ferrer y Lemmis, 2006).

Este tipo de resistencia tiene efectos sobre los antibióticos macrólidos y lincomicinas interviniendo para este caso la subunidad 50s y con los aminoglucósidos la subunidad 30s (Martin y Luas, 1989).

Los cambios en el sitio blanco donde el medicamento actúa, interfieren y limitan la interacción, evitan su acción bactericida/bacteriostática y promueven la resistencia hacia los antibióticos (Yoneyama y Katsumata, 2006).

2.7.3. Resistencia por alteraciones en la membrana

Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos tales como betalactámicos y aminoglucósidos, los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico

En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente (Daza, 1998 y Vila *et al.*, 2007).

2.8. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA)

La mayoría de los *Staphylococcus* meticilino resistentes son usualmente resistentes a varios antibióticos, incluyendo otros β -lactámicos, aminoglicósidos, macrólidos, clindamicina y tetraciclina. La observación de múltiple resistencia debe ser una señal para la posibilidad de resistencia a meticilina.

Para *S. aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativos meticilino resistentes, todas las penicilinas y otros β lactámicos tales como amoxicilina/Ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/clavulánico, piperazilina/tazobactam, ertapenem e imipenem podrían aparecer como activos *in vitro* pero ser clínicamente no efectivos (estas antibióticos deberían ser

reportados como resistentes o no deberían ser informados). Los aislamientos de *S. aureus* resistentes a penicilina pero sensibles a oxacilina son resistentes a los β -lactámicos lábiles, a las β -lactamasas estafilocócicas: ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, piperacilina, mezlociclina y carbenicilina (Prat, 2004).

2.9. Pruebas para detección de mastitis

Existen varios métodos para realizar el RCS individualmente en cada vaca o por muestreo de la leche del tanque, entre ellos se encuentran: conductividad eléctrica, prueba de white side, prueba de California para mastitis, prueba de Wisconsin para mastitis y recuento electrónico de células somáticas. Estos métodos difieren en sencillez, confiabilidad, costo y la selección generalmente se hace en base al que mejor se ajuste a las necesidades y posibilidades de cada explotación o unidad productiva.

Lo importante es que una explotación lechera siempre debe realizar el RCS porque su resultado nos indica tanto el nivel de mastitis existente en el establo, como la calidad de la leche producida (Hernández y Bedolla, 2008).

2.9.1. Recuento de células somáticas

El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Bedolla, 2004; Zarkower y Scheuchenberger, 1978).

La leche de una ubre sana presenta pocas células somáticas. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células del sistema inmunes (neutrófilos polimorfonucleares 15%, macrófagos 60%, linfocitos 25%). De todas las células de la leche de un cuarto infectado, aproximadamente el 99

% serán leucocitos, mientras que el resto 1% serán células secretoras que se originan de los tejidos de la ubre, juntos esos dos tipos de células constituyen el recuento de células somáticas (RCS) de la leche que comúnmente es expresada por mililitros (cel/ml). El recuento de células somáticas (RCS) es la medición más ampliamente utilizada para supervisar el estado inflamatorio de las glándulas mamarias y puede ser realizada en la leche de cuartos individuales, vacas individuales, el hato completo y de un grupo de hatos. La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en el RCS en la leche. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo de la vaca tiende a reclutar leucocitos para combatir a dichos microorganismos causantes de la mastitis. (Philpot y Nickerson, 1992)

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado, normalmente tienen RCS de 20,000 a 50,000 cel/ml. En grandes poblaciones de vacas, 80% de los animales no infectados tendrán un RCS menor de 200,000 cel/ml y 50% menor de 100,000 cel/ml (Fernández, 1997; Pérez y Bedolla, 2005).

2.9.2 Prueba de California para mastitis (CMT)

La prueba de California para mastitis (CMT, por sus siglas en inglés California Mastitis Test), es uno de los métodos más ampliamente usados para el diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de campo (Ferraro *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2004; Shitandi y Kihumbu, 2004; Faría *et al.*, 2005; Kivaria *et al.*, 2007 y Nunes *et al.*, 2007;). Es una prueba económica, sencilla y rápida, que cuenta con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93% (Bedolla, *et al.*, 2007) la cual detecta el estado de salud de la ubre mediante una estimación del contenido de células somáticas. Su principal desventaja es

la subjetividad implícita en la lectura de los resultados (Rueeg, 2003). La prueba de California para mastitis se fundamenta en la lisis que ocasiona el detergente aniónico Alquil-ArilSulfonato de sodio en las células somáticas presentes en la leche, la lisis produce la salida del ácido desoxirribonucleico (ADN); los filamentos de ADN libres tienden a formar un gel cuando se unen, y el púrpura de bromocresol incluido en el reactivo facilita la visualización del gel formado. Por tanto, a mayor contenido celular en la leche, mayor gelificación, y el gel estima en forma indirecta el número de células somáticas existentes en la leche, permitiendo clasificar los cuartos mamarios en cinco categorías (Rueeg, 2003).

Cuadro 1. Lectura e interpretación de la prueba de california para mastitis (CMT) y su equivalencia con el recuento de células somáticas (RCS).

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

(Kivaria *et al.*, 2007).

2.10. Identificación de *Staphylococcus aureus* mediante pruebas bioquímicas

Las pruebas o ensayos bioquímicos son aquellas reacciones que ponen en evidencia la existencia de una enzima o pasos metabólicos determinados, y que muchas veces nos permiten llegar a la identificación a nivel de especie. Existen diferentes pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de los *Staphylococcus* (Machado *et al.*, 2008).

2.10.1. Tinción diferencial Gram

De acuerdo a Santambrosio y colaboradores (2009), esta tinción es denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, gram-positivas y gram-negativas. Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano.

2.10.2. Prueba de catalasa

Se investiga la presencia en el microorganismo de la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) en H_2O y O_2 , que se desprende en forma de burbujas en el medio. El H_2O_2 se forma como un producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares, siendo tóxico al acumularse en una bacteria (Huchin. 2009).

2.10.3. Prueba de DNAsa

Permite conocer si los microorganismos tienen la enzima desoxirribonucleasa capaz de degradar las moléculas de DNA existentes en el medio de cultivo con agar. Esta prueba se utiliza para diferenciar las especies de *S. aureus*, productoras de la enzima desoxirribonucleasa, de otras especies que no la producen (Borraz, 2005).

2.10.4. Prueba de coagulasa

La coagulasa es una enzima extracelular libre producida por algunos microorganismos capaces de coagular el plasma. *S. aureus* posee dos tipos de coagulasa, una endocoagulasa o coagulasa ligada unida a la pared celular que actúa directamente sobre el fibrinógeno provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado y una exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un factor sérico (CRF), el cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina (test en tubo) (Machado *et al.*, 2008).

2.11. Identificación de *Staphylococcus aureus* mediante PCR

Debido a que el cultivo microbiológico de las muestras clínicas, solo ofrece resultado en un 50% de los casos (Koskinen *et al.*, 2009) el diagnóstico por PCR es una alternativa.

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

Hasta la fecha se han publicado diferentes tipos de cebadores para la amplificación de diferentes regiones del genoma del *S. aureus* (Restrepo *et al.*, 2012), algunos de los cuales se ilustran en el cuadro 2.

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

Número de muestras de leche evaluadas	Cebadores	Pares de bases	Autor	PCR <i>in silico</i>
Muestras de 30 cuartos de 24 vacas.	F: 5'-GCGATTGAT GGTGAT ACGGTT-3' R: 5'AGCCAAGCCTTGA CG AAC TAAAGC-3'	270pb.	(Kuzma <i>et al.</i> , 2003).	No amplifica en todas las cepas de <i>S. aureus</i> .
No reportada	F: 5'-TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA-3' R: 5'-TAA GTC AAA CGT TA ACA TAC G-3'	418- 510 pb.	(Sindhu <i>et al.</i> , 2007).	Solo amplifica una cepa <i>S. aureus</i>
187 muestras	F: 5'-ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G-3' R: 5'-TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC-3'	---	(Aarestrup, Wegener y Rosdahl, 1995).	No amplifica ninguna cepa de <i>S. aureus</i>
30 muestras	F: 5'-AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG-3' R: 5'-TCG CTC GCT CAC CTT AGA A-3'	499 pb.	(Cremonesi <i>et al.</i> , 2006).	Amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> , pero también <i>S. epidermidis</i> , <i>S. lungdunensis</i> , <i>S. pseudointermedius</i>
No reportada	F: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GT-3' R: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	279 pb.	(Brakstad, Aasbakk y Maeland, 1992).	Más específico, solo <i>S. aureus</i> pero deja por fuera una cepa de <i>S. aureus</i> .
20 cepas dediferentes <i>Staphylococcus sp.</i>	F: 5'-ATG GTT TTG GTA GAA TTG GTC GTT TA-3' R: 5'-GAC ATT TCG TTA TCA TAC CAA GCT G-3'	933 pb.	(Yugueros <i>et al.</i> , 2001).	Amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> y no las otras especies de <i>Staphylococcs</i> .
52 muestras	F: 5'-TCG CTC AAA ACA ACG ACA CC-3' No describe R.	300 pb.	(Reinoso <i>et al.</i> , 2007).	No se puede realizar análisis porque no tiene RV.
555 muestras, 362 vacas CMT positivo.	F: 5'-ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G-3' R: 5'-TGC TTT CGA	964 bp.	(Vieira-Da-Motta, Folly y Sakyiama,	Estos cebadores no dan ningún resultado; no amplifica nada.

	TTG TTC GAT GC-3'		2001).	
No reportada	F: 5-CCG TTT CAT AAG GCG AGT TG-3 R: 5-CTG TTC GGGTAT TTG AAG ATG G-3'	405 bp.	(Park, Lee y Kim, 2006).	Solo amplifica una cepa de <i>S. aureus</i> , <i>in silico</i> amplifica 156 pb.
9 cepas aisladas	F: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' R: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	279 pb.	(Yang <i>et al.</i> , 2007).	No amplifica una cepa de <i>S. aureus</i> .
No reportada	F: 5'-GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3' R: 5'-CGC ACA TCA CGC TAC G-3'	228 pb.	(Manfredi, Leotta y Rivas, 2010)	No amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> y amplifica otros <i>Staphylococcus</i> .
24 cepas mastitis clínica 16 de mastitis Subclínica	F: 5'-ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC-3' R: 5'-AGC TCA GCC TAA ACG AGT AC-3'	1251pb	(Castañeda <i>et al.</i> , 2009).	El cebador Reversa no amplifica.
113 CMT	F: 5'-CGG TCC AGA CTC CTA CGG G-3' R: 5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'	204 pb.	(Granados, 2011).	Amplifica <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S.</i> <i>Seuointermedius</i> .
No reportada	F: 5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3' R: 5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG-3'	162 pb.	(Oliveira y de Lencastre, 2002).	No amplifica todas las cepas de <i>S.</i> <i>aureus</i> , amplifica <i>S. saprophyticus</i> , <i>S.</i> <i>seuointermedium</i> y otros <i>Staphylococcus</i>

(Restrepo *et al.*, 2012)

Riffon y colaboradores (2001) desarrollaron dos conjuntos de oligonucleótidos específicos para identificar mediante PCR las principales especies de bacterias causantes de mastitis bovina, entre las que destaca *S. aureus*. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de regiones altamente divergentes y específicas del ADN que codifica para los RNA ribosomales 16S y 23S, tomando como base las secuencias previamente publicadas y disponibles en la base de datos GenBank. Los genes que codifican ARNr se utilizaron como secuencias diana en lugar de los genes que codifican ARNm debido a la mejora

de la señal, esto por la presencia de varias copias que codifican ARNr en el genoma. Así mismo, se diseñaron dos conjuntos de oligonucleótidos universales usados como controles positivos, que se muestran a continuación:

Cuadro 3. Cebadores utilizados en este estudio para la identificación de *Staphylococcus aureus*.

Oligonucleótido	Especificidad	Secuencia (5´-3´)	G+C (%)
Sau 234	<i>S. aureus</i>	CGATTCCCTTAGTAGCGGCG	60
Sau 1501	<i>S. aureus</i>	CCAATCGCACGCTTCGCCTA	60
Sau 327	<i>S. aureus</i>	GGACGACATTAGACGAATCA	45
Sau 1645	<i>S. aureus</i>	CGGGCACCTATTTTCTATCT	45

(Modificado de Riffon, *et al.*, 2001)

2.12. Tipificación molecular de *Staphylococcus aureus*.

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

La necesidad de conocer la evolución y la distribución de las diferentes tipos de cepas de *S. aureus*, ha permitido el desarrollo y la estandarización de diversas metodologías para realizar la tipificación molecular de *Staphylococcus aureus* (De Colsa, 2011).

2.12.1. Análisis de microorganismos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

La electroforesis de campos pulsados (PFGE), permite su clasificación según el análisis de fragmentos generados por la enzima de restricción *SmaI*. La CDC (Por sus siglas en ingles Centers for Disease Control and Prevention) ha desarrollado un protocolo estandarizado para su proceso y una nomenclatura denominada “USA” que permite clasificar los diferentes patrones electroforéticos generados (ej. USA100, USA300, USA400, entre otros) (Mark *et al.*, 2000).

El principio de la electroforesis de campo pulsado se basa en que primero es aplicado un campo eléctrico (E1) al gel, entonces hebras de ADN, el cual se ha cortado con enzimas de restricción, migran por los cambios periódicos en un campo eléctrico. Este primer campo es entonces removido y un segundo campo (E2) en ángulo con el primer campo, es activado. El ADN debe cambiar la conformación y la reorientación antes de comenzar a migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. El tiempo requerido para esta reorientación varía de acuerdo al peso molecular de la muestra. La PFGE separa fragmentos cromosómicos que no pueden ser separados por el método convencional uni-direccional de electroforesis. El límite de la electroforesis convencional es su ineficiencia para separar secuencias de ADN con un tamaño mayor de 50kb. Las técnicas moleculares para el análisis de ADN cromosomal como el PFGE han demostrado ser un método eficiente para resolver divergencias entre las diferentes cepas y ha sido bastante utilizado en el estudio epidemiológico de las mismas. La electroforesis en gel de campo pulsado

(PFGE) es una de las técnicas más modernas utilizadas en estudios epidemiológicos, ya que es capaz de separar fragmentos de 10 kpb hasta 10.000 kpb y por esta razón ha demostrado ser altamente discriminatoria para estudios epidemiológicos por su habilidad para diferenciar intra-especies de aislados bacterianos en estudios epidemiológicos de zoonosis. Los estudios sugieren que PFGE es una técnica útil en la diferenciación de cepas provenientes de animales y del hombre y que puede complementar otras técnicas moleculares para propósitos epidemiológicos, así como para la prevención y control de importantes infecciones bacterianas. Este método es además, fácilmente reproducible, relativamente estable y rápido en comparación con métodos que requieren hibridación de ADN (Máttar, 2000).

2.12.2. Tipificación por secuenciación de múltiples locus (MLST)

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

2.12.3. Tipificación *spa*.

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

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

2.12.4. Tipificación SCCmec,

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

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

Estos marcadores genéticos, antes denominados minisatélites, se identificaron inicialmente en seres humanos, donde han tenido su mayor aplicación en pruebas forenses y de paternidad (Frothingham, *et al.*, 1998 y Gascoyne-Binzi, *et al.*, 2001). Los VNTR son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o delección de secuencias repetidas. Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por PCR con oligonucleótidos complementarios a

secuencias específicas en sus flancos. El tamaño del amplicón revela el polimorfismo del VNTR y puede expresarse como el número de secuencias repetidas que contiene, permitiendo almacenar códigos numéricos comparables entre diversos laboratorios y crear bases de datos de fácil acceso (Sabat, *et al.*, 2003 y Ablordey, *et al.*, 2005)

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

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

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

La proteína *Sdr* junto con los factores de aglutinación A (*ClfA*) y B (*ClfB*), son miembros de la familia de proteínas de superficie las cuales se caracterizan por tener una región R que contiene varios números de repeticiones de dipéptidos de Ser-Asp codificados por una repetición de ADN de 18 nucleótidos en la región 3' de los genes *sdr*. (McDevittet *al.*, 1994 y Ni Eidhinet *al.*, 1998).

El locus *ssp* contiene el gen *sspA* que codifica para una serina proteasa (proteasa v8). El fragmento terminal C se construye de un número variable de múltiples repeticiones de tripeptidos codificados por unidades de 9 nucleótidos (Carmona *et al.*, 1987 y Rice *et al.*, 2001).

Finalmente los genes *coA* y *spa* codifican para la proteína de unión al colágeno y a la proteína A respectivamente, teniendo diversos números de repeticiones degeneradas de 81 y 24 pares de bases respectivamente (Van Belkum *et al.*, 1998). Este polimorfismo se ha utilizado comúnmente para la diferenciación de aislados de *S. aureus* (Frenay *et al.*, 1994 y Gohet *et al.*, 1992).

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

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

Cuadro 4. Panel de oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de *Staphylococcus aureus*.

NOMBRE	SECUENCIA	NÚM. DE COPIAS (pb)	NUM. DE REP. EN EL GENOMA Mu50*	PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)	TEMP. ALINEACIÓN (°C)
PANEL 1					
Sa0122	L-AGCAGTAGTGCCGTTTTGCTT	24	10	392	60
	R-AAGACGTCCTTTCAGTGAGCA				
Sa0266	L-TTGGATATGAAGCGAGACCA	81	6	630	60
	R-CTTCCGATTGTTTCGATGCTT				
Sa0311	L-AGGGTTAGAGCCCGAGACAT	55	3	272	60
	R-CACGGGATTGGAACAGAAAT				
Sa0704	L-CGCGCGTGAATCTCTTTTAT	67	4	380	60
	R-AGTCCCATATCGTGCGTAAA				
Sa1132	L-CGTGCATAATGGCTTACGAA	63	6	532	60
	R-AAGCAGCAGAAAAGCTAAAGAA				
Sa1194	L-AGTGCAAGCGGAAATTGAAG	67	7	524	60
	R-ATCGTGAAAAAGCCCAAAA				
Sa1291	L-GGGGGAAATTCTAAGCAACC	64	4	369	60
	R-CGAAATTTTCCACGTCGATT				
Sa1729	L- TACTTAAAAATARGAATACATAATTAG	56	5	499	53
	R- CAACAATAAATTACTTATTTGAAGTT				
Sa1866	L-CTGTTTTGCAGCGTTTGCTA	159	6	607	60
	R-GCAACTTGAAGAAACGGTTG				
Sa2039	L-TTCGTTCTACCCCACTTGC	56	3	282	60
	R-GAGCCTGGGTCATAAATTCAA				
	R-ACGTAAAGGTCGCGACAAAA				

*Mu50: cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) con resistencia a la vancomicina.

(Pourcel, 2009)

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

III. HIPÓTESIS

Existen cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* en los establos de la región e incluso dentro del mismo establo que pueden ser diferenciadas mediante la técnica de genotipificación VNTR y que muestran patrones diferentes de resistencia a los antibióticos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar genéticamente aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de diferentes hatos lecheros en el estado de Baja California para determinar la relación existente entre dichos aislados y sus patrones de resistencia a antibióticos.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener aislados bacterianos de diferentes casos de mastitis bovina.
- Caracterizar y comparar genéticamente los aislados de *Staphylococcus aureus* por VNTR.
- Determinar los patrones de resistencia a antibióticos de los diferentes aislados obtenidos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación

El presente estudio se realizó en el estado de Baja California, México, en donde se recolectaron muestras de leche de cuatro establos lecheros comerciales orientados a la producción de leche destinada para la elaboración de subproductos lácteos. Los establos muestreados fueron: a) el perteneciente al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC; b) un establo ubicado en la zona oriente de la ciudad de Mexicali; c) un establo ubicado en la zona del Florido en el municipio de Tecate B.C. y d) un establo localizado en la zona de Ojos Negros en el municipio de Ensenada B.C. Todos los hatos muestreados cuentan con una estructura de producción semitecnificada.

5.2. Tipo de estudio

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

5.3 Criterios de inclusión

Se incluyeron las vacas en etapa producción que fueron positivas a la prueba de California para mastitis (CMT) (Dairy research products inc.) en un grado 2 o mayor, o bien aquellas que presentaron un conteo de células somáticas superior a 400,000 por ml, dicha prueba fue interpretada en una escala ordinal como menciona Kivaria y colaboradores (2007).

Así mismo se incluyeron aquellas vacas que el productor indicó que presentaban signos clínicos referentes a mastitis y a las que se les habían aplicado tratamientos por periodos prolongados y mostraron poca mejoría.

5.4 Toma de muestras

Se muestrearon 90 cuartos mamarios de 44 vacas afectadas tanto por mastitis clínica como subclínica, de las cuales 10 correspondieron al establo Mexicali 1 (600 vacas en producción), 33 al establo Mexicali 2 (36 vacas en producción), 37 al establo Tecate (218 vacas en producción) y 10 correspondieron al establo Ensenada (370 vacas en producción), se corroboró la mastitis con prueba de California (CMT).

Las muestras de leche se tomaron siguiendo la metodología del Consejo Nacional de la Mastitis (NCM) de los Estados Unidos (2004). Brevemente, se tomaron de 3 a 5 ml de leche en tubos estériles de polipropileno de 50 ml con tapa rosca, previa limpieza y desinfección del pezón, mediante el uso de torundas de algodón con alcohol al 70%, usando varias torundas por pezón, hasta que la última torunda de algodón una vez utilizada no presentó suciedad.

5.5. Cultivo y aislamiento de las muestras.

Las muestras se analizaron en los laboratorios de biología molecular y microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad de Baja California.

Las muestras fueron sembradas en medio agar sangre base Columbia (CONDA S.A), esto consistió en colocar 100 µl de leche, los cuales se esparcieron con un asa triangular sobre la superficie de una caja de petri con medio. Una vez sembradas se incubaron entre 24 y 48 horas a 35°C para observar el crecimiento bacteriano.

Una vez obtenidas las colonias se seleccionaron aquellas que presentaron la morfología típica del género *Staphylococcus*, es decir, colonias de forma circular, convexas, de borde entero y algunas veces pigmentadas, blanco-grisáceas o doradas y que en agar sangre presentaron el halo de hemólisis α ó β (Gaillot *et al.*,2000).

5.6 Tinción diferencial Gram

Se llevó a cabo tinción gram (BD inc.) para determinar su morfología y clasificarlas como bacterias ya sea gram positivas o gram negativas, este procedimiento se realizó, según Huchin (2009):

Se tomó una colonia bacteriana y se disolvió en una gota de solución salina en un portaobjetos, una vez seca la placa se fijó con la flama del mechero, en seguida se realizó la tinción cubriendo el portaobjeto con cristal violeta durante un minuto luego se lavó, después se cubrió con lugol durante otro minuto y se lavó en seguida se decoloró utilizando alcohol-cetona luego se cubrió con safranina durante un minuto y después se lavó, una vez seca se colocó una gota de inmersión y se observó al microscopio con el objetivo de 100X.

A las colonias identificadas como gram positivas y que presentaron la morfología típica del género *Staphylococcus*, a saber, cocos en pares, tétradas o en racimos, se les realizaron pruebas bioquímicas tales como catalasa, coagulasa y DNAs a las cuales *S. aureus* resulta positivo, diferenciándolo así de otras especies de *Staphylococcus*.

5.7 Prueba de catalasa

Esta prueba se realizó de acuerdo a lo publicado por Machado y colaboradores (2008), se colocó una gota de peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfirió una porción de colonia sobre el H_2O_2 realizándose una emulsión en la cual se observó desprendimiento de burbujas de la mezcla indicando con esto que la muestra pertenece al género *Staphylococcus*.

5.8 Prueba de DNAsa

Se sembraron las colonias en una placa de medio sólido (acumedia) con DNA y verde de metilo y se incubó 24 horas a 37°C, una vez realizada la incubación se agregó ácido clorhídrico (CIH) a la superficie del medio, considerándose positivo la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento del microorganismo con actividad DNAsa, quedando opaco el resto de la placa (Borraz 2005).

5.9 Prueba de coagulasa

Se realizó el procedimiento con algunas modificaciones según lo publicado por Borraz (2005), se utilizó plasma humano en heparina (BD Vacutainer), se mezclaron 0.5 ml de plasma con 0.5 ml de cultivo de colonias puro y fresco enriquecido con medio infusión cerebro corazón (DIFCO), la mezcla se incubó a 35°C y se leyó a las 2 horas, 4 horas y posteriormente a las 24 horas, considerándose como positivo a *S. aureus* la formación de un coagulo.

Las colonias identificadas como posible *S. aureus* se sembraron en caldo de cultivo Todd Hewitt (acumedia) y glicerol al 4 %, para su almacenamiento a -80 °C y posterior utilización.

Se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 33591 como control positivo para las pruebas realizadas a las bacterias cultivadas.

5.10 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Para conocer la susceptibilidad de la bacteria hacia diferentes antibióticos se utilizó el método de difusión en multidisco Gram positivos, utilizando Agar Muller-Hinton chocolate BD Bioxon el cual se preparó de acuerdo a las especificaciones indicadas en el producto.

Se tomaron de 2 a 3 colonias y se suspendieron en 100 µl de PBS (Buffer de fosfatos con 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 2 Mm KH₂PO₄) en un microtubo de 1.5 ml. Se colocaron los 100 µl en el agar Mueller-Hinton chocolate y se esparcieron en toda la superficie con un asa estéril triangular, una vez esparcida la mezcla se colocó el multidisco para bacterias gram positivas (BIO-RAD) que contiene los siguientes antibióticos: ampicilina 10 µg, dicloxacilina 1 µg, penicilina 10 U, cefalotina 30 µg, cefotaxima 30 µg, cefuroxima 30 µg, ceftazidima 30 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, pefloxacina 5 µg, tetraciclina 30 µg, trimetoprim -sulfametoxazol 25 µg. Las cajas se incubaron a una temperatura de 35°C durante 24 hrs y los resultados se interpretaron como sensible, intermedio y resistente dependiendo de la medida en milímetros del halo de inhibición formado.

Se determinó la presencia de resistencia a un panel de 12 antibióticos por el método de difusión en caja de acuerdo a Ortez (2005), utilizando multidiscos para bacterias gram positivas (BIO-RAD inc.).

Los antibióticos y concentraciones utilizados fueron los siguientes: (ampicilina 10 µg, dicloxacilina 1 µg, penicilina 10 U, cefalotina 30 µg, cefotaxima 30 µg, cefuroxima 30 µg, ceftazidima 30 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, pefloxacina 5 µg, tetraciclina 30 µg, trimetoprim - sulfametoxazol 25 µg).

5.11. Extracción del ADN bacteriano.

Para la extracción de ADN, las bacterias se cultivaron en un medio de Agar sangre base Columbia (CONDA S.A), a una temperatura de 35°C durante 24 horas antes de la extracción del ADN.

La extracción de ADN para efectuar todos los experimentos se realizó utilizando el kit DNeasy blood & Tissue kit (QIAGEN), se utilizó el protocolo Pretreatment for Gram-Positive Bacteria el cual está indicado en el DNeasy Blood & Tissue Handbook (Anexo1).

5.12. Identificación de *Staphylococcus aureus* mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Se realizó la confirmación por PCR de los aislados obtenidos compatibles con *S. aureus*, utilizando la técnica descrita anteriormente por Riffon (2001), utilizando los oligonucleótidos F- Sau 327 5'-GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA-3' y R- Sau 1645 5'-CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT-3' los cuales fueron diseñados de una región específica de ADN que codifica para el gen 23S ribosomal, amplificando un producto de 1318pb.

Se utilizó el termociclador iCycler Thermal Cycler (BIO-RAD) para el proceso de detección de *S. aureus*. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl. La mezcla se conformó de 1µl (200 ng) de ADN templado, 1 µl de oligonucleótidos a una concentración de 25µM, 2 µl de *Taq*

polimerasa, 5 μ l de buffer 10X (-MgCl₂), 1.5 μ l de MgSO₄ y 1 μ l de d'NTPs (desoxirribunucleótidos trifosfatados) a una concentración de 10mM. Una pre-etapa de PCR se realizó a 94°C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, alineación 64.3°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 2 minutos. Después del último ciclo se llevó a cabo una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Se analizaron 10 μ l de producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X (89 mM de Tris (pH 7.6), 89 mM de ácido bórico y 2 mM de EDTA) y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio (SIGMA co). La electroforesis se corrió a 100 volts durante 1 hora, se utilizó 1 μ l de colorante azul de bromofenol para cada muestra, 2 μ l de marcador de peso Lambda DNA/Hind III para 1000 pb los cuales se diluyeron en 3 μ l de agua libre de DNasa y RNasa. Al terminar el proceso de electroforesis, los geles se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotodocumentó (UVP Benchtop Variable Transilluminator M-26V P/N 95-0458-01).

5.13. Genotipificación mediante la técnica VNTR (MLVA)

Para realizar la genotipificación a los aislados de *S. aureus*, se utilizaron los oligonucleótidos propuestos por Pourcel y colaboradores (2009) específicamente los diez pares que describen en el panel 1 expuestos en su trabajo de investigación, los cuales tuvieron un alto poder discriminatorio en muestras clínicas.

Para este procedimiento, se modificaron las condiciones de desnaturalización y alineación hasta obtener mejor amplificación que lo anteriormente reportado. Se utilizó el temociclador iCycler Thermal Cycler de BIO-RAD. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l. La mezcla se conformó de 1 μ l (200 ng) de ADN templado extraído, 2 μ l de oligonucleótidos a una concentración de 25 μ M, 2 μ l de *Taq* polimerasa, 2.5 μ l

de buffer 10X (-MgCl₂), 0.75 µl de MgSO₄ para los oligonucleótidos: Sa0122, Sa0704, Sa2039, Sa0266, Sa1132, Sa1291, Sa1866 y 1.5 µl de MgSO₄ para los oligonucleótidos: Sa0311, Sa1729 y Sa1194 y 0.5 µl de dNTPs a una concentración de 10mM. El proceso de PCR se realizó con tres programas diferentes, en los cuales se modificaron las condiciones de las temperaturas y los tiempos en las etapas de alineación y desnaturalización de acuerdo las condiciones requeridas por cada oligonucleótido, el programa uno (savnr1) para los oligonucleótidos Sa0122, Sa0704, Sa2039 y Sa0266 se inició con una pre-desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación a 60 °C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para el programa dos (savnr2) para los oligonucleótidos Sa1132-Sa1291, se inició con una pre-desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineación a 60 °C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. El programa 3 (savnr3) para los oligonucleótidos Sa1866, Sa0311, Sa1729 y Sa1194 se inició con una pre-desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, alineación a 60°C (Sa1866 y Sa031), a 53°C (Sa1729) y 55.6°C (Sa1194) durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 45 segundos. Finalmente se llevó a cabo una final a 72°C por 10 minutos.

Al finalizar el proceso de amplificación, se analizaron 10 µl de producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa (BIO-RAD) al 2% y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (SIGMA co). La electroforesis se corrió en TAE 1X a 100 volts durante 2 horas y 20 minutos. Se utilizó 1 µl de colorante azul de bromofenol para cada muestra y 4 µl de marcador de peso Bench Top para 100 pb. Al terminar el proceso de electroforesis, el gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y se documentó.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

De 90 cuartos mamarios muestreados se aislaron 27 colonias con las características morfológicas compatibles con *S. aureus*. A las colonias obtenidas se les realizó tinción gram, pruebas bioquímicas y se confirmó la especie por PCR, resultando todas ser *S. aureus* se muestran algunos resultados en la figura 2. Los 27 aislados de *S. aureus* obtenidos correspondieron a 15 vacas, e interesantemente en tres casos se presentó coinfección entre *S. aureus* y otros microorganismos como *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus agnetis* y *Staphylococcus succinus* sbsp. *Casei* y *Klebsiella oxytoca*. Otros 4 animales mostraron infección en la ubre por *Streptococcus dysgalactiae* (2 animales), *Staphylococcus Sciuri* y *Staphylococcus Chromogenes* (1 animal), y *Escherichia coli* (1 animal) sin estar infectados por *S. aureus*. En las 25 vacas restantes no se aisló ningún microorganismo, lo que sugiere que las causas de mastitis en esos animales pudieron haber sido por causas no infecciosas o por algún microorganismo que no crece bien en medio agar sangre como *Mycoplasma bovis*.

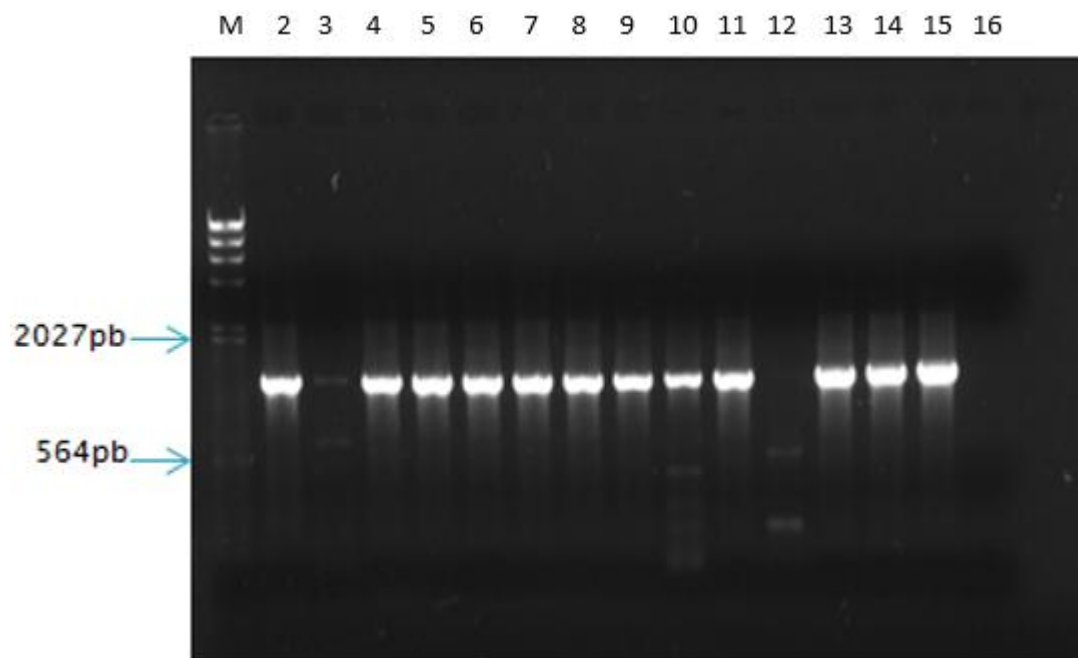


Figura 2. Identificación de *Staphylococcus aureus* mediante PCR.

S. aureus= 1318 pb. M= marcador de peso molecular. Pozos 2-8= aislados de casos de mastitis, 9= control positivo ATCC 33591, 10-15= aislados *S. aureus*, 16= control negativo.

Cuadro 5. Porcentajes de vacas infectadas con *Staphylococcus aureus* y otros microorganismos

Establo	Vacas analizadas	Vacas con <i>Staphylococcus aureus</i>	Otro microorganismo	Coinfecciones	Otras causas
MEXICALI 1	10	2 (20 %)	2 (20%)	0	6 (60%)
MEXICALI 2	15	1 (6.6%)	0	0	14 (93.33%)
TECATE	14	9 (64.28%)	1 (7.14%)	3 (21.42%)	1(7.14%)
ENSENADA	5	0	1 (20%)	0	4 (80%)
TOTAL	44	12 (27.27%)	4 (9.09%)	3 (6.81%)	25(56.81%)

En el cuadro 5 se observa la presencia de *S. aureus* en los diferentes establos muestreados varió desde un 0% para el establo Ensenada hasta un 64.28% para el caso del establo Tecate, esta variación puede deberse al bajo número de muestras obtenidas en cada establo, sin embargo la tendencia parece ser clara en cuanto a que cada establo tiene problemas diferentes, lo cual puede estar asociado al tamaño del hato, condiciones climáticas y a aspectos de higiene y bioseguridad. En el establo Tecate, el 85.7% de las vacas muestreadas se vieron afectadas por *S. aureus* lo que demuestra que este patógeno es muy importante en este hato, siendo necesarias estrategias para controlar su presencia. Para el caso del establo Mexicali 1 el 40% de las vacas se vieron afectadas por agentes patógenos, la mitad de ellas por *S. aureus*, lo que sugiere que existen otras causas importantes de mastitis en ese hato por lo que se ve la necesidad de realizar más muestreos y descartar la presencia de *Mycoplasma bovis*, así como identificar que causas no infecciosas pudieran estar afectando a los animales. Esa tendencia está aún más marcada en el establo Mexicali 2, donde solo se encontró una vaca afectada con *S. aureus* y ningún otro microorganismo por lo que habría que determinar las causas de la

presencia de mastitis en la mayoría de los casos. En el establo Ensenada solo se pudo identificar una vaca afectada por *Escherichia coli*, lo cual se puede deber al bajo número de muestras analizadas, sin embargo el hallazgo es importante, ya que algunas cepas de esta especie son muy peligrosas tanto en animales como en humanos y son una causa de intoxicación alimentaria por consumo de leche.

Del total de vacas muestreadas el 56.86% se vio afectada por mastitis debido a causas que no se pudieron identificar con la metodología llevada a cabo, por lo que se deben llevar a cabo más muestreos con cultivo en diferentes medios y cuestionarios epidemiológicos para poder determinar las causas de todos los casos de mastitis en los hatos muestreados.

Cuadro 6. Resistencia a antibióticos de los aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de casos de mastitis en los establos muestreados.

Establo	Aislados	ERI	AMPI	TRIM-SULF	PEN	CEF	DICLO	PEF
MEXICALI 1	2 (7.4%)	0	0	0	2 (100%)	2 (100%)	0	0
MEXICALI 2	1 (3.7%)	0	1 (100%)	0	1 (100%)	1 (100%)	0	1 (100%)
TECATE	24 (88.9%)	1 (4.1%)	24 (100%)	3 (12.5%)	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	0
TOTAL	27 (100%)	1 (3.7%)	25 (92.6)	3 (11.1%)	27 (100%)	27 (100%)	24 (88.9%)	1 (3.7%)

ERI= eritromicina, AMPI= ampicilina; TRIM-SUL= trimetoprim sulfametoxazol; PEN= penicilina; CEF= ceftazidima; DICLO= dicloxacilina; PEF= pefloxacina.

Una vez aisladas e identificadas las colonias de *S. aureus* se les realizó un antibiograma con el método de difusión en caja como se muestra en el cuadro 6. La resistencia a penicilina y ceftazidima fue la más frecuente, presentándose en el 100% de los aislados, seguida de ampicilina y dicloxacilina para los cuales se presentó en el 92.59% y el 88.88% de los aislados respectivamente.

En el establo Mexicali 1 los dos aislados obtenidos presentaron resistencia a 2 de los 12 antibióticos utilizados, en este caso penicilina y ceftazidima, lo que puede sugerir que el resto de los antibióticos excepto la dicloxacilina a la que muestran resistencia los aislados de este establo, se pueden utilizar para tratar infecciones posteriores. En el establo Mexicali 2 a pesar de solo haberse obtenido un aislado de *S. aureus* se observó que la presencia de resistencia a 4 de los 12 antibióticos utilizados siendo más frecuente en los de la familia de los Betalactámicos (ampicilina, penicilina), uno de la familia de las cefalosporinas (ceftazidima) y otro más de la familia de las quinolonas (pefloxacina), esto sugiere que anteriormente se han utilizado estos antibióticos en ese establo y pone de manifiesto que ya no son efectivos para

tratamientos posteriores. En el establo Tecate se pudo observar una multiresistencia más extendida, ya que se observó en 6 de los 12 antibióticos utilizados en la prueba de susceptibilidad, esto puede ser debido a que en este establo se obtuvieron más aislados de *S. aureus* con respecto a los otros, sin embargo se observó que el total de los aislados obtenidos en este establo son resistentes a la familia de los antibióticos betalactámicos utilizados (ampicilina, penicilina y dicloxacilina) en menor proporción se encontró resistencia a trimetoprim sulfametoxazol y eritromicina con un 12.5 y 4.1% respectivamente.

Las diferencias en cuanto a la resistencia de los aislados obtenidos de diferentes establos, parece deberse al hecho de que los tratamientos para mastitis y otras infecciones, es también muy diferente en cada uno de los establos muestreados, variando desde ningún tratamiento o con productos naturales, hasta un abuso en la utilización de los antibióticos comerciales disponibles, afectando también el hecho de que los antibióticos utilizados para otras afecciones pueden seleccionar microorganismos resistentes en la ubre.

En el presente estudio también se identificaron los aislados que fueron sensibles a los antibióticos probados. La cefuroxima y la tetraciclina fueron los más frecuentes, presentándose en el 100% de los casos, en tanto la sensibilidad a cefalotina, gentamicina y trimetoprim sulfametoxazol se presentó en un 96.2%, 88.88% y el 81.4% respectivamente, como se muestra en el cuadro 7.

El establo Mexicali 1 se observó que los 2 aislados obtenidos son sensibles a 9 de los 12 antibióticos utilizados, lo que sugiere que pueden ser antibióticos de primera elección para tratar los casos de mastitis que se puedan presentar. El caso de la eritromicina no se debe utilizar como antibiótico de primera elección ya que muestra una susceptibilidad intermedia. En el establo Mexicali 2 el aislado obtenido presenta sensibilidad a 5 de los antibióticos utilizados por lo que son los que se pueden utilizar para combatir los problemas de mastitis en este establo. En lo que se refiere al establo Tecate existe una

sensibilidad a 8 de los antibióticos, principalmente a cefuroxima y tetraciclina a los cuales el 100% de los aislados fueron sensibles, siguiendo cefalotina con un 95.83%, gentamicina con un 87.5%, trimetoprim sulfametoxazol con un 79.16%, cefotaxima y pefloxacina 45.83 % y con menor porcentaje está la eritromicina a la cual solo 1 aislado de *S. aureus* fue sensible. Lo anterior muestra que la opción adecuada a utilizar es con los antibióticos de la familia de las tetraciclinas y aminoglucósidos para el control de la mastitis en este establo, aunque siempre será mejor hacer un antibiograma inmediatamente antes del tratamiento para evitar la aplicación errónea de tratamientos.

Cuadro 7. Sensibilidad a antibióticos de los aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de casos de mastitis en los establos muestreados

Establo	Aislados	CEF	ERI	AMP	TRIM. SULFA	CEFO	CEFU	PEFLO	TETRA	GENTA	DICLO
MEXICALI 1	2 (7.4%)	2 (100%)	0	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)
MEXICALI 2	1 (3.7%)	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0	1 (100%)	0	1 (100%)	1 (100%)	0
TECATE	24 (88.9%)	23 (95.83%)	1 (4.1%)	0	19 (79.16%)	11 (45.83%)	24 (100%)	11 (45.83%)	24 (100%)	21 (87.5%)	0
TOTAL	27 (100%)	26 (96.29%)	1 (3.70%)	2 (7.40%)	22 (81.48%)	13 (48.14%)	27 (100%)	13 (48.14%)	27 (100%)	24 (88.88%)	2 (7.40%)

CEF= cefalotina; ERI= eritromicina; AMPI= ampicilina; TRIM-SUL= trimetoprim sulfametoxazol; CEFO= cefotaxima;

CEFU=cefuroxima PEFLO=pefloxacina; TETRA=tetraciclina; GENTA=gentamicina; DICLO= dicloxacilina.

Cuadro 8. Resultados de VNTR de los 27 aislados de *Staphylococcus aureus*.

ESTABLO	NOMBRE DEL OLIGO									
	Sa-0122	Sa-0266	Sa-0311	Sa-0704	Sa-1132	Sa-1194	Sa-1291	Sa-1729	Sa-1866	Sa-2039
MEXICALI 1	NÚMERO DE REPETICIONES									
87	4	5	4	8	2	4	2	2	3	1
MEXICALI 2										
2879*	6	6	3	2	7	7	4	4	3	3
3556	6	6	3	2	7	7	4	4	3	3
TECATE										
1008 B	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1012 A	7	8	3	6	4	5	5	2	3	2
1012 B	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1012 D	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1047 A1	7	8	3	4	3	6	5	2	3	2
1047 B	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1047 C	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1098 A	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1098 B	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1103 B	7	8	3	6	4	5	5	2	3	2
1103 D	7	8	3	6	4	5	5	2	3	2
1111 A	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1111 B	7	8	3	6	3	6	5	2	3	2
1111 D	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1120 B	7	6	3	6	4	6	5	2	3	2
1125 A	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1125 B	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
1125 D	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
5808 A	7	8	3	6	4	5	5	2	3	2
5808 D	7	8	3	10	4	6	4	2	3	2
728 A	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
745 C	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
745 Db	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
988 D	7	8	3	6	4	6	5	2	3	2
ATCC 33591	7	6	3	2	2	3	1	1	3	2

Se llevó a cabo la genotipificación por VNTR (MLVA) de cada uno de los 27 aislados obtenidos para los 10 loci previamente descritos por Pourcel y colaboradores (2009), observándose en el cuadro 8 el número de repeticiones por loci por aislado y en la figura 3 el dendrograma obtenido al analizar los datos de la tabla en el programa Phylip y graficarlos en el programa Treeview.

En total, se lograron identificar 8 cepas diferentes en los tres establos en que se aisló *S. aureus*. Una cepa en el establo Mexicali 1 y otra en el establo Mexicali 2, en tanto se identificaron 6 cepas diferentes en el establo Tecate

Se observó claramente que los aislados de diferentes establos son genotípicamente también diferentes, lo que puede posteriormente ayudar a inferir el origen de nuevos casos de mastitis ya que si un animal presenta una cepa no emparentada con las demás que están circulando en un establo, se puede deber a la entrada de un nuevo genotipo en el establo proveniente ya sea de un trabajador, ganado nuevo, alimento contaminado (Wolter *et al.*, 2004), animales de compañía o fauna silvestre. Así mismo se observó que los diferentes genotipos presentes en el establo Tecate están emparentados entre sí, lo que sugiere que *S. aureus* está presente desde hace mucho tiempo en el establo aumentando su diversidad, pero por otro lado parecen tener todos los aislados un mismo origen, lo que sugiere que la infección por *S. aureus* en el establo ocurrió en principio por una sola cepa que divergió con el tiempo. Lo anterior es muy importante ya que sugiere también que no se han logrado controlar las infecciones por *S. aureus* en hatos de la región, y más aún, solo se ha propiciado la existencia de una mayor resistencia a los antibióticos, por lo que se hacen necesarias nuevas estrategias de prevención y control, así como productos antimicrobianos y servicios de diagnóstico, para disminuir los casos de mastitis por *S. aureus* en la región.

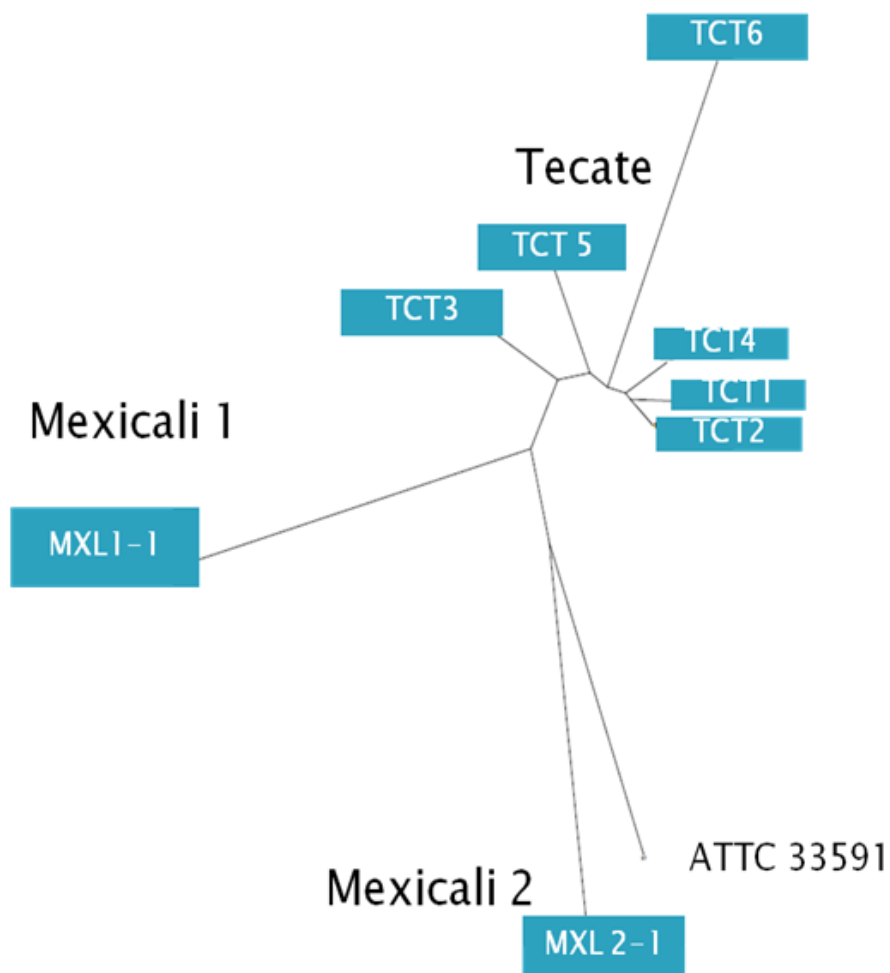


Figura 3. Dendrograma de 27 aislados de *S. aureus* utilizando 10 loci (Sa-0122, Sa-0704, Sa-2039, Sa-0266, Sa-1132, Sa-1291, Sa-1866, Sa-0311, Sa-1729 y Sa-1194). La cepa ATCC 33591 se incluyó como referencia. Se lograron diferenciar 8 cepas diferentes en 3 agrupaciones.

VII. CONCLUSIONES

El patógeno más frecuente encontrado en casos de mastitis en los hatos estudiados fue *Staphylococcus aureus*, por lo que los esfuerzos para controlar la mastitis deben ir dirigidos principalmente contra este patógeno, aunque también es importante mejorar el manejo de los animales en la ordeña para disminuir los casos de mastitis no infecciosa ya que se observaron deficiencias en las prácticas de ordeño de acuerdo a SAGARPA (Manual de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).

Los diferentes patrones de resistencia a antibióticos de los aislados de *S.aureus* obtenidos, dan a conocer que existe una multiresistencia de los mismos, principalmente provocada por el uso inadecuado de antimicrobianos, ya que según información de los mismos establos, éstos se utilizan para diferentes problemas de salud y no solamente como tratamiento sino como preventivo.

Se identificaron 8 cepas diferentes de *S. aureus* en los establos en estudio, las cuales pertenecen a tres grupos genéticos, cada uno perteneciente a diferente establo, lo cual nos indica que una vez presente en un establo, permanece largo tiempo pasándose de animal en animal dentro del mismo establo y divergiendo genéticamente, por lo que es importante llevar a cabo programas de prevención y control tendientes a disminuir y controlar la presencia de *S. aureus* tomando en cuenta la información genética generada.

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que *S. aureus* multirresistente es común en la región y que la diversidad genética es baja dentro de un establo pero alta al comparar diferentes establos, por lo que los tratamientos y las prácticas de manejo deben mejorarse en función de la información generada por este tipo de estudios en cada establo.

VIII. LITERATURA CITADA

- Ablordey A, Hilty M, Stragier P, Swings J y Portaels F. 2005. Comparative nucleotide sequence analysis of polymorphic variable-number tandem-repeat Loci in *Mycobacterium ulcerans*. J Clin Microbiol, 4310:5281-5284.
- Almeida, R. A., Fang, W. y Oliver, S. P. 1999. Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. FEMS Microbiol.Lett. 177, 313-317.
- Barlow, J. W. 2009. Mathematical and molecular epidemiology of subclinical mastitis treatment in lactating dairy cows. Ph.D. dissertation. University of Vermont.
- Bedolla, C. C. 2004. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. No. 41. Febrero Marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp 24-28.
- Blowey, R y Edmondson, P. 1995. Control de la Mastitis en Granjas de Vacuno de Leche. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Borraz, O. C. 2006. Epidemiología de la Resistencia a Meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aislada en Hospitales Españoles. Disponible en: http://tdx.cesca.cat/bitstream/handle/10803/2513/CBO_TESIS_DOCTOR_AL.pdf?sequence=1
- Bortel, M. A., *et al.* 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. Foodborne Pathog. Dis. 7:479-487.
- Bradley, A. J., Leach, K.A, Breen, J. E., Green, L, E. y Green, M. J.2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec. 160:253-258.

- Bradley, J. y Green, M. J. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland Journal of Clinical Microbiology. 39:1845-1849.
- Bubeck, W. J., Patel, R.J., Schneewind, O. 2007. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. Infec Immun 2007; 75:1040–1044
- Cabral, K., Lämmler, C., Zschöck, M., Langoni, H., De Sá, M., Victória, C. y Da Silva, A. 2004. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. Can. J. Microbiol. 50: 901–909.
- Calderwood, S., Moellering, D.Jr. 1988. Principios de tratamiento anti-infeccioso. En: Stein LH. Medicina interna. 2 ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1988: 1469-86.
- Carmona, C. y Gray, G. L. 1987. Nucleotide sequence of the serine protease gene of *Staphylococcus aureus*, strain V8. Nucleic Acids Res. 15: 6757.
- Cassone, M. y A. Giordano. 2009. Resistance genes traveling the microbial internet down the drain, up the food chain? Expert Rev. Anti Infect. Ther. 7:637-639.
- Ceron, M. M., Tonhati, H., Duarte, J., Oliveira, J., Muñoz, B.M., Jurado, G. H. 2002. Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. J. Dairy Sci. 85:2885-2889.
- Chaneton, L. 2010. Buenos Aires, Argentina. Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana. Disponible en:http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4760_Chaneton.pdf
- Correa, M. G. P. y Marin, J. M. 2002. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. Veterinary Microbiology. 85: 125-132.

- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C. y Moroni P., *et al.* 2001. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *Journal of Dairy Science* 2006; 89(1):163-169.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap. 2001. A *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(9):2888-2896.
- Daza, P., R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema de Salud* 1998; 22:57-67.
- De Colsa, R. A. 2011. *Staphylococcus aureus*: De la genómica a la clínica. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* Vol. XXIV Núm. 95
- Delgado Rodríguez A. Los aminoglucósidos. *Rev Acta Méd* 1990;4(2):238-46.
- Dos Santos, J. N., Netto Dos Santos, K.R., Gentiline, E., Sordelli, D., De Freire Bastos, M. C. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 85: 133-144.
- Dávalos, M. M., 1998. Cefalosporinas de tercera generación. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. Vol. 11 N°1-1988.
- Drlica, K y Zhao, X.L. 1997. Dna gyrase, topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 1997, p. 377–392.
- Faría, R. J. F., Valero-Leal, K., D'Pool, G., García, A., Allara, M. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Rev. Científica. FCV-Luz. Maracaibo*. 15 (3): 227-234.

- Farlow, J., Smith, K.L., Wong, J., Abrams, M., Lytle, M. y Keim, P. 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. J. Clin. Microbiol. 39:3186–3192.
- Fernández del Río. 1997. Mastitis. Tema V. Calidad y eficiencia en la producción de leche. Manual de procedimientos para la ordeña. Mexico DF. Virbac Departamento técnico. P.13-18. Mol Biol Rev 1997; 61:377-92.
- Ferraro, L., Scaramelli, A.; Troya, H.1999. Prevalencia de la Mastitis Subclínica Bovina en Venezuela y Evaluación de la Prueba de Mastitis de California (CMT) Prueba Diagnóstica.
- Ferrer, M.M. y Lemis, D.R. 2008. Enfermedades Infecciosas y Resistencia bacteriana en una Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos. Rev Cub Med Int Emerg 2003;2(17-25).
- Frenay, H. M., Theelen, J. P., Schouls, L.M., Vandenbroucke, G. C. M., Verhoef, J., Van Leeuwen, W. J. y Mooi, F.R. 1994. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J. Clin. Microbiol. 32:846–847.
- Frothingham R, Meeker, O.W.A. 1998 Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology; 144 Pt 5:1189-1196.
- Fueyo, M. J.M. 2005. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Disponible en:
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/11092/UOV0004s.pdf;jsessionid=01722B79A5E428C7E6196BDBEE811FE0.tdx2?sequence=1>

- Gascoyne, B.D.M., Barlow, R.E., Frothingham, R., Robinson G., Collyns, T.A., Gelletlie, R. y Hawkey, P.M. 2001. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol*, 391:69-74.
- Gasque. G. R. 2008. Enciclopedia Bovina. Disponible en: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/Indice.pdf
- Gimeno, O. y Ortega, C. 2005. Antibióterapia y salud pública veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos. Disponible en: http://www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/antib_portugal.pdf
- Goh, S. H., Byrne,S.K., Zhang, J.L. y Chow, A.W. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 30:1642–1645.
- Goodman L. y Gilman A. 1990. The pharmacological basis of therapeutics. 8 ed. New York: Pergamon, 1990:1197!1202.
- Gordon, R.J. y Lowy, F.D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46 Suppl 5:S350-9.
- Grissa, I., Bouchon, P., Pourcel, C. y Vergnaud, G. 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90:660–668.
- Guardabassi, I., y Courvalin, L. 2006. Modes and antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Aarestrup, F. (Ed.). ASM. Press. Washington, DC. 1-19 pp. 2006.

- García, R. J.A., García S.E. 1997. Resistencias bacterianas y antibioterapia. En: *Eficacia in vivo, Eficacia in vitro*. Madrid-Barcelona: ed Doyma, S.A., 1997; 39-50.
- Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Tormo-Mas, M. A., Weinert, L. A., Lowder, B. V., Cartwright, R. A., Smyth, D. S., Smyth, C. J., Lindsay, J. A., Gould, K. A., Witney, A., Hinds, J., Bollback, J. P., Rambaut, A., Penades, J. R. y Fitzgerald, J. R. 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol.Evol.* 2, 454-466.
- Haenni, M; et al. 2011. Staphylococcal bovine mastitis in France: enterotoxins, resistance and the human Geraldine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *J. Atimicrob. Chemother.* 66:216-218.
- Hall, S. L., Costerton, J.W y Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology.* 2: 95-108.
- Hallin, M., Friedrich, A.W. y Struelens, M.J. 2009. *spa* typing for epidemiological surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology* Volume 551, 2009, pp 189-202.
- Harmon, R. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Science.* 77.2103-2112. 1994.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothganger, J., Claus, H., Turnwald, D. y Vogel, U. 2003. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by use of novel software for *spa* repeat determination and database management. *J. Clin.Microbiol.* 41:5442-5448.
- Hernández, J. y Bedolla, J. 2008. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET.* 9: 1-34.

- Hernández, P. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO. Fisheries Technical Paper. No.469. Rome. pp. 97.
- Hooper, D.C. 2001. Mechanism of action of antimicrobials: Focus on fluoroquinolones. Clin Infect Dis 2001; 32(Suppl 1):9-15.
- Howe, R.A., Brown, N.M., Spencer, R.C.1996. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. J Clin Pathol 1996; 49:444-9.
- Huchin, C. C. 2009. Instructivo para el procesamiento de muestras del área de Microbiología. Universidad Autónoma de Yucatán. I-FQUI-LAC-07. Disponible en:
http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. y Thein, S. L. 1992. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Bio/Technology 24:467–472.
- Josefsson, E., McCrea K. W., Ni Eidhin, D., O'Connell, D., Cox, J., Hook, M. y Foster, T. J. 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. Microbiology 144:3387– 3395.
- Kanafani, Z.A., Fowler, V.G.2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006; 24:182-93.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska ,A. M., Smith, K. L., Schupp,J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J. y Hugh, J. M. E. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 182:2928–2936.

- Kérouanton, A., Hennekinne, J., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 369-375.
- Kirst, H.A., Sides, G.D. 1983. New directions for macrolide antibiotics: pharmacokinetics and clinical efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;33:1419-22
- Kivaria, F., Noordhuizen, J., Nielen, M. Interpretation of California mastitis test scores using *Staphylococcus aureus* culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dares Salaam region of Tanzania. *Prev. Vet. Medicine.* 78: 274-285. 2007.
- Koskinen M, Holopainen J, Pyörälä S, Bredbacka P, Pitkälä A, Barkema H, et al. 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 2009; 92(3):952-959.
- Leigh, J. A., Field, T. R. y Williams, M. R. 1990. Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defence factors. *Res.Vet.Sci.* 49, 85-87.
- Lindstedt, B. A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26:2567–2582.
- Loeza-Angeles H., López-Meza J.E, Ochoa A. 2010. Efecto del medio condicionado de células endoteliales que expresan el péptido antimicrobiano tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus*. *Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2010; 41(2):36-41.

- Machado, V., Pardo, L. y Seija, V. Genero *Staphylococcus*. In: Departamento de Bacteriología y Virología (Org.). 2008. Temas de bacteriología y virología médica (3 Ed.). Oficina del Libro FEFMUR. p. 305-320. Montevideo, ISBN:9789974312098.
- Machado, V., Pardo, L. y Seija, V. Genero *Staphylococcus*. In: Departamento de Bacteriología y Virología (Org.). 2008. Temas de bacteriología y virología médica (3 Ed.). Oficina del Libro FEFMUR. p. 305-320. Montevideo, ISBN:9789974312098.
- Martin, F.J. y Luas, P. 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites.
- Martin, R.J. 1991. Terapéutica en Pequeños animales. Interamericana McGraw-Hill. Pag. 280.
- Martinez, F. P. Integrones: nueva causa de Resistencia a antibióticos. Rev. Esp. Quimioterapia 1997;10: 191-194.
- Martinez, G., Harel, J., Higgins, R., Lacouture, S., Daignault, D. y Gottschalk, M. 2000. Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates of Bovine and Human Origin by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 38:71-78.
- Máttar, V. S., 2000. Utilidad de la biología molecular en el estudio de las zoonosis. MVZ-CORDOBA 2000; 5:(1), 46-50.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P. y Foster, T. J. 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 11:237-248.

- Medina, R. J. J. 2002. Prevalencia e identificación de agentes etiológicos causantes de mastitis en el Municipio de Vista Hermosa, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México 39-41 y 83.
- Melchior M, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal* 2006; 171(3):398-407.
- Menzies, P. I., Ramanoon, S. Z. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 17(2):333-358.
- Miller G, B. P. 2004. Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *J Am Vet Med Associ.* 2004; 198:227-231.
- Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M. y Foster, T. J. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 30:245–257.
- Nunes, S., Bexiga, R., Cavaco, L. y Vilela, C. 2007. Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 90: 3242-3246.
- O’Flaherty, S., Ross, R. P., Flynn, J., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F. y Coffey, A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. *Letters in Applied Microbiology.* 41: 482–486.
- O’Neill, E., C. Pozzi, P. Houston, D. Smyth, H. Humphreys, D.A. Robinson, A. Loughman, T. J. Foster and J.P. O’Gara. , 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol.* 190:3835-50.

- Oliveira, D., Tomas, A., De Lancastre, H 2001. The evolution of pandemic clones of methicillinresistant *Staphylococcus aureus*: associated *mec* elements. *Microb. Drug Resist.* 7: 349-361.
- Patty, J.M., Jonsson, H., Guss, B., Switalski, L.M. y Wiberg, K. *et al.* 1992. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesion. *J. Biol. Chem.* 267:1766-1772.
- Pérez; Bedolla; Castañeda, VH. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche Sustentabilidad. Vol. II No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco. México. P. 86-94.
- Prat, M, S. 2004. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Instituto de Salud pública de Chile. Disponible en: http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf
- Philpot, N. y Nickerson, S. 1992. Mastitis: el contra ataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Babson Bros Co, Estados Unidos. p 147-234.
- Philpot, N. W.; Nickerson S.C. (1993). Mastitis: El contraataque: Una estrategia para combatir la mastitis. Publicado por Babson Bros. Co., 1992.
- Pitkala, A.; M. Haveri; S. Pyorala; V. Myllys y T. Honkanen-Buzalski. . 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.
- Pourcel, C., Hormigos, K., Onteniente, L., Sakwinska, O., Deurenberg, R. H. y Vergnaud, G. 2009. Improved Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Assay for *Staphylococcus aureus* Genotyping, Providing a Highly Informative Technique Together with Strong Phylogenetic Value. *Journal of Clinical Microbiology.* P. 3121-3128.

Prenafeta, A. 2009. Aspectos generales del biofilm e implicación en la mastitis de rumiantes. Disponible en:

http://www.hipra.com/wps/wcm/connect/353164004520ae0ca3cef3a6a9024696/Capitulo_1y2_C.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=353164004520ae0ca3cef3a6a9024696

Rabello, R.F., Souza, C.R, Duarte, R.S., Lopes, R.M.M., Teixeira, L.M. y Castro, A.C.D. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J. Dairy Sci. 88(9), 3211-3219.

Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. Cell, Vol. 108, 557-572.

Restrepo, J., Ortiz, L., Cardona, X. y Olivera M. 2012. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular del *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis.

Rice, K., Peralta, R., Bast, D., De Azavedo, J. y McGavin, M.J. 2001. Description of *Staphylococcus* serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. Infect. Immun. 69:159–169.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. y Lagacé, J. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 39: 2584-2589.

Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M y Besser, T.E.1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J. Dairy Sci. 77, 3354–3364.

- Roberson, J.R, Lawrence K, Hancock, D.D, Gay, J.M, Besser, T.1996. Prevalence of coagulase positive Staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. AJVR 1996; 57 (Suppl):54-58.
- Romero, A. T. 2004. Situación actual de la mastitis en México. Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. México D. F. pp.122-134.
- Rosas, R. B. (1992). Boletín informativo. Síntesis de investigación clínica. Mastitis y heridas del pezón. Vol. 37. No. 8. pp 15-23
- Sabat A, Krzyszton, R. J, Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J. y Potempa, J.2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol; 414:1801-1804.
- Sabour, P., Gill, J., Lepp, D., Pacan, J., Ahmed, R., Dingwell, R., Leslie, K. 2004. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. J. Clin. Microbiol. 42: 3449-3455.
- SAGARPA. Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Unidades de Producción de Leche. 2010. Disponible en:
<http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=21454&IdUrl=39640>
- Sande, M.A. y Mandel, G.L. 1993. Los aminoglucósidos. En: Las basesfarmacológicas de la terapéutica. 8 ed. Editorial Médica Panamericana. 1993:1065-82.
- Santambrosio, E., Ortega, E. y Garibaldi, P. A. 2009. Tinción y observación de microorganismos. Disponible en: http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf

- Schmitz, F.J., Higgins, P.G., Mayer, S., Fluit, A.C., Dalhoff, A. 2002. Activity of quinolones against Gram-positive cocci: Mechanism of drug action and bacterial resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21:647-59.
- Schukken, Y., Wilson, D., Welcome, F., Garrison, L. y Gonzalez, R. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34: 579-596
- Sharma N, Pandey V, Sudhan, N. 2010. Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2010; 13(2):98-103.
- Sharma N, Pandey V, Sudhan, N. 2010. Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2010; 13(2):98-103.
- Souto, L.I.M., Minagawa, C. Y., Telles, E. O., Garbuglio, M. A., Amaku, M., Melville, P. A. et al. 2010. Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. *Journal of Dairy Research*.2010;77(01):63-70.
- Sumano, L.H.S. y Ocampo, C.L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, pp. 95-189.
- Taroco, R., Seija, V y Vignoli, R. 2008. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Disponible en:
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Tondo, E., Guimarães, M., Henriques, J., Ayub, M. 2000. Assessing and analyzing contamination of dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can. J. Microbiol.* 46: 1108-1114.

- Trovó, T., Lemos, M. y Givisiez, P. 2005. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of human and animal *Staphylococcus aureus* isolated from dairy farms with manual milking. *Vet. Microbiol.* 109: 57-63. 2005.
- Tung,H., Guss, B., Hellman, U., Persson, L., Rubin, K. *et al.*, 2000. A bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*: a member of the staphylococcal Sdr family. *Biochem J.* 345(3):611-619.
- Van Belkum, A., Scherer, S., Van, Alphen, L y Verbrugh, H. 1998. Short sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:275–293
- Varon, E., Janoir, C., Kitzis, M.D. y Gutmann L. 1999. ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:302-6.
- Vergnaud, G. y Pourcel, C. 2009. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *Methods Mol. Biol.* 551:141–158.
- Vila, J., Marti, S. y Sanchez-Cespedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1210-5.
- Waage, S., Sviland, S., Odegaard, S.A. 1988. Identification of risk factors for clinical mastitis in dairy heifers. *J Dairy Sci* 1988; 81: 1275-1284.
- Ward, P. N., Holden, M. T., Leigh, J. A., Lennard, N., Bignell, A., Barron, A., Clark, L., Quail, M. A., Woodward, J., Barrell, B. G., Egan, S. A., Field, T. R., Maskell, D., Kehoe, M., Dowson, C. G., Chanter, N., Whatmore, A. M., Bentley, S. D. y Parkhill, J. 2009. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC. Genomics*, 10,54.

- Wellenberg, G. J., Van Der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, Article 2361, pp. 2-21.
- Werckenthin, Ch., Cardoso, M., Martel, J., Schwarz, S. 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Res.* 32: 341-362. 2001.
- Wilson, D.J., Gonzales, R.N. y Das, H.H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2592-2598.
- Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B. y Zschock, M. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. *Mastitis Bovina*. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16, 62-72.
- Yoneyama, H. y Katsumata, R. 2006. Antibiotic Resistance in Bacteria and its Future for Novel Antibiotic development. 70(5): 1060-1075.
- Zarkower y Scheuchenberger, W.J. 1978. Somatic Cell Count. EE.UU. Cornell. P. 68-40.

ANEXO 1

Extracción de DNA total a partir de colonias de *S. aureus*

- En un tubo eppendorf agregar 180 µl de Buffer de lisis (20 mM de Tris-HCL, Ph 8.0, 2 mM de EDTA, 1.2% Triton X-100 y 200 µg de lysostaphin/ml), colocar la colonia bacteriana utilizando un asa estéril de plástico y mezclar mediante vortex, luego agregar 10 µl de enzima lisostafina (se agrega dentro de la campana y con el mechero apagado).

Nota: en este paso para ahorrar enzima lisostafina se pueden utilizar 5 µl de lisostafina en 100 µl Buffer de lisis y continuar con el siguiente paso, después de incubar agregar 95 µl de agua grado molecular libre de DNasa y RNasa para obtener 200 µl totales y continuar con el protocolo.

- Incubar la mezcla a 37°C durante 1 hora.
- Agregar 20 µl de proteinasa K y 200 µl de Buffer **AL**, mezclar por medio de vortex durante 5 segundos.
- Incubar a 56°C durante 30 minutos.
- Agregar 200 µl de etanol al 96 o 100 % y mezclar por medio de vortex durante 5 segundos.
- Extraer la mezcla y colocarla en una columna y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto y desechar el tubo con el producto obtenido.
- Colocar la columna en un tubo nuevo y agregar 500 µl de Buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto, desechar el tubo con el contenido obtenido.
- Colocar la columna en un tubo nuevo y agregar 500 µl de Buffer AW2 y centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos, este paso se realiza 2 veces para secar bien la membrana de la columna (el producto obtenido se

elimina del tubo de colección y se vuelve a colocar la columna para ser centrifugado de nuevo).

- La columna se pasa a un microtubo y se deja abierta de 2 a 4 minutos para eliminar el etanol.
- Se agregan 150 μ l de agua grado molecular libre de DNasa y RNasa y se deja a incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos, luego se centrifuga a 8000 rpm durante 1 minuto, este paso se realiza 2 veces (se extrae el producto obtenido y se vuelve a colocar en la columna para ser centrifugado de nuevo).