

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León

Escuela de Medicina Veterinaria



Tesis para optar al título de

Licenciatura en Medicina Veterinaria

Resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas en leche de vacas con mastitis subclínica, en fincas que abastecen los centros de acopio de Achuapa y Larreynaga; Septiembre – Noviembre 2011.

Autores

Maryuri Isabel Rivera Varela

Marcos Antonio Tórrez Cáliz

Tutor

Lic. Byron Flores Somarriba. MSc.

Co- Tutor

Dr. Migdonio Quintanilla

León, 02 mayo 2012

“A la libertad por la universidad”



RESUMEN

Entre las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino de leche está la mastitis, patología reconocida mundialmente por causar grandes pérdidas económicas tanto al productor como a la industria. Sin embargo el mal uso y abuso de los fármacos en las granjas lecheras ha contribuido al desarrollo de resistencia antimicrobiana. Este es un estudio descriptivo, de corte transversal, con el objetivo de Determinar la resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas en leche de vacas con mastitis subclínica en las fincas que abastecen a los centros de acopio de los municipios de Achuapa y Larreynaga, a través del método de difusión en agar Kirby Bauer. Se aisló *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) en un 57.5%, *Staphylococcus aureus* en un 25%, *Streptococcus* spp y *Pseudomonas* spp en un 7.5% *E.coli* en un 2.5%. Se encontró que las bacterias aisladas presentaron resistencia a la Vancomicina en 80.6%, seguido de la Eritromicina 77.8%, Oxitetraciclina con un 28.2%, Cefalexina y Amoxicilina/Ác. Clavulánico. 23.1% Ciprofloxacina 20.8%, Enrofloxacin 20.5% y la Gentamicina 0%. La presencia de estos agentes en ambos municipios fue variable teniendo en común *S. aureus* y SCN. Las bacterias encontradas mostraron mayor resistencia a Vancomicina y Eritromicina. No presentaron resistencia a Gentamicina. El monitoreo de la resistencia por sí solo no provee la información necesaria para una intervención bien dirigida hacia el control de este problema, ya que deben considerarse además las interrelaciones con el ambiente interno del hospedero.



AGRADECIMIENTO

A Dios por acompañarnos todos los días y en cada momento.

A nuestros padres por ser nuestros mejores amigos, aliados, nuestro ejemplo, gracias por su apoyo en todo este tiempo.

A nuestros profesores y tutor por su infinita paciencia, por su inagotable apoyo, gracias por compartir su sabiduría.



ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
II. JUSTIFICACIÓN	8
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
IV. OBJETIVOS	10
V. MARCO TEÓRICO	11
VI. DISEÑO METODOLÓGICO	46
VII. RESULTADOS	51
VIII. DISCUSIÓN	52
IX. CONCLUSIÓN	55
X. RECOMENDACIONES	56
XI. REFERENCIAS	57
XII. ANEXOS	65



I. INTRODUCCIÓN

La producción de leche reviste una gran importancia a nivel de fincas e industrias, es un alimento vital para la población más vulnerable y genera divisas al país. Los alimentos son necesarios para producir energía, para el trabajo muscular y para construir y reparar el organismo. Una dieta completa proporciona todos los nutrientes necesarios para estos fines. Se ha visto que la leche es un alimento casi completo en sí misma, puesto que contiene tanto elementos nutritivos energéticos (grasa e hidratos de carbono) así como elementos nutritivos plásticos (proteínas y minerales) y también cantidades adecuadas de casi todas las vitaminas necesarias para el funcionamiento correcto de los procesos bioquímicos que se producen en nuestro organismo y que son esenciales para la vida.¹

Entre las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino de leche está la mastitis, patología reconocida mundialmente por causar grandes pérdidas económicas tanto al productor como a la industria.²

Si bien existen numerosos factores que influyen en la presentación de la mastitis, estos responden principalmente a causas traumáticas o a la infección por microorganismos patógenos, entre los cuales algunas especies bacterianas juegan un rol particularmente importante.³

Considerando este último aspecto, la terapia de la mastitis clínica se focaliza fundamentalmente en la eliminación del agente infeccioso, utilizando como primera herramienta terapéutica los antimicrobianos; Sin embargo, aunque los antimicrobianos representan el 45% de la venta total de fármacos utilizados en animales de producción, existe escasa información sobre los patrones de sensibilidad en medicina veterinaria, incluyendo la mastitis.³

En un estudio realizado por Peralta y col. en el municipio de León, 2007, refleja que se aisló 77.90% *S. aureus*, 4.42% *S. Epidermis*, 3.87% *Streptococcus α-hemolítico*, 4.42% *Streptococcus B-hemolítico* del grupo "A", 8.29% *Tétradas*, 0.55%



Enterobacter y 0.55% *Pseudomona*. Solo se determinó la sensibilidad a *S. aureus*, siendo resistente a Vancomicina en un 7.21%, Eritromicina 4.85%, Gentamicina 4.72% y Ciprofloxacina en un 4.82%.⁴

Se realizó un estudio en 3 municipios del estado de Michoacán por Patiño N; en donde refleja que el *Staphylococcus aureus* presentó una resistencia de 34% para Eritromicina, 3.5% Gentamicina y 36% a la Penicilina.⁵

Un estudio realizado en 4 granjas del departamento de León-Nicaragua por Zeledón y col; aislaron *S. aureus*, *Staphylococcus Coagulosa* Negativo, *Streptococcus spp* y *E.coli* proveniente de leche bovina, solo determinaron la sensibilidad a *E. coli* y *S. aureus*. Se encontró que el *Staphylococcus aureus* presentó una resistencia a la penicilina en un 15%, Eritromicina 8% y a la Gentamicina un 2% y la *E. coli* presentó 100% de resistencia a la Penicilina, Eritromicina y Gentamicina.⁶

Una investigación realizada por Florentin C. en un laboratorio de micología y bacteriología de Paraguay, reveló que el *Staphylococcus coagulasa negativo* mostró una resistencia frente a la penicilina del 70% y 19% a Gentamicina, en cambio el *Streptococcus agalactiae* presentó una resistencia de 64% a Penicilina y 20% a la Gentamicina, mientras que la *E. coli*, fue de 7% para ambos antibióticos.⁷

La resistencia bacteriana es variable de una zona otra, como sucedió en un estudio de dos regiones de Chile, en donde el *Staphylococcus aureus* presentó una resistencia de 13.9% y 1.3% frente a Enrofloxacin, Gentamicina 20% y 1.4%, Oxitetraciclina 16.9% y 5.7%, Penicilina 50.8% y 26.7%. El *Staphylococcus coagulasa negativo* 22.5% y 0.4% a Enrofloxacin, 15% y 3% a Gentamicina, 3.5% y 3.7% a Oxitetraciclina, 30% y 30.3% a Penicilina. El *Streptococcus spp* mostró una resistencia frente a Enrofloxacin de 37.1% y 38.5%, Oxitetraciclina 29.2% y 26.2%, Penicilina 45.1% y 30%. La *E. coli* 21.9% y 21.9% a Enrofloxacin, 18% y 7.5 a Gentamicina, 24.2% y 7.5% a Penicilina.³



Normalmente no se realiza aislamiento ni evaluación por antibiograma del agente causal de la infección intramamaria.⁸ Esto, sumado al hecho de que la elección y suministro del fármaco muchas veces está en manos de una persona que no es el médico veterinario, puede hacer variar la sensibilidad bacteriana así como la recurrencia de presentación de los microorganismos asociados a esta patología.^{9, 10} Esta resistencia trae como consecuencia dos aspectos importantes: el primero, una disminución en la respuesta al tratamiento en caso de mastitis clínica y el segundo, la transmisión de bacterias resistentes a los consumidores a través de la cadena alimentaria, más aún cuando se consumen productos elaborados a partir de leche cruda.¹¹ Para seleccionar adecuadamente un antimicrobiano, el médico veterinario no sólo necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también su sensibilidad a los antibióticos. Dentro de los más utilizados en la mastitis clínica, tanto en el ámbito internacional como nacional están los β -lactámicos, Tetraciclinas, Macrólidos, Aminoglucósidos y Sulfonamidas, sin embargo, el indiscriminado uso de estos fármacos a través de los años, ha inducido la aparición de microorganismos patógenos multi-resistentes, ocasionando, en algunos casos, fracaso terapéutico que puede incluso causar la muerte del animal.¹²



II. JUSTIFICACIÓN

La aplicación de terapia antimicrobiana obliga a seguir los principios de un uso prudente de antibióticos que es propuesta por varias organizaciones científicas. Al aplicar un producto controlado y eficaz para el tratamiento de la mastitis, deben de ser considerados diferentes factores como: el tipo de patógeno involucrado, susceptibilidad al antibiótico, severidad de la respuesta inflamatoria, duración de la infección, estadio de la infección y edad de la vaca.

Sin embargo el mal uso y abuso de los fármacos en las granjas lecheras para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la mastitis, ha llevado a que se establezca una alta presión de selección por parte de los microorganismos contagiosos hacia los antibióticos.

Con este trabajo se pretende conocer los agentes implicados en la mastitis, así como determinar la resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas en leche de vacas con esta patología en las fincas que abastecen a los centros de acopio de los municipios de Achuapa y Larreynaga. Los resultados obtenidos pueden ser utilizados para una adecuada selección de antimicrobianos, mejorar el rendimiento productivo del hato ganadero, proporcionar alimentos sanos a la población y como base a futuros estudios.



III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas en leche de vacas con mastitis subclínica, en fincas que abastecen a los centros de acopio de Achuapa y Larreynaga?



IV. OBJETIVOS

General

- ✓ Determinar la resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas en leche de vacas con mastitis subclínica, en fincas que abastecen a los centros de acopio de Achiapa y Larreynaga.

Específicos.

- ✓ Identificar las bacterias más frecuentes en mastitis subclínica bovina en las fincas que abastecen a los centros de acopio.
- ✓ Detectar la resistencia de las bacterias causantes de mastitis subclínica bovina.



V. MARCO TEÓRICO

1. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria.

La ubre representa un conjunto de 4 glándulas de origen dérmico, considerada como una glándula sudorípara modificada y cubierta externamente por una piel suave al tacto, provista de vellos finos excepto en los pezones.¹³

Cada cuarto consiste en un tejido secretor que produce leche que se conoce como alvéolo, dos áreas de almacenamiento denominadas cisternas y un pezón. Un componente importante del pezón es el “canal de Streak” un tejido muscular grueso que está protegido con sustancias antibacteriales y cierra el pezón cuando no se está extrayendo leche. Cada cuarto es independiente y está separado de los otros por ligamentos gruesos.¹³

La mayor parte de la ubre está compuesta de alvéolos y la leche se almacena en las siguientes proporciones: 60% en los alvéolos, 20% en los conductos y 20% en la cisterna. Las células que cubren el alvéolo son las que producen la leche; al llenarse el alvéolo con leche la presión en las células epiteliales aumenta y la producción de leche se hace más lenta. Las arterias que suministran los nutrientes para la producción de leche corresponden a cada alvéolo. Se estima que cada ml de leche requiere entre 500 y 100 ml de sangre circulando por la ubre y 8% del volumen total de la vaca lechera está presente en la ubre. Células del músculo rodean al alvéolo, denominadas “mioepiteliales”. Para extraer leche, los músculos alrededor del alvéolo se deben contraer para mover la leche hacia los conductos y cisternas, proceso denominado bajada de la leche. Este proceso es iniciado por el entorno y el estímulo físico que activa una serie de eventos hormonales. El estímulo positivo envía señales a la glándula pituitaria para producir oxitocina. La oxitocina viaja a la ubre por el torrente sanguíneo y hace que las células mioepiteliales alrededor del alvéolo se contraigan y muevan la leche hacia el conducto y sistema de cisterna donde puede ser extraída mediante el proceso de ordeño.¹³



2. Inmunidad de la glándula mamaria

La glándula mamaria cuenta con una batería de elementos para la defensa contra la entrada y proliferación de los distintos patógenos. El pronunciado aumento en la sensibilidad a mastitis que se observa en el parto y al inicio del secado ha sido asociado a deficiencias en la función de estos elementos. La primer línea de defensa, y quizás la más importante, es de tipo anatómico y consiste en el esfínter del pezón que se cierra estrechamente en el periodo entre ordeño. Un impedimento en la función de este esfínter ha sido asociado a una mayor susceptibilidad a las infecciones. A su vez, el canal del pezón está revestido internamente por queratina, que es capaz de retener mediante interacciones electrostáticas a las bacterias que están ingresando en la ubre.¹⁴

En esta capa de queratina se encuentran también proteínas y lípidos con capacidad bacteriostática. Al finalizar la lactancia, durante el secado, esta queratina forma un tapón que ocluye el canal del pezón. Problemas en la formación de este tapón han sido vinculados a mayor riesgo de infección. De hecho, y como se menciona más arriba, se cree que la apertura parcial del esfínter debido al aumento de la presión en la cisterna de la glándula, que se produce en los días previos al parto y en los primeros días de involución, es una de las principales causas de la alta tasa de infección registrada en estos periodos.¹⁴

Una vez que un patógeno logra atravesar el esfínter del pezón, se encontrará con factores celulares y solubles de la inmunidad innata y adaptativa. Estos dos tipos de inmunidad, que comparten elementos efectoros y colaboran estrechamente en la defensa de la glándula mamaria, difieren fundamentalmente en la forma de reconocer la entrada de agentes patógenos. La inmunidad innata es la primera en activarse frente a la entrada de elementos extraños y ha evolucionado para reconocer patrones moleculares típicos de patógenos (PAMPs) como lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteicoico (LTA) o péptidoglicano, a través de receptores tipo Toll en la membrana de macrófagos y células epiteliales. Cuando los PAMPs de un patógeno



que ha logrado penetrar en la glándula mamaria son reconocidos, se inducirá la síntesis de citoquinas pro inflamatoria como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleuquina 1 β (IL-1 β).¹⁴

Estas citoquinas promoverán a su vez la migración de neutrófilos del torrente sanguíneo al lumen de la glándula mamaria. Los neutrófilos constituyen unos de los principales efectores de la inmunidad de glándula mamaria bovina y son capaces de fagocitar y ejercer actividad citotóxica mediante shock respiratorio sobre las bacterias invasoras. En una glándula mamaria sana los macrófagos constituyen el tipo celular predominante; su función es fagocitar elementos extraños, presentarlos a células de la inmunidad adaptativa y, como ya se ha mencionado, secretar citoquinas que activarán la migración de neutrófilos. Se cree que la severidad de la mastitis está por lo menos en parte influenciada por la velocidad de reclutamiento de estos neutrófilo.

14

Durante el parto, la actividad de los neutrófilos reclutados se encuentra parcialmente impedida lo que ha sido asociado con la susceptibilidad aumentada de la glándula mamaria en este periodo. Varios trabajos han vinculado la inmunosupresión que se observa en el parto con una menor actividad de neutrófilos. A su vez este impedimento ha sido asociado a cambios en la expresión génicas de estas células producto de las alteraciones endocrinas propias del parto. Otros autores han vinculado el balance energético negativo que se produce en el parto con la disminución en la función de estas células. Por otro lado, se ha propuesto que el descenso en los niveles del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF 1) reduce el tiempo de vida de los neutrófilos y gatilla una disminución en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias con el consecuente impedimento en la resolución de la infección.¹⁴

Además de estos factores celulares, la inmunidad innata cuenta con elementos solubles como defensinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa y factores del complemento que son capaces de opsonizar o atacar directamente a los patógenos



invasores. La inmunidad innata no genera memoria; es decir, no produce respuesta aumentada por exposición repetida al mismo patógeno. Pese a ser activada en conjunto con la respuesta innata, la inmunidad adaptativa constituye una segunda línea de defensa frente a la infección y será relevante cuando la inmunidad innata haya sido sobrepasada. A diferencia de la innata, la respuesta adaptativa no reconoce características típicas de patógenos sino que es capaz de diferenciar lo propio de lo no propio.¹⁴

La inmunidad adaptativa genera memoria, es decir, provee una respuesta aumentada frente al encuentro repetido con un antígeno determinado. Es ésta la respuesta que se busca aumentar cuando se utilizan vacunas contra patógenos de mastitis. Entre sus elementos efectores celulares de la inmunidad adaptativa se encuentran los linfocitos B y T y los macrófagos, siendo inmunoglobulinas y citoquinas los principales componentes solubles de este tipo de respuesta. Como ya se ha dicho, ambos tipos de inmunidad están estrechamente relacionados y comparten mecanismos efectores y activadores. De hecho la inmunidad innata es fundamental para que la inmunidad adaptativa se active adecuadamente y ésta a su vez complementa la función de la respuesta innata.¹⁴

Muchos patógenos de la glándula mamaria bovina han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta de la glándula mamaria a la infección. Entre ellos, se cuentan la producción de cápsula de polisacárido, la adherencia e internalización en las células epiteliales de la mama y la producción de super-antígenos.¹⁴

3. Aspectos Históricos

Desde el aparecimiento del hombre sobre el planeta, su mayor problema ha sido asegurar los alimentos en suficientes y adecuadas cantidades para satisfacer las necesidades nutricionales de la familia.¹⁵

Hoy en día, a nivel mundial no se cuenta con los suficientes alimentos que satisfagan los requerimientos diarios, con un alto valor nutritivo como es la leche.¹⁵



Esto indica que la humanidad está en constante lucha por producir enormes cantidades de alimentos, a fin de satisfacer las necesidades del consumo diario de la creciente población. ¹⁵

Tomando en cuenta que los productos y subproductos de la leche son uno de los principales alimentos de consumo a nivel mundial, son utilizados como materia prima para la elaboración de una gran variedad de productos en la industria alimenticia. Muchos son los factores que impiden el desarrollo normal de las explotaciones lecheras, ya sean estos de tipo ambientales, de manejo e instalaciones, pero sin duda alguna, las enfermedades en las glándulas mamarias son las que impiden obtener una mayor producción y calidad de leche donde la principal es la Mastitis. ¹⁵

Según datos históricos la mastitis ha sido reconocida como tal desde que el hombre domesticó la vaca, en los miles de años siguientes y a pesar de los avances científicos, la enfermedad permanece en muchos hatos lecheros, de hecho se estima que un tercio de todas las vacas lecheras están infectadas de cualquier forma de mastitis en uno o más cuartos. ¹⁵

La mastitis existe alrededor del mundo donde quiera que existan vacas y la presencia continua de esta enfermedad puede atribuirse a la deficiencia en el manejo de los hatos. ¹⁵

4. Definición de mastitis

El término mastitis se deriva de las palabras griegas “mastos”, que significa “pechos” e “itis” que quiere decir “inflamación de”. La inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche en la ubre a una lesión traumática o la presencia de microorganismos infecciosos que han ingresado a la ubre. ¹⁵

La Federación Internacional de Lechería (1999), define a la mastitis bovina como una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria, que tiene por objetivo la eliminación del agente patógeno y la restauración de la funcionalidad del órgano. ¹⁶



4.1. Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas de la leche. Un conteo elevado de células en la leche indica mastitis subclínica.¹⁷ Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o la ubre. Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche, composición alterada de la leche y la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche.¹⁸

Cuando los signos no son visibles, la presencia de patógenos y las modificaciones citológicas de la leche traen como resultado una mastitis subclínica.¹⁹ Por lo que las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico son necesarias para detectar inflamación e infección.²⁰

El contenido de células somáticas se designa a las células del propio organismo, estas pasan a la leche procedente de la sangre y del tejido glandular. El conteo de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con su composición de la leche.²¹

La leche de una ubre sana presenta pocas células somáticas, en este caso se trata de células de tejido epitelial y células inmunes, (neutrófilos polimorfonucleares, granulocitos, macrófagos, linfocitos) la importancia biológica de las células somáticas es que participan en la defensa de la ubre, cuando hay estímulos o enfermedades de la glándula mamaria, aumenta considerablemente el número de células somáticas.²¹

La mastitis, particularmente subclínica y crónica, es la más persistente y más amplia del grupo de enfermedades de importancia por la higiene de la leche en el ganado lechero.²²



La mastitis subclínica ocurre frecuentemente y puede conducir a grandes pérdidas económicas debido al reducido rendimiento de leche, y multa a causa de los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche.²³

5. Agentes etiológicos

La distribución de los patógenos que producen mastitis pueden ser diferentes entre los dos tipos arriba descritos, puesto que en los casos clínicos la etiología puede ser por bacterias que están presentes solamente por un corto periodo de tiempo, naturalmente desencadenando claros signos clínicos, ej. *Escherichia coli*. Por el contrario, las mastitis subclínicas pueden ser causadas por patógenos que pueden estar presentes por largos periodos de tiempo y solamente produciendo leves signos en la ubre, ej. *Staphylococcus aureus*. Pero considerando básicamente la etiología, las mastitis contagiosas son producidas por microorganismos cuyo hábitat principal es el canal del pezón o la piel externa del mismo, de forma que los contagios se producen fundamentalmente durante el ordeño, así en este caso destacando bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*.²⁴

Las mastitis ambientales son aquellas que se producen por gérmenes cuyo hábitat es el medio ambiente que rodea a los animales, de forma que el contagio se produce fundamentalmente en el periodo entre los ordeños aunque después puedan comportarse también como contagiosas durante el ordeño, estos microorganismos considerados ambientales son por ejemplo coliformes (*E.coli*).²⁴

5.1. Agentes contagiosos

Los patógenos contagiosos también son nombrados por su habilidad para propagarse entre los cuartos de la vaca durante el proceso del ordeño.²⁵

Los patógenos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp*, y *Mycoplasma spp*.^{19, 26, 27}



Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, donde el reservorio primario que alberga los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre²⁷ y la exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso del ordeño.^{25, 28, 29}

Los patógenos contagiosos de la mastitis como el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son infecciosos a nivel individual y a nivel de población han sido reportados bajo control en los hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de las tetas después del ordeño, terapia de la vaca seca, desecho, mantenimiento del equipo de ordeño, y terapia antibiótica de las infecciones intramamarias.^{27, 29}

→ ***Staphylococcus aureus***

S. aureus es a nivel mundial el agente patógeno contagioso más importante asociado con la glándula mamaria, que causa la mastitis.³⁰ Este término se traduce como: staphylo = racimo, coccus = esferas y aureus = doradas. O sea un racimo dorado de esferas.³¹ Es un coco Gram positivo, inmóvil, posee un diámetro 0.5-1 μm , aerobio y anaerobio facultativo, catalasa positivo.³²

Estas bacterias no suelen encontrarse sobre la piel sana del pezón, pero sí colonizan y crecen muy bien en la queratina del canal del pezón. Los pezones cuarteados que terminan lesionándose favorecen la colonización. Esta es una ubicación ideal para infectar la ubre y es transmitida a cuartos sanos por medio de las pezoneras, los paños para limpiar la ubre y las manos del ordeñador. Las bacterias de los cuartos infectados también pueden ingresar a los cuartos sanos por medio del impacto de microgotas originado en las pezoneras u otras caídas de vacío. Una vez que ésta bacteria infecta, se genera una inflamación crónica con un elevado recuento de células somáticas.³¹

Se detectan áreas firmes fibróticas del tejido cicatrizal al palpar el cuarto. La mayoría de las veces la infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* son de naturaleza subclínica con interrupciones periódicas de síntomas clínicos en las que se observan



la hinchazón moderada, y grumos en el despunte. Las infecciones crónicas son extremadamente difíciles de erradicar con antibióticos por el tejido cicatrizal que se desarrolla en muchos lugares impidiendo la distribución del mismo en el cuarto infectado. En consecuencia, los antibióticos no entran en contacto con las bacterias, la infección permanece y la vaca debe ser eliminada para evitar el contagio con otros animales.³¹

En los casos clínicos agudos, los cuartos generalmente están calientes e hinchados, y la temperatura asciende de 39,4 a 41,1°C. Algunas infecciones se vuelven gangrenosas. Los cuartos afectados están fríos al tacto por la falta de irrigación de sangre.³¹

En algunos hatos *Staphylococcus aureus* causa infecciones intramamaria en terneras, que se vuelven crónicas y persisten en la parición. Por eso las vaquillas pueden ser una fuente de contagio de esta mastitis, cuando pasan a formar parte del hato lechero.³¹

→ ***Streptococcus agalactiae***

El término *Streptococcus agalactiae* deriva del latín y su significado puede traducirse literalmente como: *strepto* = cadenas, *coccus* = esferas y *agalactiae* = sin leche. O sea una cadena de esferas que reduce la producción de leche.³¹

Streptococcus agalactiae, o *Streptococcus β-hemolítico* del grupo B (EGB), es un coco grampositivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. El EGB puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su crecimiento. Tras 18-24 hrs de incubación en agar sangre, las colonias son de unos 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de β-hemólisis, aunque existen algunas cepas no hemolíticas. El empleo de medios selectivos favorece la recuperación del EGB.³³

El único reservorio de *Streptococcus agalactiae* es la leche de un cuarto mamario infectado. Pueden encontrarse en las superficies que tuvieron contacto reciente con



la leche contaminada como, por ejemplo: la máquina de ordeño, las manos del ordeñador y la cama.³¹

Estas bacterias son vertidas del cuarto infectado a la leche en gran cantidad. Se ha documentado que un solo cuarto infectado de una vaca en un hato de 100 animales puede elevar el recuento bacteriano del tanque frío a más de 100.000/ml.³¹

La transmisión a cuartos sanos sucede principalmente durante el ordeño. Si la higiene de la ubre es insuficiente y las medidas de control inefectivas, puede dispersarse por todo el hato. El ordeño incompleto de cuartos infectados aumenta la severidad de esta mastitis, porque queda una gran cantidad de bacterias en el cuarto infectado, que luego contagiarán a otras vacas. Como signo clínico se observa el cambio en el color de la leche. Las infecciones subclínicas pueden volverse crónicas si el tratamiento con antibióticos falla, quedando los cuartos no funcionales o ciego.³¹

5.2. Agentes ambientales

Las bacterias responsables de la mastitis bovina también pueden ser clasificadas en ambientales (*Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*).²⁶

Los patógenos principales son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp*.^{27, 29}

Los organismos ambientales causantes de la mastitis se originan en el ambiente y su control es realizado mejor disminuyendo la exposición de los pezones a los organismos. Esto significa mantener a las vacas en un ambiente tan limpio como sea posible. Las infecciones con estos organismos son más altas en hatos en confinamiento que los que se encuentran en pastoreo, cuando existen condiciones sucias y durante los meses de verano.³⁴

El 40 % de los *Streptococcus* ambientales persistirán menos de 8 días, el 62 % persistirá menos de 10 días, y solo 18 % tendrán una duración de más de 100 días,



el 66 % se volverán clínicos, y el 50 % de todas las infecciones sucederán en el periodo seco.³⁴

La mastitis por coliformes es también de origen ambiental, algunas de las realidades relacionadas con la enfermedad son: 50 % de las infecciones tendrán una duración de 10 días, 70 % persistirán menos de 30 días, solo el 2 % persistirá por más de 100 días, el 90 % de las infecciones se volverán clínicas, y el 10 % causaran una mastitis hiperaguda. Las infecciones con *Escherichia coli* raras veces se vuelven crónicas.³⁴

→ ***Escherichia coli***

La Mastitis causada por este patógeno es sobre todo la principal enfermedad en las vacas lecheras.³⁵

E. coli es un bacilo corto facultativo, móvil y Gram negativo. Se distinguen varios serotipos de *Escherichia coli*; en base a la presencia de antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (F). Este patógeno habita el tracto intestinal de los animales y el hombre.³⁶

Entre el 80% y el 90% de las infecciones causadas por *E. coli* produce grados distintos de mastitis clínica en las vacas en lactación; aproximadamente, entre 8 y el 10% de las infecciones por este patógeno produce mastitis fulminante, normalmente unos días después del parto.³⁷

Los signos en la forma aguda son: hinchazón de las glándulas mamarias, leche acuosa con copos pequeños, respuesta sistémica leve, recuperación en pocos días.³⁷

Los signos en la forma fulminante son: aparición repentina de toxemia grave, fiebre, taquicardia, shock inminente; las vacas afectadas pueden permanecer en decúbito. Los cuartos pueden estar o no hinchados y calientes, las secreciones son líquidas y serosas, contienen copos pequeños. Las vacas pueden morir en pocos días.³⁷



→ ***Mycoplasma spp.***

Los *Mycoplasmas spp* son las bacterias más pequeñas de vida libre. Su tamaño va de 0.2 – 0.8 micrómetros, por lo cual pueden atravesar algunos filtros utilizados para la eliminación de bacterias. Además poseen el genoma con el tamaño más pequeño y como un resultado, han sufrido la pérdida de algunas rutas metabólicas, por lo que se requiere de un medio complejo para su aislamiento. El *Mycoplasma spp* es un anaerobio facultativo, excepto *M. pneumoniae*, el cual es un aerobio estricto. Una característica típica que distingue a los *Mycoplasma spp* de otras bacterias, es la falta de la pared celular. Así, ellos pueden asumir múltiples formas incluyendo formas redondas, en forma de pera e incluso la forma filamentosa.³⁸

La mastitis causada por *Mycoplasma spp* es rara, sin embargo, es altamente contagiosa y provoca una caída de la producción de leche grave. Vacas diagnosticadas con mastitis por *Mycoplasma spp* no responden bien al tratamiento tradicional y a los métodos de control, a menudo las tasas de sacrificio de las vacas infectadas son altos.³⁹

→ ***Pseudomonas aeruginosa.***

P. aeruginosa, está generalizada en el medio ambiente de las vacas lecheras, ya que requiere pocos nutrientes para crecer y multiplicarse. Los suministros de agua de todo tipo (pozos, abrevaderos, estanques, sala de lavar las mangueras, rociadores y corrales), pezones contaminados y equipo de infusión, son las principales fuentes de *P. aeruginosa* en las granjas lecheras. También se ha aislado de residuos de alimentos, suelos, estiércol y la piel del animal. La presencia de viviendas insalubres y las condiciones de las camas puede contribuir a los brotes de infecciones ocasionales por *P. aeruginosa*.⁴⁰



6. Patogenia de mastitis

Desarrollo de la enfermedad

Las infecciones comienzan cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican en la glándula mamaria¹.

Invasión del pezón

El pezón, en sí, es la primera línea de defensa contra la penetración de bacteria dentro de la ubre. Normalmente, el esfínter cierra el canal del pezón fuertemente cuando la vaca no es ordeñada. La invasión del pezón se presenta generalmente durante el ordeño. Los organismos presentes en la leche o en la punta del pezón son impulsados dentro del canal del pezón y de la cisterna cuando existe la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño (desprendimiento o pérdidas de la unidad o remoción de la pezonera sin haber antes cerrado el vacío). Luego del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal del pezón dañado puede permanecer parcialmente o permanentemente abierto. Los organismos del ambiente o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel en la punta del pezón, pueden invadir fácilmente y abrir total o parcialmente el canal¹.

Establecimiento de la infección e inflamación de la ubre dañada

Algunas bacterias pueden avanzar dentro de la ubre atacando y colonizando nuevos tejidos; otras pueden moverse por medio de la corriente de leche producida por el movimiento de la vaca. Las bacterias dañan primero los tejidos que recubren los grandes tubos colectores de leche. Las bacterias pueden enfrentarse con leucocitos (células blancas de la leche) presentes naturalmente en bajas cantidades en la leche. Estas células son la segunda barrera de defensa debido a que pueden englobar y



destruir a las bacterias. Aún así, durante este proceso, los leucocitos liberan sustancias que atraen a más leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la leche¹.

Si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares. Las células secretoras de leche que son dañadas por las toxinas, liberan sustancias irritantes que conducen a un incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Leucocitos adicionales se mueven al lugar de la infección. Ellos penetran el tejido alveolar en gran medida moviéndose entre el tejido secretor de leche dañado. Fluidos, minerales y factores de coagulación también se mueven dentro del área infectada. La leche coagulada también puede cerrar conductos y, en efecto, aislar las regiones infectadas¹.

Destrucción del tejido alveolar

Algunas veces los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se aclara. En este caso, los conductos tapados se abren y la composición y producción de leche retorna a la normal en varios días. Aún así, a medida que la infección persiste y los conductos se mantienen tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras pasen a una etapa de descanso (sin producir) y el alveolo comienza a reducir su tamaño. Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo y cicatriza. La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la tercera línea de defensa de la vaca para mantener a la infección bajo control.⁴²



7. Diagnóstico

7.1. Diagnóstico de campo para mastitis subclínica bovina.

Californian Mastitis Test (CMT)

Esta prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilaurilsulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina.⁴³

A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de gel, traduciéndose en la lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base a la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes, permitiendo evaluar cada cuarto independientemente.⁴³

Interpretación del CMT^{44, 45}

Negativo 0: El estado de la solución permanece inalterado. La mezcla sigue en estado líquido. El 25% de las células son leucocitos polimorfonucleares, (Cuarto Sano).

Trazas: Se forma un precipitado en el piso de la paleta que desaparece pronto, 30% son leucocitos polimorfonucleares, (Mastitis Subclínica)

1 (+): Hay mayor precipitado pero no se forma gel, 30 a 40% son leucocitos polimorfonucleares, (Mastitis Subclínica)

2 (++) : El precipitado se torna denso y se concentra en el centro, un 40 a 70% son leucocitos polimorfonucleares, (Infección Seria)

3 (+++) : Se forma un gel muy denso que se adhiere a la paleta. De un 70 al 80% son leucocitos polimorfonucleares, (Infección Seria)



7.2. Diagnóstico Laboratorial

Método de difusión Kirby Bauer ⁴⁶

Una vez que se han aislado colonias de un organismo que ha sido identificado como patógeno, es necesario proceder de la siguiente manera para realizar la prueba de susceptibilidad.

1. Seleccionar las colonias
2. Preparar una suspensión del inóculo
3. Estandarizar la suspensión del inóculo
4. Inocular la placa
5. Colocar discos de antimicrobiano
6. Incubar la placa
7. Medir las zonas de inhibición
8. Interpretar los resultados

Interpretación del método de Kirby Bauer (ver anexo tabla 1) ⁴⁷

8. Farmacología básica para el tratamiento de mastitis

Los antimicrobianos son sustancias producidas por la fermentación de microorganismos o en forma sintética y que se utilizan para curar infecciones bacterianas, favorecen la recuperación de los animales enfermos y alivian el sufrimiento y las lesiones asociadas con la enfermedad. ⁴⁸

El tratamiento de los animales con antibióticos debe tener una adecuada relación costo-beneficio, un claro ejemplo es el tratamiento de todas las glándulas mamarias de todas las vacas que finalizan lactación. ⁴⁹

Las mastitis subclínicas por lo general no se tratan ya que realizando medidas de higiene y desinfección, buen ordeño y funcionamiento de la máquina de ordeño se corrigen estos problemas. ⁵⁰



9. Grupos de fármacos empleados en el estudio.⁵¹

9.1. Antimicrobianos que actúan en la pared bacteriana

Antibióticos β - lactámicos

El grupo de los antibióticos β - lactámicos es uno de los mejor conocidos y ampliamente utilizados. Su utilidad y popularidad se debe a su escasa toxicidad, alta eficacia, bajo coste y disponibilidad de una amplia gama de formas farmacéuticas.

Mecanismo de acción

Los antibióticos β - lactámicos actúan sobre unas enzimas de la pared bacteriana que se conoce como proteínas ligadas a las penicilinas o **PLP**. Existen diferentes clases de PLP en cada especie bacteriana, habitualmente entre 2 y 8 tipos diferentes. Algunas de estas proteínas son transpeptidasas, y su misión es mantener íntegra la pared celular.

La reacción de la transpeptidación es la responsable del entrecruzamiento de las fibras peptídicas para dar lugar a una estructura entrecruzada que confiere a la pared bacteriana la estabilidad necesaria. La inhibición por parte de la penicilina de la acción de las transpeptidasas catalizadoras de esta reacción da lugar a una pared celular débil, que no puede soportar la presión del medio interior bacteriano y se rompe durante el proceso de división celular, conduciendo a la bacteriólisis.

Mecanismo de resistencia

Entre los mecanismos de resistencia más comunes a los β - lactámicos destacan:

Impermeabilidad de la membrana externa de la bacteria al antibiótico. Este mecanismo confiere resistencia innata a los microorganismos gramnegativos frente a ciertos antibióticos β - lactámicos.



La modificación de las PLP puede hacer disminuir la afinidad del antibiótico por estas proteínas y, así dar lugar al fenómeno de resistencia.

Producción de β - lactamasa: Éste es el mecanismo de resistencia bacteriana más importante. Las bacterias producen ciertos tipos de enzimas β - lactamasas que tienen la capacidad de hidrolizar la unión cíclica amídica en la estructura de los antibióticos β - lactámicos. Se cree que estas enzimas evolucionaron a partir de las PLP como una adaptación de los microorganismos del suelo para protegerse de las sustancias β - lactámicas producidas de forma común por hongos y levaduras.

β - lactamasa producida por *Staphylococcus*: La producen fundamentalmente los *Staphylococcus coagulasa negativo*. Están codificados en parte por plásmidos y son de tipo exocelular. Otras β -lactamasas de organismos grampositivos son cromosómicas.

β - lactamasa producida por bacterias gramnegativas: Éste es un grupo muy diverso de β - lactamasa codificado por plásmidos o por cromosomas. Puede hidrolizar tanto las penicilinas (penicilinasas) como las cefalosporinas (cefalosporinasas) la producción de este tipo de β - lactamasa es muy común entre gramnegativos y patógenos como oportunistas.

β - lactamasa de bacteroides fragilis: Este microorganismo anaerobio, causa frecuente de las infecciones oportunistas en la cavidad bucal, piometra y abscesos, expresa de forma continua un gen que codifica la proteína que constituye la β - lactamasa. Es por tanto una enzima cromosómica y constitutiva, que confiere a este organismo resistencia intrínseca a los β - lactámicos y que puede inactivarse por medio del ácido clavulánico. Tiene actividad con penicilinasas y cefalosporinasas.

Farmacocinética

Estos fármacos se administran por vía parenteral, debido a su fácil desactivación por hidrólisis en el medio ácido gástrico.



Los fármacos β -lactámicos se eliminan por filtración glomerular y preferentemente por secreción en los túbulos renales.

Amoxicilina (Aminopenicilinas) ⁵¹

Las Aminopenicilinas se han convertido con los años en fármacos de uso popular en medicina veterinaria debido a su mayor espectro de actividad, que incluye gérmenes Gram positivos y Gram negativos. En este grupo de fármacos se incluye la Amoxicilina

Espectro de actividad: Las Aminopenicilinas pueden atravesar la capa externa de las bacterias gramnegativas mejor que lo hace la Bencilpenicilina. Por ello, su espectro no solo incluye a grampositivos, como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *bacilos* y *clostridios*, sino que también es eficaz frente a *Escherichia coli*, y algunas especies del género *Salmonella*. Estos fármacos son realmente eficaces frente a la mayoría de los microorganismos anaerobios, con la excepción de Bacteroides productores de β -lactamasa. Por este hecho, su combinación con fármacos inhibidores de las β -lactamasas, como el ácido clavulánico, da lugar a un aumento considerable de su eficacia.

Administración: Existen diversas formulaciones de estos productos para administración oral y parenteral. La administración por vía parental es rápida, y la biodisponibilidad es alta, en torno al 100%. Sin embargo. Existen diferencias asociadas al tipo de formulación

Efectos secundarios: Son antibióticos de baja toxicidad, el efecto secundario mejor conocido es la reacción alérgica que se puede producir tras la administración del fármaco a animales previamente sensibilizados y que es más común cuando se emplea la vía parenteral que la vía oral.

Uso clínico: En rumiantes, se utilizan para el tratamiento de las mastitis. La combinación de estos fármacos con inhibidores de las β -lactamasas les proporciona un mayor espectro de acción frente a gérmenes gramnegativos y es, por tanto,



recomendables en infecciones causadas por *E.coli*, *Klebsiella* y *Proteus*. El espectro de acción de estos fármacos no incluye especies del género *Pseudomonas*.

Cefalosporinas ⁵¹

Las cefalosporinas son antibióticos de amplio espectro de acción que se utilizan para el tratamiento de una amplia gama de infecciones en animales.

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las cefalosporinas es similar al del resto de fármacos β -lactámicos. Su unión a la **PLP** de la pared bacteriana interrumpe el proceso de formación de ésta durante la división celular, dando lugar a la muerte de la bacteria. El espectro de actividad de las cefalosporinas varía según la generación a la que pertenezcan; pero, en general, muestran actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus* productores de β -lactamasas y frente a bacterias Gram negativas, como las *Enterobacterias*.

Cefalexina (Cefalosporina de primera generación) ⁵¹

Este sub grupo incluye a la Cefalexina; las cefalosporinas de primera generación tienen la máxima actividad entre todas las cefalosporinas frente a bacterias grampositivas, entre las que se incluyen *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y otros *Staphylococcus* productores de β -lactamasa. Son activas frente a algunos microorganismos gramnegativos (*E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*), pero las resistencias de estos son bastante comunes por lo que las cefalosporinas de primera generación no se pueden considerar muy eficaces frente a organismos gramnegativos.

La resistencia a las cefalosporinas se debe a su escasa capacidad para atravesar la membrana externa de los microorganismos Gram negativos y a la producción de β -lactamasas.



Vancomicina (Glucopeptidos) ⁵¹

La emergencia de cepas multirresistentes de *Enterococos* y *Staphylococcus* en las últimas décadas ha llevado a la utilización de este fármaco en medicina humana como en veterinaria, como último recurso en el tratamiento de infecciones por los mencionados microorganismos. Por tanto, y para evitar la transmisión de resistencias entre animales y seres humanos, se ha prohibido su uso en animales de abasto en la mayoría de los países.

Mecanismo de acción

Como en el caso de los antibióticos β -lactámicos, la acción antibacteriana de la Vancomicina se debe a su inhibición de la síntesis de la pared bacteriana en la célula en división. Adicionalmente, daña la membrana celular e interfiere en la síntesis de ARN bacteriano. Su acción es bacteriostática cuando se administra sola, pero es bactericida cuando se administra junto con Aminoglucósidos, con los que muestra sinergia.

Actividad antimicrobiana

La Vancomicina es activa frente a la gran mayoría de las bacterias grampositivas, en especial frente a *Staphylococcus* y *Enterococcus* que son resistentes a otros fármacos. Su actividad se extiende a los microorganismos anaerobios Gram positivos, pero no a los Gram negativos. El desarrollo de resistencias frente a este fármaco es poco común.

Farmacocinética

La absorción oral de este fármaco es muy escasa y, por tanto, solo se usa en infusión intravenosa lenta, pues es un irritante tisular. La inyección intramuscular es muy irritante y dolorosa. Se elimina fundamentalmente por filtración glomerular en el riñón. Una pequeña porción se elimina a través de la bilis.



Efectos secundarios

Cuando se administra en la forma óptima, los efectos secundarios son mínimos; pero después de una administración intravenosa rápida, eritema, prurito, taquicardia, otros efectos son su nefrotoxicidad y ototoxicidad.

9.2. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de la proteína.

Oxitetraciclina (Tetraciclinas)⁵¹

Las tetraciclinas son uno de los grupos clásicos de antibióticos de amplio espectro, ya que son efectivas contra bacterias gramnegativas, tanto aerobias como anaerobias, así como contra grampositivas. Actualmente suelen usarse como antibióticos de primera elección preferentemente en rumiantes.

Mecanismo de acción

Está perfectamente establecido que las tetraciclinas actúan como agentes bacteriostáticos inhibiendo la síntesis de proteínas en las células bacterianas. Dicha inhibición la lleva a cabo evitando la asociación entre el aminoacil-ARNt y el ribosoma, uniéndose las tetraciclinas específicamente a la subunidad de 30S del ribosoma. El resultado es que se impide la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en formación, lo que inhibe la elongación de la cadena

Resistencia

La resistencia adquirida a las tetraciclinas se ha extendido considerablemente entre muchas bacterias, lo que ha reducido drásticamente su utilidad. La base de esta resistencia está relacionada con la alteración del sistema de transporte activo de las tetraciclinas hacia el citoplasma, y el bombeo del antibiótico hacia el exterior. La protección del ribosoma a través de una proteína citoplasmática que impide la actuación del antibiótico sobre la subunidad de 30S es otro de los mecanismos más extendidos, y, aunque menos frecuente, la existencia de actividades enzimáticas que degradan el antibiótico ha sido también descrita en algunas bacterias.



Farmacocinética

La mayoría de las tetraciclinas puede administrarse por vía oral, aunque se utilizan también las vías intramuscular (IM) e Intravenosa (IV). La vía IM se utiliza únicamente con la tetraciclina y la Oxitetraciclina, ya que las demás provocan abscesos estériles. La administración intravenosa debe realizarse lentamente para evitar el riesgo de aparición de un colapso cardiovascular, probablemente debido a la fijación del calcio por las tetraciclinas.

Las distintas tetraciclinas varían en su liposolubilidad, lo que determina su diferente distribución en los tejidos y su tasa de eliminación permite establecer tres grupos en función de la duración de efecto: corto (Oxitetraciclina), intermedio, o largo; todas pueden penetrar en la mayoría de los tejidos en mayor o menor grado.

Las tetraciclinas, se eliminan principalmente por excreción renal, intactas en un 42-70% a través de orina, y en menor medida a través de la bilis.

Toxicidad

Aunque en general las tetraciclinas son fármacos relativamente seguros, no están exentos de efectos secundarios sobre los tejidos del organismo, su capacidad de alteración de la microflora intestinal, y sus efectos tóxicos sobre las células hepáticas y renales. El tratamiento con Oxitetraciclina puede dar lugar a la aparición de fotodermatitis.

Interacciones con otros fármacos

El tratamiento con Tetraciclinas es incompatible con la utilización de antibióticos β -lactámicos y Cloranfenicol, así como con cualquier preparado que contenga concentraciones elevadas de calcio, magnesio o sodio. La administración simultánea de corticoesteroides puede conllevar una elevación anormal de compuestos nitrogenados en la sangre (azotemia) debido a un aumento del catabolismo, lo cual puede dar lugar a pérdida de peso, sobre todo en animales débiles. La combinación



con Polimixinas es sinérgica, ya que se incrementa la incorporación de Tetraciclinas por las células bacterianas.

Gentamicina (Aminoglucósidos)⁵¹

Los Aminoglucósidos son un amplio grupo de sustancias antibacterianas de utilidad para tratar principalmente infecciones debidas a bacterias Gram negativas aerobias. El uso de la mayoría está limitado por sus notables efectos tóxicos, especialmente en el riñón, el oído y el aparato vestibular. Dentro del grupo de antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, son los únicos claramente bactericidas en concentraciones terapéuticas.

Mecanismo de acción

La inhibición de la síntesis de proteínas por los Aminoglucósidos se basa en la unión, mucho más fuerte que con ningún otro inhibidor de la síntesis proteica, a la subunidad de 30S del ribosoma bacteriano. El punto específico de unión varía ligeramente según el antibiótico concreto, pero en general tiene como consecuencia la lectura errónea del mensaje genético, al interferir en el apareamiento correcto de las bases del codón del ARNm con las del anticodón del ARNt. Esto hace que se bloquee el comienzo de la síntesis, al impedir que se coloque el primer aminoácido, la formil-metionina, o bien que se interrumpa la traducción de forma prematura originándose una proteína trunca no funcional, o bien que se coloquen aminoácidos distintos a los especificados por la secuencia de bases del ARNm, formándose proteínas anormales.

Resistencia

La resistencia a los Aminoglucósidos está muy extendida entre muchos grupos bacterianos. Aunque existen varios mecanismos de resistencias, a los más importantes y más extendidos están relacionados con la síntesis de enzimas que modifican el antibiótico. Existen tres clases de enzimas reconocidas como origen de resistencias a los Aminoglucósidos, las fosfotransferasas, acetiltransferasas y



adeniltransferasas que fosforila, acetilan o adenilan, respectivamente, los grupos hidroxilo o amino libres e impiden la unión del antibiótico al ribosoma. Algunas de estas enzimas actúan específicamente sobre un Aminoglucósido o sobre los miembros de algunos de los subgrupos, mientras que otras tienen un espectro de actividad más amplio, por lo que las resistencias cruzadas son frecuentes y complejas entre los diferentes Aminoglucósidos.

Indicaciones terapéuticas

Los Aminoglucósidos son activos principalmente contra bacterias gramnegativas aerobias, aunque algunos son también activos contra algunos grampositivos.

La Gentamicina es también efectiva frente a miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero es potencialmente neurotóxica, lo que limita seriamente su utilidad.

La gentamicina tiene una potencial toxicidad para el riñón.

Farmacocinética

Las propiedades farmacocinéticas vienen determinadas por la naturaleza policatiónica de los Aminoglucósidos, que los hace muy hidrosolubles y muy poco liposolubles, por lo que atraviesan las membranas biológicas muy lentamente.

Toxicidad

Los Aminoglucósidos presentan cuatro tipos de efectos secundarios relacionados con la dosis administrada: a) daños celulares en los túbulos proximales del riñón, b) destrucción de las células sensitivas de la cólea, c) destrucción de las células sensitivas del aparato vestibular, y d) parálisis neuromuscular.

La nefrotoxicidad aparece sobre todo después de un tratamiento prolongado y con concentraciones plasmáticas elevadas.



Interacciones con otros fármacos

Todos los Aminoglucósidos tienen un efecto sinérgico con los antibióticos β -lactámicos, ya que estos incrementan la tasa de incorporación de los Aminoglucósidos por las células bacterianas, aunque la administración conjunta con cefalosporinas puede producir un incremento de la nefrotoxicidad. La gentamicina es también sinérgica con la combinación trimetoprima- sulfamida contra *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Eritromicina (Macrólidos) ⁵¹

Este grupo tiene una actividad antimicrobiana elevada contra bacterias grampositivas especialmente. La eficacia de alguno de estos antibióticos, algunos de ellos clásicos, como la Eritromicina, ha llevado al desarrollo de nuevos antibacterianos de última generación con propiedades mejoradas, especialmente en cuanto al incremento de la actividad antibacteriana y la superación de algunos efectos secundarios.

Mecanismo de acción

Debido a su estructura común, todos los macrólidos actúan bloqueando la síntesis de proteínas mediante inhibición de la translocación por unión reversible a la subunidad ribosómica de 50S. El efecto reversible sobre la peptidiltransferasa hace que la mayoría de los macrólidos, en concentraciones terapéuticas, actúen como bacteriostáticos, aunque algunos, como la Eritromicina, puede actuar también como bactericidas, dependiendo de la concentración y de la sensibilidad específica de cada microorganismos.

La resistencia a los macrólidos es relativamente frecuente en muchos patógenos y puede aparecer durante el tratamiento.

Farmacocinética

La mayoría de los macrólidos se absorbe bien por vía gastrointestinal o parenteral. La Eritromicina se absorbe fácilmente en la primera porción del intestino delgado,



pero el compuesto básico es inactivado por el ácido gástrico, por lo que debe administrarse con en presentaciones con cubiertas entérica que se disuelven en el intestino, o bien en forma de ésteres o estearatos. La presencia de alimentos modifica de forma notable la biodisponibilidad de todas estas preparaciones. Otras formulaciones para uso parenteral son el lactobionato o el gluceptato de eritromicina. La administración intramuscular es dolorosa y provoca irritación tisular, por lo que es preferible la vía intravenosa.

A pesar de su peso molecular relativamente alto, la liposolubilidad de los macrólidos es suficientemente alta como para que atraviesen fácilmente muchas membranas, por la que se distribuye por todo el organismo y pueden lograr concentraciones antibacterianas en casi todos los tejidos.

La biotransformación no es un factor importante en este grupo de fármacos, y la eliminación se produce fundamentalmente a través de la bilis, y solamente en un 3-5 % a través de la orina.

Toxicidad

La eritromicina es un antibiótico relativamente seguro en su utilización, con pocos efectos secundarios aunque la administración del esteolato de eritromicina puede provocar en algunas ocasiones la aparición de hepatitis colestática, debido seguramente a una reacción de hipersensibilidad a esta preparación ya que es mucho mas frecuentes con el estearato o el etilsuccinato. La reacción desaparece totalmente una vez suspendido el tratamiento. Una característica común a todos los macrólidos es su naturaleza irritante: la mayoría provoca dolor agudo durante su administración intramuscular y la aparición de tromboflebitis durante su administración intravenosa, especialmente o en dosis elevadas.

Interacción con otros fármacos

La eritromicina puede potenciar el efecto de otros fármacos por inhibición del metabolismo hepático mediado por el citocromo P-450. Está especialmente



contraindicada su administración conjunta con Carbamazepina, Corticosteroides, Digoxina, Teofilina y Warfarina. Este efecto es casi inexistente en los nuevos macrólidos. La combinación de diferentes macrólidos entre si, o de macrólidos con Lincosamidas o Cloranfenicol tiene un efecto antagonista. La combinación con Bencilpenicilina o Rifampicina tienen efectos sinérgicos contra algunos microorganismos grampositivos.

9.3. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos

Quinolonas ⁵²

Las quinolonas y fluoroquinolonas son el grupo farmacológico de mayor desarrollo en la actualidad, se distinguen 3 generaciones constituyen una esperanza para nuevos y viejos problemas.

Mecanismo de acción

El sitio de acción de todas las quinolonas y fluoroquinolonas es la DNA- girasa o topoisomerasa II una enzima esencial para la replicación del material genético bacteriano.

La función de la DNA- girasa es vital para la replicación de los ácidos nucleicos bacteriano. De manera muy simplificada se puede decir que dicho material se encuentra apilado y que la función de la DNA-girasa consiste en convertir en lineal dicho material genético se replique transcriba, repare y recombine así, la inhibición de estos procesos genera el bloqueo de múltiples funciones celulares muchas de ellas vitales de ahí el carácter bactericida de las quinolonas.

Enrofloxacin (Fluoroquinolonas) ⁵¹

Las Fluoroquinolonas son sustancias anfóteras. Su hidrosolubilidad es baja, y en medios ácidos pueden precipitar.



Actividad antimicrobiana

El espectro de todas las Fluoroquinolonas es considerablemente más amplio e incluye bacterias aerobias gramnegativas y algunos microorganismos grampositivos, aunque tienen capacidad limitada frente a *Streptococcus* y *Enterococcus*, y solo una actividad débil frente a bacterias anaerobias obligadas.

Una ventaja de las Fluoroquinolonas es que no destruyen los *Enterococcus* intestinales comensales.

Mecanismo de acción

Las Fluoroquinolonas inhiben la enzima ADN girasa (topoisomerasa de tipo II). Ésta es una enzima compuesta de 4 subunidades cuya función incluye el desenrollamiento, corte y resellado del ADN girasa también interviene en el plegamiento y enrollamiento del ADN bacteriano alrededor del centro de ARN, otorgándole la apariencia de bucles o lazos. Cada lazo se enrolla después negativamente mellando ambas cadenas de ADN, pasando la cadena rota alrededor de la cadena acompañante y resellando la doble muesca.

Las Fluoroquinolonas son bactericidas, y tienen un inicio de acción rápido. Este rápido comienzo de la acción sería valioso particularmente en animales inmunodeprimidos.

Las Fluoroquinolonas penetran en la flora bacteriana de forma rápida a través de porinas; subsecuentemente atraviesan la membrana citoplasmática, proceso que se ve facilitado por la alta liposolubilidad de estas moléculas. Las concentraciones en el interior de la célula bacteriana se equilibran rápidamente. Los cationes bivalentes, calcio y magnesio, antagonizan, probablemente por un efecto quelante, la acumulación de Fluoroquinolonas en el interior de la bacteria.



Farmacocinética

Las Fluoroquinolonas se comportan como bases débiles. Su carácter lipófilo determina sus propiedades farmacocinéticas. Se absorben bien por vía oral, intramuscular y subcutánea; su absorción desde el tracto digestivo en poligástricos y monogástricos de transición (equinos) es menor que monogástricos, siendo la biodisponibilidad en rumiantes adultos del orden del 10 %. La absorción gastrointestinal se reduce por la presencia de iones bivalentes, como Ca^2 y Mg^2 .

Las fluoroquinolonas se metabolizan en el hígado, donde el grado de biotransformación depende del compuesto y de la especie. Generalmente sufren reacciones de hidroxilación y de oxidación, que las transforman en oxoquinolonas, las cuales se someten posteriormente a reacciones de fase 2, consistentes en conjugación con ácido glucurónico. Los glucuronos conjugados sintetizados son excretados en la orina y la bilis.

La semivida de estos compuestos está en el intervalo de 2-7 horas, dependiendo del compuesto y la especie, algunos metabolitos tienen actividad antimicrobiana, así, el Enrofloxacin se convierte en ciprofloxacino,

Toxicidad

En general las fluoroquinolonas ofrecen un amplio margen de seguridad en mamíferos y aves. Sin embargo, un inusual pero característico efecto del grupo es la acción erosiva sobre los cartílagos en crecimiento.

Ciprofloxacina (Quinolona) ⁵²

Es una Quinolona de segunda generación de la que se tienen pocos datos de su cinética una buena proporción se elimina por vía renal y se especula que también a través de las secreciones intestinales.

En cuanto a la actividad de la ciprofloxacina, se ha dicho que es excelente, con notable acción contra los, *Mycoplasmas spp*, más comunes en veterinaria.



Desafortunadamente, no se cuenta con más datos acerca del destino de este fármaco en el organismo de las distintas especies y por ello aun no se puede establecer indicaciones precisas de eficacia para diversas enfermedades.

Dicho de otra forma, esto no significa que el medicamento carezca de actividad para controlar las enfermedades en los animales domésticos sino que al igual que en muchas Quinolonas aun no se cuenta con datos farmacológicos que hagan de su uso un ejercicio más profesional.

Se ha descrito que varias Quinolonas de segunda generación llegan con rapidez a la glándula mamaria en particular la Norfloxacin y la Ciprofloxacina.

10. Resistencia bacteriana

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos.³⁹

Desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles.³⁹

10.1. Tipos de Resistencia bacteriana

Natural o intrínseca.

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprin sulfametoxazol.⁴⁰



En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico.⁴³

Adquirida o extrínseca

La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias.

En el primer caso, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas.^{44, 45} De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos

10.2. Mecanismos de Resistencia

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico:^{40, 46, 47}

- A. Inactivación del antibiótico.
- B. Barreras de permeabilidad.
- C. Alteración del sitio blanco del antibiótico.

Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.



A. Inactivación del antibiótico

Existen enzimas codificadas por genes cromosómicos o extracromosómicos que modifican a los antimicrobianos. En el caso de penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos relacionados se denominan β -lactamasas y catalizan la degradación del antibiótico mediante la ruptura del enlace amino del anillo β -lactam para producir metabolitos inactivos. Actúan en el espacio extracelular contenido entre la membrana y la pared celular y pueden ser neutralizadas por inhibidores específicos como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.^{46, 47}

Los Aminoglucósidos son inactivados durante su transporte a través de la membrana celular de los gérmenes anaerobios por medio de enzimas que catalizan la adenilación, acetilación y fosforilación de grupos amino e hidroxilo. El Cloranfenicol es inactivado por medio de una reacción de acetilación catalizada por la cloranfenicol-acetiltransferasa y la eritromicina es hidrolizada en su anillo lactona por medio de la eritromicinaesterasa.^{46, 47, 48, 49}

B. Barreras de permeabilidad

Incluye tres componentes básicos:^{46, 47}

- a) La estructura de la membrana externa e interna de la bacteria.
- b) Las porinas. Canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular.
- c) Características fisicoquímicas del antimicrobiano (Eflujo activo)



Estructura de la membrana externa e interna de la bacteria

1. Permeabilidad de la membrana externa

Claramente definida en los microorganismos Gram negativos que poseen una membrana lipídica externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de antibiótico.^{46, 47}

2. Permeabilidad de la membrana interna

Consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula. La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos.^{46, 47}

Porinas

Son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria.

De la modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antibiótico. Éste es el mecanismo empleado por *Salmonella typhimurium* contra cefalosporinas de primera generación, *Serratiamarcescens*, *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa* contra aminoglucósidos y carbapenem.^{46, 47}

Eflujo activo

Es debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas. Se altera la producción de energía y se disminuye no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y se promueve la extracción activa del mismo. Confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas,



Cloranfenicol y β -lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario.^{46,47}

C. Alteración del sitio blanco

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50S, 30S ribosomales, etc.^{41 49} De esta manera la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, conferirán resistencia a los β -lactámicos dado que es esta enzima su sitio de acción.^{40,50}

La resistencia a las Quinolonas de gérmenes como *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* obedece a la modificación por mutación de los genes Gyr A y Gyr B que codifican para las topoisomerasas II y IV.^{40,50}

Característicamente las mutaciones mencionadas se presentan como cromosómicas y no como plásmidos.^{40,50} Respecto a las demás estructuras ribosomales encontramos modificaciones a nivel de múltiples subunidades como 30S, 50S. Sitios de acción de Aminoglucósidos, Lincosamidas, Macrólidos y Tetraciclinas. Por ejemplo: la metilación ARN ribosomal de la subunidad 50S es el mecanismo de resistencia de *S. aureus*, *Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens* a Tetraciclinas, Cloranfenicol y Macrólidos.^{40,50}

El mecanismo de resistencia (ribosomal) a Gentamicina, Tobramicina y Amikacina es poco frecuente y consiste en la mutación del péptido S12 de la subunidad 30S.

Cabe destacar en este punto los mecanismos de meticilino resistencia por producción de una proteína ligadora de penicilina (PBP), la resistencia a Glicopéptidos por *S. aureus*.^{40,50}



VI. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio.

Es un estudio descriptivo de corte transversal

Áreas de estudio.

El Municipio de Achuapa está localizado en la zona norte del Departamento de León, ubicado entre las coordenadas 13° 03 ' de latitud norte y 86°35' de longitud oeste y a una altitud de 330.90 m sobre el nivel del mar. Su extensión territorial es de 416.24 km².⁵⁴

Se destaca un valle donde se asienta la zona urbana y la zona montañosa con predominancia de áreas dedicadas al pastoreo, un área de bosques secos tropicales y la presencia de bosques de conífera. Posee un clima del tipo Sub-tropical seco, presenta un promedio anual de precipitación de 1,400 a 1,800 mm, con una distribución regular principalmente en los meses de Mayo a noviembre.⁵⁴

Se localiza al norte con el municipio de San Juan de Limay, del Departamento de Estelí. Al sur con El Sauce, del Departamento de León. Al este con Estelí. Al oeste con Villanueva, municipio del Departamento de Chinandega.⁵⁴

El municipio de Larreynaga esta localizado en las coordenadas 120 40' de latitud norte y 860 34' de longitud oeste, a 92.28 mts. Sobre el nivel del mar. Con una extensión territorial de 888Km².⁵⁵

Tiene como cabecera municipal a Malpaisillo limita Al Norte: Municipios de El Sauce y Villanueva. Al Sur: Municipio de La Paz Centro. Al Este: Municipio de El Jicaral. Al Oeste: Municipios de León y Telica⁵⁵

EL municipio de Larreynaga, tiene un clima Tropical de Sabana, se caracteriza por una marcada estación seca de seis a siete meses de duración.⁵⁵



Población.

Estuvo compuesta por 650 vacas productoras de leche, de las cuales 286 correspondían a 18 fincas del municipio de Achuapa y 364 vacas distribuidas en 16 fincas del municipio de Larreynaga, que abastecen a los centros de acopio lecheros de dichos municipios.

Unidades de análisis

Las muestras de leche obtenida de cada vaca seleccionada.

Tamaño de muestra

El cálculo se realizó en base a la población de 5200 vacas en producción láctea de todas las fincas lecheras del occidente de Nicaragua, que abastecen a los centros de acopio lecheros de la red fría de la Cuenta Reto del Milenio (CRM), dato proporcionado por el organismo **TecnoEmprendeS**. Obteniéndose un total de 358 muestras de leche proveniente de vacas afectadas con mastitis, empleando para su cálculo un 95% de confianza, una prevalencia esperada del 50% y un margen de error de 5%. Aplicándose un muestreo estratificado se calculó una fracción muestral de 0.068 que se aplicó a la población de cada centro, obteniéndose 19 muestras para el municipio de Achuapa y 24 muestras para el Larreynaga. Obteniéndose así un total de 43 muestras para el estudio, se eliminaron 3 muestras por contaminación. Los resultados se presentan en base a 40 muestras.

Selección de la muestra

Las muestras en cada finca fueron seleccionadas a través de muestreo aleatorio simple



Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- * Vacas productoras de leche positivas a la prueba del CMT.
- * Vacas productoras de leche con 20 días de lactación.
- * Vacas productoras de leche con menos 250 días de lactación.
- * Participación Voluntaria del productor.

Exclusión:

- * Vacas no productoras de leche.
- * Vacas productoras de leche negativas a la prueba del CMT.
- * Vacas con periodos de lactación menor de 20 días pos parto.
- * Vacas productoras de leche con más de 250 días de lactación.

Detección de vacas con mastitis

Previa a la recolección de la muestra se realizó el diagnóstico de mastitis mediante la prueba California Mastitis Test (CMT). (Ver anexos)

Método de recolección de las muestras.

Al momento del ordeño, se descartaron los primeros chorros de leche. En un tubo estéril (Cónico de 15 ml) previamente identificado, se tomaron 4ml de leche del pezón afectado. El tubo fue sellado herméticamente y colocado en una gradilla para su posterior conservación y transporte

Transporte y Conservación de las muestras

Las muestras fueron transportadas en refrigeración (4-8°C) al laboratorio de microbiología del Centro Veterinario de Diagnóstico en Investigación (CEVEDI) de la UNAN-León para ser procesadas en menos de 24hrs.

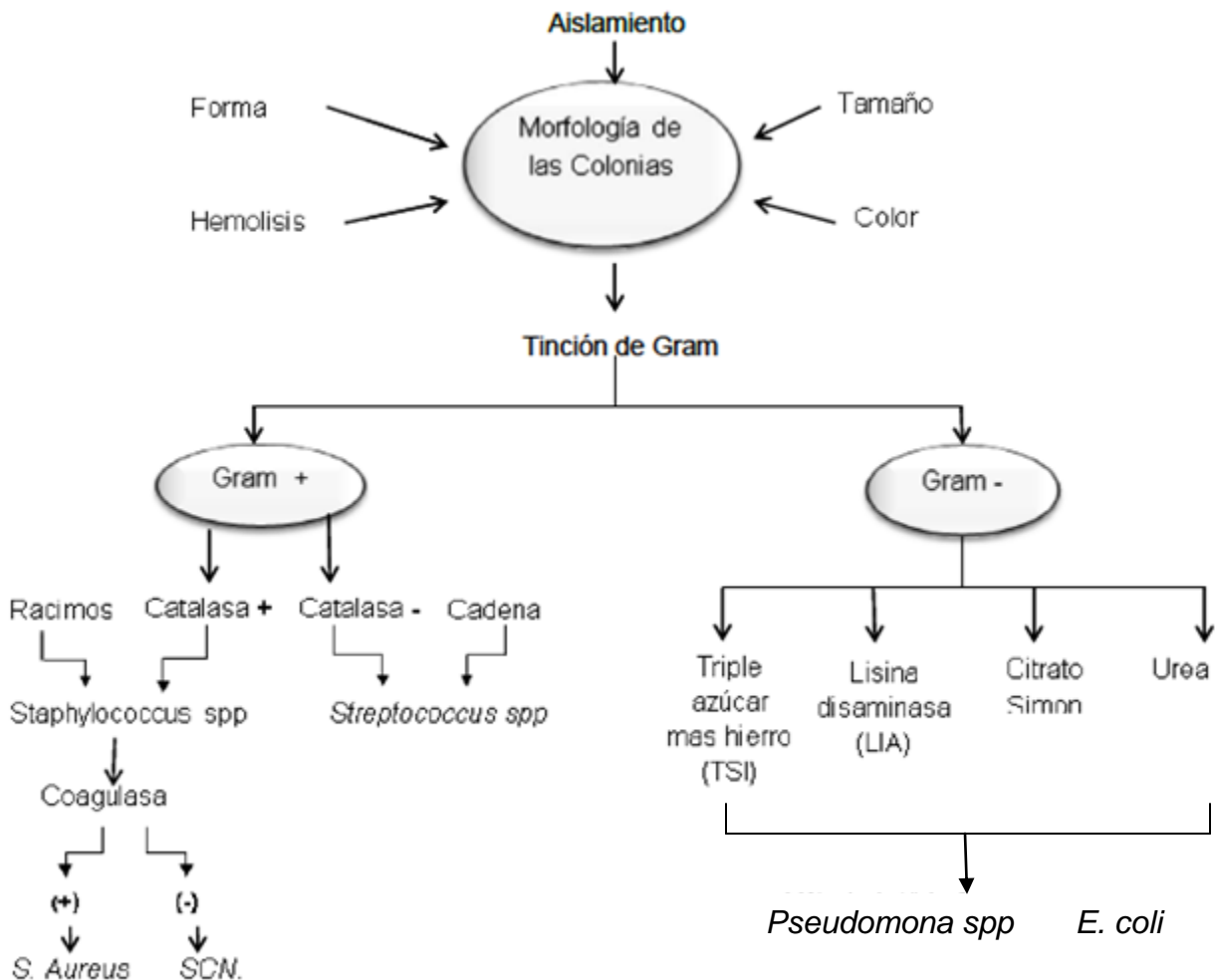


Procesamiento de laboratorio.

Aislamiento e Identificación bacteriana.

Se inoculó 20 µl de cada muestra en Agar Sangre de Carnero (ASC) al 5% y agar Mac Conkey por rayado convencional, se incubaron a 37°C por 18- 24hrs.

La identificación bacteriana se realizó de acuerdo con el siguiente esquema de trabajo.





Determinación de los perfiles de resistencia.

Los perfiles de resistencias fueron determinados por el método de difusión en agar (Kirby Baüer) según el manual de National Committee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS) ^{56, 57} empleando agar Mueller Hintol, con los siguientes antibióticos.

Gentamicina (CN), Oxitetraciclina (OT), Eritromicina (E), Ciprofloxacina (CIP), Cefalexina (CL), Vancomicina (VA), Enrofloxacin (ENR), Amoxicilina/Ácido clavulánico (AMC).

Recolección de los datos

Por fuente de información primaria a través de una ficha de recolección de datos completado por observación directa y preguntas al productor. (Ver anexo tabla 2)

Análisis de los datos

Los datos fueron registrado en Statistic paquet for Social Sciences (SPSS) versión 19 para ser analizado por medio de estadísticos descriptivos como la distribución de frecuencias absolutas y relativas a si como tablas de contingencias.



VII. RESULTADOS

Al realizar el aislamiento de las bacterias causantes mastitis de subclínica bovina en 40 vacas afectadas en los municipios de Achuapa y Larreynaga, se encontró *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) en un 57.5%, *Staphylococcus aureus* en un 25%, *Streptococcus spp* y *Pseudomonas spp* en un 7.5% y *E.coli* en un 2.5% (Gráfica1)

Respecto a los aislamientos por municipio, en Achuapa se aisló SCN en un 52.2%, *S. aureus* en un 34.8%, *Streptococcus spp* en un 17.6% y *E.coli* en un 4.3%, mientras que en el municipio de Larreynaga, los aislamientos fueron de un 64.7% para SCN, 17.6% *Pseudomona spp* y 11.8% para *S. aureus*. (Gráfica 2).

Se encontró que las bacterias aisladas presentaron resistencia a la Vancomicina en 80.6%, seguido de la Eritromicina 77.8%, Oxitetraciclina con un 28.2%, Cefalexina 23.1%, Amoxicilina/Ác. Clavulánico. 23.1% Ciprofloxacina 20.8%, Enrofloxacin 20.5% y la Gentamicina 0%. (Gráfica 3).

S. aureus mostró una resistencia de 100% a Vancomicina, 50% a Cefalexina, Eritromicina, Oxitetraciclina y Ciprofloxacina, 30% a Amoxicilina/Ác. Clavulánico, 0% a Eritromicina y Gentamicina. La resistencia presentada por el SCN, fue de 77.8% a Eritromicina, 69.96% a Vancomicina, 34.8% a Enrofloxacin, 21.7% a Oxitetraciclina, 13.3% a Ciprofloxacina y Cefalexina, y 0% a Gentamicina. (Gráfica 4)

La *Escherichia coli* resultó resistente en un 100% a Amoxicilina/Ác. Clavulánico, siendo sensible a los demás antibióticos. *Pseudomona spp* se mostró resistente a Vancomicina y Eritromicina en un 100%, resultando sensible al resto de los antibióticos implicados en el estudio. (Gráfica 4)

El *Streptococcus spp* expresó una resistencia del 100% a Amoxicilina/Ác. Clavulánico, Vancomicina y Eritromicina, 50% a Oxitetraciclina, no expresando resistencia a los demás antibióticos. (Gráfica 4)



VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se identificaron agentes bacterianos implicados en la aparición de mastitis bovina y se evaluó la resistencia de las bacterias ante los fármacos utilizados para tratar esta patología. Las muestras de leche se obtuvieron de fincas que abastecen a los centros de acopio de Achuapa y Larreynaga, León.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los principales bacterias implicados en la mastitis son cepas de, *SCN* en un 57%, *Staphylococcus aureus* en un 25%, *Streptococcus spp* en un 7.5% y *Pseudomonas spp* en un 7.5% y *Escherichia coli* en un 2.5%. Estos datos concuerdan con los resultados de Peralta y col; 2004, en donde aisló *Staphylococcus aureus* en un 62%, *SCN* en un 31%, *Streptococcus spp* en un 6% y *Escherichia coli* en un 1%, de leche proveniente de cuatro granjas del departamento de León. Zeledón K. y Aguirre 2007, encontraron en seis fincas del municipio de León, *S. aureus* en un 77.9% y *Pseudomonas spp* en un 0.55%. Nickerson y Boddie⁵⁸, sostienen que el rol de los SCN como agentes etiológicos de mastitis bovina no está completamente claro, ya que, por un lado, incrementan el recuento de células somáticas en la glándula mamaria, alterando la calidad de la leche y, por otro, contribuyen a mantener elevada la barrera leucocitaria previniendo la colonización de otros patógenos mamarios.

El aislamiento de *Streptococcus spp*; *Pseudomonas spp* y *E.coli*, se debió probablemente al fallo de los mecanismos de defensa de la vaca, (fallo en el cierre del canal del pezón, inmunodeficiencia, edad de la vaca etc.), ya que la procedencia de estos es ambiental. Las causas son errores en el manejo, especialmente en la higiene (insalubridad de los corrales) y el régimen de ordeño. Amiot J.⁵⁹ afirma que la mamitis producidas por *Streptococcus spp*, *Staphylococcus* y *Coliformes* se deben a una infección localizada en la ubre como consecuencia de una contaminación exógena.

En los municipios de Achuapa y Larreynaga se encontró en común la presencia de *Staphylococcus aureus* y *SCN*. Esto puede deberse a que los *Staphylococcus spp* no



son patógenos obligados de la ubre, ya que se encuentran también en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, y los equipos de ordeño.

Las bacterias aisladas presentaron resistencia a: Vancomicina con un 80.6% y Eritromicina 77.8%; En nuestro país la Vancomicina dejó de utilizarse hace varios años en Medicina Veterinaria por su elevado costo, pero es de uso frecuente en Medicina Humana; mientras que la Eritromicina tiene un uso limitado en Veterinaria (aves). Cada vez son menos las barreras para la transferencia de genes de resistencia entre microorganismos patógenos, como también para la transferencia horizontal de bacterias resistentes del hombre a los animales y viceversa. Existen muchas explicaciones teóricas sobre los mecanismos de resistencia creados por las bacterias ante Vancomicina y Eritromicina, sin embargo es necesaria la realización de pruebas diagnósticas como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la búsqueda de genes implicados, tales como el gen **van** para Vancomicina y el gen **erm** para Eritromicina.

S. aureus presentó resistencia a Vancomicina 100%, Cefalexina, Eritromicina, y Ciprofloxacina en un 50%, En comparación a una investigación realizada en el 2007 por Zeledón en donde esta bacteria presentó una resistencia de 7.21% a Vancomicina, 4.28% Eritromicina, 4.72% Gentamicina y 4.82% a Ciprofloxacina. En 3 municipios del estado de Michoacán se obtuvieron resultados de resistencia del *Staphylococcus aureus* a Eritromicina 34%, Gentamicina 3.5%.

S. aureus mostró resistencia principalmente frente a Vancomicina esto se debió probablemente a que estábamos frente a cepas de *S. aureus* resistentes a Meticilina (SARM). El mecanismo por el cual estas cepas presentan una sensibilidad disminuida a la Vancomicina no está plenamente aclarado, pero se atribuye básicamente a una alteración en la pared bacteriana secundaria al aumento en la síntesis de peptidoglucano por parte de *S. aureus*, lo que disminuiría el acceso de la Vancomicina al lugar de acción en la pared bacteriana.⁶⁰



El SCN resultó ser resistente a Eritromicina en un 77.8%, Vancomicina en un 69.6%, Una investigación realizada por un laboratorio de micología y bacteriología de Paraguay, reveló que el SCN mostró una resistencia a Gentamicina en un 19%. Esta ausencia de sensibilidad del SCN a la Eritromicina puede atribuirse a la resistencia por metilaciones que impiden la unión de los fármacos al ribosoma 50S, este mecanismo está codificado por plásmidos en transposones, es cruzada y puede ser inducible.

La cepa de *E. coli* aislada en este estudio, solo obtuvo resistencia a un antibiótico (Amoxicilina/ác. Clavulánico). En la investigación realizada por Peralta y col; esta bacteria fue resistente a Penicilina 100%. Florentin C. en su estudio encontró que la *E. coli* presentó una resistencia del 7 % a Penicilina y Gentamicina. Esta resistencia a la Amoxicilina/Ác. Clavulánico, pudo haber sido causada por una *E.coli* productor de β -lactamasa. Para la comprobación de esta hipótesis se recomienda la realización de pruebas más específicas como Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Streptococcus spp presentó una resistencia a Amoxicilina/ác. Clavulánico, Vancomicina, Eritromicina y Oxitetraciclina. La aparición de estas resistencias puede estar motivada por la aparición de transposones, que aportan genes de resistencia a varios antimicrobianos, o mediante la incorporación de plásmidos.⁶¹

Las bacterias aisladas no presentaron resistencia a Gentamicina, debido a que este fármaco está siendo poco utilizado en las granjas lecheras por su efecto residual, lo que no favorece a los productores, por lo que ha llegado a ser sustituido por otros.

El monitoreo de la resistencia por sí solo no provee la información necesaria para una intervención bien dirigida hacia el control de este problema, ya que se requiere información detallada sobre la generación de resistencia así como el uso que se hace de los distintos antimicrobianos⁶² Además, orienta la elección terapéutica pero no asegura el éxito de la misma ya que deben considerarse además las interrelaciones con el ambiente interno del hospedero



IX. CONCLUSIÓN

Los agentes con mayor frecuencia aislados de las muestras de leche provenientes de vacas con mastitis fueron *SCN* en un 57.5% y *S. Aureus* en un 25 %.

En el municipio de Achuapa, se encontró mayor diversidad de agentes como: *SCN*, *S. aureus*, *Streptococcus spp* y *E.coli*.

La presencia de estos agentes en ambos municipios fue variable teniendo en común *S. aureus* y *SCN*.

Las bacterias encontradas mostraron mayor resistencia a Vancomicina y Eritromicina.

Las bacterias aisladas no presentaron resistencia a Gentamicina.



X. RECOMENDACIONES

Considerando que existe una preocupación mundial por el problema de resistencia bacteriana adquirida a los diversos antibióticos que son utilizados con mayor frecuencia en las terapias de mastitis clínicas y subclínicas y, teniendo en cuenta que el uso del antibiograma «in vitro» es considerado como un buen medio de orientación terapéutica, a pesar de las posibles diferencias con los resultados «in vivo», creemos que es de gran utilidad:

1. Realizar o estructurar un programa de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos mediante la técnica de Kirby Bauer, con el fin de mantener información actualizada que oriente sobre la mejor selección de antimicrobianos frente a esta patología de impacto productivo.
2. Disminuir la resistencia bacteriana, controlando el uso y distribución de los fármacos.
3. Introducción obligatoria de la receta médico veterinaria.
4. Rotación de los fármacos por sectores (disminuye la presión de selección), conservándose la susceptibilidad a éstos en distintas localidades.
5. usar antimicrobianos de espectro reducido, sobre todo aquellos que no son de primera línea de elección en infecciones graves en medicina humana.
6. Aplicar las técnicas de ordeño limpio.



XI. REFERENCIAS

- 1) Franklin José Torrez Salmiento, Omar Antonio Duarte Moya. Estudio Preliminar de la Utilización de la Manteca de Armadillo (*Dasypus novemcinctus*) en el tratamiento de la mastitis bovina en el Municipio de PAIWAS Departamento de Región Autónoma del Atlántico Norte (RAAN). para optar al grado de Médico Veterinario Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. Agosto, 2006.
- 2) Watts, J. L., S. A. Salmon, R. S. Yancey, S. C. Nickerson, L. J. Weaver, C. Hoemberg, J. W. Pankey, L. K. Fox.. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mamary glands of dairy heifers. *J. DairySci.* 1995. 78: 1637-1648.
- 3) B. San Martin, M.V., Dr. Med. Vet.; J. Kruze, M.V., Ph.D.; M. A. Morales, M.V., Ms.Sc.; H. Agüero, M.V., Ms.Sc.; B. Leonm.V.; S. Espinoza, M.V.; D. Iragüen, M.V.; J. Puga, M.V.; C. Borie, M.V., Ms.Sc. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región, Chile. *Revista electrónica UACH.* vol. XXXIV. 2002. pp. 221-234.
- 4) Zeledón K, Aguirre J. Aislamiento e identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus*, mediante la técnica de Fingerprinter (PHP), a partir de leche bovina afectada con mastitis subclínica en seis fincas del municipio de León en el periodo mayo 2005-mayo 2006. para optar al título de licenciado de Medicina Veterinaria. UNAN-León.2007.
- 5) Patiño Sanchez Norberto. Resistencia a antimicrobianos del *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis subclínica en tres municipios del estado de Michoacán. Tesis para optar al título de Médico Veterinario y Zootecnista. Michoacán-Mexico.2008.
<http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/567/1/RESISTENCIAANTIMICROBIANOSDELSTAPHYLOCOCCUSAUREUSENVAC>



[ASLECHERASCONMASTITISSUBCLINICADETRESMUNICIPIOSDELESTAD
ODEMICHOCAN.pdf](#)

- 6) Peralta A, Berrios R. Estudio epidemiológico de la mastitis subclínica bovina en cuatro hatos lecheros del departamento de León, e identificación y sensibilidad antimicrobiana in vitro de los agentes etiológicos implicados. Tesis para optar al título de licenciado en Medicina Veterinaria. León-Nicaragua. UNAN-León. 2004
- 7) Florentin Celeste. Perfil de Resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. vol.5. Paraguay. 2007.
http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S181295282007000100005&script=sci_arttext .
- 8) Owens, W.; Ray, C.; Watts, J.; Yancey, R. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J. DairySci. 80: 313-317. 1997.
- 9) Gnanou J.; Sanders, P. Antibiotic resistance in bacteria of animal origin: methods in use to monitor resistance in EU countries. Int. J. AntimicrobialAgents 15:311-322. 2000
- 10) Leon, B. Frecuencia de aislamiento de los principales agentes de mastitis en el sur de Chile. II Seminario de Calidad de Leche Bovina. Colegio Médico Veterinario de Chile. Consejo Regional Osorno. Libro. 18-19 julio, Temuco. 34-43 pp. 1997.
- 11) Tikofsky, L. Barlow, J. Santisteban, C. Schukken, Y., A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for Staphylococcus aureus in organic and conventional dairy herds. Microb. Drug Resist. 9: S39-S45. 2003.
- 12) Who, World Health Organization. 2000. Overcoming antimicrobial resistance. WHO. Geneva, Switzerland. 67 p. (World Health Organization Report on Infectious Diseases 2000).



- 13) Patiño Sánchez Norberto. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis subclínica de tres municipios del estado de Michoacán. Tesis para optar al título de médico veterinario zootecnista. Morelia, Michoacán, México. Universidad michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 2008
- 14) Chaneton Luciano. nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana. Tesis para optar al título de doctor en el área de química biológica. Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. 2010
- 15) <http://biblio2.ugb.edu.sv/bvirtual/8899/capitulo2.pdf>
- 16) Concha Bascuñán Carlos M. V. MSc PhD. Mastitis bovina: nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. http://www.agronomia.uchile.cl/extension/circular_extensio_panimal/circular%20de%20extension/n_33/capitulo_4.pdf
- 17) Bedolla, C. C. 2004. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos., Nº 42. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 24-26.
- 18) Heringstad, B. Klemetsdal, G., Ruane, J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 64:95-106.
- 19) Djabri, B., Barielle, N., Beaudeau, F., Seegers, H. Quarter.. Milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res.* 33:335-357. 2002
- 20) Schukken, Y. H., Leslie, K. E., Barnum, D. A., Mallard, B. A., Lumsden. J. H., Dick, P. C.. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* Intramammary Challenge in Late Lactation Dairy Cows: Quarter and Cow Effects Determining the Probability of Infection. *Journal Dairy Science*. 82:2393-2401. 1999
- 21) Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschock, M.. Mastitis Bovina, Prevención, Diagnóstico y Tratamiento. Editorial Universitaria, Guadalajara, Jalisco. pp. 132-138. 2004



- 22) Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F.. Mycrobiological Quality y Somatic cell Count of Ewe Milk with Special Referente to Staphylococci. *J. Dairy Sience*. 2002. 85:1370-1375.
- 23) Wellenberg, G. J., van der Poel, W.H.M y Van Oirschot, J. T.. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 2002. Article 2361, pp. 2-21
- 24) OSTERAS , O. et al.. Milk culture results in a large Norwegian survey. *J.Dairy Sci*. 2006. 89:1010-1023
- 25) Bradley, A. J. y Green M.J 2001 Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine M
- 26) Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. y Lagace J.. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001. 39: 2584-2589.
- 27) Rossitto, P. V., Ruiz, L. Kikuchi, Y., Glenn, K., Ruiz, K., Watts, J. L. y Cullor J. S.. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J. Dairy Sience*. 2002. 85:132-138. *ammary Gland. J. Clin Microbiol*. 39 (5): 1845-9.
- 28) Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkeman, H. W., Sampimon, O. C., Oliver, S. P. y Schukken, H.. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. 2002. 130:335-349.
- 29) Bedolla, C. C., y Castañeda, V. H. 2003. Agentes patógenos causantes de la mastitis bovina. *Cuatro vientos*. N° 38. Universidad Michoácana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 27-29
- 30) W. Wolter, Castañeda. 2002. La Mastitis Bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara. México. Pp 68.
<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/912/pdf/p020003.pdf>



- 31) Londoño González Diana Carolina.. Prevalencia de los principales microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras del Centro del Valle del Cauca en los años 2003 a 2006. Requisito para optar al grado de Técnico Profesional en Agropecuaria. Guadalajara de Buga en Valle, Colombia. Instituto Técnico Agrícola. 2008.
<http://www.monografias.com/trabajos59/microorganismos-mastitis-vacas-lecheras/microorganismos-mastitis-vacas-lecheras3.shtml>
- 32) Cordiés Jackson L, Machado Reyes LA, Hamilton Cordiés ML. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Med 1998;8 (1):13-27.
http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32_1_03/mil07103.htm
- 33) De la Rosa Fraile Manuel. Streptococcus agalactiae. Servicio de Microbiología. Hospital Virgen de las Nieves, Granada, España.
<http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/agalac.pdf>
- 34) Medina, R. J. J.. Prevalencia e identificación de agentes etiológicos causantes de mastitis bovina 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. Pp.20-22. 2002
- 35) Correa, M. G. P. y Marin, J. M.. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in Escherichia coli isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. Veterinary Microbiology. 2002. 85:125-132.
- 36) Velasco, Ma E. y Yamasaki, A. 1995. Bacterias de Interés Veterinario. México
- 37) Radostits, O. M., Gay Clive, C., Blood. D. C. y Hinchcliff, K. W.. Medicina Veterinaria; tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. Madrid, España. 9ª ed. Vol. 1. Ed. McGraw – Hill Interamericana., pp. 711 - 718. 2002



- 38) Luna Torres Ana Laura. 2009. Mycoplasma y Ureaplasma. Instituto Politécnico Nacional-México. <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish/chapter19.htm>
- 39) Grull Debbie. 2010. Mycoplasma bovis mastitis. Department of Primary Industries, Parks Water and Environment.
[http://www.dpiw.tas.gov.au/inter/nsf/Attachments/MCAS-87H7U2/\\$FILE/mycoplasma.pdf](http://www.dpiw.tas.gov.au/inter/nsf/Attachments/MCAS-87H7U2/$FILE/mycoplasma.pdf)
- 40) Kirk John, Mellenberger Roger. Mastitis Control Program for Pseudomonas Mastitis in Dairy Cows. University of Wisconsin.
<http://www.uwex.edu/milkquality/pdf/pseudomonas.pdf>
- 41) Couvalin AJ. El final de la edad de oro de los antibióticos. Ther Nat 1988; 314(3):50-2.
- 42) Gasques Gómez Ramón. Enciclopedia temática digital, enciclopedia bovina. Primera edición. México. 2008. UNAM. facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- 43) Kirk John, Mellenberger Roger. Mastitis Control Program for Pseudomonas Mastitis in Dairy Cows. University of Wisconsin.
<http://www.uwex.edu/milkquality/pdf/pseudomonas.pdf>
- 44) http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04MastitisBovina.pdf
- 45) Bedolla, CC, y col. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. REDVET. Vol. VIII. Pp 17. 7-9.
- 46) Mellenberger Roger, Roth Carol J. 2000. Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT). pp3. 1-3
- 47) <http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/04.pdf>
- 48) Dtb, Dsa. 2003 uso racional de productos antimicrobianos revista Bay Vet 11 enero- febrero 2003 año 5. Vol 7 nº11. Mexico



- 49)Ruiz, SH, Romero, At, 2003. La estrategia en la prevención de la mastitis bovina, manual de buenas prácticas de ordeño para el aseguramiento de la calidad de la leche, AMMVEPA y AMMVEB.
- 50)Cano, CP, 2004. Nuevas alternativas en el diagnóstico clínico del campo y en el tratamiento de mastitis. FMVZ, UNAM, en línea from:
<http://www.bovintecnia.unam> (consulta 26-08-08)
- 51)Botana L M. Landoni F. T. Martín Jiménez. Farmacología y terapéutica Veterinaria. España Mc Graw Hill Interamericana. 455-488
- 52)Sumano López Hectro S. Ocampos Camberros Luis. Farmacología veterinaria. México. Mc Graw Hill interamericana. Segunda Edición..
- 53)Abbasi K: Report calls for action on antibiotic resistance. Br. Med. J. 1998; 316, 1261.
- 54)<http://www.inifom.gob.ni/municipios/documentos/LEON>
- 55)<http://www.inifom.gob.ni/municipios/documentos/LEON/larreynaga.pdf>
- 56)<http://www.paho.org/spanish/ad/ths/ev/04.pdf>
- 57)http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf
- 58)NICKERSON, S. C., R. L. BODDIE.. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 1994. 77: 2526-2536.
- 59)Amiot J.. Ciencia y tecnología de la leche. Zaragoza-España Editorial Acribia S,A.. Pag 79-88. 1991
- 60)AppelbaumPC,BozdoganB.Vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Clin LabMed.2004;24:381–402



- 61) Vadillo S, Píriz S, Mateos E. Manual de microbiología veterinaria. Madrid España. Mc Graw Hill. 2003.
- 62) BAGER, F. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. Int. J. Antimicrobial Agents. 2000.14:271-274.
- 63) CRAVEN, N.; ANDERSON, C.; JONES, T. Antimicrobial drug susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. Vet. Rec. 118: 290-291. 1986.
- 64) <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioPruebasBioquimicas.htm>
- 65) Luis F. Calvino, Méd. Vet., PhD. 2008. Diagnóstico bacteriológico de mastitis y su importancia en los programas de control. pp15. 1-15
http://www.apocal.com.ar/wpcontent/uploads/diagnostico_de_mastitis.htm.pdf



XII. ANEXOS

Pasos previos a la recolección de muestra para el laboratorio

Preparación de la piel de la ubre y pezones

Las muestras fueron obtenidas directamente de la vaca previa al ordeño con una desinfección de acuerdo al siguiente procedimiento.

Se debe comenzar a desinfectar en primer término el pezón más alejado del operador, finalizando por el más cercano al mismo

Lavar los pezones con agua potable, una toalla de papel descartable y además con una solución antiséptica alcohol al 80%.

La punta de cada pezón se debe frotar vigorosamente con un algodón o pequeños paños humedecidos en alcohol etílico o isopropílico de 70% por 10 a 20 segundos; utilizando un trozo de algodón o paño para cada pezón a muestrear hasta notar que la punta del pezón esté visiblemente limpia.⁶⁴

Materiales para la toma de muestras

Tubos estériles con tapa a rosca o descartables con tapón a presión. Normalmente se utilizan tubos de 15 a 25 ml de capacidad debido a la facilidad para manipular los mismos. Sin embargo, se pueden utilizar viales o tubos de menor capacidad. En caso que se desee utilizar material de vidrio, se debe limpiar cuidadosamente y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos con las tapas ligeramente flojas. Las mismas deberán ajustarse luego de la esterilización⁶⁵

Se recomienda colocar cinta de enmascarar o similar a cada tubo para posibilitar la identificación de cada muestra utilizando bolígrafo o marcador permanente. Esta práctica es preferible a escribir directamente sobre el tubo de vidrio ya que facilita el lavado del material en el laboratorio. Es conveniente identificar los tubos cuando están secos antes del muestreo. Los viales de plástico se pueden identificar con



marcador permanente. Los tubos deberán posteriormente ubicarse en gradillas adecuadas para su manipuleo y almacenamiento⁶⁵

Momento de la toma de muestras

Las muestras para cultivo bacteriológico deben ser tomadas antes del ordeño.

Recolección de la muestra

Para disminuir la contaminación involuntaria de los pezones durante la toma de muestra, se debe comenzar a muestrear el cuarto más cercano al operador, finalizando con el más alejado. Se sacará la tapa del tubo sin tocar con los dedos la superficie interna de la tapa o la boca del mismo. Se eliminarán los primeros dos o tres chorros de leche y se mantendrá el tubo en posición oblicua.⁶⁵ El pezón se llevará asimismo a una posición oblicua y se dirigirá el chorro de leche dentro del tubo. Al ubicar tubos y pezones en esta posición se minimiza la posibilidad de contaminación por partículas que se desprendieran de la piel de la ubre. La celeridad en el procedimiento también disminuye la posibilidad de contaminación. La recolección de 3 a 4 ml de leche es suficiente para los análisis bacteriológicos⁶⁵.

Flora bacteriana de la ubre sana

La leche obtenida de una glándula mamaria sana puede contaminarse con organismos presentes en el canal del pezón. Si bien la magnitud y el tipo de la contaminación del canal del pezón son variables, los organismos más frecuentemente aislados son: *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium bovis*, *Bacillus spp*, *estreptococos*, *estafilococos*, *enterobacterias* y *Pseudomonas spp*⁶⁵

Procedimientos básicos de cultivo

El medio utilizado para el aislamiento primario de la mayoría de los organismos patógenos de mastitis es agar sangre. La sangre de bovino (preferiblemente ternero) u ovino, defibrinada u obtenida con anticoagulante, se agrega al medio base en una



concentración del 5%. No se recomienda el uso de sangre de caballo o conejo ya que no revelan la presencia de la hemolisina b de *S. aureus*⁶⁵

Las muestras deben ser retiradas del refrigerador para que tomen temperatura ambiente antes de ser sembradas. Las bacterias se concentran en la capa de grasa, por lo que las muestras deben ser cuidadosamente homogeneizadas mecánica o manualmente antes de inocular el medio de cultivo. La leche de los cuartos mamarios se siembra 0,01 ml en un cuadrante de la placa de cultivo⁵⁶.

Las placas inoculadas deben incubarse a 35-37°C por 24-48 hs. Usualmente las placas se examinan a las 18-24 hs para detectar la presencia de organismos de crecimiento rápido. En caso de no observarse desarrollo se reincuban por otras 24 hs. Si se sospecha la presencia de organismos de crecimiento lento, la incubación puede prolongarse. Por lo comentado anteriormente es posible que una muestra tomada en condiciones asépticas contenga organismos contaminantes provenientes del canal o el orificio del pezón⁶⁵. El aislamiento de varios tipos de bacterias a partir de leche de cuartos individuales sugiere una toma de muestra deficiente. Si se aíslan tres o más tipos de colonias distintos se deben considerar la muestra como contaminada, salvo que se aíslen *S. agalactiae* o *S. aureus*. Si se sospecha que la muestra está contaminada, el muestreo debería repetirse ⁶⁵.

Identificación de los organismos más frecuentemente aislados.

Los organismos más frecuentemente aislados son los cocos Gram positivos (estafilococos y estreptococos). El diagnóstico preliminar de *S. aureus* puede hacerse sobre la base de la morfología de las colonias y la hemólisis. Una zona amplia y una estrecha de hemólisis alrededor de las colonias son características de *S. aureus*. El diagnóstico definitivo se hará sobre la base de coloración de Gram, presencia de catalasa y coagulasa en plasma de conejo⁶⁵

Es importante que se diferencien los estafilococos coagulasa negativos de *S. aureus*, ya que la patogenicidad y características epidemiológicas de ambos son distintas⁶⁵



Los estreptococos producen colonias más pequeñas que los estafilococos, pudiendo dar una hemólisis clara (b) o verdosa (a) alrededor de la colonia, o no producir hemólisis. La identificación de las distintas especies se hace sobre la base de producción de hemólisis, ausencia de catalasa, CAMP test, hidrólisis de la esculina y del hipurato, crecimiento en caldo CINA al 6,5% y serotipificación. Las especies más frecuentemente aisladas son: *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*⁶⁵

Dentro de los organismos aeróbicos Gram negativos, los más frecuentemente aislados son los coliformes. Las colonias pueden diferenciarse de las de estafilococos por su mayor tamaño, humedad y color grisáceo a transparente. Luego de la coloración de Gram es conveniente inocular la colonia en medios diferenciales como el triple azúcar hierro y sulfhídrico indol motilidad, para proceder a una identificación presuntiva. La identificación definitiva se hace sobre la base de pruebas bioquímicas. Los géneros y especies más representativos dentro de este grupo son: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp*⁶⁵

Otro organismo aeróbico Gram negativo de aislamiento frecuente es *Pseudomonas aeruginosa*. *Corynebacterium bovis* es un bacilo Gram positivo considerado un patógeno menor. Las colonias se detectan luego de 48 hs de incubación y crecen mejor en la zona de la placa donde se depositó la primera estría de leche⁵⁶. La identificación se hace sobre la base de morfología microscópica, presencia de catalasa, y requerimiento de ácidos grasos insaturados. *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* es un organismo grasos insaturados. *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* es un organismo emparentado con las *Corynebacterias*, aunque causante de mastitis severas. Puede estar asociado con organismos anaerobios, generando exudados malolientes. Se identifica sobre la base de presencia de hemólisis, ausencia de catalasa, hidrólisis de la caseína y la gelatina, etc⁶⁵



Los *Mycoplasmas spp* son organismos sin pared celular. La especie más común es *Mycoplasma bovis*. Este organismo causa mastitis de aparición rápida y curso prolongado, caracterizadas por la presencia de exudado purulento y una marcada reducción de la producción láctea. La identificación se basa principalmente en la demostración de las colonias (0,01 a 0,5 mm de diámetro) con una típica apariencia de “huevo frito”⁶⁵

Otras bacterias que se aíslan frecuentemente son *Bacillus spp*, que si bien son considerados saprófitos, en ocasiones pueden causar mastitis. La posibilidad de estar en presencia de infección intramamaria causadas por gérmenes anaerobios debe contemplarse cuando no se aíslan organismos en cultivo aeróbico a partir de mastitis clínicas severas que no han recibido tratamiento. Estos organismos requieren técnicas de obtención de muestras y cultivo especiales⁶⁵

Otros organismos que pueden aislarse esporádicamente son: *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium bovis*, hongos (*Candida spp.*, *Criptococcus spp.*, etc.) y *Prototheca*⁶⁵



Ficha de recolección de datos

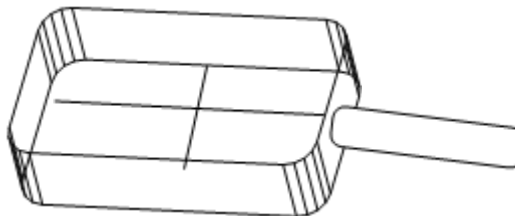
Resistencia antimicrobiana de bacterias aisladas en leche de vacas con mastitis en las fincas que abastecen a los centros de acopio de Achuapa y Larreynaga.

Fecha _____ N° de muestra _____

Municipio _____ Identificación del animal _____

Nombre de la finca _____

Resultados de CMT



Agentes encontrados

Fármaco	R	I	S	Fármaco	R	I	S
Amoxicil./A. Clav.				Amoxicil./A. Clav.			
Gentamicina				Gentamicina			
Oxitetraciclina				Oxitetraciclina			
Ciprofloxacina				Ciprofloxacina			
Cefalexina				Cefalexina			
Vancomicina				Vancomicina			
Enrofloxacin				Enrofloxacin			
Eritromicina				Eritromicina			



Tabla 1. Interpretación del método Kirby Bauer

Antibiótico	Concentración (miligramos)	Resistente	Intermedio	Sensible
Amox / ac. clav	30	< 13	14-17	> 18
Cefalexina	30	< 14	15-17	>18
Ceftriaxona	30	< 13	14-20	>21
Gentamicina	10	< 12	13-14	>15
Enrofloxacin	5	<16	17-22	>23
Oxitetraciclina	30	< 14	15-18	>19
Ciprofloxacina	30	< 15	16-20	>21
Vancomicina	30	< 17	—	—
Eritromicina	10	<15	16-20	>21

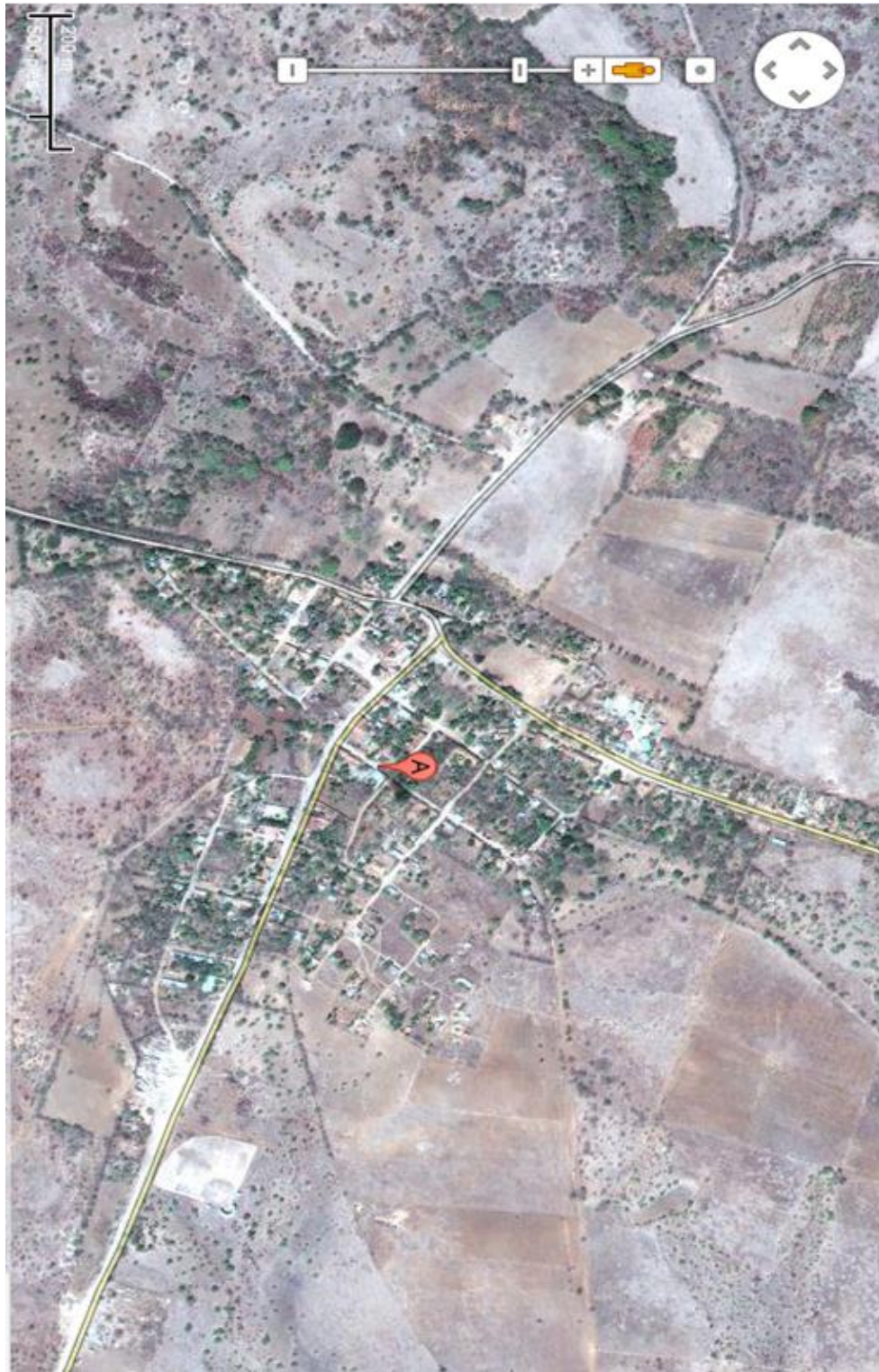


**Áreas de estudio
Municipio de Achuapa**





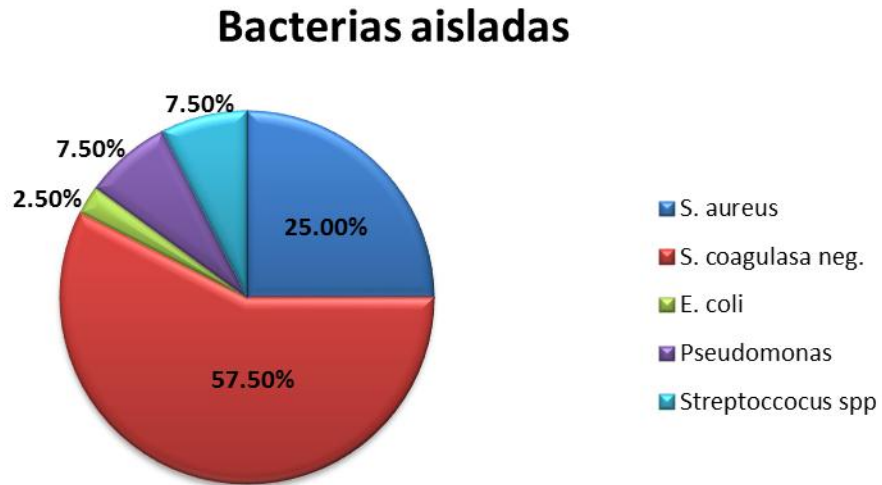
Municipio de Larreynaga



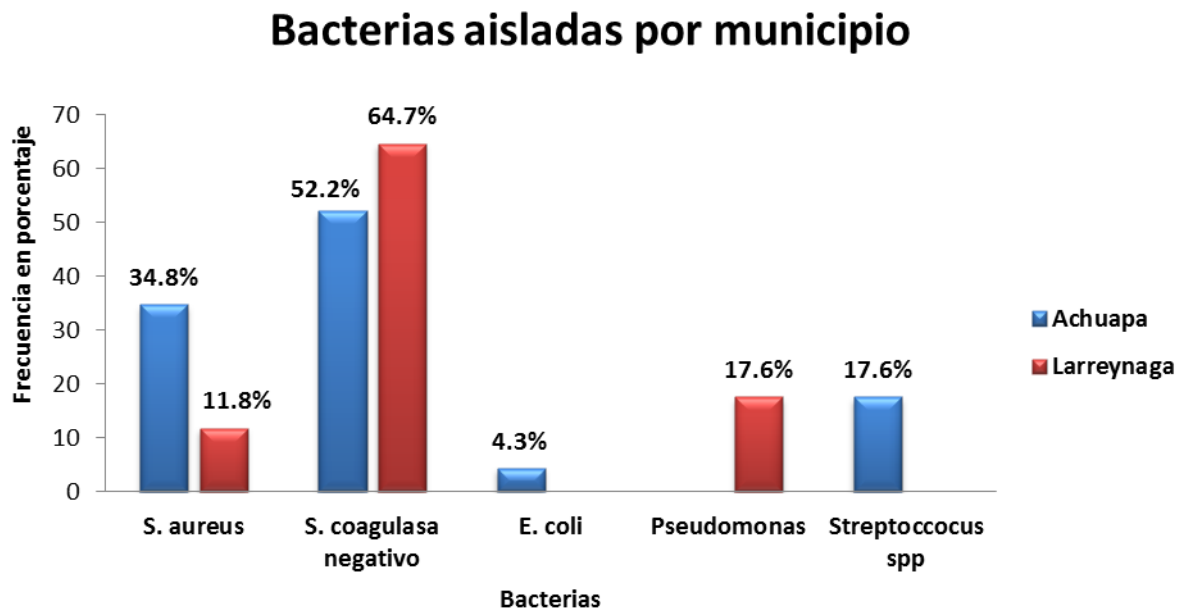


Gráficas de Resultados

Gráfica 1



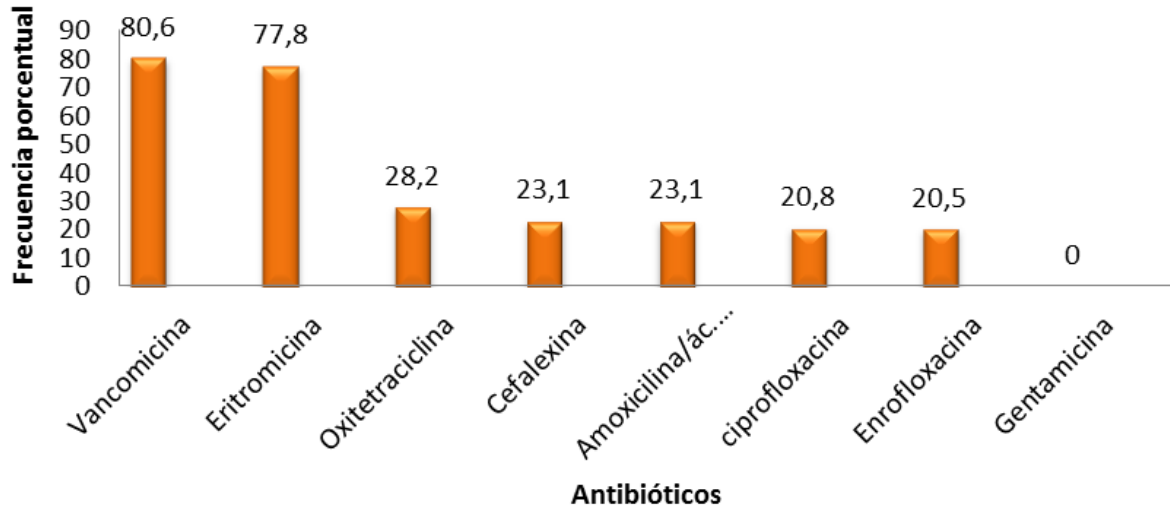
Gráfica 2





Gráfica 3

Resistencia antimicrobiana de las bacterias aisladas



Gráfica 4

Perfil de Resistencia de las Bacterias aisladas a los diferentes antibióticos

