



<https://revistaagrocienza.wordpress.com/>

Artículo de investigación

DOI:10.5281/zenodo.10788475

Efecto de tres selladores de barrera sobre la incidencia de mastitis subclínica y la evaluación de resistencia a antibióticos de tres bacterias patógenas en dos lecherías en el municipio de Caluco, Sonsonate, El Salvador

Effect of three brands of teat sealants on the incidence of subclinical mastitis and the evaluation of resistance to antibiotics of three pathogenic bacteria in two dairies in the municipality of Caluco, Sonsonate, El Salvador

Inestroza-Osorio, F.¹, Zepeda-Calles, T.Z.¹, Galindo-Guzmán, L.R.¹,
Salazar, C.D.², Morán-Rodríguez, A.E.³, Corea, E.E.²

Correspondencia:

fabrizio.nix@gmail.com
luis.reynaldo.gg@hotmail.com
tatianaazc@hotmail.com

Presentado:

17 de octubre de 2020

Acceptado:

13 de noviembre de 2020

- 1 Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Medicina Veterinaria.
- 2 Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Zootecnia.
- 3 Universidad de El Salvador, Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

RESUMEN

La mastitis clínica y subclínica infecciosa ocurre cuando uno o más agentes etiológicos ingresan al interior de la glándula mamaria y le provocan cambios físicos, químicos y morfológicos. Para su control se utilizan diferentes antibióticos que eliminan la infección. El uso de tratamientos de manera empírica sin realización de pruebas ha llevado en la era moderna a que los microorganismos desarrollen resistencia y multiresistencia. El objetivo de la investigación fue determinar la eficacia de tres marcas de selladores de pezón sobre la incidencia de mastitis subclínica bovina. Los cuartos mamarios de 120 vacas fueron examinados y evaluados mediante la prueba california para el diagnóstico de mastitis (CMT) durante 3 rotaciones de 21 días, dando un total de 360 observaciones. Las muestras positivas a CMT fueron llevadas al laboratorio para la identificación de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y mediante el método de difusión en disco se midió la sensibilidad, resistencia y multiresistencia hacia los antibióticos de uso más frecuente en dos ganaderías del departamento de Sonsonate en El Salvador. Los resultados indican que 13.88% de las vacas fueron positivas a CMT. Los selladores presentaron niveles de protección contra mastitis subclínica entre el 82.5% y el 89.16%, sin presentar diferencia significativa entre ellos. *Escherichia coli* fue el principal patógeno encontrado (42.85% de los aislamientos), seguido de *Staphylococcus aureus* (21.97%) y *Streptococcus spp.* (16.48%). Además, se aisló *Staphylococcus coagulasa-negativo* (18.68%); *Streptococcus agalactiae* no se encontró en ningún aislamiento. Las bacterias aisladas presentaron un alto grado de resistencia a penicilina G y a ampicilina (betalactámicos), además de presentar multiresistencia a las familias de aminoglucósidos, betalactámicos y quinolonas.

Palabras clave: mastitis subclínica; antibióticos, Prueba california de mastitis (CMT), resistencia bacteriana, multiresistencia bacteriana.

ABSTRACT

Infectious clinical and subclinical mastitis occurs when one or more etiological agents enter the interior of the mammary gland and cause physical, chemical and morphological changes of the gland. Different antibiotics are used to eliminate mastitis infection. The empirical use of antibiotic treatments without testing has led, in the modern era, to the development of resistance and multi-resistance of microorganism to antibiotic therapy. The objective of the research was to determine the efficacy of three brands of teat sealants on the incidence of subclinical bovine mastitis. The mammary quarters of 120 cows, in two herds of the Department of Sonsonate, were examined and evaluated using the California Mastitis Diagnostic Test (CMT) during 3 rotations of 21 days, for a total of 360 observations. The samples positive to CMT were taken to the laboratory for the identification of *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The sensitivity, resistance and multi-resistance towards the most frequently used antibiotics were determined by the disk diffusion method. The results indicated that 13.88% of the cows were positive for CMT. The sealants presented levels of protection against subclinical mastitis between 82.5% and 89.16%, with no significant difference among sealants. *Escherichia coli* was the main pathogen found (42.85% of the isolates), followed by *Staphylococcus aureus* (21.97%) and *Streptococcus* spp. (16.48%). In addition, coagulase-negative *Staphylococcus* (18.68%) was isolated; *Streptococcus agalactiae* was not found in any isolate. The isolated bacteria presented a high degree of resistance to penicillin G and ampicillin (beta-lactams), in addition to presenting multi-resistance to the aminoglycoside, beta-lactam and quinolone antibiotic families.

Keywords: subclinical mastitis; antibiotics, California mastitis test (CMT), bacterial resistance, bacterial multiresistance.

INTRODUCCIÓN

La producción de leche en El Salvador, es una de las principales actividades productivas del sector ganadero que ha generado 150 000 empleos a nivel rural y produjo cerca de 500 millones de litros de leche en 2015 (BCR, 2016); lo que representa un 60% a 70% de las necesidades de consumo del país, esto refleja una producción insuficiente para la demanda actual.

La mastitis es uno de los problemas que influye en la disminución de la producción de leche en las ganaderías y permite que la productividad anual en el hato disminuya entre un 10% a 11% (Calvinho y Tirante, 2005). Esta es una inflamación de la glándula mamaria ocasionada por lesiones traumáticas o la entrada de microorganismos patógenos a su interior; según su severidad, la mastitis se clasifica como clínica y subclínica, esta última es difícil de ver a simple vista, ya que casi siempre los cuartos afectados y la leche tienen apariencia normal, por lo que se vuelve necesario realizar conteo de células somáticas para su verificación. La mastitis no sólo causa disminución en la calidad y la producción láctea, también provoca daño y en ocasiones la pérdida glandular; además implica mano de obra extra, leche de desperdicio, gastos por medicamentos e incremento de los costos

por concepto de reemplazos. Se reporta que el porcentaje de vacas eliminadas por causa de mastitis va de 1.3% hasta 25% anualmente (Olguín y Bernal, s.f).

La mastitis subclínica afecta a todas las ganaderías con un porcentaje variable entre 15% a 75% de prevalencia (Merck, 2006), lo que limita la cantidad de litros de leche aportada por los ganaderos para solventar la demanda de productos lácteos.

Para mantener al mínimo la prevalencia es necesaria una desinfección post ordeño. La desinfección de pezones mantiene sana la piel del pezón y ayuda a cicatrizar heridas, además contribuye de forma decisiva al control de mastitis, ya que más del 50% de nuevas infecciones de la ubre se pueden prevenir desinfectando los pezones después de cada ordeño con un producto efectivo. Entre los principales componentes activos en los desinfectantes de pezones se encuentran: yodo, clorhexidina, compuestos aniónicos ácidos (ácido sulfónico de alquil benceno), cloro, amonios cuaternarios, ácidos grasos (Callejo Ramos, 2010). El sellador de pezón busca que el paso al interior de la ubre quede bloqueado a los agentes patógenos causantes de la mastitis.

Los patógenos causantes de la mastitis en ganado, se

dividen en mayores y menores: primero se encuentran los patógenos contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma bovis*) y los patógenos medioambientales (*Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*) en cuanto a coliformes se encuentran bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp.). En el segundo grupo encontramos patógenos como: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus epidermidis*, así como *Corynebacterium bovis* (Ruiz, 2016). De todos estos, se seleccionaron tres patógenos por ser los más comúnmente encontrados en otros estudios y bibliografías (*S. agalactiae*, *S. aureus* y *E. coli*).

Los agentes antimicrobianos han sido ampliamente usados para el tratamiento de mastitis bovina. Existen importantes razones para evaluar la resistencia a los antibióticos, una de ellas es obtener información que ayudará en la elección del antimicrobiano más adecuado para el tratamiento. Y la más importante desde el punto de vista de salud pública, que se enfoca en la detección temprana de cepas bacterianas con resistencia múltiple a distintos antibióticos para evitar la presencia de estas en la cadena de alimentos de origen animal (Giannechini et al., 2014).

Por estas razones el objetivo de la investigación fue; comparar tres de los selladores a base de yodo disponibles en el mercado y determinar cuál provee un porcentaje mayor de protección contra mastitis subclínica, así como medir la prevalencia; además verificar la presencia de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, considerados los principales agentes patógenos causantes de mastitis, y determinar su sensibilidad, resistencia y multiresistencia a los antibióticos más comúnmente utilizados en el tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología de campo: Ubicación, duración, unidades experimentales

El estudio se llevó a cabo en el periodo de junio – agosto del año 2017 en dos ganaderías lecheras ubicadas en el municipio de Caluco departamento de Sonsonate en El Salvador, que cuentan con sistemas de producción intensiva, manejo estabulado, ordeños mecanizados y genética predominantemente Holstein con una cantidad mayor a 120 vacas en ordeño.

Evaluación de efectividad de selladores

Se utilizó un protocolo de ordeño que consiste en la aplicación de un sellador de barrera a base de yodo, así como en la realización de forma periódica la prueba california de mastitis test (CMT). Se siguió el protocolo de ordeño recomendado por la Cooperativa La Salud de Sonsonate que incluía: lavado de manos, despunte, resellado, secado, colocación y lavado de pezoneras y aplicación de sellador.

Selección de unidades experimentales

Al inicio del estudio, se seleccionaron 60 vacas en ordeño para cada ganadería con resultado a prueba CMT negativo, menos de 150 días en lactancia, condición corporal mayor a 3.0 e historial de salud normal. Las vacas fueron repartidas al azar en tres grupos de tratamiento, que consistían en tres diferentes selladores de pezón (a base de yodo). Las vacas fueron identificadas por grupos con listón de color diferente para cada sellador y se instruyó a los ordeñadores para usar el sellador correspondiente en cada caso.

Aplicación de los tratamientos

El experimento consistió en tratar 120 vacas negativas a CMT, divididas en grupos a las que se le aplicaron uno de tres selladores a base de yodo activo (2200-2500 ppm) durante 21 días, 20 con el sellador A; 20 con sellador B; y 20 sellador C). Las vacas de ambas ganaderías fueron preselladas con un desinfectante con acción virucida, bactericida, fungicida y

esporicida. Al final de un periodo de 21 días se realizó la prueba de CMT, y registró como negativas a las vacas sin reacción y positivas a las vacas que presentaron reacción grado Trazas o 1 en uno o más cuartos, las vacas positivas en al menos un cuarto de la ubre se sustituyeron con una vaca negativa para mantener el número de vacas en estudio. Luego de

la prueba CMT, las vacas de cada grupo pasaron a usar el siguiente sellador hasta que se completaron los tres productos con intervalos de 21 días cada uno (Cuadro 1). Durante la prueba CMT, se anotó el grado de reacción en todos los cuartos de todas las vacas de las ganaderías y así se obtuvo el número de casos nuevos de mastitis dentro de cada tratamiento.

Cuadro 1. Dinámica de aplicación y rotación de selladores

Diseño metodológico/ Unidades experimentales						
	Ganadería 1			Ganadería 2		
UNIDADES	20	20	20	20	20	20
Periodo 1	A	B	C	A	B	C
Periodo 2	C	A	B	C	A	B
Periodo 3	B	C	A	B	C	A
Lecturas obtenidas por cada sellador	A = 60	B = 60	C = 60	A = 60	B = 60	C = 60
TOTAL	180			180		

Nota: Cada grupo de tratamiento por cada sellador comprendía 20 individuos.

Aislamiento, evaluación de la sensibilidad y resistencia a antibióticos

Recolección de muestras

Durante las pruebas de CMT, se escogieron diez vacas positivas en cada ganadería y se les realizó un estudio de aislamiento de bacterias y sensibilidad a antibióticos. Para obtener las muestras se realizó una higienización de la ubre y el pezón y así retirar residuos contaminantes de la muestra. Las muestras fueron tomadas de forma manual directamente del pezón afectado por lo que se eliminaron los primeros 2 o 3 chorros de leche y luego se recolectó una cantidad suficiente (aproximadamente 150 ml) en bolsas estériles y estas fueron transportadas en hieleras con gel refrigerante a una temperatura aproximada de 4°C hacia los laboratorios de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en la Universidad de El Salvador donde eran procesadas.

Metodología de laboratorio: aislamientos bacterianos

Se siguieron los procedimientos establecidos

por BAM (2016), para el aislamiento de bacterias importantes para la mastitis: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Se realizó una siembra primaria de cada una de las muestras de leche para cada una de las tres bacterias en agua peptonada bufferada (APB) (*S. aureus*, *E. coli*) y caldo Brain Heart Infusion (BHI) (*S. agalactiae*); luego se procedió a incubar por un periodo de 24-48 horas en aerobiosis para *S. aureus* y *E. coli*, y anaerobiosis para *S. agalactiae*.

***Streptococcus agalactiae*.**

Después de su incubación en BHI, se procedió a realizar el siguiente procedimiento:

Agar Sangre: se inoculó en este medio y se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas, esperando ver beta hemólisis.

Prueba de CAMP: para esto se procedió a sembrar una estría de una cepa control de *S. aureus* y perpendicularmente a esta (lo más cerca posible sin llegar a tocarla) se sembró la cepa de *Streptococcus* spp. en estudio. Se dejó incubar por 24 horas a 35°C en anaerobiosis y su interpretación fue el sinergismo

de hemólisis causadas por ambas bacterias, en forma de punta de flecha en la zona que estaba más cercana a ambas estrías (Julio et al., 2014).

Prueba de bilis esculina: se sembró directo de agar sangre en este medio donde se esperaba la degradación de la esculina con la presencia de un color verde olivo oscuro hasta negro (Julio et al., 2014).

Prueba de la catalasa: se realizó de una colonia directa de agar sangre colocada en un portaobjetos que tiene solución de peróxido de hidrógeno al 2%, donde no debía observarse aparición de burbujas (BAM, 2016).

Tinción de gram: el resultado esperado debía ser color morado que representa una bacteria gram + y observar al microscopio cocos en cadena.

Staphylococcus aureus.

Después de su incubación en APB se procedió a inocular en agar Baird Parker, donde se esperó un crecimiento de colonias redondas, negras y con un halo transparente característico de esta especie.

Prueba de la catalasa: se realizó de una colonia directa de agar Baird Parker colocada en un portaobjetos que tiene solución de peróxido de hidrógeno al 2%, donde no debía observarse aparición de burbujas (BAM, 2016).

Procedimiento: Se colocaba una colonia crecida en un portaobjetos de vidrio y se agregaba una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre esta, luego se observaba burbujeo inmediato y vigoroso debido a la producción de oxígeno gaseoso.

Estafilococos son catalasa positivos, mientras que estreptococos y enterococos son catalasa negativos (Winn, et al., 2008).

Prueba de coagulasa: se transfirieron las colonias sospechosas de *S. aureus* a pequeños tubos conteniendo 0.2-0.3 ml de caldo BHI y se emulsionaron a fondo; se incubó en suspensión por 18-24 horas a 35-37°C, luego se le agregó 0.5 ml de plasma al cultivo BHI y se mezcló profundamente;

se incubó a 35-37°C durante 6 horas. Se examinó la formación de un coágulo (BAM, 2016).

Tinción de gram: el resultado esperado debía ser color morado que representa una bacteria gram + observando al microscopio cocos en racimo.

Escherichia coli

Luego de haber inoculado en APB durante 24 horas, se procedió a realizar las siguientes pruebas:

VRBA: de APB se sembró por placa vertida en agar bilis rojo violeta (VRBA) incubado en aerobiosis a 35°C por 18-24 h. (debían crecer colonias planas color rosa con decoloración del medio) (BAM, 2016).

Prueba confirmatoria de coliformes fecales (EC): se inoculó con tres asadas de cada colonia positiva a VRBA un tubo que contenía 10 ml de caldo EC y tubo de Durham, para comprobar la presencia de coliformes fecales. Se incubó durante 24-48 horas a 44.5°C, luego del periodo de incubación se observaron los tubos. Si había turbidez y producción de gas, la prueba se consideraba positiva (BAM, 2016).

Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (EMB, Rapid HiCrome™ Coliform Agar y Chromocult® Agar): se tomó una asada de cada uno de los tubos positivos en caldo EC y se sembró por estría cruzada en agar eosina azul de metileno (EMB), se incubaron las placas invertidas a 35°C por 18-24 h, se seleccionaron dos colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: colonias planas con o sin brillo metálico (EMB). Si no había colonias con morfología típica, se probó una o más colonias lo más parecido *E. coli*, para realizar las pruebas de morfología microscópica, se seleccionaron colonias características de *E. coli* y se sembraron por estría cruzada en agar Rapid Hi-Coliform y se incubaron las placas a 37°C por 18-24 h. se hizo la observación macroscópica en presencia de luz ultravioleta, el cual presenta un color verde fluorescente. Para las muestras sembradas en chromocult se observaba un crecimiento de colonias azul o violeta (BAM, 2016).

Tinción gram: el resultado esperado debía ser

color rosado que representa una bacteria gram - observando al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos (Camacho et al., 2009).

Mantenimiento de aislados para evaluación de sensibilidad/ resistencia

Todas las bacterias aisladas fueron conservadas en Tripticasa Soya Agar (TSA) en refrigeración hasta la realización de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

Prueba de sensibilidad de las bacterias a antibiótico (método de discos por difusión)

Los antibióticos evaluados fueron: ampicilina (AMP), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC), enrofloxacin (ENR), gentamicina (CN), neomicina (N) y penicilina G (P). Estos antibióticos son los utilizados en el tratamiento de la mastitis subclínica en las ganaderías en estudio.

Preparación del inóculo: se suspendieron de 3-5 colonias de la bacteria en estudio (cultivo reciente en TSA no mayor a 24 horas) a la escala 0.5 de McFarland.

Inoculación de placas: se impregnó un hisopo estéril en la suspensión, y se removió el exceso de líquido rotando el hisopo sobre la pared interior del tubo. Se inoculó la superficie de las placas con agar Müller-Hinton y se estrió en tres direcciones distintas, inoculando toda la placa uniformemente (Erna, 2002).

Aplicación de sensidisco: Los discos se colocaron sobre la superficie del agar Müller-Hinton con ayuda de una pinza estéril haciendo leve presión para asegurar el contacto completo del disco con el agar, la cantidad de los discos dependía del diámetro de la caja Petri, siendo así 12 unidades en placas de 150 mm de diámetro y 5 unidades en placas de 100 mm de diámetro, con una separación de 24-25 mm (del centro de un sensidisco al otro más cercano).

Incubación: se incubaron en aerobiosis y anaerobiosis (*Streptococcus spp*) a 35°C por 24 horas posterior a la aplicación de los discos (Erna, 2002).

Lectura e interpretación de resultados: después del periodo de incubación, se midió el diámetro de las zonas (Figura 1) de completa inhibición con un calibrador o pie de rey. Se observó con luz y con fondo negro, para poder visualizar mejor el halo. La interpretación de los diámetros de inhibición fue interpretada según las tablas propuestas por Clinical & Laboratory Standards (NCCLS, 2002).

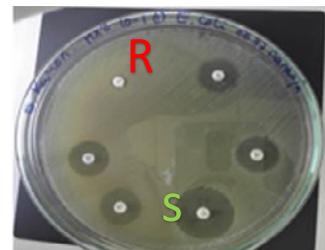


Figura 1. Placa con resultados sensibles y resistentes

Análisis de datos

El efecto de tres selladores sobre la incidencia de mastitis subclínica en dos ganaderías y tres periodos, se evaluó mediante la prueba de Chi-cuadrada. Se utilizó el programa IBM SPSS STATISTICS versión 25 y con dos grados de libertad y una probabilidad de 5%. Los datos de aislamientos y antibiogramas se presentan en cuadros y gráficos que son descritos y discutidos en relación con la literatura pertinente y las condiciones del estudio. Los aislamientos se presentaron como número de positivos y negativos en relación con las muestras analizadas para cada bacteria en una tabla de contingencia e interpretada mediante estadística descriptiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prevalencia de mastitis subclínica y efectividad de los selladores

Se determinaron los resultados de la prueba de California Mastitis Test (CMT) para mastitis subclínica en 360 totales por las dos ganaderías. Los valores globales de resultados para CMT en las vacas incluidas en el estudio, independientemente del sellador usado, se muestran en el Cuadro 2 y se resumen en el Figura 2. Estos corresponden a 310 (86.11%) casos negativos y 50 (13.88 %) casos positivos.

Cuadro 2. Resultados de prueba California mastitis Test (CMT) en vacas en ordeño en dos ganaderías lecheras de Sonsonate, El Salvador.

Vacas / Ganadería	Vacas positivas		Vacas negativas		TOTAL
	Casos	%	Casos	%	Casos
Ganadería 1	29	16.11	151	83.89	180
Ganadería 2	21	11.66	159	88.33	180
TOTAL	50	13.88	310	86.11	360

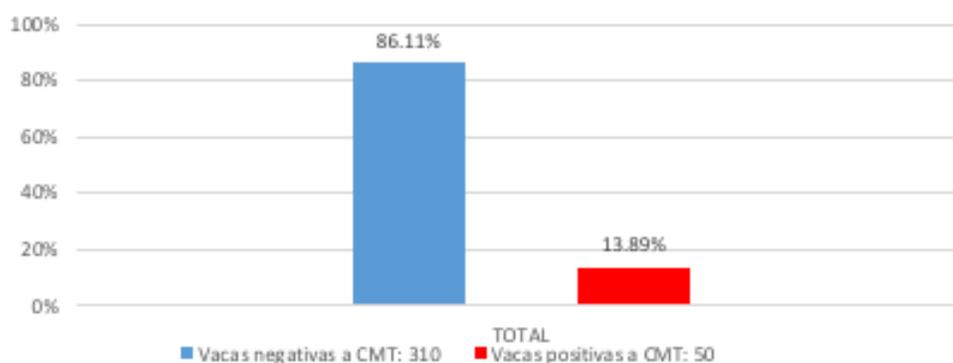


Figura 2. Porcentaje de vacas totales en estudio positivas y negativas a prueba CMT (n=360).

Se observó que los selladores en estudio presentaron niveles de protección aceptables contra mastitis, lo que permitió solamente entre un 11.66% - 16.11% de incidencia de mastitis subclínica en las vacas del estudio en conjunción con los pasos de ordeño

higiénico. En el Figura 3, se presenta el resultado global de las dos ganaderías y los tres periodos para los selladores en estudio. El nivel de protección fue similar entre ellos con un rango de 82.5% a 89.17%.

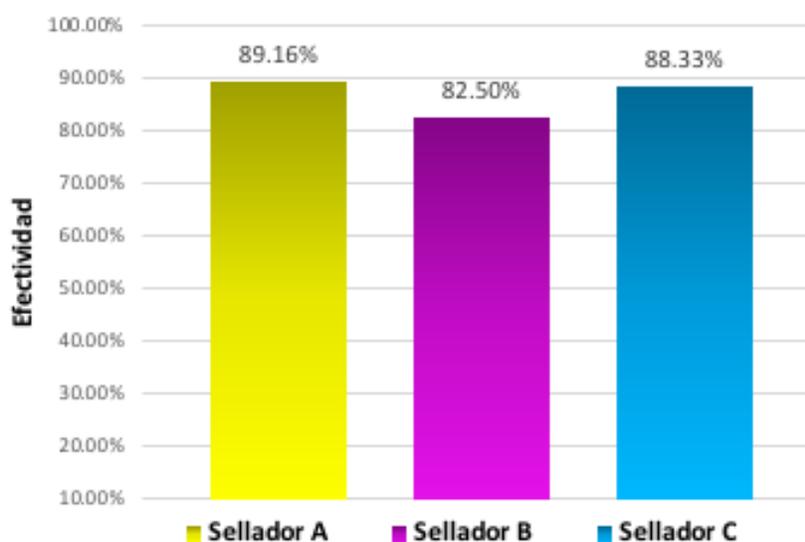


Figura 3. Porcentaje de vacas con prueba CMT negativa después de 3 rotaciones de 21 días de uso de diferentes selladores de pezón

La prueba de chi cuadrado dio como resultado un valor calculado de 1.10, que es menor al valor de tabla 5.99 (a una probabilidad de 0.05), por lo tanto, se asume que el efecto de los diferentes selladores sobre la presentación de casos nuevos de mastitis subclínica no es significativo. Lo que se interpreta que cualquiera de ellos tendrá un efecto similar sobre el control de la mastitis subclínica.

Según el National Mastitis Council (Tirante, 2007), para que un sellador de pezón pueda considerarse eficaz debe reducir el porcentaje de nuevas infecciones intramamarias en más del 40%. Chávez (2010), afirma que está suficientemente comprobado que la práctica de sellado disminuye en un 50% las nuevas infecciones en el hato cuando se realiza con un producto de eficacia probada. Los resultados de esta investigación muestran que se puede evitar los nuevos casos de mastitis en un porcentaje superior al 80% cuando se usa los selladores evaluados en este estudio.

En un estudio realizado en Costa Rica, los selladores de barrera de pezón a base de Iodo-povidona protegieron un 89.65%, también observaron que el sellador disminuyó en un 66% las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y en un 100% las causadas por coliformes fecales (Fernández et al., 2008).

En México un estudio en el que se trabajó con 222 animales alojados en corrales húmedos y sucios reveló que al hacer la aplicación de un sellador de barrera permitió nada más un 3% de casos de mastitis en un periodo de 18 días de tratamiento (Caro, 2011); estas condiciones ambientales son similares a las del presente estudio, para el cual los animales siempre llegaban al ordeño con una capa de lodo y excretas en la parte ventral de su cuerpo.

En un estudio realizado en Uruguay, se evaluó la incidencia de las infecciones intramamarias comparando dos selladores de barrera a base de yodo en tres establecimientos, los resultados (63% y 60%) mostraron que no hubo diferencias significativas en la prevención de infecciones intramamarias entre los

dos selladores evaluados (Pagliano 2016).

Aislamientos bacterianos

Se buscó aislar tres de las bacterias importantes para mastitis en vacas positivas a CMT, para conocer si son las más comunes en las ganaderías salvadoreñas. De las 60 muestras de vacas positivas a CMT, se descartaron trece debido a que los animales estaban en tratamiento antibiótico al momento del muestreo, lo que interferiría con el aislamiento, debido a esto se trabajó con 47 muestras de este total se obtuvieron 94 aislamientos de microorganismos considerados de interés para la mastitis subclínica en esta investigación.

Los porcentajes correspondientes de aislamientos fueron *Streptococcus* spp. (16.48%), *Staphylococcus aureus* (21.97%), *Staphylococcus coagulasa negativa* (18.68%) y *Escherichia coli* (42.85%) (Cuadro 3). Es de notar que *Streptococcus agalactiae* fue buscado en este trabajo pues en la literatura y estudios previos a esta investigación lo señalan como uno de los principales agentes etiológicos en mastitis (Wolter et al., 2015); sin embargo, no se encontró ningún aislado correspondiente a este microorganismo. Por otra parte, del total de las 47 muestras positivas a CMT, se aisló *Streptococcus* spp. en 31.91%, *Staphylococcus* spp. en 40.65 %, y *Escherichia coli* en 68.08 % (Cuadro 3).

A pesar que no se identificó *Streptococcus agalactiae*, la prevalencia de otras especies de *Streptococcus* fue de 16.48% en este estudio (Cuadro 3), lo que es comparable con investigaciones cuyos resultados son similares en América Latina, por ejemplo en Brasil la prevalencia de *Streptococcus* spp. en hatos con ordeño mecánico fue de 12,9% (Ruiz et al., 2011). En Argentina fue de 12,5% (Calvinho y Tirante, 2005), Colombia de 4,1% (Becerra et al., 2014) y 19.5% reportado en Uruguay (Giannenci et al., 2014).

De los tres géneros de interés, *Staphylococcus aureus* se presentó en un 21.97% y 18.68% para *Staphylococcus coagulasa negativo* (Cuadro 3). En un trabajo reciente en El Salvador, Perla y Herrera (2017)

Cuadro 3. Microorganismos aislados en muestras de leche provenientes de vacas positivas a CMT. (Total de pruebas = 360, total de muestras positivas = 47).

Microorganismos aislados.	CMT (+)	Muestras positivas para cada microorganismo		Aislados obtenidos de cada Microorganismo				
		No.	%	A*	B*	C*	TOTAL	%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	47	0	0	0	0	0	0	0.00%
<i>Streptococcus spp</i>	47	15	31.91%	3	6	6	15	16.48%
<i>Staphylococcus aureus</i>	47	16	34.04%	4	9	3	23	21.97%
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	47	17	36.17%	6	6	5	17	18.68%
<i>Escherichia coli</i>	47	32	68.08%	6	14	12	39	42.85%
TOTAL							94	100.00%

*A = Tensolac; B = Io Shield; C= Scud. Se aislaron dos de los tres microorganismos de interés en la investigación, y para el caso de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* se identificaron de manera general otras especies no contempladas inicialmente en el estudio.

reportaron que *Staphylococcus aureus* se encontró en un 22.61% de todos los aislamientos de muestras de leche provenientes de ganaderías con ordeño manual, lo que se asemeja a lo encontrado en estudio actual con ordeño mecánico.

Diferentes estudios han señalado a *Staphylococcus aureus* como uno de los principales causantes de mastitis. En Montería, Colombia, se evaluaron 2,854 vacas de 40 fincas especializadas y encontraron a *S. aureus* (29.09%) como principal patógeno (Calderón y Rodríguez, 2008). En Brasil se estudiaron 185 vacas en 11 propiedades productoras de leche bovina del estado de Pernambuco; seis con ordeño manual y cinco con ordeño mecánico (Ruiz et al., 2011), determinando una prevalencia de *Staphylococcus spp.* en ordeño mecánico del 36.4%. Otros reportes de prevalencias de *S. aureus* en Suramérica son 13.9% (Calvinho y Tirante, 2005), 74.4% (Mendoza et al. 2017), y 6.6 % (Becerra et al., 2014). Los bajos valores encontrados en los últimos dos estudios probablemente se deban a que fueron desarrollados en ganaderías con buen nivel tecnológico y de higiene.

Escherichia coli presentó una prevalencia de 38.55%

en esta investigación (Cuadro 3), un valor mayor al reportado por otra investigación realizada en El Salvador con una prevalencia de *E. coli* (17.85%) (Perla y Herrera 2017). Probablemente el valor mayor en el estudio actual se deba a que las vacas estaban estabuladas con una densidad alta que permitía mayor contacto con material fecal, mientras que en el otro caso se usaron ganaderías más extensivas. Otros estudios han reportado prevalencias de *E. coli* de 13.3% en Colombia (Mendoza et al., 2017) y se observa un menor porcentaje de presentación a diferencia de los resultados obtenidos en El Salvador.

E. coli se encuentra en el ambiente, no forma parte de la microbiota normal del ubre de la vaca. Estos microorganismos se consideran contaminantes medioambientales y han sido señalados como agentes causales hasta en un 97.5% en otras explotaciones en regiones tropicales (Olivarez et al., 2015). Por el contrario de los agentes patógenos contagiosos de la mastitis, se localizan principalmente en el medio que rodea a la vaca. Las bacterias pertenecen a la microbiota normal del ambiente y se encuentran en cada establo (Wolter et al., 2015).

Es posible que estos patógenos estén aumentando debido a las fallas observadas en las prácticas de prevención y control de la mastitis, como en la implementación de la higiene de la ubre antes del ordeño o la presencia de excretas en el ambiente, así como aguas encharcadas y lodazales, contaminando las zonas de descanso y la sala de ordeño. Según Calderón y Rodríguez (2008), las malas prácticas ganaderas en la implementación de las medidas profilácticas, hace que algunos de estos microorganismos puedan llegar a desarrollar signos sistémicos en la vaca e incluso, provocar la muerte.

Resultados de sensibilidad antimicrobiana a los antibióticos

De un total de 47 muestras de leche de vacas positivas a mastitis subclínica, se evaluaron los perfiles de resistencia de los microorganismos de interés aislados.

Streptococcus spp.

Basados en los datos obtenidos, los antibióticos que más eficacia tiene contra *Streptococcus spp.*, son: gentamicina (CN) y enrofloxacin (ENR), ya que sus niveles de sensibilidad fueron entre el 93 - 100% (Figura 4), mientras que fue 80% sensible a neomicina (N). Diferentes autores recomiendan el uso de aminoglucósidos (entre ellos CN y N) para el tratamiento de mastitis subclínica, los resultados obtenidos en este estudio respaldan dicha recomendación.

De los antibióticos que pertenecen al grupo de los betalactámicos, se encontró el 100% de resistencia a penicilina (P), 93% a ampicilina (AMP) y 60% de resistencia para amoxicilina más ácido clavulánico (AMC). García et al. (2000), sugiere que el uso de betalactámicos (P y AMP) no es recomendable, aunque si estos antibióticos llevan ácido clavulánico tienen mayor efectividad como en el caso de (AMC) debido a que ese componente inhibe la acción de las betalactamasas, que son las enzimas bacterianas que las hacen resistentes a esta familia de antibióticos, lo que nos deja un porcentaje de sensibilidad en este

estudio de 27% para ayudar a combatir infección por *Streptococcus spp.*

Estudios realizados en Suramérica en vacas con mastitis, han mostrado resistencia de *Streptococcus spp.* a antibióticos. En Colombia se reportó resultados de 21% de resistencia a ampicilina (Cruz et al., 2007). En Paraguay, se presentó un 20% de resistencia a gentamicina, un 64% a penicilina, un 56% a ampicilina y un 88% a neomicina (Florentín, 2007). La resistencia de alto nivel frente a aminoglucósidos puede ser por mutación ribosómica o por inactivación enzimática de una adeniltransferasa. La resistencia de alto nivel se traduce en la anulación del sinergismo bactericida entre el aminoglucósido y los betalactámicos (Gilbert, 2000).

Staphylococcus aureus

Para *S. aureus* los antibióticos más efectivos fueron neomicina con 87% de sensibilidad, 78% gentamicina, amoxicilina con ácido clavulánico con 70% y enrofloxacin con 87 % de sensibilidad. Por otra parte, los menos efectivos fueron penicilina con 87% y ampicilina con 73 % de resistencia (Figura 5). La penicilina fue el antibiótico menos eficaz contra *Staphylococcus aureus* en este estudio. Para penicilina se observan resultados similares en estudios realizados en El Salvador por Perla y Herrera (2017), quienes encontraron una resistencia de 57.14% a penicilina y en Nicaragua un 16.7% de resistencia (Aguirre y Zeledón, 2007), porcentajes menores que el de esta investigación.

En Santa Fe, Argentina, Russi (2008), reportó que un 48.4% de los aislamientos fueron considerados resistentes a la penicilina. Otros reportes, han mostrado menores porcentajes en resistencias, tal es el caso de Argentina donde reporto un 22.2% (Pellegrino et al., 2011), Venezuela 12.4% (Valero et al., 2010) y El Salvador 5.71% (Arreces, 2015).

Escherichia coli

Para *E.coli* se encontró 97% de sensibilidad a gentamicina, 92% a enrofloxacin y 87.17% a

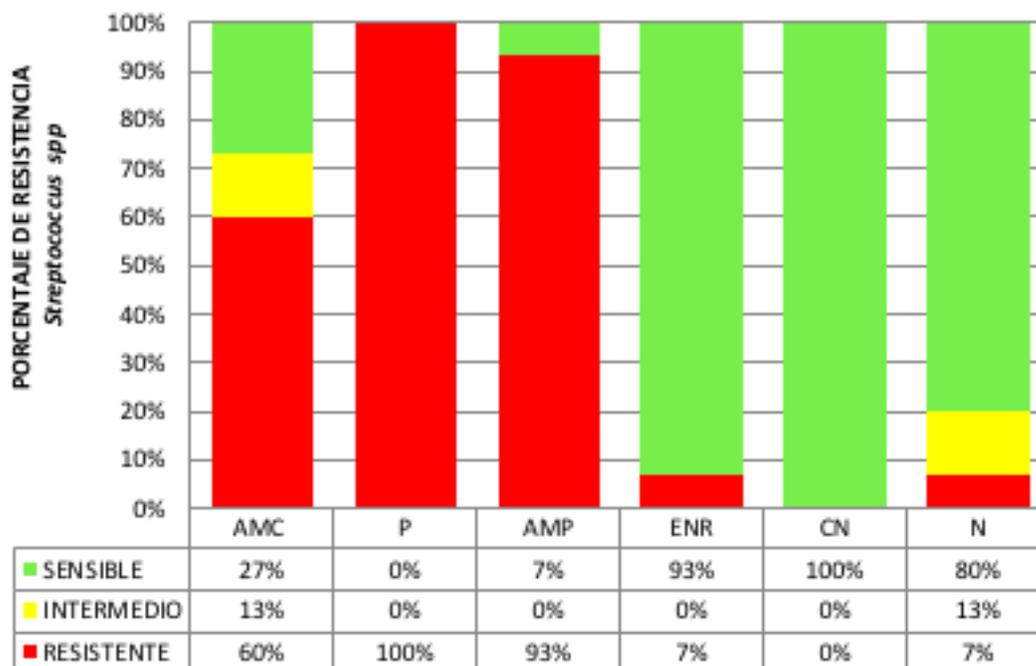


Figura 4. Perfil de sensibilidad antibiótica en aislados de *Streptococcus* spp. en muestras de leches con reacción positiva a CMT (n=15).

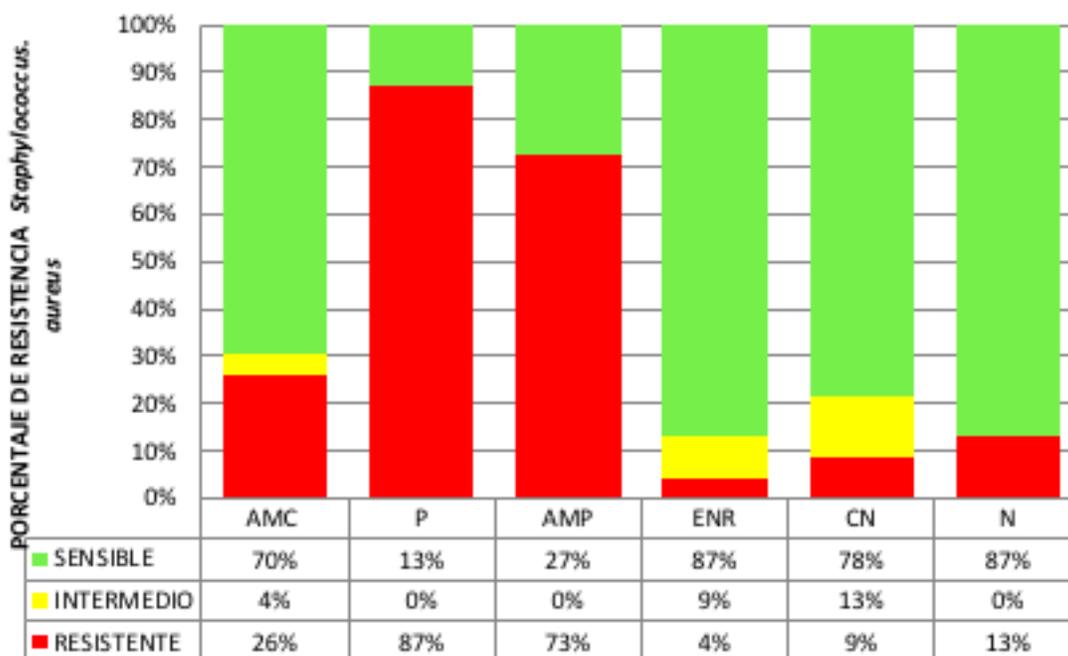


Figura 5. Perfil de sensibilidad antibiótica en aislados de *S. aureus* en muestras de leches con reacción positiva a CMT (n=16).

neomicina (Figura 4). A su vez, estos aislados presentaron mayores resistencias a penicilina 100% y ampicilina 58.97%, ambos betalactámicos; y una menor resistencia a amoxicilina más ácido clavulánico 28% (Figura 6).

En este estudio de sensibilidad en placa, los aislamientos de *E. coli* mostraron elevada sensibilidad a gentamicina, enrofloxacina y neomicina. Sumano y Ocampo (2008), señala que la acción de algunos antibióticos como gentamicina puede ser limitada

por la capacidad del fármaco de actuar en la zona, su uso no es viable porque no alcanza concentraciones adecuadas en la glándula mamaria y tiene efectos nulos en presencia de leche u otras secreciones. Por lo tanto, los resultados utilizados en campo podrían no coincidir con los resultados en este estudio; debido a que estos antibióticos resultaron ser sumamente efectivos contra *E. coli*, pero según este autor en la práctica no sería viable su uso.

Estudios previos han reportado resistencias de *E. coli* a los antibióticos como a ampicilina (76.5%) (Jiménez et al., 2017) y a penicilina (93%) (Perla y Herrera, 2017).

El desarrollo de resistencia a antibióticos en bacterias causantes de mastitis subclínica en las ganaderías, puede relacionarse al uso indiscriminado de antibióticos que no son recetados, controlados o supervisados por médicos veterinarios, además de cambios genéticos o mecanismos adaptativos de las bacterias para enfrentar la acción de éstos.

En el caso de los antimicrobianos, se producen problemas cuando se emplean para tratar enfermedades que no corresponde utilizarlos en dosis inapropiadas, durante periodos de tiempo inadecuado y en preparación farmacéutica incorrecta (OMS, 2001).

Las bacterias causantes de mastitis y el desarrollo de resistencia a los antibióticos podrían tener implicaciones en la salud humana. El abuso y el uso indebido de antibióticos en animales y humanos están contribuyendo al aumento de la amenaza que representa la resistencia a los antimicrobianos. Algunos tipos de bacterias causantes de infecciones humanas graves, ya son resistentes a la mayoría o a la totalidad de los tratamientos disponibles, lo que deja pocas alternativas prometedoras en fase de investigación (Lindmeier, 2017).

Los resultados de este estudio muestran que los antibióticos penicilina y ampicilina, han perdido eficacia en el control de bacterias importantes para mastitis. Los niveles de resistencia encontrados para penicilina fueron 100% en *Streptococcus* spp, 87% para *Staphylococcus aureus* y 100% para *Escherichia coli*, mientras que para ampicilina la resistencia fueron 93% *Streptococcus* spp., 73% para *Staphylococcus aureus* y 58.97% *Escherichia coli*. Por lo tanto, su uso a nivel de campo podría tener un impacto limitado en el control de la mastitis. Resultado esperado para *E. coli* pues naturalmente puede producir enzimas betalactamasas cromosómicas o extra cromosómicas que le confieren resistencia a los betalactámicos (Miranda, 2013).

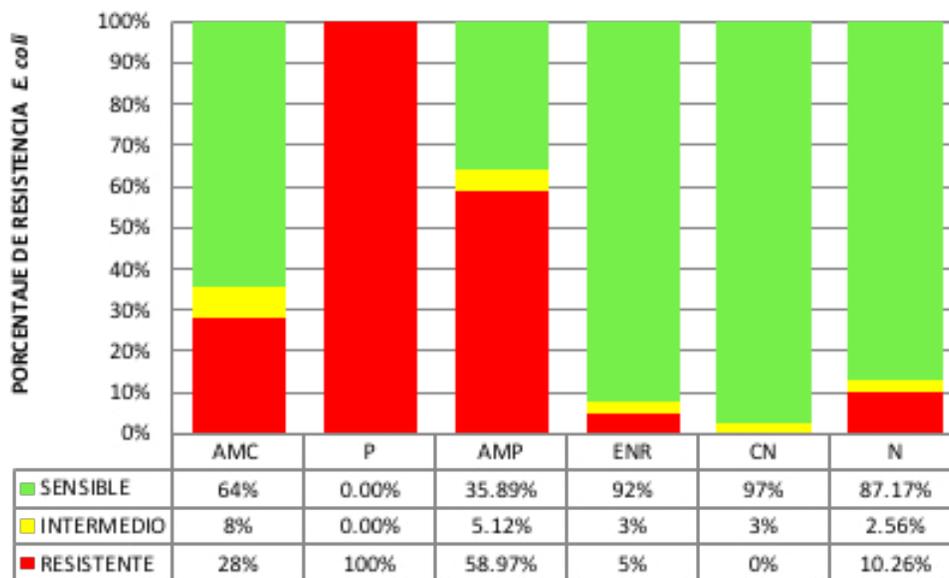


Figura 6. Perfil de sensibilidad antibiótica en aislados de *E. coli* en muestras de leches con reacción positiva a CMT (n=47).

Resultados de multirresistencia bacteriana a antibióticos

Aquellos microorganismos resistentes a uno o más clases de antibióticos son clasificados como multirresistentes. La Figura 7, muestra los porcentajes obtenidos por bacteria, a las distintas multirresistencia que se obtuvieron de las tres familias a las que pertenecen los antibióticos en estudio.

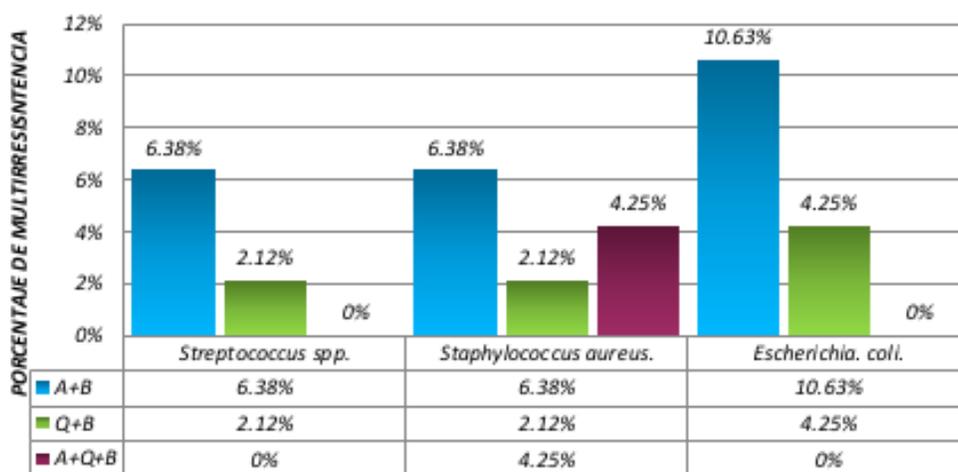
El perfil de multirresistencia obtenido para los 15 aislados del género de *Streptococcus* indicó que tres de ellos (6.38%) presentaron multirresistencia a la combinación de las familias de los betalactámicos junto con aminoglucósidos, también hubo una muestra que presentó multirresistencia a betalactámicos y quinolonas, siendo los antibióticos más resistentes, los de la familia de los betalactámicos.

De las bacterias aisladas de las muestras de leche con mastitis subclínica, se identificaron cepas multirresistentes de *S. aureus* a dos interacciones de familias e incluso a la multirresistencia de las tres familias de antibióticos en estudio, siendo sus valores para betalactámicos y quinolonas de 2.12% y también para betalactámicos y aminoglucósidos, con un 6.38%, dentro de las que los antibióticos con más multirresistencia fueron: amoxicilina más

ácido clavulánico, ampicilina y penicilina para el grupo de los betalactámicos y gentamicina para los aminoglucósidos.

En Argentina, se reportó un 19% de cepas de *S. aureus* con multirresistencia a las familias de betalactámicos y aminoglucósidos (Pellegrino et al., 2011), mostrando similitud con el presente estudio. Perla y Herrera (2017), mencionan que las bacterias que evaluaron presentaron multirresistencia, y el 87% mostró resistencia a antibióticos pertenecientes al grupo de los betalactámicos.

Para el género *Escherichia coli*, se lograron identificar siete aislados multirresistentes a dos familias de antibióticos evaluados, para los que la combinación de betalactámicos con aminoglucósidos fue la más alta con un 10.63% y quinolona más betalactámicos con 4.25%; el grupo de los betalactámicos es la familia con más resistencia bacteriana observada, y la penicilina resistente en el 100% de los aislados. Entre algunos mecanismos de resistencia que se le pueden atribuir a *Escherichia coli*, está la producción de betalactamasas, enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico. También hay mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanca del antibiótico (Mosquito et al, 2011).



A= Aminoglucósidos= Gentamicina; Neomicina B= Betalactámicos = Amoxicilina + A. Clavulánico; Penicilina; Ampicilina Q= Quinolona = Enrofloxacin

Figura 7. Perfil de multirresistencia antibiótica aislados de muestras de leches con reacción positiva a CMT (N= 15 S. spp; N= 16 S. aureus; N= 47 E.coli).

CONCLUSIONES

Los tres selladores a base de yodo evaluados en esta investigación demostraron tener una buena tasa de protección (86.12%) en la prevención de la mastitis subclínica; independientemente de su formulación, produjeron un nivel de protección similar en la presentación de casos nuevos de mastitis subclínica en vacas.

Streptococcus agalactiae no es uno de los patógenos más prevalentes en los casos de mastitis encontrados en las ganaderías en estudio. Los resultados de esta investigación sugieren que existe contaminación ambiental en el proceso de ordeño, ya que el mayor agente etiológico aislado fue *Escherichia coli* que es una bacteria ambiental.

Existe resistencia a antibióticos en *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en las ganaderías estudiadas, principalmente para la familia de betalactámico como penicilina, ampicilina y en menor medida en amoxicilina más ácido clavulánico. Y a su vez, existen cepas que presentan diferentes porcentajes de multirresistencia antibiótica entre las familias, siendo el principal para aminoglucósidos (gentamicina y neomicina) más betalactámicos (penicilina, ampicilina y amoxicilina más ácido clavulánico) en las tres bacterias estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, J.; Zeledón, A. 2007. Aislamiento e identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de fingerprint (PHP) a partir de leche bovina afectada con mastitis subclínica en seis fincas del municipio de León, durante el periodo mayo 2005 - mayo 2006, León, Nicaragua, 2007, 59 p. en línea, consultado el 25 de octubre de 2017, Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/1042/1/203954.pdf>
- Arreces Martínez, G. 2015. Determinación de la multirresistencia a los antibióticos en cepa de *Staphylococcus aureus*, aislada de leche cruda de vaca obtenida de una lechería del departamento de Santa Ana, Universidad de El Salvador, 151 P. en línea, consultado el 6 de junio de 2017, disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/8772/1/16103639.pdf>
- BCR, (Banco Central de Reserva). 2016. Documento de trabajo; La transformación productiva en el sector agropecuario: una herramienta para el crecimiento económico en el área rural de El Salvador, segundo semestre de 2016, Banco central de reserva de El Salvador, 54 p. En línea, consultado el 17 de junio de 2017, Disponible en: <https://www.bcr.gob.sv/bcrsite/uploaded/content/category/1105524910.pdf>
- BAM (Microbiological Methods & Bacteriological Analytical Manual). 2016. 8th Edition, Revision A, 1998, en línea, Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm> consultado el 22 de noviembre de 2016
- Becerra, A.; Roy, J.; Carvajal.; Dallos-Baez, A. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras del altiplano boyacense (Colombia) Revista Científica, vol. XXIV, núm. 4, julio-agosto, 2014, 7 p. en línea, consultado el 22 de noviembre de 2016, Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95931404001.pdf>
- Chávez, J. 2010. Mastitis Bovina, su control y prevención es una tarea permanente. Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, Comisión Técnica de ALMAST, Argentina. 19 p. en línea, Disponible en: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/mastitis_bovina.htm.pdf
- Calderón, A.; Rodríguez, V. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). 2008, Rev Colomb Cienc Pec 21: 582-589. En línea, consultado en marzo de 2016, Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2950/295023543006.pdf>
- Callejo Ramos, A. 2010. Desinfectantes de pezones (en línea). Frisona Española N° 178 (94-95), en línea, Consultado 26 oct. 2016. Disponible en http://oa.upm.es/7650/2/INVE_MEM_2010_80160.pdf

- Calvinho, L. F. 2010. Higiene pre-ordeño y desinfección de pezones, INTA, APROCAL, 2010, 43 p. en línea, Consultado el: 21 de Noviembre de 2018, Disponible en: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/Desinfeccion_pezones_Calvinho.pdf
- Calvinho, L. F.; Rafaela, E.E.A.; INTA F.C.V.; Esperanza, U.N.L. 2010 Tratamiento de mastitis clínicas y manejo de antibióticos en el tambo, APROCAL, 11 p. en línea, Agosto, 2010, Disponible en: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/manejo_antibioticos.htm.pdf
- Calvinho, L. F.; Tirante, L. 2005 Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años, INTA, Santa Fe, Buenos aires, 2005, 12 p. En línea, consultado en agosto de 2017, Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FAVEveterinaria/article/download/1413/2261/>
- Camacho, A.; Giles, M.; Ortegón, A.; Palao, M.; Serrano, B.; Velázquez, O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. 17 p. En línea, consultado en junio de 2017, Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf
- Caro García, J.A. 2011. Disminución de la incidencia de mastitis en ganado vacuno con la aplicación de un sellador de barrera, Universidad autónoma agraria "Antonio Narro" unidad laguna división regional de ciencia animal, Torreon, Coahuila, Mexico, 2011. 63 p. En línea, consultado en junio de 2017, Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3179/JESUS%20ARTURO%20CARO%20GARC%20CDA.pdf?sequence=1>
- Cruz, A.; Estepa, E.; Hernández, L.; Sanabria, V. 2007. Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos, Colombia, 2007, 8 p. En línea, consultado en octubre de 2017, Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63646040004.pdf>
- Erna, T. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar, Revista chilena de infectología, Rev. chil. infectol. v.19 supl.2 Santiago 2002, 5 p. En línea, Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v19s2/art01.pdf>
- Fernández, M.; Ramírez, J.; Chaves, C.; Arias, M. 2008. Disminución en la incidencia de mastitis en ganado vacuno con la aplicación de un sellador de barrera experimental. Agronomía Costarricense 32(1): 107-112. En línea, Disponible en: https://www.mag.go.cr/rev_agr/v32n01-107.pdf
- Florentín A. 2007. Perfil de resistencia in vitro a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción, Paraguay, 2007, 7 p. en línea, Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v5n1/v5n1a05.pdf>
- García, J.; Canton, R.; Garcia, E.; Gomez, L.; Martínez, L.; Rodriguez, C.; Vila, J. 2000. Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, 54 p. en línea, consultado en junio del 2019. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Giannechini, R.; Concha, C.; Delucci, I.; Gil, J.; Salvarrey, L.; Rivero, R. 2014. Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana, veterinaria (Montevideo) Vol. 50 Uruguay, 2014. 29 p. en línea, Disponible en: <http://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/132/75>
- Gilbert, D. 2000. Aminoglycosides. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; p. 307-36, en línea, consultado el 20 de junio de 2019. Disponible

- en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apuacuba/a6-aminogluocosidos.pdf>
- Julio, J.A.; Hernández, J.C.; Suárez, M.C. 2014. Identificación manual y automatizado de aislamientos de la familia Streptococcacea proveniente de muestras de leches de vaca, Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/272621471_Identificacion_Manual_y_Automatizado_de_Aislamientos_de_la_Familia_Streptococcacea_Provenientes_de_Muestras_de_Leche_de_Vacas_con_Mastitis
- Jiménez, R.; Gudino, L.; Aguilar, J.; Loeza. 2017. Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Rev. mex. de cienc. pecuarias* [online]. 2017, vol.8, n.4 [citado 2018-09-23], pp.387-396. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242017000400387
- Lindmeier, C. 2017. Responsable de prensa OMS, Dejemos de administrar antibióticos a animales sanos para prevenir la propagación de la resistencia a los antimicrobianos, comunicado de prensa, 2017, Consultado en mayo de 2018, disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>
- Merck 2006. Manual de veterinaria. Sexta edición, océano/ centrium, merial, editorial océano Barcelona, ES, 2006. Vol. I; 1307 p.
- Mendoza, J.; Vera, A.; Peña, L. 2017. Prevalencia de mastitis subclínica y microorganismos asociados y factores de riesgo identificados en hatos de la provincia de Pamplona, norte de Santander, *Revista Médica Vet. Zoot.* 64, 2017, Colombia, 14 p. en línea, disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v64n2/v64n2a02.pdf>
- Miranda García, M. A. 2013. *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido. Resistencia, laboratorio de microbiología Hospital general básico de la defensa San Carlos, San Fernando, Cádiz, España. 5 p. en línea, consultado en abril de 2019, disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/sm/v69n4/original2.pdf>
- Mosquito, S.; Ruiz, J.; Bauer, J.; Ochoa, T. 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociada a diarrea. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú, 9 p. en línea Consultado en Julio, 2019. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/430>
- National committee for clinical laboratory standards (NCCLS). 2002. Document M39-A. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline. NCCLS document M39-A. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 30 pp.
- Olgún, A.; Bernal. s.f. Enfermedades de la glándula mamaria, universidad nacional autónoma de México facultad de medicina veterinaria y zootecnia, asociación mexicana de médicos veterinarios especialistas en bovinos, 11p. en línea, consultado el 27 de julio de 2016, disponible en: http://www.ammveb.net/clinica/enfermedades_de_la_glandula_mamaria.pdf
- Olivares, J.; Kholif, A.; Rojas, S.; Elghandour, M.; Salem, A.; Bastida, A.; Velázquez, D.; Cipriano, M.; Camacho, L.; Fresán, M.; DiLorenzo, N. 2015. Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of México. *Trop Anim Health Prod.* 47(8): 1497-1504. Doi: 10.1007/s11250-015-0890-8. En línea, consultado el 1 de marzo de 2018, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26255183>
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos, 2001, 99p. En línea, consultado en marzo de 2017, disponible en: http://www.antibioticos.mscbs.gob.es/PDF/resist_OMS_estrategia_mundial_contra_resistencias.pdf
- OPS/OMS, Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. 2017. Dejar de administrar antibióticos en animales sanos

- puede prevenir la propagación de resistencia a los antibióticos. Ginebra, Suiza. Consultado en Diciembre, 2017, disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13897:stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance&Itemid=135&lang=es
- Pagliano, S. 2016. Comparación de la eficacia de dos selladores en la prevención de las infecciones intramamarias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 2016, 29 p. en línea, disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10392/1/FV-31702.pdf>
- Pellegrino, M.; Frola, I.; Odierno, L.; Bogni, C. 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche. (en línea) Revista electronica de veterinaria, vol. 11, n° 7, año 2011, 15 p. en línea, consultado en Junio del 2019. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63622567006.pdf>
- Perla, A.; Herrera, M. 2017. Evaluación in vitro de la multirresistencia antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis subclínica y mastitis clínica identificadas en vacas en ordeño manual en tres ganaderías del Municipio de Agua Caliente, Chalatenango, El Salvador, 2017, 93 p.
- Ruíz, R. 2016. Mastitis bacteriana en ganado bovino: etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio, departamento de medicina y zootecnia de ruminantes (en línea). Mexico, UNAM. 15 p Consultado 27 jul. 2016 Disponible en http://www.ammveb.net/articulos/mastitis_bacteriana.pdf
- Ruiz, A.; Ponce, G.; Gomes, R.; Mota, E.; Sampaio, E.; Lucena, S. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil, Revista Salud animal volumen 33 No 1, 2011, 8 p. en línea, disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v33n1/rsa09111.pdf>
- Russi, N. 2008. Susceptibilidad a antibióticos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina, Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fé, Argentina, 86 p. en línea, disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/259/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, M.; Gutiérrez, N.; Posada, I. 2017. Prevalencia de mastitis bovina en el cañón de Anaime, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia microbiana. Anaime, Colombia. 226 p. En línea, consultado Febrero 2018. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n1/a22v29n1.pdf>
- Sumano, H.S. Ocampo, L. 2008. Farmacología Veterinaria, Tercera Edición, Mc Graw Hill, 1092 p.
- Tirante, L. 2007. Requisitos de un buen antiséptico para pezones, II Jornada de actualización en mastitis para técnicos, Uruguay, 2007. 6 p. en línea, consultado en agosto de 2018, Disponible en: <http://www.lactodiagnosticosur.com.ar/wp-content/uploads/2011/12/Selladores.pdf>
- Valero Leal, K.; Valbuena, E.; Chacón, F.; Olivares, Y.; Briñez, R. 2010. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado zulía, Maracaibo, Venezuela, 9 p. en línea, consultado en julio de 2017 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262479997_Patogenos_contagiosos_y_ambientales_aislados_de_cuartos_mamarios_con_mastitis_subclinica_de_alto_riesgo_en_tres_fincas_del_estado_Zulia
- Winn, H.; Allen; Janda; Koneman; Procop; Schreckenber; Woods. 2008. Koneman diagnóstico microbiológico texto y atlas en color 6a EDICIÓN, editorial médica panamericana, Madrid, España, 2008, 593 p.
- Wolter; Castañeda, V.H; Kloppert B; Zschoeck M. 2015. La mastitis bovina, Instituto estatal de investigaciones de Hesse, Universidad de Guadalajara, México, 2015, 68p. en línea, consultado en agosto de 2017 disponible en: <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/608.pdf>