



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y

ZOOTECNIA

**EFICACIA CLÍNICA Y MICROBIOLÓGICA DE UNA
ENROFLOXACINA HIDROCLORADA (enro-C) EN CASOS
CLÍNICOS DE MASTITIS BOVINA Y DETECCIÓN DE
GENES DE RESISTENCIA CONTRA QUINOLONAS EN LOS
MICROORGANISMOS AISLADOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

JUAN CARLOS CRUZ VILLA

Asesores:

Dr. Edgar Alfonseca Silva

MVZ M en C Salvador Ávila Téllez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mis padres, Juan y María del Carmen quienes siempre me brindaron amor, educación y ejemplos de superación, gracias por siempre creer y confiar en mí, por apoyarme aún en los momentos más difíciles de mi vida, porque gracias a ustedes me he forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este, los amo.

Papá: aunque hoy no pueda tener tus consejos ni tu presencia, espero que te sientas tan orgulloso de mí, así como yo lo estoy de ti; donde quiera que estés va por tí.

A Carlitos y Brenda; mi familia. Carlos, hoy comprendo lo que es el amor verdadero e incondicional sin intereses de por medio, porque siempre serás mi mayor motor y esa razón por la cual voy a sonreír, te amo. Breen, no me queda más que agradecerte el apoyo que me has brindado aún en los momentos más difíciles, en ti he encontrado el apoyo para seguir mi camino.

A mis hermanas Fabi y Fer, incondicionales para mí y porque gracias a ustedes tengo un excelente concepto de lo que es un hermano.

Para ti “mamá Bety” porque siempre me quisiste ver como todo un “gran” médico veterinario y porque sin ti mi infancia no hubiera sido tan hermosa.

A Bety y Dani, gracias por tantos buenos momentos, por tantas risas, juegos, carcajadas y ocurrencias que tienen.

A todas mis tías y mis tíos, porque en mi familia tan hermosa pude encontrar toda la felicidad que una persona puede desear.

Agradecimientos

Mi eterno agradecimiento al Dr. Edgar Alfonseca Silva, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo y regresar al trabajo de laboratorio que tanto me apasiona, por compartir todo su conocimiento, porque no solo se preocupó por motivarme académicamente, si no también personalmente y por haber guiado este trabajo hasta buen puerto ¡Gracias!

A la Dra. Beatriz Arellano Reynoso, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por la confianza que deposito en mí, por el apoyo personal, laboral y académico, por cada uno de los consejos y platicas que ha compartido conmigo.

Al Dr. Salvador Ávila Téllez (QEPD), por toda su asesoría durante el trabajo con los bovinos.

A cada uno de los integrantes de mis sinodales, les agradezco el tiempo y las facilidades que tuvieron conmigo.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de investigación en Brucelosis y Tuberculosis Bovina; gracias por sus contribuciones y porque en tan poco tiempo me hicieron sentirme como en casa

A mi amada FMVZ, mi alma mater, en donde me forje profesionalmente en cada una de sus aulas y laboratorios.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. Mastitis.....	3
1.1 Mastitis clínica.....	5
1.2 Mastitis subclínica.....	6
2. Etiología.....	7
2.1 Microorganismos contagiosos.....	7
2.2 Microorganismos ambientales.....	8
2.3 Microorganismos oportunistas.....	9
3. Diagnóstico.....	9
3.1 Prueba de California (CMT).....	10
3.2 Conductividad eléctrica (CE).....	11
3.3 Cultivo bacteriológico y micológico.....	12
4. Tratamiento.....	12
5. Uso de las quinolonas en el tratamiento de la mastitis.....	17

6. Uso de una nueva enrofloxacin clorhidrato-dihidrato.....	21
7. Resistencia bacteriana.....	22
7.1 Mutaci3n cromos3mica.....	23
7.2 Disminuci3n de la permeabilidad de la membrana.....	24
7.3 Sobreexpresi3n de sistemas de expuls3n activa.....	25
7.4 Resistencia mediada por pl3smidos.....	26
7.5 Prote3nas qnr.....	26
7.6 Enzima AAC (6')-Ib-cr.....	27
7.7 Bombas de eflujo OqxAB y QepA.....	28
8. Justificaci3n.....	29
9. Hip3tesis.....	30
10. Objetivos.....	30
MATERIAL Y M3TODOS	30
Animales.....	30
Prueba de California para mastitis (CMT).....	31
Cuenta de c3lulas som3ticas.....	33
Microbiolog3a.....	33
Prueba de susceptibilidad a antibi3ticos.....	34
Prueba de susceptibilidad a enrofloxacin.....	35
Detecci3n de genes de resistencia a quinolonas: plasm3dico AAC (6')-Ib-cr y cromos3mico (GyrA).....	36
Tratamientos intramamarios y evaluaci3n cl3nica.....	39

RESULTADOS.....	40
Susceptibilidad a antibacterianos.....	40
Eficacia clínica de la enrofloxacin hidroc lorada.....	40
Conteo de células somáticas.....	42
Microbiología de las muestras de leche.....	43
Susceptibilidad a antibióticos.....	44
Detección de genes de resistencia a quinolonas: Aminoglucósido N-Acetiltransferasa (AAC (6´)-Ib-cr) y ADN girasa (Gyr A).....	47
DISCUSIÓN.....	50
REFERENCIAS	55

FIGURAS

1. Resumen del mecanismo de acción que tienen las quinolonas en el complejo ADN-topoisomerasa (Chávez-Jacobo 2015).....	18
2. Distribución de los porcentajes de los microorganismos aislados de muestras clínicas N=29.....	43
3. Genes asociados con la resistencia a enrofloxacin: ADN girasa con mutación en la sub-unidad A (<i>Gyr A</i>) y Aminoglucósido N-Acetiltransferasa (<i>AAC (6´)-Ib-cr</i>) en microorganismos aislados a partir de casos de mastitis bovina subclínica. La búsqueda se realizó por PCR N= 29 microorganismos.....	49
4. Distribución porcentual de la presentación de 1 sólo gen de resistencia a quinolonas.....	49

CUADROS

1. Compartimientos farmacológicos donde se localizan algunos microorganismos productores de mastitis (Tomado de Erskine <i>et al.</i> , 2003).....	15
2. Interpretación para los resultados de la prueba de CMT.....	32
3. Se muestra el resumen de los tratamientos con antibacterianos que fueron utilizados en las vacas.....	41
4. Resultados de algunas de las pruebas de CMT y cuenta de células somáticas.....	42
5. Identificación de microorganismos aislados a partir de leche de vacas con mastitis subclínica, se muestra el porcentaje y número de aislados identificados.....	43
6. Susceptibilidad a enrofloxacin enro-C a diferentes concentraciones (0.2 mg/mL, 1 mg/mL y 2 mg/mL) se muestra el promedio del tamaño del halo de inhibición en milímetros. Control positivo de susceptibilidad fenotípica a quinolonas <i>E. coli</i> ATCC 10536.....	44
7. Porcentaje de cepas resistentes, medianamente sensibles y sensible a enrofloxacin base.....	45
8. Porcentaje de cepas resistentes, medianamente sensibles y sensible a enro-C.....	45
9. Susceptibilidad a enrofloxacin base (2 mg/mL). Se muestra el grado de susceptibilidad de los microorganismos aislados de muestras de leche de bovino.....	46

10. Susceptibilidad a enro-C (2 mg/mL). Se muestra el grado de susceptibilidad de los microorganismos aislados de muestras de leche de bovino.....	46
11. Presencia de genes de resistencia a quinolonas, cromosómico (<i>Gyr A</i>) y plasmídico (<i>AAC (6')-Ib-cr</i>).....	48
12. Porcentaje de muestras que expresan genes asociados con la resistencia a quinolonas (<i>Gyr A</i> o <i>AAC (6')-Ib-cr</i>).....	48

RESUMEN

CRUZ VILLA JUAN CARLOS. Eficacia clínica y microbiológica de una enrofloxacina hidroclicorada (enro-C) en casos clínicos de mastitis bovina y detección de genes de resistencia contra quinolonas en los microorganismos aislados (bajo la dirección de: MVZ Edgar Alfonseca Silva y MVZ Salvador Ávila Téllez).

La mastitis bovina es una enfermedad que ocasiona grandes pérdidas al sector lechero mundialmente. Este estudio mostró una prevalencia de 47.4% de mastitis subclínica con un 38.9% de cuartos afectados. A partir de las muestras de leche, se obtuvieron 29 aislados clínicos: *Staphylococcus* spp coagulasa negativos (55.2%), *Staphylococcus aureus* (27.6%), *Escherichia coli* (6.9%), *Streptococcus uberis* (6.9%) y *Corynebacterium bovis* (3.4%). La prueba de susceptibilidad *in vitro* para enrofloxacina base mostró 100% de resistencia a 0.2 mg/mL y 1 mg/mL, 89.7% de resistencia y 10.3% de susceptibilidad intermedia a 2 mg/mL. Para enro-C se observó 100% de resistencia a 0.2 mg/mL, 96.6% de resistencia y 3.4% de susceptibilidad intermedia a 1mg/mL y 89.7% de resistencia, 6.9% de susceptibilidad intermedia y 3.4% de susceptibilidad a 2 mg/mL. Al final del primer tratamiento con enro-C se obtuvo una eficacia clínica del 42%, el resto de los cuartos siguieron positivos a CMT, se requirió la aplicación de un segundo tratamiento con tetraciclina, al término de éste se obtuvo 100% de cura clínica. Sin embargo, 5-7 días después 3 cuartos reincidieron, por lo que se decidió la aplicación de un tratamiento con otro antibiótico, 7 días después mostraron una recuperación clínica del 100% sin una posterior reincidencia. Por PCR se detectaron genes de resistencia cromosómico (*GyrA*) y plasmídico (*aac(6')-Ib-cr*) a enrofloxacina, en los microorganismos aislados, 31% de las bacterias presentaron ambos genes, el 44.8% presentó 1 gen ya sea de regulación cromosómica o plasmídica y el 24.1% no presentó genes de resistencia. Se observó una resistencia *in vitro* >89% y el 75 % de las cepas mostraban genes de resistencia a enrofloxacina, a pesar de este factor, la tasa de éxito de cura clínica fue cercana al 50% con el tratamiento con enro-c. La biodisponibilidad de enro-c permite una mejor difusión en el tejido mamario y es adecuada en casos de mastitis recurrentes donde se presente resistencia a antibacterianos.

SUMMARY

CRUZ VILLA JUAN CARLOS. Clinical and microbiological efficacy of a hydrochlorinated enrofloxacin (enro-C) in clinical cases of bovine mastitis and detection of resistance genes against quinolones in the isolated microorganisms (Directed by MVZ Edgar Alfonseca Silva and MVZ Salvador Ávila Téllez)

Bovine mastitis is a disease that causes great losses to the dairy sector worldwide. This study shows a prevalence of 47.4% of subclinical mastitis with 38.9% of mammary gland quarters affected. From the milk sample, 29 isolated clinical were obtained: Coagulase negative *Staphylococcus* spp (55.2%), *Staphylococcus aureus* (27.6%), *Escherichia coli* (6.9%), *Streptococcus uberis* (6.9%) and *Corynebacterium bovis* (3.4%). The test of susceptibility for enrofloxacin showed 100% of resistance at 0.2 mg/mL and 1 mg/mL, 89.7% of resistance and 10.3% of intermediate susceptibility at 2 mg/mL. For enro-C it showed 100% resistance at 0.2 mg/mL, 96.6% of resistance and 3.4% of intermediate susceptibility at 1 mg/mL and 89.7% of resistance, 6.9% of intermediate susceptibility and 3.4% of susceptibility at 2 mg/mL. At the end of the first treatment with enro-C, we obtained a clinical efficacy of 42%, the other mammary quarters continued to test positive for CMT, for which the application of a second treatment with tetracycline was required, at the end of this, a 100% clinical cure was obtained. However, 5-7 days after, 3 mammary gland quarters relapsed, so it was decided to apply a treatment with another antibiotic, 7 days later it showed a 100% clinical recovery without a subsequent recurrence. By PCR chromosomal (*GyrA*) and plasmid (*aac(6')-Ib-cr*) to enrofloxacin resistance genes were detected, in the isolated microorganisms, 31% of the bacteria presented both genes, 44.8% presented 1 gene either a chromosomal or plasmid regulation and 24.1% did not show resistance genes. In vitro resistance > 89% was observed and 75% of the strains showed genes for resistance to enrofloxacin, despite this factor, the clinical cure success rate was close to 50% with enro-c treatment The bioavailability of enro-C allows better diffusion in breast tissue and is suitable in cases of recurrent mastitis where antibacterial resistance is present.

Introducción.

La leche es el principal alimento para niños y jóvenes, así como para los mamíferos antes de que sean capaces de digerir otro tipo de alimento; la leche contiene altos niveles de proteína, carbohidratos, grasa, minerales y vitaminas, constituyéndose como un alimento indispensable en la dieta, igual que los derivados lácteos que se preparan a partir de ella (1).

De acuerdo con los datos de la SAGARPA-SIAP (2), la producción lechera en México en el año 2018 se estimó en un promedio de 12 008 239 litros y se estima que para el 2019 haya un aumento del 1.7%, con esto se calcula una producción de 12 212 379 litros (SAGARPA-SIAP 2019). Aunque existe un incremento anual en la producción de leche, se tiene que fijar medidas que permitan aumentar y mejorar los sistemas de producción para poder ofrecer productos en cantidad suficiente y de buena calidad (3).

La calidad higiénica de la leche, así como la inocuidad de esta, depende de las buenas prácticas ganaderas, de una correcta rutina de ordeño (manual o mecánica) y del cumplimiento de los tiempos de retiro, cuando se aplican tratamientos en animales de producción. La producción y calidad de la leche, así como la rentabilidad para los productores, se ve disminuida cuando se presentan patologías como la mastitis (1). La evidencia histórica sugiere que las vacas han sido ordeñadas desde al menos el año 3100 a. C., es probable que la mastitis bovina haya existido desde entonces (4).

MASTITIS

La mastitis bovina se describe como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que es causada comúnmente por algún microorganismo patógeno, pero también puede ser por

alguna lesión, traumatismo y menos frecuente por alguna alergia o neoplasia; es la enfermedad más prevalente y costosa mundialmente para la industria lechera, esto debido a que induce una disminución del 4 al 30% en la producción de leche con efecto negativo en su calidad, además de incrementar los costos del cuidado de la salud del hato, gastos veterinarios, desecho de la leche durante y después del tratamiento, sanciones por el alto conteo de células somáticas (CCS) y desecho prematuro de animales genéticamente mejorados (1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Además, se ha reportado que la mastitis tiene un efecto de detrimento en el desarrollo reproductivo de las vacas especializadas en la producción de leche (4, 10).

Esta enfermedad representa una carga económica muy alta a los productores de leche en todo el mundo, dado que las pérdidas mundiales anuales debido a las mastitis se han estimado en 35 billones de dólares americanos (7), estos números se estima que son aproximadamente la mitad o el total de los costos en salud en las unidades de producción animal (13). En México, se ha reportado que la mastitis en vacas lecheras causa pérdidas en la producción de leche hasta en un 30%; lo que significa que el costo promedio anual del tratamiento para esta enfermedad puede ser de hasta 1200 pesos por vaca (13). En un estudio realizado por Gerlach y colaboradores (2009) en Sonora, México, se determinó que el costo promedio del tratamiento de la mastitis clínica y subclínica fue de \$185.40 pesos por animal mensualmente; en el mismo estudio para un establo en Santa Ana, Sonora, de carácter semi- intensivo de un total de 804 vacas en producción, 147 presentaron mastitis subclínica y 43 presentaron mastitis clínica, en este establo el costo que generó la mastitis en ese año fue de \$30 966.34 pesos de los cuales \$12 470.75 pesos (40.3%) fueron por mastitis subclínica y \$19 459.59

pesos (59.7%) fueron por mastitis clínica, donde el gasto que se generó equivale a la tercera parte de los ingresos generados en este establo por año (14).

Mastitis clínica

La mastitis puede presentarse en dos formas principalmente; clínica y subclínica. La forma clínica es caracterizada por la presencia de inflamación, dolor y enrojecimiento de la ubre, en algunos casos se presenta incremento de la temperatura corporal, anorexia y decaimiento. Esta forma de mastitis siempre va acompañada de cambios en la calidad de la leche, algunos de los cuales pueden ser percibidos a simple vista o no, entre los cambios que se pueden observar a simple vista encontramos la presencia de grumos y pérdida de la coloración; y dentro de los que no se pueden observar con la vista encontramos un incremento en el número de células somáticas, bacterias y otros microorganismos, disminución de la lactosa, calcio, fósforo, grasa y caseína, y un aumento en las proteínas séricas, cloro y sodio, también existe un aumento del pH. De esta manera no sólo afecta a la leche sino también a sus subproductos causando rancidez y gusto indeseable durante la conservación (1, 7, 11, 15, 16, 17).

En un estudio realizado por Barker y colaboradores (18), demostraron en vacas de la raza Jersey que los animales con mastitis clínica durante la primera lactación presentaron un prolongado intervalo de aparición del calor, hasta el primer servicio (94 días) comparado con animales que no presentaron mastitis clínica (71 días). Se ha documentado que las vacas con mastitis clínica entre el primer servicio y la etapa de gestación tuvieron un aumento en el número de días abiertos y un doble aumento de servicios por concepción (7, 19).

Mastitis subclínica

La forma subclínica es caracterizada porque en la ubre no existe signo alguno de inflamación y la leche parece normal, sin que existan cambios organolépticos en la misma. El número de células somáticas en leche, indicativo de la respuesta inflamatoria, se encuentra elevado, al igual que el número de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de la secreción láctea, así como de la alteración de la composición de dicho producto (1, 7, 13, 16, 17). La frecuencia de la mastitis subclínica es de 20 a 50 veces superior a la mastitis clínica y puede conducir a grandes pérdidas económicas debido a la reducción en la producción de leche y penalizaciones a causa de los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche (7, 17, 20).

Cuando los signos no son visibles, la presencia de patógenos y las modificaciones citológicas de la leche traen como resultado una mastitis subclínica (7, 13, 17, 21), por lo que las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico son necesarios para el diagnóstico (7).

Es imperativo para los productores de leche y los médicos veterinarios enfocar su principal atención al control de la mastitis subclínica debido a que (7, 13, 16, 22):

- Es 15 a 40 veces más prevalente que la mastitis clínica y presenta una incidencia del 5 al 50%.
- Usualmente precede a la mastitis clínica
- Es de duración prolongada.
- Es más difícil de detectar debido a su naturaleza oculta de la enfermedad.
- Reduce significativamente la producción láctea.

- Constituyen un reservorio de patógenos causantes de mastitis que pueden diseminarse de una vaca a otra en el hato.

Existen estudios en los que se determina que la edad, condición física, rendimiento lechero y número de parto son considerados potenciales factores de riesgo de la mastitis subclínica (16, 17).

Etiología

Existe una amplia variedad de microorganismos que han sido involucrados como agentes causales de mastitis bovina. De acuerdo con su hábitat, patogenicidad, interacción con el sistema glandular y con el pezón, los microorganismos pueden ser clasificados como microorganismos contagiosos, medioambientales, oportunistas y otros microorganismos (7, 8, 12, 15).

Microorganismos contagiosos

Estos microorganismos se transmiten de vaca a vaca, contribuyendo la transmisión desde los cuartos infectados a los no infectados, principalmente durante el ordeño. Los más comunes son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, en ambos casos generan principalmente una mastitis de tipo subclínica, son altamente infecciosos a nivel individual y poblacional, han sido reportados bajo control en hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de los pezones después de la ordeña, terapia de la vaca seca, desecho de animales, mantenimiento del equipo de ordeño y antibioterapia. Los casos de infección con *Staphylococcus aureus* son más difíciles de erradicar y presentan una prevalencia mucho más alta que con *Streptococcus agalactiae* (7, 8, 15, 16, 17, 20).

Mycoplasma bovis es menos común como causa de mastitis contagiosa, este llega a causar brotes de mastitis clínica que no responden a la terapia, por lo cual son difíciles de controlar; la mayoría de los brotes están asociados con la introducción de nuevos animales en el hato (7, 8, 15, 20). Por último, otra bacteria dentro de esta clasificación es *Corynebacterium spp* (7, 8, 22).

Microorganismos ambientales

El principal reservorio de estos microorganismos se encuentra en los alrededores del establo, incluyendo la materia fecal, el suelo, agua, alimentos ensilados, corrales y materia vegetal. Su amplia distribución en el medio ambiente y sus probabilidades de alcanzar el tejido glandular aumentan en condiciones de mala higiene, con ordeños realizados con ubres húmedas, uso de esponjas o trapos sucios y con material de cama inadecuado (7, 8, 15, 17).

Dentro de esta categoría se encuentran enterobacterias como *Escherichia coli* (principalmente), *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y especies del género *Enterococcus* (7, 8, 12, 15, 17, 20).

Además de los microorganismos ya mencionados anteriormente, existen otros poco comunes causantes de mastitis clínica como lo son *Trueperella pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, levaduras (principalmente *Candida spp* y *Cryptococcus neoformans*), y algas como *Prototeca* (7, 15, 17).

Microorganismos oportunistas

Los *Staphylococcus* spp coagulasa negativos (SCN) residen en la piel sana de los pezones y en las manos de los ordeñadores, por lo que se encuentran en una posición “oportunista” para colonizar el canal del pezón. La incidencia de infecciones por SCN es principalmente pasando el periodo seco, momento en el cual la piel del pezón no está expuesta a los desinfectantes. Actualmente los SCN son la principal causa de mastitis subclínica en la mayoría de los establos lecheros con un adecuado manejo higiénico-sanitario que han controlado la mastitis contagiosa; se han reportado prevalencias de 31.1% en vaquillas al parto y de 27.9% para el postparto (8, 15,20).

Este grupo de bacterias comprende más de 50 especies y subespecies, las especies de SCN comúnmente aisladas en la mastitis bovina son *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermitis*, *S. hyicus*, *S. simulans* y *S. saprophyticus* (8, 17, 20, 23, 24).

Aunque por lo general las infecciones por SCN suelen ser leves o de tipo subclínico, se ha demostrado también que pueden causar procesos más graves y persistentes, provoca un aumento en el recuento de células somáticas y una disminución en la calidad y producción de la leche debido al daño causado en el tejido mamario (17, 24).

Varios estudios han sugerido que los SCN se consideren patógenos emergentes causantes de mastitis (15, 17, 23, 24).

Diagnóstico

Durante milenios, el contacto cercano requerido por el ordeño manual permitió una detección temprana y fácil de anomalías en la leche y la glándula mamaria, pero poco se sabía de las

causas o el manejo de la mastitis. Una mejor y completa comprensión de las mastitis no fue posible hasta que se desarrolló el microscopio, que permitió la detección de los microorganismos que son los agentes etiológicos primarios (4).

Para el diagnóstico de la mastitis clínica es necesario realizar la exploración física de la glándula mamaria, para evidenciar su simetría y consistencia, así como la inspección de la leche mediante el uso de un tazón de fondo oscuro para observar la presencia de grumos, pus o sangre y se complementa mediante diferentes pruebas de diagnóstico, ya sea de uso común en campo o mediante pruebas de laboratorio (11, 14, 25).

El control y prevención de la mastitis requiere de una revisión constante en la sala de ordeño junto con el empleo de pruebas de laboratorio que complementen al examen físico de la ubre, sobre todo para el diagnóstico de la mastitis subclínica (14, 21).

Los métodos de diagnóstico que se usan con mayor frecuencia son la prueba de California (CMT), conductividad eléctrica (CE) y el cultivo bacteriológico de leche. Actualmente métodos tales como la medición de la N-acetyl-b-D-glucosaminidasa (NAG-ase), lactato deshidrogenasa (LDH), prueba de Wisconsin y métodos moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son usadas menos frecuentemente (11, 21).

Prueba de California para mastitis (CMT por sus siglas en inglés)

La prueba de California para la mastitis ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis subclínica en el ganado bovino debido a que es una prueba simple, barata y rápida (13, 14, 17, 21).

Una vez iniciado el proceso infeccioso que da lugar a la mastitis se desarrolla un incremento en la afluencia de células del sistema inmune y proteínas del torrente sanguíneo a la leche, lo que se ve reflejado en un aumento en la cuenta de células somáticas (25). El fundamento de la prueba se basa en que los componentes del reactivo, que son un detergente (alquilauril sulfonato de sodio) y un indicador de pH (Purpura de bromocresol), provoca una ruptura de las células y dejan salir el ADN fuera de la membrana celular y dado que estos filamentos de ADN forman estructuras tipo gel cuando se unen unos con otros, cuantas más células haya destruidas y existentes en la muestra problema, mayor será la infección y se espera que la muestra de lugar a una mayor reacción. El cambio de coloración indica la variación del pH de la leche (14, 17, 21, 25); esta prueba se ha reportado con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%, se puede realizar en el muestreo por cada cuarto o con una muestra del tanque donde se recolecta toda la leche, se pueden llegar a presentar falsos positivos en la leche de animales recién paridos o en vacas próximas al secado (14).

Conductividad eléctrica (CE).

La prueba de conductividad eléctrica (CE) se ha utilizado como un indicador de la mastitis durante la última década (17, 21, 22, 25).

La concentración de aniones y cationes como el Na^+ , K^+ , Cl^- , determina la CE de la leche. En la glándula mamaria, las bombas de sodio se encuentran en la membrana baso-lateral de las células secretoras, su función es bombear Na^+ hacia el líquido extracelular y K^+ hacia el interior de las células. Tanto como el Na^+ como el K^+ son transportados pasivamente, a través de la membrana apical. Además, una vía paracelular está presente en el epitelio, mediante ella el Na^+ y el Cl^- se desplazan hacia la leche y el K^+ y la lactosa se desplazan hacia el líquido

extracelular. Cuando una vaca es expuesta a una infección intramamaria, la CE de la leche aumenta debido a un aumento en la concentración de electrolitos, especialmente sodio y cloro (11, 17, 22, 25). Este aumento es causado por la destrucción de las uniones entre células y la activación del sistema de bombeo de iones. Como resultado del daño celular, iones de Na^+ y Cl^- son vertidos en el lumen de los alveolos (25).

Existen otros factores además de la mastitis, como el número de parto, la fase de lactancia, el intervalo de ordeño y la composición de la leche que puede afectar la CE de la leche (22, 25). Por lo que a veces da como resultado un gran número de falsos positivos o de falsos negativos, por esta razón la CE se utiliza como medida complementaria en el diagnóstico de la mastitis y/o estado de salud de la glándula mamaria (17, 22, 25).

Cultivo bacteriológico y micológico.

El aislamiento de bacterias y hongos en leche de animales con mastitis es considerado como la prueba de oro y el diagnóstico definitivo (11, 25). La fidelidad de los resultados de laboratorio depende de los cuidados sanitarios que se tengan durante la toma de la muestra y su manipulación posterior (17, 25). Los métodos de identificación tradicionales se basan en el cultivo microbiológico de la leche y en pruebas bioquímicas de los microorganismos aislados (25).

Tratamiento

Diversos fármacos se han utilizado y evaluado en el tratamiento de la mastitis. Entre ellos se incluyen antibióticos, antiinflamatorios, electrolitos, vitaminas, vacunas y terapias de tipo herbolario (25, 26). A pesar de esto, el uso de antimicrobianos sigue siendo el principal

método para tratar las infecciones intramamarias ya que es fundamental para la cura de esta enfermedad; sin embargo, la eficacia es limitada debido al aumento en la incidencia de bacterias resistentes a los antibióticos, por el uso indiscriminado de los mismos para el tratamiento de infecciones (5, 8, 12, 15, 25) y como promotores del crecimiento en animales (12). Por lo que la mastitis bovina, en la actualidad es considerada un problema de salud pública, debido a la contaminación de la leche con bacterias patógenas resistentes a los antibióticos (12). El objetivo principal de una terapia con antibióticos es obtener concentraciones efectivas del mismo en el sitio de la infección, esto es debido a que el insuficiente contacto entre el fármaco y la bacteria causal de mastitis en el sitio de infección es la principal causa de falla en el tratamiento (26, 27).

Uno de los grandes compromisos del médico veterinario además de la cura de su paciente debe de ser el uso racional de los fármacos, para así evitar residuos en la carne, leche y productos lácteos que pueden tener repercusiones importantes en la salud pública (26). Para que la terapéutica sea efectiva es fundamental realizar el aislamiento bacteriano y su antibiograma (8, 15). Siempre es deseable tratar las mastitis infecciosas de acuerdo con el patrón del antibiograma que muestre el patógeno y a la experiencia clínica. La regla básica al momento de seleccionar el fármaco correcto es elegir el que tenga un espectro muy específico para enfocar el tratamiento y minimizar los efectos adversos. Debido a que lleva tiempo realizar la prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos, inicialmente se debe administrar un quimioterapéutico de amplio espectro por razones prácticas, con base en el conocimiento de las propiedades de la farmacocinética-farmacodinamia del fármaco y la formulación (26, 28).

La tasa de eficacia de un antimicrobiano está condicionada por las concentraciones que éste alcanza en su sitio de acción, su liposolubilidad, los valores de pKa, la afinidad por el tejido, la formulación del vehículo usado y la susceptibilidad del microorganismo al antibiótico, expresada como concentración mínima inhibitoria (CMI) y/o concentración mínima bactericida (CMB). Otro punto relevante es la actividad que muestre el antibacteriano en presencia de leche y material derivado de la infección, así como su unión a las proteínas de la leche, quelación por iones bivalentes, etc. (25, 28).

En la mastitis bovina hay tres potenciales rutas terapéuticas o compartimentos farmacológicos donde los microorganismos pueden estar presentes y en donde se necesita que el fármaco difunda. El primero tiene que ver con la parte apical de los alveolos, los ductos y la leche; los microorganismos que típicamente residen en estos lugares y que se consideran no invasivos son *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus* spp coagulasa negativos; en esta región se necesita que el antibiótico permanezca en la leche en concentraciones efectivas, siendo la forma más fácil y efectiva de lograrlo la administración del fármaco de forma intramamaria. El segundo compartimiento o ruta terapéutica tiene que ver con el parénquima mamario, siendo los microorganismos invasivos como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* los que se localizan frecuentemente en esta zona; en estos casos es donde se necesitaría la vía parenteral o sistémica para lograr que el fármaco difunda a estos tejidos y así servir de apoyo a la vía intramamaria. El tercer y último compartimiento es el animal, el cual es afectado principalmente por bacterias coliformes, que además de producir mastitis, son capaces de invadir el torrente circulatorio originando una septicemia, acompañada de signos sistémicos (fiebre, hipotensión, choque, etc.) (25, 26).

Patógeno de mastitis	Compartimientos farmacológicos		
	Alveolos, leche y ductos	Parénquima	Vaca
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	-----	-----
<i>Streptococcus spp.</i>	+++	+	-----
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	-----
<i>Staphylococcus spp</i>	+++	-----	-----
<i>E. coli</i> y otros coliformes	+	-----	+++
<i>Mycoplasma spp</i> y otros Gram negativos	-----	-----	+++

Cuadro 1. Compartimientos farmacológicos donde se localizan algunos microorganismos productores de mastitis (Tomado de Erskine *et al.*, 2003).

La ruta más común para la administración de antibióticos en la mastitis es la vía intramamaria. Las ventajas de esta vía son las altas concentraciones logradas del antibiótico en el compartimiento de la leche en la glándula mamaria y el bajo consumo de antibiótico debido a que el fármaco está siendo introducido directamente al sitio de la infección (25, 26, 27), sin o con poca absorción sistémica, evitando así efectos secundarios no deseados (25). Además, no se tiene acceso del quimioterapéutico al microbioma intestinal, lo que es más favorable desde el punto de vista de disminuir la generación de resistencia bacteriana. Por añadidura, la dosis total de antimicrobiano administrados por vía intramamario es considerablemente inferior a la del tratamiento parenteral y se evitan inyecciones dolorosas

(25). Las desventajas podrían ser: la distribución poco uniforme de muchas sustancias a través de la ubre, el riesgo de contaminación al introducir la cánula de tratamiento por el conducto de la teta y una posible irritación del tejido mamario causado por el mismo fármaco (26).

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que los antibióticos pueden alterar la fagocitosis cuando son administrados por vía intramamaria. Otro punto que se tiene en desventaja es la frecuencia de ordeño de las vacas tratadas; la eliminación del fármaco desde el compartimiento de la leche durante la rutina de ordeño, especialmente aquellos animales que por manejo o recomendación del médico veterinario se ordeñan más de dos veces al día, puede reducir las concentraciones efectivas del fármaco. Aunado a este factor debe de recordarse que los fármacos pueden ser absorbidos desde el compartimiento de la leche hacia la sangre como una ruta de eliminación que también puede originar el decremento de las concentraciones efectivas (26).

De manera adicional, el ambiente de la glándula mamaria durante la mastitis puede favorecer la formación de tapones de fibrina, abscesos y obstrucción en los ductos que van a interferir con la distribución del fármaco hacia los sitios de infección. Esta vía debería de ser la elección cuando se tenga certeza que el microorganismo involucrado se encuentre en el compartimiento lácteo. Otra norma a seguir es elegir un antibacteriano de acción bactericida debido a que la fagocitosis se puede encontrar afectada en la glándula mamaria (26).

Uso de las quinolonas en el tratamiento de la mastitis.

Una familia de antibióticos sintéticos que comúnmente se utiliza en el tratamiento de la mastitis, son las quinolonas, que constituyen una familia de quimioterapéuticos con acción bactericida y de amplio espectro contra microorganismos Gram positivos y negativos (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35). Para ejercer sus efectos antimicrobianos, las quinolonas son primero transportadas al interior de la célula bacteriana mediante un proceso de difusión pasiva (34, 35). Su mecanismo de acción es bloquear las funciones del ADN bacteriano al inhibir las enzimas ADN topoisomerasa II (ADN-girasa) y ADN topoisomerasa IV (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35) formando un complejo quinolona-ADN-topoisomerasa; ambas son topoisomerasas de tipo II, las cuales son necesarias para realizar el superenrollamiento del ADN. Las topoisomerasas son enzimas que catalizan cambios en la topología del ADN y se dividen en tipo I y tipo II, dependiendo de si catalizan reacciones que involucren la ruptura temporal de una (tipo I) o ambas cadenas de ADN (tipo II) (33). Ambas enzimas como ya se mencionó anteriormente, contribuyen al desenrollamiento del ADN que se requiere para que éste pueda ser procesado, pero funcionan de diferente manera: la girasa elimina superenrollamientos positivos y avanza delante de la horquilla de replicación, mientras que la topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación; esta enzima, además, participa en la segregación de los cromosomas posterior a la división celular (31, 33).

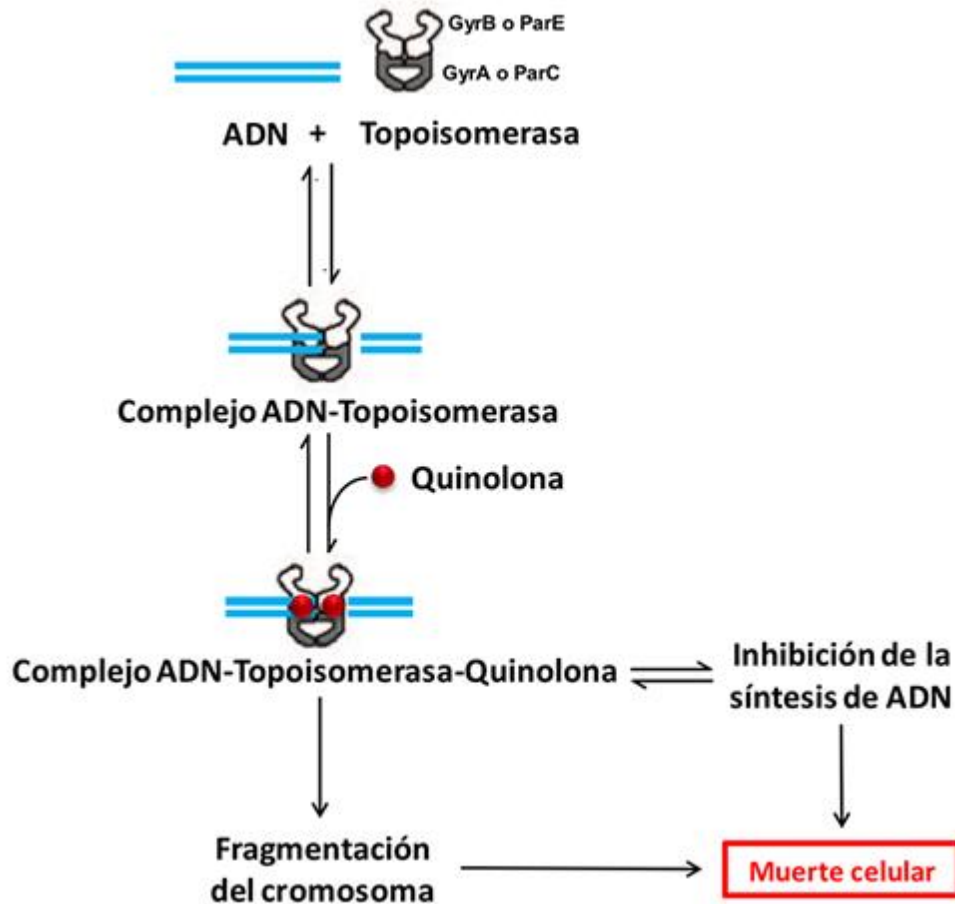


Figura 1. Resumen del mecanismo de acción que tienen las quinolonas en el complejo ADN-topoisomerasa (Chávez-Jacobo 2015).

Es importante destacar que en células eucariotas existen topoisomerasas de tipo II que conservan una homología con las de las bacterias. Sin embargo, se ha demostrado que las concentraciones necesarias para inhibir la actividad de las topoisomerasas eucariotas por parte de las quinolonas son unas 100 veces mayores que las necesarias para inhibir las topoisomerasas bacterianas y de 50 a 100 veces mayores que las que se alcanzan en suero y tejidos. Por ellos es muy poco probable la toxicidad de las quinolonas a través de esta vía (33).

Las quinolonas han sido el centro de interés, tanto científico como clínico, debido a que ofrecen muchos de los atributos de un antibiótico ideal: alta potencia, amplio espectro de acción, buena biodisponibilidad, formulaciones tanto en presentaciones orales e intravenosas, altos niveles en suero, un amplio volumen de distribución y baja incidencia en efectos adversos (31); debido a esto, las quinolonas constituyen uno de los grupos de quimioterapéuticos con mayor desarrollo. Las quinolonas tienen su origen sintético en la degradación de sustratos alcaloides, cuando Prince J. R. en 1949, obtuvo un compuesto inactivo durante el proceso de síntesis de la cloroquina (un agente contra la malaria), al que denominó quinolona (35). El primero de estos compuestos, el ácido nalidíxico, fue descrito por George Lescher y colaboradores, en 1962, compuesto eficaz contra microorganismos Gram negativos; al inicio tenía ciertas limitaciones en cuanto a sus parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos, aunque las concentraciones alcanzadas en el tracto urinario eran altas, limitando su utilidad al tratamiento en infecciones urinarias (29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37). Sin embargo, la relación entre la estructura química y la actividad biológica de esta molécula, ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos modificando de manera importante su actividad antimicrobiana (31, 36), este desarrollo se ha visto favorecido, no solo por la posibilidad de modificar su estructura básica, sino también por la posibilidad de alterar seis radicales, es decir, todas las posiciones de la molécula, excepto 2, la posición 3 que presenta un radical carboxilo y la posición 4 con un radical ceto. Todas estas posibilidades de modificar o alterar la molécula va a dar lugar a variaciones en la actividad de las quinolonas frente a los microorganismos y a modificaciones en los parámetros farmacocinéticos, así como también se puede ver alterada la toxicidad de la molécula y las interacciones que presenten con otros fármacos (34).

Dentro de las quinolonas, uno de los fármacos que se utilizan con mayor frecuencia es la enrofloxacin, la cual es una fluoroquinolona desarrollada en los años 80's para uso exclusivo en medicina veterinaria, la adición de un átomo de flúor en la posición 6 mejoró el espectro antibacterial y la unión a su enzima diana (32, 33, 34, 37, 38), se reporta que incluso aumentó la penetración celular hasta 70 veces con respecto a las quinolonas que no tienen flúor en esa posición (37, 38). Con esta adición se aumentó la eficacia contra patógenos Gram negativos y se amplió el espectro de actividad al actuar contra patógenos Gram positivos (38). Se clasifica para efectos de farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) como concentración-dependientes y está aprobada para su uso en ganado lechero en la Unión Europea y Estados Unidos (25, 39). La enrofloxacin es un cristal de color amarillo claro, soluble en KOH, ácido acético glacial y casi insoluble en agua a pH 7 (0.6 mg/ml) (25); en ocasiones la eficacia de las fluoroquinolonas es afectada por el pH del medio. Se ha comprobado menor actividad contra bacterias Gram negativas en medio ácido que en medio básico, sin embargo, la eficacia frente a bacterias Gram positivas, no parece ser afectada por el pH del medio (38). Resalta en esta molécula, una alta biodisponibilidad, una excelente penetración en el tejido y un amplio espectro antibacteriano (25, 38). El metabolismo de la enrofloxacin varía entre especies. Aunque la enrofloxacin es un antibiótico activo, puede producirse biotransformación a su metabolito activo: la ciprofloxacina (25, 27, 37, 38).

Normalmente la enrofloxacin es administrada por vía IM a dosis de 5 mg/kg y con esta dosis se alcanza concentraciones altas y sostenidas de la misma y su metabolito ciprofloxacina en sangre, alcanzando concentraciones de 2 a 3 µg/mL en leche (25, 27). La mayoría de los antibióticos disminuyen su eficacia en presencia de leche y secreciones relacionadas con el proceso inflamatorio-infeccioso y la enrofloxacin no es la excepción, aunque si es uno de

los que menos se afectan. Se estima que la reducción en la capacidad antibacteriana puede llegar a ser hasta de un 70% (25, 27). Por otro lado, la enrofloxacin (y ninguna fluoroquinolona conocida) no puede administrarse vía intramamaria dado el pH que se requiere para disolver este fármaco (al menos 10.4) (25, 27). Medicamentos con pH inferior a 3 o superior a 9, no son recomendables para la administración parenteral ni para las preparaciones farmacéuticas intramamarias debido a que serían demasiado agresivas para los tejidos (25).

Uso de una nueva enrofloxacin clorhidrato-dihidrato.

Un nuevo fármaco, la enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-C-UNAM patente 472715) es una nueva forma polimórfica recristalizada de enrofloxacin, la cual ha mostrado una mayor solubilidad en agua que el compuesto principal, así como poseer una mayor biodisponibilidad que la enrofloxacin de referencia en pollos de engorda y hámsteres (25, 27, 40). También se ha reportado que después de la aplicación SC a una dosis de 10 mg/kg en hámsteres sirios, la enro-C muestra una marcada C_{max} y valor de ABC (área bajo la curva), estos valores son aproximadamente 6 veces más altos que los valores correspondientes para una preparación de referencia de enrofloxacin (39). Así como una suspensión al 1.5%, la enro-C muestra un pH de 5.5, la cual no irrita la glándula mamaria al aplicarlo por esta vía (27).

La actividad *in vitro* no es diferente entre la enrofloxacin comercial y la enro-C; por lo tanto, parece que la enrofloxacin comercial muestra una distribución insuficiente del tejido en comparación con la enro-C, por lo que no alcanza las concentraciones bactericidas necesarias, esto cumple con el reporte que la enro-C tiene una mayor biodisponibilidad y se

destaca como la explicación más probable para las diferencias observadas en la eficacia clínica y bacteriológica entre enrofloxacin y enro-C (40). En estudios anteriores se logró una eficacia del 75% con enro-C en casos crónicos de mastitis por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* spp coagulasa negativos (27).

Resistencia bacteriana

En el siglo XX fueron descubiertos los antibióticos, constituyendo esto un hito en el control de las enfermedades infecciosas. No obstante, siendo las bacterias organismos vivos, poseen mecanismos biológicos que les permiten adaptarse a situaciones adversas para ellas, como es el caso de la presión que ejercen los antibacterianos. Surge así, la resistencia a los antimicrobianos que es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, al final de cuentas fueron las bacterias quienes los inventaron (1).

Como ha ocurrido con todos los antibióticos empleados en el tratamiento de infecciones bacterianas, en el caso de las quinolonas también se han detectado microorganismos resistentes a estos antibióticos. Las bacterias han desarrollado variados y novedosos mecanismos de tolerancia a estos fármacos, codificados tanto en genes cromosómicos como de plásmidos (31, 33, 34, 41).

Los sistemas de resistencia a quinolonas pueden dividirse en dos grupos:

- Los que están regulados por medio de mutaciones cromosómicas, estos mecanismos tienen mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR por sus siglas en inglés), que incluyen las modificaciones en el sitio blanco del antibiótico y los sistemas de expulsión (31, 33, 34, 35, 42, 43).

- Los que están codificados por genes presentes en plásmidos, estos mecanismos son conocidos como resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR por sus siglas en inglés), que incluyen a las proteínas qnr, la enzima aminoglucósido acetil transferasa y los sistemas membranales de expulsión (31, 33, 34, 42, 43).

Mutación cromosómica

Las alteraciones de la diana consisten en sustituciones aminoacídicas en la proteína, la ADN-girasa o la topoisomerasa IV, generadas por mutaciones puntuales en sus genes codificantes. Estas mutaciones tienen como objetivo cambiar el aminoácido en la zona de interacción entre la quinolona y la proteína diana, perdiendo esta afinidad por la proteína diana con la consecuencia de que las quinolonas pierden actividad mientras que la enzima sigue siendo activa (34, 43).

La adquisición de resistencia a las quinolonas en general es gradual y está relacionada con el número de mutaciones que presentan los microorganismos en la región determinante de resistencia a quinolonas (RDRQ), principalmente en los genes *GyrA* y *parC* (32, 34, 43).

Nakamura *et al.*, (1989) estudiaron la proporción de mutaciones de los genes *GyrA* y *GyrB* entre mutantes espontáneas resistentes a quinolonas de *E.coli* KL16 seleccionadas por ácido nalidíxico. A partir de 20 mutantes seleccionadas, 10 presentaron mutaciones en *GyrA* y 10 presentaron mutaciones en *GyrB*. Algunas de las mutantes en *GyrA* exhibieron MICs elevados de ácido nalidíxico (200 a ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$), mientras que la mayoría de las mutantes en *GyrB* presentaron MICs relativamente bajos para ácido nalidíxico (25 a 50 $\mu\text{g/ml}$), y ninguna mostró MICs tan altos como 200 a ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$. En cambio, de ocho aislamientos clínicos, cinco presentaron mutaciones en *GyrA* y sólo uno presentó mutación en *GyrB*. Las cinco

mutantes *GyrA* mostraron MICs elevados para ácido nalidíxico (200 a ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$), mientras que el de la mutante *GyrB* fue relativamente bajo (100 $\mu\text{g/ml}$). Estos resultados demuestran que la frecuencia de mutaciones espontáneas es prácticamente la misma para ambos genes, *GyrA* y *GyrB*. El porqué se presenta mayor número de mutantes *GyrA* en aislados clínicos puede ser debido a que éstas son más resistentes a quinolonas que las mutantes *GyrB* y por lo tanto presentan ventajas selectivas (33). También se ha descrito que la mutación tiene que ver con la actividad *in vitro* e *in vivo*, ya que, aunque *in vitro* es similar para *GyrA* y *GyrB*, mientras que *in vivo* esta frecuencia es mucho mayor en *GyrA* (35).

Disminución de la permeabilidad de la membrana

Se ha demostrado que la disminución de permeabilidad debido a la pérdida o reducción del número de porinas, o su alteración estructural, provoca resistencia a los antimicrobianos. Los mutantes en porinas que disminuyen su expresión producen resistencia de bajo nivel, la cual aumenta si el microorganismo adquiere o posee otros mecanismos como sistemas de expulsión activa o un mecanismo específico de resistencia. Se ha puesto de manifiesto que, la pérdida de las porinas OmpF y OmpC en *E. coli* y OmpK35 y OmpK36 en *K. pneumoniae*, contribuyen escasamente a la resistencia a quinolonas en cepas altamente sensibles, mientras que en cepas con alteraciones en las topoisomerasas y/o sistemas de expulsión activa producen un incremento de 2 a 4 veces en el nivel de resistencia (35).

Sobreexpresión de sistemas de expulsión activa

La reducción de la concentración intracelular de quinolonas también se puede realizar por un mecanismo activo, el cual es la expresión o sobreexpresión de bombas de eflujo (31, 32). Los sistemas de eflujo, definidos como proteínas de transporte constitutivas e involucradas en la

expulsión de una amplia gama de sustratos, fueron descritos por McMurry en 1980, donde demostró la presencia de eflujo activo para tetraciclina en *E. coli*, (19).

Los sistemas de eflujo se dividen en 5 familias: familia de ATPasas (ABC), familia facilitadora principal (MFS), familia pequeña de multirresistencia (SMR), familia de multirresistencia y expulsión de compuestos tóxicos (MATE) y familia de resistencia, nodulación y división celular (RND) (19, 35, 43), los cuales están ampliamente distribuidos en las bacterias y fueron descritas para Gram positivos, también se hallan en Gram negativos asociadas a porinas de la membrana externa, lo que genera un canal directo entre el citoplasma y el exterior, evitando el espacio periplásmico (31, 35). Las bombas de eflujo están constituidas por una proteína de membrana interna cuya función es el intercambio protónico, un componente de membrana externa formador de canales y una proteína periplásmica fusionada a la membrana. Estos sistemas funcionan capturando del citoplasma y expulsando de las células sustratos variados que pueden incluir a los antibióticos, colorantes, detergentes, etc. Al suceder esto, se consideran que no son sistemas específicos para la eliminación de quinolonas (1, 18, 19, 35, 43) y se cree que los sistemas de eflujo anteceden a la era de los antibióticos, por lo que su rol no está relacionado con el uso de estos. Por tanto, se sugiere que son elementos antiguos evolutivamente, de gran importancia para la fisiología y el comportamiento ecológico de todos los seres vivos, incluyendo bacterias y arqueas (19).

Resistencia mediada por plásmidos

Durante un largo periodo de tiempo se pensó que la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos transferibles no tenía lugar, al menos con una frecuencia detectable, mientras que la resistencia plasmídica a otros antimicrobianos había aparecido en periodos más cortos (35). Este tipo de resistencia fue descubierta inadvertidamente mientras se estudiaba la resistencia producida a los fármacos beta lactámicos (24).

Proteínas qnr

La primera proteína codificada por plásmido que confiere resistencia a quinolonas fue identificada en 1994 en *Klebsiella pneumoniae* aislada de una muestra de orina en Alabama (33, 35, 43). A la fecha existen cerca de 100 variantes de qnr que han sido identificadas y han sido clasificadas en 6 distintas familias: QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD y QnrVC (24, 32, 33, 43), estas proteínas son pentapéptidos repetidos, esto debido a que presenta repeticiones de cinco aminoácidos en tándem y confieren la resistencia a las quinolonas por una protección física a la ADN girasa (topoisomerasa II) y a la topoisomerasa IV que las protege de la inhibición de las quinolonas (24, 32, 33, 35, 42, 43). Por último, cabe mencionar que todas las especies en las que se han identificado determinantes de tipo qnr han sido enterobacterias (31, 35). La presencia de genes qnr puede aumentar el número de mutaciones que causan resistencia a quinolonas; además, suelen combinarse con otros genes dentro del mismo plásmido, generando resistencia cruzada entre quinolonas y otros antimicrobianos a los que no eran previamente resistentes (24, 31). Varios estudios epidemiológicos han mostrado que los aislados de enterobacterias positivos a Qnr expresan también beta

lactamasas de espectro extendido codificadas por plásmidos, especialmente aquellos que expresan determinantes QnrA y QnrB (24, 33).

Enzima aac(6')-Ib-cr

Robicsek et al (2006) describen por primera vez en un aislamiento de *E. coli* en Shangai, China el gen *aac(6')-Ib-cr* que codifica para una nueva variante de la aminoglucósido acetiltransferasa o aac(6')-Ib, . Esta determinante se considera responsable de conferir resistencia a kanamicina, tobramicina, amicacina y reducción de la susceptibilidad a ciertas fluoroquinolonas, ya que produce una N-acetilación en el nitrógeno del grupo piperazina en la posición 6 del antibiótico (de las más estudiadas es la norfloxacin y ciprofloxacina). Esta variante presenta dos cambios en la secuencia de aminoácidos, Trp102Arg y Asp179Tyr, ambas responsables de la reducción de la susceptibilidad (2 o 3 veces mayor) de algunas fluoroquinolonas, sumando este efecto a otros mecanismos codificados por plásmidos (26, 31, 32, 33, 44). Es usualmente encontrado como parte de un integrón en un plásmido de multirresistencia el cual contiene otros genes PMQR (24, 44). A pesar de conferir una resistencia, su nivel es bajo, pero puede crear un entorno que facilite la selección de determinantes más resistentes, especialmente los que albergan mutaciones de topoisomerasas (45). De hecho, en trabajos realizados por Robicsek et al., se ha reportado que cuando en una misma bacteria se presenta tanto QnrA como aac (6')-Ib-cr, el nivel de resistencia a ciprofloxacina incrementa cuatro veces más que el conferido cuando solo se presenta QnrA (33).

Este gen ha sido encontrado a nivel mundial en una variedad de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* e inclusive en *P. aeruginosa*. Es más prevalente en *E. coli* que en otras *Enterobacteriaceae* y es más común que los alelos *qnr* en algunas muestras (24, 45).

Bombas de eflujo OqxAB y QepA.

Estas bombas de eflujo constituyen los últimos descubrimientos de genes *PMQR*. La proteína QepA comparte identidad significativa con las bombas de eflujo pertenecientes a la familia de tipo facilitador principal (MF por sus siglas en inglés) que son transportadores dependientes de protones (23, 24, 31, 32, 33, 43) y este gen se identificó en plásmidos pHPA de *E. coli* C316 y en el plásmido pIP1206 de *E. coli* en 1450 aislados en Japón y Bélgica, respectivamente (31, 32, 33). Esta proteína confiere baja susceptibilidad a quinolonas hidrofílicas como la ciprofloxacina, norfloxacina y enrofloxacin (24, 31, 32, 33, 43). Se ha sugerido la posibilidad de una fuerte relación entre los genes *qepA* y *rmtB*, que confieren resistencia a todos los aminoglucósidos, excepto estreptomicina (33).

Por otro lado, OqxAB es codificado por los genes *oqxA* y *oqxB*, localizados en un plásmido conjugativo de 52 kb designado pOLA52 (31, 32, 33) y fue descrito por primera vez en el 2004 en un aislado de *E. coli* a partir de estiercol de una granja de cerdos en Dinamarca, donde usaban olaquinox como promotor del crecimiento (33). Estas proteínas consisten en varios bloques conservados de aminoácidos similares a otras proteínas verificadas y posiblemente pertenecientes a la familia RND (23, 24, 31, 32, 33, 43). De manera similar a otros miembros de esta familia, el sistema de eflujo OqxAB también requiere de la proteína TolC para formar el canal transmembranal (31, 33).

A pesar de los reportes en décadas pasadas sobre la aparición de este gen entre la familia de *Enterobacteriaceae*, en comparación con otros mecanismos de resistencia mediados por plásmidos, se conoce muy poco sobre su prevalencia y su contribución con la resistencia a diferentes antimicrobianos (31).

Justificación

La mastitis es una enfermedad infecto-contagiosa que ocasiona grandes pérdidas a la ganadería productora de leche del país y afecta fundamentalmente al ganado bovino que se encuentra en producción de forma intensiva, tanto el que es ordeñado en forma manual, así como el que es ordeñado en forma mecánica, esto es debido a las deficientes condiciones de manejo e higiene que se tienen establecidas en la gran mayoría de las producciones lecheras. Usualmente la mastitis bovina es tratada o prevenida con antibióticos intramamarios; representado una carga económica muy alta a los productores de leche en todo el mundo; además de que los microorganismos pueden generar resistencia a estos antibióticos haciendo más complicado su tratamiento.

El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo y adaptativo de los microorganismos, por lo cual inevitablemente, se va a presentar e irá aumentando con el paso del tiempo. Sin embargo, la presencia de cepas resistentes al variar de una región a otra determina la necesidad de que sea estudiada periódicamente en las diferentes zonas de cada país. Adicionalmente, el conocimiento de los mecanismos de resistencia, permiten hacer modificaciones farmacológicas para recuperar la susceptibilidad a los antibacterianos y con ello contrarrestar su ineficacia.

Hipótesis

La Enrofloxacin hidroc lorada (enro-C) presenta una buena eficacia clínica y acción microbicida en el tratamiento de la mastitis bovina aún con la presencia de bacterias que posean genes de resistencia a quinolonas

Objetivos

- 1.- Realizar el examen clínico de los animales y la detección de mastitis subclínica por CMT
- 2.- Evaluar la cuenta de células somáticas de los cuartos afectados.
- 3.- Realizar el examen microbiológico de las muestras de leche positivas por CMT.
- 4.- Evaluar la susceptibilidad *in vitro* a enro-C y enrofloxacin base de los aislados bacterianos provenientes de las muestras de leche.
- 5.- Evaluar por PCR la presencia de los genes de resistencia a quinolonas presentes en plásmidos y cromosoma (AAC (6')-Ib-cr y Gyr A) en las bacterias aisladas.
- 6.- Realizar tratamientos intramamarios con enro-C y evaluar su eficacia clínica.

Material y métodos.

Animales

Los procedimientos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la normatividad sobre el uso de animales en la investigación establecidos por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El manejo de los animales del presente trabajo se realizó durante el mes de abril del 2018, en un hato

lechero con actividad de enseñanza e investigación ubicado al sur de la ciudad de México. Se utilizaron 20 hembras de la raza Holstein-Friesian mayores a 5 años.

Los animales que fueron detectados con mastitis subclínica por CMT o con signos de mastitis clínica durante la ordeña, fueron registrados en reportes correspondientes a la hora del ordeño, señalando el cuarto afectado y el número de animal.

Prueba de California para mastitis (CMT).

Se utilizó una paleta de 4 compartimentos, los cuales corresponden a cada uno de los cuartos de la ubre y el reactivo de California que consta de un detergente (alquilauril sulfonato de sodio) y un indicador de pH (púrpura de bromocresol).

Para iniciar la prueba se lavó la ubre y se limpiaron los pezones, ya que cualquier tipo de materia orgánica interfiere con los resultados. Se descartaron los dos primeros chorros de leche de cada pezón sobre un tazón de fondo oscuro y acción seguida tomando la paleta por el mango dirigido hacia la cola de la vaca, se colectó alrededor de 5 mL de leche de cada cuarto, se niveló la cantidad de leche inclinando la paleta y de inmediato se agregó a cada compartimiento la misma cantidad de reactivo de California, cuidando que la proporción de reactivo-leche fuera de 1:1. De inmediato se mezcló la leche y el reactivo mediante un movimiento rotatorio suave, haciendo la lectura de la reacción alrededor de 7-10 segundos posteriores a este movimiento.

Interpretación de la prueba de California para mastitis.

Resultados	Reacción	No. de células/mL	%PMN
Negativo	Sin evidencia	< 150 000	0 a 25
Trazas	Precipitación leve	150 000 a 500 000	30 a 40
1	Ligera precipitación que desaparece al agitar.	400 000 a 1 500 000	40 a 60
2	Ligera precipitación con algunos filamentos grumosos.	800 000 a 5 000 000	60 a 70
3	Formación de gel rápido, apariencia de clara de huevo.	>5 000 000	70 a 80
+	Fuerte color morado (leche alcalina).	Actividad secretora reducida	
++	Color amarillo (leche ácida).	Fermentación de lactosa por bacterias (pH 5.2).	

PMN = Polimorfonucleares

Adaptado de Schalm *et al* 1970.

Cuadro 2. Interpretación para los resultados de la prueba de CMT.

Cuenta de células somáticas.

El recuento de las células somáticas se obtuvo mediante el dispositivo De Laval DCC® (De Laval DCC®, Suecia) con las muestras que se tomaron al momento de la ordeña. Las muestras se trabajaron siguiendo las directrices del proveedor.

Microbiología.

La leche que se utilizó para el análisis bacteriológico se obtuvo después del descarte de los tres primeros chorros de leche al momento de la ordeña, se recolectaron en recipientes estériles y herméticos; posterior a esto las muestras se identificaron con datos correspondientes y se conservaron en refrigeración (4°C) para transportarlas inmediatamente hasta el laboratorio y trabajarlas.

La metodología aquí descrita es un resumen de las directrices publicadas por el Consejo Nacional de la Mastitis de EU (NMC, 2004); para el análisis se tomaron 10 mL de leche en recipientes estériles. Previo al procesamiento, las muestras se sometieron a una incubación de 37°C durante una hora y posteriormente a una agitación con un mezclador o manualmente durante un periodo de 1 minuto con el objetivo de tener una muestra homogénea y para liberar las bacterias que puedan encontrarse atrapadas en la grasa. Se realizaron 2 frotis directos, uno para ser teñido con la tinción de Gram y el otro con la tinción de Ziehl-Neelsen; posteriormente la muestra de leche se sembró por la técnica de primocultivo (cultivo primario) en placas de agar sangre, agar MacConkey y agar de manitol sal, se incubaron en condiciones aerobias durante 24 - 48 horas a 37°C. Después de este tiempo se examinaron las placas para observar el crecimiento microbiano. Las bacterias se identificaron de acuerdo con sus características morfológicas de la colonia y características microscópicas como la

afinidad a los colorantes de la tinción de Gram, forma y agrupación. Además, se evaluaron características fisiológicas como la actividad de las enzimas catalasa y coagulasa, fermentación de manitol y pruebas bioquímicas para las bacterias que crecieron en agar MacConkey (Oxidasa, TSI, SIM, urea y citrato). En el caso de los aislados con colonias sospechosas para *Streptococcus* spp se confirmó al realizar la prueba de CAMP e hidrólisis de la esculina. Los aislados con colonias sospechosas de ser *Staphylococcus*, se confirmaron o no, basándose en la morfología microscópica y reacción de la catalasa. Las colonias de *Staphylococcus aureus* se diferenciaron de otros estafilococos por medio de reacciones de coagulasa y fermentación del manitol, según los lineamientos (NMC, 2004).

Una vez terminada la identificación de las bacterias se realizó un pase a agar de tripticaseína de soya (TSA) (para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp, *Corynebacterium* y enterobacterias) y agar sangre (para *Streptococcus uberis*) para poder realizar los antibiogramas correspondientes.

Prueba de susceptibilidad a antibióticos

Para seleccionar la mejor terapia antibacteriana a aplicarse a las vacas, se realizó la prueba de susceptibilidad a antibióticos por medio de una modificación al método de Kirby-Bauer, donde el inóculo bacteriano fue estandarizado con el 0.5 del nefelómetro de McFarland y sembrado por estría cerrada en placas de agar Müller-Hinton, posteriormente diferentes productos comerciales y experimentales de aplicación intramamaria fueron aplicados directamente sobre el agar (aproximadamente 50 µl), las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas y se determinó la susceptibilidad por medio de los halos de inhibición presentados. Los antibióticos presentes en dichos productos fueron: enro-C (30 mg/mL), cefalexina

monohidrato (22.5 mg/mL), tetraciclina HCL-neomicina (20 mg-10 mg/mL, ceftiofur clorhidrato (80 mg/g), penicilina G (100,000 UI/mL), rifaximina (20 mg/mL).

Prueba de susceptibilidad a enrofloxacin

Con el fin de determinar la susceptibilidad a enrofloxacin, en sus dos presentaciones (enro-C y enrofloxacin base), a todas las cepas aisladas se les realizo la prueba de susceptibilidad a antibi6ticos por medio de una modificaci6n al m6todo de Kirby-Bauer *et al*, en el cual se utiliz6 agar de M6ller-Hinton con pozos hechos con ayuda de un sacabocados de 5 mm de di6metro. Posterior a esto, se estandariz6 el in6culo bacteriano agregando colonias bacterianas necesarias a un tubo con SSF, hasta alcanzar una turbidez igual al 0.5 de Mc Farland. El in6culo se sembr6 en las placas de agar M6ller-Hinton con ayuda de un hisopo por estria cerrada sobre toda la superficie, se dejaron las cajas ligeramente abiertas junto al mechero de 3 a 5 minutos aproximadamente, una vez que se secaron las cajas se les agreg6 en cada pozo 50 µl de una soluci6n a diferentes concentraciones de cada uno de los dos antibi6ticos a utilizar: enro-C y enrofloxacin base (0.2 mg/mL, 1mg/mL y 2 mg/mL). Se incub6 a 37°C por 24 horas y posterior a este tiempo se verific6 que existiera o no un halo de inhibici6n del crecimiento bacteriano, en las cepas donde se present6 dicho halo se midi6 con la ayuda de un vernier y se registr6 para su posterior comparaci6n, cada evaluaci6n se realiz6 por duplicado en dos repeticiones independientes.

Las diferentes concentraciones a las que se decidi6 probar la enrofloxacin (en ambas presentaciones) se realizaron con base en los patrones est6ndar del halo de inhibici6n, Puntos de corte equivalente a la Concentraci6n M6nima Inhibitoria (CMI) para enterobacterias y di6metro del halo de inhibici6n para *E.coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus*

ATCC25923 empleadas como control de calidad usando discos de ciprofloxacina (5 µg) en estudios validados por el NCCLS (año 2000), diámetros de los halos de inhibición (en milímetros):

Antimicrobiano	Resistente	Intermedio	Sensible
Ciprofloxacina	≤ 15	16-20	≥21

* Elaborado con datos del NCCLS, 2000 (46).

Detección de genes de resistencia a quinolonas: plasmídico (*AAC (6')-Ib-cr*) y cromosómico (*Gyr A*).

Se realizó la extracción de ADN total a partir de los cultivos de las bacterias en agar TSA y agar sangre, utilizando el siguiente protocolo:

1. Utilizando un asa microbiológica de aro grande se transfieren varias colonias (hasta generar una pastilla visible) y se resuspenden en dos tubos cónicos con 2 mL de buffer Tris-EDTA (TE).
2. Inactivar las bacterias a 80°C durante 20 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.
3. Centrifugar durante 5 minutos a 10 000 rpm. Desechar el sobrenadante.
4. Agregar 400 µl de buffer TE a cada uno de los tubos.
5. Añadir 50 µl de lisozima (10mg/mL) mezclar gentilmente e incubar al menos 1 hora a 37°C (preferible toda la noche).
6. Añadir 75 µl de SDS al 10% y 50 µl de proteinasa K (1mg/mL) mezclar con un agitador automático.
7. Incubar 20 minutos a 65°C
8. Añadir 100 µl de NaCl 5M y mezclar suavemente

9. Añadir 100 µl de la solución de CTAB/NaCl precalentada a 65°C, agitar hasta que se ponga blanca. Incubar a 65°C por 10 minutos (Al prepararse la solución de NaCl en agua, esta debe calentarse a 65°C con agitación para ir añadiendo el CTAB y ésta pueda entrar en solución. Al momento de enfriarse, la solución normalmente se vuelve viscosa, por lo cual hay que calentarla nuevamente cada vez que se use)

Nota: El objetivo del tratamiento con CTAB es remover los restos celulares, desnaturalizar proteínas y agregar el polisacárido, mientras mantiene el ácido nucleico en solución.
10. Añadir 750 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar por inversión y luego centrifugar 5 minutos a 12 000 rpm a TA (el objetivo es remover los complejos CTAB-proteína/polisacárido).
11. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. Repetir la extracción con 1 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
12. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo y añadir 0.7 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar suavemente por inversión (si la extracción es buena se pueden observar las hebras de ADN). Colocar 30 minutos a -20°C (o toda la noche).
13. Centrifugar a 10 000 rpm por 15 minutos a TA. Desechar el sobrenadante, agregar 1 mL de etanol al 70% frío mezclando manualmente por inversión.
14. Centrifugar 5 minutos a 10 000 rpm a TA y desechar el sobrenadante secando bien el tubo.
15. Dejar secar la pastilla al aire 10 minutos a TA sin que se sobre seque (si esto sucede la pastilla se verá blanca y es más difícil de disolver. Es mejor punto cuando ya no se aprecian gotas de líquido en las paredes del tubo y la pastilla de ADN es traslúcida).

16. Disolver la pastilla de ADN en 50 µl de agua libre de nucleasas.

17. Almacenar a 4°C durante toda la noche, para permitir que las pastillas de ADN se disuelvan.

Una vez lista la extracción de todas las muestras se procedió a medir la concentración e integridad del ADN por medio de espectrofotometría (NanoDrop), en un rango de lectura de 260-280 nm y electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Una vez conocidas las concentraciones de las muestras, todas se estandarizaron a 40 ng/µL y se realizó la PCR para la detección de genes de resistencia a quinolonas. La búsqueda se realizó para los genes Gyr A (cromosómico) y AAC (6´)-lb-cr (plasmídico), estos genes se utilizaron después de una amplia y profunda revisión bibliográfica donde los marcan como los principales responsables en la resistencia a las quinolonas. Se utilizó el gen GroEL como control interno; los iniciadores que se utilizaron son los siguientes:

Gen	Secuencia	
Gen Resistencia	Iniciadores 5´ → 3´	Amplicon (pb)
Gyr A *	F- TAC ACC GGT CAA CAT TGA GG R- TTA ATG ATT GCC GCC GTC GG	648
AAC (6´)-lb-cr **	F- TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA R- CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT	482

* Qin *et al.* (2017)

**Park *et al.* (2006)

Las condiciones de la PCR fueron: activación 95°C x 2 minutos, 35 ciclos: desnaturalización 95°C x 45 segundos, alineación 62°C x 30 segundos, amplificación 72°C x 45 segundos y

una extensión final de 72°C x 2 minutos. Una vez terminada la PCR se comprobó el tamaño de los amplicones por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (teñido con GelRed).

Tratamientos intramamarios y evaluación clínica

Con base en los resultados de susceptibilidad a quimioterapéuticos, se determinó que la enro-C era la mejor opción para ser utilizada como tratamiento. A las vacas diagnosticadas con mastitis subclínica y con aislamiento bacteriano positivo se les aplicó el siguiente tratamiento: 5 mL de oxitocina vía intramuscular (IM) por 4 días y ordeñar a las vacas 2 veces al día. Además, posterior al ordeño (2 veces al día) y previa limpieza y desinfección de la glándula y ápice del pezón se les aplicó por cuarto afectado una preparación farmacológica de enro-C a 30 mg/mL en suspensión de 10 mL por vía intramamaria durante 5 días. Al término de este tratamiento se realizó un protocolo de revisión para evaluar el estado de salud de la glándula mamaria que consiste en la palpación y exploración de la misma, los resultados de la prueba de tazón en fondo oscuro y CMT; a las vacas que seguían presentando grumos en la leche y reacciones positivas al CMT se aplicó una suspensión de tetraciclinas durante 4 días, si el problema persistía, se aplicó hasta 3 tratamientos diferentes, el primero de ellos fue una solución farmacológica de ceftiofur intramamario e intramuscular, el segundo una combinación de lavados con penicilina y en el caso de una glándula que tardo más tiempo en sanar, se aplicó una combinación de enrofloxacin, más espiramicina/neomicina y tetraciclina/neomicina. Después de estos tratamientos todas las vacas sanaron clínicamente; cabe resaltar que en las vacas en las que se aisló *Staphylococcus aureus*, el cuarto afectado se secó para no volver a ordeñarse.

Resultados

Susceptibilidad a antibacterianos

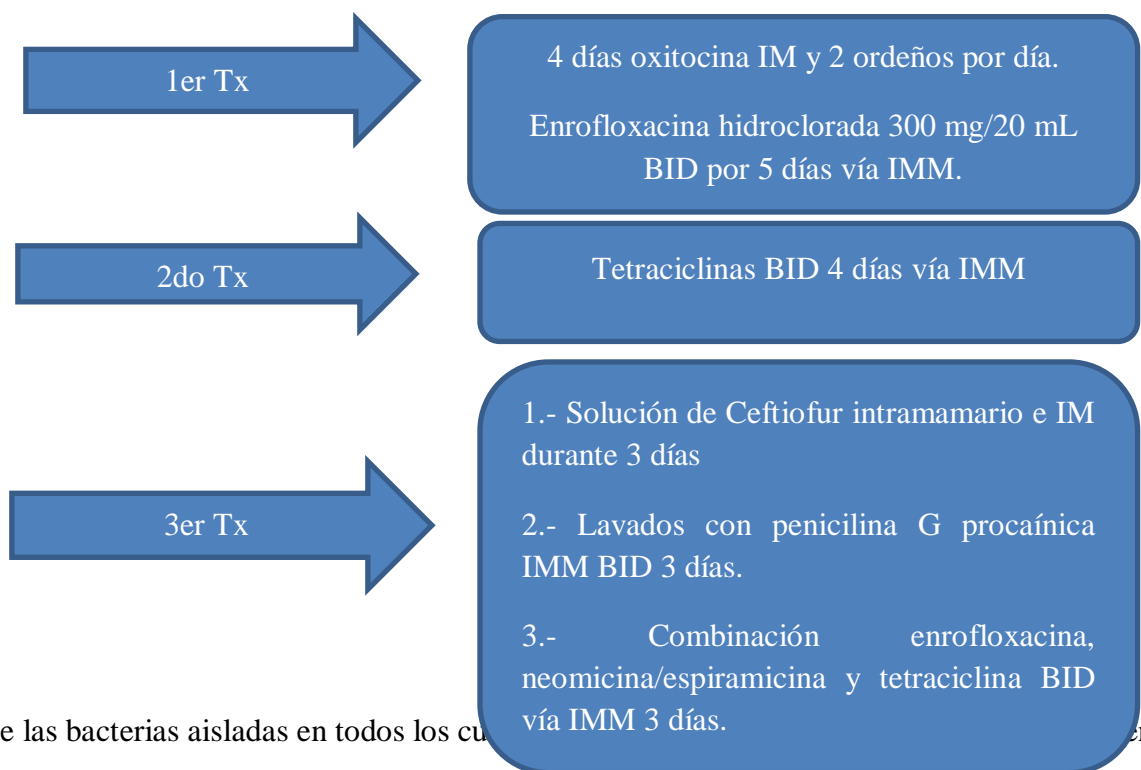
Los ensayos de susceptibilidad a los diferentes antibióticos probados mostraron que 100% de las cepas aisladas fueron susceptibles a enro-C, 95.2% a Monohidrato de cefalexina, 85.7% Rifaximina, 76.2% Sulfato de neomicina y Tetraciclina HCl y 38.1% Sulfatiazol Sódico y Penicilina G Procaínica.

Eficacia Clínica de la enrofloxacin hidrocliclorada

Debe tenerse en cuenta, que el hato lechero con el que se trabajó tiene actividad de enseñanza e investigación, las vacas son mayores a 5 años y están sometidas a un intenso manejo.

De un total de 19 vacas que se encontraban dentro del hato, 9 vacas (47.4%) presentaron casos de mastitis subclínica diagnosticadas por tazón de fondo oscuro y CMT. Como la prueba se realizó por cada cuarto, se maneja como unidad el cuarto y no la vaca. Los cuartos afectados fueron 14 (38.9%), al final del primer tratamiento (enro-C 300 mg/10 mL por 5 días) 6 cuartos sanaron clínicamente, dando como resultado 42% de eficacia, los 8 cuartos restantes (58%) siguieron dando positivo a las pruebas de campo, por lo cual se decidió dar un segundo tratamiento con productos comerciales a base de tetraciclina, los cuales ya habían sido probados con anterioridad por medio de una prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos, al término de este tratamiento todos los cuartos presentaron una cura clínica del 100%; sin embargo de 5 – 7 días después de terminado el tratamiento, 3 cuartos (28.6%) reincidieron y volvieron a ser positivos a tazón en fondo oscuro, por lo cual se decidió dar un tratamiento con otro grupo de quimioterapéuticos, que al cabo de 7 días

mostraron una recuperación clínica del 100% sin una posterior reincidencia. En la siguiente tabla se resumen los tratamientos:



Cuadro 3. Se muestra el resumen de los tratamientos con antibacterianos que fueron utilizados en las vacas.

a los casos reincidentes:

- Vaca 271 cuarto posterior derecho: *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus spp* coagulasa negativo y *Escherichia coli*.
- Vaca 357 cuarto posterior derecho: *Staphylococcus spp* coagulasa negativo.
- Vaca 358 cuarto posterior derecho: *Staphylococcus spp* coagulasa negativo.

En los tres casos se observa la presencia de *Staphylococcus* coagulasa negativos.

Conteo de células somáticas.

Las vacas que conforman el hato lechero del presente estudio presentaron diversos resultados en la prueba de CMT, la mayoría de ellas fueron grado 2 y 3, de acuerdo con la interpretación de la prueba de California para mastitis corresponde a un rango que va de 800 000 a 5 000 000 de células/mL. El promedio del conteo de células somáticas obtenido mediante el dispositivo De Laval DCC® (De Laval DCC®, Suecia) fue de 2 740 142 células/mL de leche.

Los resultados de la prueba de CMT, así como el conteo celular/mL de leche obtenido de algunas de las vacas se muestra en la tabla 2:

Vaca	CMT	CCS*
271	AD y PD= 3	2 688 000
351	AD y AI=1	583 000
358	PD= 3	2 601 000
2195	AD=2 PD, AI y PI= 3	AD= 4 883 000 PD= 1 477 000 AI= 3 581 000 PI= 3 368 000

Cuadro 4. Resultados de algunas de las pruebas de CMT y cuenta de células somáticas.

*Número de células/mL.

Microbiología de las muestras de leche

Se obtuvieron 29 aislados a partir de muestras de 14 cuartos (en más de un cuarto se aislaron de 2 a 3 microorganismos), los microorganismos identificados fueron los siguientes:

Bacteria	Porcentaje	# de aislados
<i>Staphylococcus</i> spp coagulasa (-)	55.2%	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.6%	8
<i>Escherichia coli</i>	6.9%	2
<i>Streptococcus uberis</i>	6.9%	2
<i>Corynebacterium bovis.</i>	3.4%	1
Total	100.0%	29

Cuadro 5. Identificación de microorganismos aislados a partir de leche de vacas con mastitis subclínica, se muestra el porcentaje y número de aislados identificados.

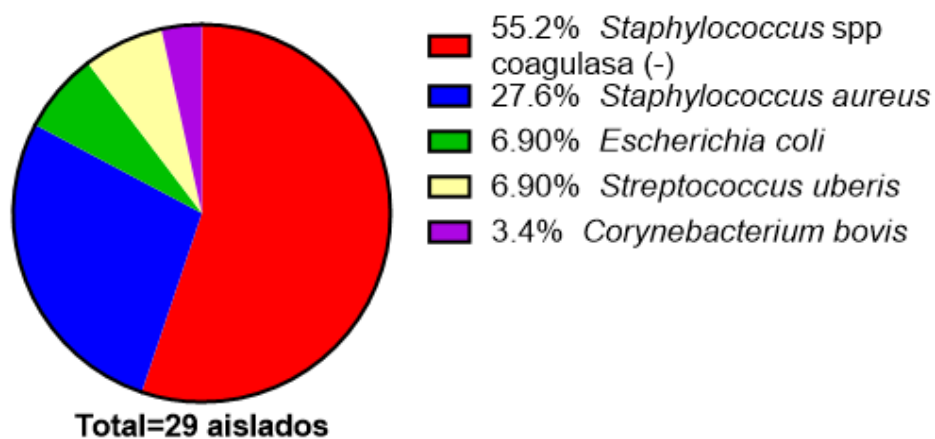


Figura 2. Distribución de los porcentajes de los microorganismos aislados de muestras clínicas. N=29.

Susceptibilidad a quimioterapéuticos.

Los 29 microorganismos aislados fueron sometidos a pruebas de susceptibilidad a antibióticos utilizando una modificación del método Kirby-Bauer. Se utilizaron tres diferentes concentraciones de las 2 enrofloxacinas (0.2 mg/mL, 1mg/mL y 2 mg/mL); los resultados se muestran en la tabla 3.

ID	Microorganismo aislado	Enrofloxacina			Enrofloxacina Clorhidrato		
		0.2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	0.2 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
1	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	8 mm	8 mm	11.9 mm	8 mm	8 mm	11.3 mm
2	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	7 mm	12.3 mm	20.3 mm	7 mm	16.5 mm	22.1 mm
3	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	7 mm	7 mm	12.5 mm	10 mm	8 mm	12.9 mm
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	7 mm	9 mm	12.1 mm	7 mm	10 mm	11.1 mm
5	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	7 mm	10 mm	12.8 mm	9 mm	11 mm	12.1 mm
6	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	9 mm	8 mm	11.9 mm	10 mm	8.5 mm	10.4 mm
7	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	8 mm	10.9 mm	12.1 mm	8 mm	10.9 mm	11.3 mm
8	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	10 mm	8.2 mm	12.1 mm	10 mm	9.8 mm	12.3 mm
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	7 mm	7 mm	10.5 mm	8 mm	9.3 mm	11.6 mm
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	7 mm	7.2 mm	10.4 mm	7 mm	7.2 mm	11 mm
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	7 mm	7.9 mm	11.7 mm	0 mm	7.2 mm	11.5 mm
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	8 mm	0 mm	8.1 mm	0 mm	0 mm	8 mm
13	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	7 mm	7 mm	11.7 mm	7 mm	7.8 mm	11.1 mm
14	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	9 mm	6.3 mm	12.9 mm	9 mm	6 mm	13.2 mm
15	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
16	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	7 mm	9.5 mm	12.3 mm	7 mm	10.8 mm	12.1 mm
17	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	7 mm	9.6 mm	12.9 mm	7 mm	9.9 mm	11.5 mm
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 mm	0 mm	0 mm	12 mm	0 mm	0 mm
19	<i>Streptococcus uberis</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
20	<i>Streptococcus uberis</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
21	<i>Escherichia coli</i>	12 mm	12.1 mm	15.1 mm	13 mm	13.2 mm	15.6 mm
22	<i>Corynebacterium bovis</i>	12 mm	12 mm	12 mm	14 mm	14 mm	14 mm
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	0 mm	8.1 mm	12.9 mm	0 mm	9.1 mm	12.3 mm
24	<i>Escherichia coli</i>	0 mm	13.8 mm	18.9 mm	0 mm	13.8 mm	18.9 mm
25	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-) *	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
26	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-) *	0 mm	0 mm	10.1 mm	0 mm	0 mm	10.1 mm
27	<i>Staphylococcus aureus</i> *	0 mm	0 mm	11.1 mm	0 mm	0 mm	12.1 mm
28	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-) *	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
29	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-) *	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
30	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	14.9 mm	16.1 mm	24.1 mm	15.1 mm	16.3 mm	23.1 mm

Cuadro 6. Susceptibilidad a enrofloxacina y enro-C a diferentes concentraciones (0.2 mg/mL, 1mg/mL y 2 mg/mL), se muestra el promedio del tamaño del halo de inhibición en milímetros. Control positivo de susceptibilidad fenotípica a quinolonas: *E.coli* ATCC 10536.

*= Mutantes resistentes tomadas del interior de los halos de inhibición, el número 25 corresponde a una colonia mutante del aislado 7 en presencia de enrofloxacin, el 26 corresponde a una mutante del aislado 7 en presencia de enro-C, el 27 proviene del aislado 9 en presencia de enro-C, el 28 y 29 proviene del aislado 16 en presencia de enrofloxacin y enro-C respectivamente.

Con base en los patrones de los diámetros de halos de inhibición en mm (CLSI) se muestra la susceptibilidad de los microorganismos aislados a enrofloxacin base y enro-C.

Dosis	Resistente (≤ 15 mm)	Intermedio (15.1-20 mm)	Susceptible (≥ 20.1 mm)
0.2 mg/mL	100%	0%	0%
1 mg/mL	100%	0%	0%
2 mg/mL	89.7%	10.3%	0%

Cuadro 7. Porcentaje de cepas resistentes, medianamente sensibles y sensibles a enrofloxacin base.

Dosis	Resistente (≤ 15 mm)	Intermedio (15.1-20 mm)	Susceptible (≥ 20.1 mm)
0.2 mg/mL	100%	0%	0%
1 mg/mL	96.6%	3.4%	0%
2 mg/mL	89.7%	6.9%	3.4%

Cuadro 8. Porcentaje de cepas resistentes, medianamente sensibles y sensibles a enro-C.

Con base en los patrones de los diámetros de halos de inhibición en mm (CLSI), todas las cepas bacterianas aisladas de leche, a excepción de un *Staphylococcus coagulasa* negativo, mostraron ser resistentes a enrofloxacin. Cuadros 9 y 10.

Bacteria	Resistentes	Intermedio	Susceptible	Total
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	15	1	0	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	0	0	8
<i>Streptococcus uberis</i>	2	0	0	2
<i>Escherichia coli</i>	0	2	0	2
<i>Corynebacterium spp.</i>	1	0	0	1
				29

Cuadro 9. Susceptibilidad a enrofloxacin base (2 mg/ mL). Se muestra el grado de susceptibilidad de los microorganismos aislados de muestras de leche de bovino.

Bacteria	Resistentes	Intermedio	Susceptible	Total
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	15	0	1	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	0	0	8
<i>Streptococcus uberis</i>	2	0	0	2
<i>Escherichia coli</i>	0	2	0	2
<i>Corynebacterium spp.</i>	1	0	0	1
				29

Cuadro 10. Susceptibilidad a enro-C (2 mg/ mL). Se muestra el grado de susceptibilidad de los microorganismos aislados de muestras de leche de bovino.

Detección de genes de resistencia a quinolonas: Aminoglucósido N-Acetiltransferasa (*AAC (6')-Ib-cr*) y ADN girasa (*Gyr A*).

Mediante PCR se identificó la presencia de genes de resistencia a enrofloxacin, 1 gen cromosomal (*GyrA*) y 1 gen plasmídico (*AAC (6')-Ib-cr*), los resultados se muestran en los cuadros 11, 12 y figuras 3 y 4:

ID	Microorganismo aislado	Presencia de gen de resistencia	
		<i>GyrA</i>	<i>AAC (6')-Ib-cr</i>
1	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	si
2	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	no	si
3	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	no	si
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	no	no
5	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	no	no
6	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	no	no
7	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	no	no
8	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	no	no
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	no	no
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	no	no
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	si	no
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	si	no
13	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	si
14	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	no
15	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	si
16	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	no

17	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	no
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	si	si
19	<i>Streptococcus uberis</i>	si	no
20	<i>Streptococcus uberis</i>	si	si
21	<i>Escherichia coli</i>	si	si
22	<i>Corynebacterium</i> spp.	si	no
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	si	no
24	<i>Escherichia coli</i>	si	no
25	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	si
26	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	si
27	<i>Staphylococcus aureus</i>	si	no
28	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	si
29	<i>Staphylococcus coagulasa</i> (-)	si	no

Cuadro 11. Presencia de genes de resistencia a quinolonas, cromosómico (*GyrA*) y plasmídico (*AAC (6')-lb-cr*).

2 genes	1 gen	Sin resistencia
9 (31%)	13 (44.8%)	7 (24.1%)
	11 <i>GyrA</i>	
	2 <i>Acetilasa</i>	

Cuadro 12. Porcentaje de muestras que expresan genes asociados con la resistencia a quinolonas (*GyrA* o *AAC (6')-lb-cr*).

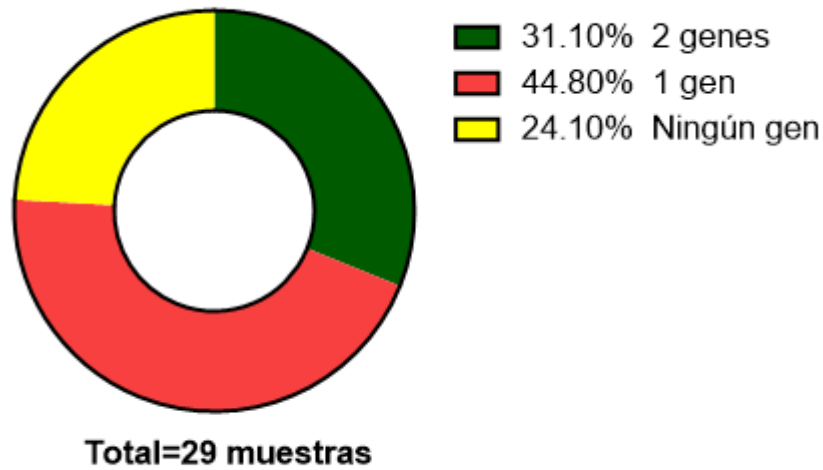


Figura 3. Genes asociados con la resistencia a enrofloxacin: ADN girasa con mutación en la subunidad A (*Gyr A*) y Aminoglucósido N-Acetiltransferasa (*AAC (6')-Ib-cr*) en microorganismos aislados a partir de casos de mastitis bovina subclínica. La búsqueda se realizó por PCR. N= 29 microorganismos.

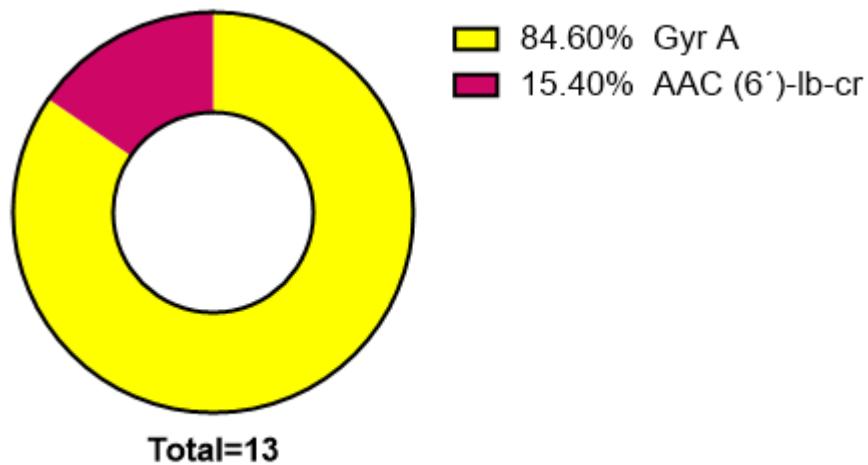


Figura 4. Distribución porcentual de la presentación de 1 sólo gen de resistencia a quinolonas.

Se observó que las 3 glándulas mamarias (cuartos) que reincidieron con problemas de mastitis después del tratamiento con antibióticos, presentaban bacterias que expresaron ambos genes de resistencia a quinolonas (cromosomal y plasmídico). Por otro lado, de las 5

colonias mutantes resistentes a quinolonas, que se recuperaron dentro de los halos de inhibición, en 4 de ellas sus parentales no expresan ningún gen de resistencia, posteriormente 3 de estas mutantes tenían la presencia de los dos los genes de resistencia a quinolonas: cromosomal y plasmídico y la cuarta mutante mostró el gen de resistencia cromosomal. En el caso de la quinta mutante recuperada dentro del halo de inhibición, su parental expresaba el gen de resistencia cromosomal (*GyrA*) y la mutante se mantuvo de la misma manera.

Discusión.

La mastitis sigue siendo una de las enfermedades más importantes en el ganado lechero, debido a las pérdidas económicas que provoca, uno de los puntos importantes a tomar en cuenta es la antibioterapia, que es el método más común de tratamiento de esta enfermedad y que se ve limitada debido a la resistencia que desarrollan algunas bacterias para poder sobrevivir en el huésped.

La incidencia de la mastitis subclínica tiene un amplio rango de presentación, diversos autores la reportan desde un 5 al 50 % en producciones bovinas lecheras comerciales (7, 13, 16). En este trabajo, que se realizó en una producción de bovinos con fines de enseñanza, en donde las condiciones productivas no son las adecuadas, además de que los bovinos están sometidos a situaciones de estrés continuo, encontramos un 47.4% de casos de mastitis subclínica diagnosticados por pruebas de campo como el tazón de fondo oscuro y la prueba de CMT; a la inspección física las vacas no mostraban ninguna semiología de mastitis clínica.

El contenido de células somáticas en una muestra de leche nos permite darnos una idea sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria; ésta si se encuentra sana deberíamos de obtener un número menor a 150,000 células por mL (Schalm *et al* 1970), en el caso de las

vacas de este estudio, la cuenta de células somáticas tuvo un rango de 583,000 – 4,883,000 células/mL, presentando un promedio en el conteo de 2,74,0142 células/mL. Se observa un conteo celular alto para lo que se espera obtener en una glándula mamaria sana, el cual es una característica distintiva que se presenta en casos de mastitis subclínica (1, 7, 13, 16, 17, 22).

Al momento de realizar el examen microbiológico de las muestras positivas a mastitis subclínica, se observa una mayor frecuencia en el aislamiento de *Staphylococcus* spp coagulasa negativo que coincide con la tendencia actual reportada por otros autores, ejemplo de ellos es el trabajo escrito por Krishnamoorthy y colaboradores, donde mencionan que en Asia existen recientes reportes que indican que la tendencia cambia hacia ser los *Staphylococcus* coagulasa negativo como principal microorganismo causante de mastitis bovina, que no se les considere como patógeno menor (22, 24, 44) de la enfermedad en comparación con los patógenos considerados como principales actualmente que son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp y las bacterias coliformes (22, 24).

Cuando se evaluó la susceptibilidad a enro-C y enrofloxacin base en los aislados provenientes de las muestras de leche con mastitis subclínica, se confirmó lo reportado en la literatura, que este antibiótico es más efectivo en contra de bacterias Gram negativas comparado con bacterias Gram positivas, esto se pudo observar con halos de inhibición más grandes en los aislados de *Escherichia coli*, mientras que para las Gram positivas presentaban halos de inhibición más pequeños. En los ensayos de susceptibilidad el 100 % de los aislados clínicos mostró resistencia fenotípica a ambos tipos de quinolonas y se observó que cepas de *Staphylococcus* spp mostraron crecimiento de clonas mutantes dentro de los halos de inhibición que nos puede indicar la aparición de cepas con mayor habilidad para sobrevivir

en presencia del antibiótico, posiblemente estas mutantes habían adquirido por transferencia horizontal otras características genéticas de resistencia al antibiótico, lo cual fue demostrado por PCR, al observar la presencia de genes de resistencia en plásmidos y mutaciones cromosómicas, esto ha sido reportado por otros autores.

Con respecto a la detección de genes presentes en el cromosoma o plásmidos que codifican para la resistencia a quinolonas, se confirmó en nuestro trabajo que la resistencia cromosomal es mayor que la plasmídica, ya que el 76% (20/29) de las muestras mostraron expresión del gen girasa con mutación en la subunidad A (*Gyr A*), contra un 37% (11/29) de la expresión del gen plasmídico Aminoglucósido N-Acetiltransferasa (*AAC (6')-Ib-cr*). Los resultados coinciden con lo reportado para las fluoroquinolonas de uso en humanos empleándolas en contra de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, en las cuales se ha visto que la resistencia está dada principalmente por mutaciones cromosómicas originando principalmente modificaciones en los sitios blancos del antibiótico, tales como las enzimas ADN girasa y la topoisomerasa IV, aunque en los últimos años han incrementado los reportes sobre la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (45).

Relacionado con los tratamientos se pudo observar que en la terapia inicial hubo pocas vacas que respondieron de manera adecuada, por lo cual se requirió dar un tratamiento combinado, esta parte coincide con lo reportado por Tremblay y colaboradores, en donde menciona que a pesar de que los *Staphylococcus* coagulasa negativos se consideran patógenos emergentes de la mastitis subclínica no se conoce bien los factores de virulencia asociado a ellos, pero a pesar de ello se ha propuesto la formación de biopelículas (biofilms) como un candidato importante en los factores de virulencia que favorecen la persistencia de estas bacterias en infecciones intramamarias. Hay que recordar que las biopelículas están definidas como

comunidades estructuradas de células bacterianas agrupadas en una matriz de producción propia y que están unidas a superficies bióticas o abióticas, que ofrecen protección contra ambientes hostiles, tales como la respuesta inmune y de manera importante hacia las concentraciones bactericidas de antibióticos o desinfectantes (23).

Se ha propuesto la formación de biopelículas como un importante factor de virulencia en patógenos causantes de mastitis bovina incluyendo *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, y *Streptococcus uberis*, justamente los géneros bacterianos aislados en este trabajo. Por otro lado, las vacas que mostraron una reincidencia en la enfermedad y necesitaron un tratamiento antibacteriano extra con un compuesto diferente, presentaban microorganismos que expresaban los dos genes de resistencia a quinolonas y que pudieron ser detectados por PCR.

La alta resistencia a antimicrobianos es un factor importante para tomar en cuenta en la terapia contra mastitis, el diseño de nuevos fármacos que aseguren concentraciones microbicidas en tejido mamario aun cuando exista lesión en éste, pueden evitar la aparición de cepas resistentes. Cabe señalar que el escenario clínico utilizado para este estudio es un factor importante para la cura, vacas mayores de 5 años y, además, se observó una resistencia in vitro >89% y el 75 % de las cepas mostraban genes de resistencia a enrofloxacin, a pesar de este factor, la tasa de éxito en la cura clínica fue cercana al 50% con el tratamiento de enro-c aplicado en primera instancia. La biodisponibilidad de enro-c permite una mejor difusión en el tejido mamario y es adecuada en casos de mastitis recurrentes donde se presente resistencia a antibacterianos.

El descubrimiento y uso de los antibióticos fue un parteaguas en la historia de la humanidad particularmente en el área médica, lamentablemente esta época dorada de grandes

descubrimientos fue muy corta, ahora la resistencia a fármacos en las bacterias patógenas pone en riesgo el valor de estos. Se deben sumar esfuerzos para contrarrestar esta crisis e implementar medidas que garanticen un uso adecuado de la antibioterapia, así como proponer alternativas para detener la aparición de resistencia que incluyan la búsqueda de nuevos productos y el conocimiento de los mecanismos microbianos de resistencia a antibióticos. La demanda de productos de origen animal que sean inocuos para el consumo humano debe ser considerada como una prioridad nacional. En este sentido, la producción láctea debe ser suficiente para cubrir la demanda, no contener residuos químicos y no verse disminuida por problemas infecciosos producidos por microorganismos difíciles de eliminar y con un alto grado de multiresistencia a los fármacos.

Bibliografía

1. Martínez-Pacheco D, *et al.*, Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes. *Conexión Agropecuaria JDC* 2013; 3(1), 53-73.
2. SIAP 2019. Consultado por última vez: 20 enero del 2020.
3. Mellado BM. Producción de leche en zonas templadas y tropicales. México: Trillas, 2010.
4. Ruegg PL. A 100 year review: Mastitis detection, management and prevention. *Journal Dairy Science* 2017; Vol 100, No.12: 10381-10397.
5. Yang F, Zhang S, *et al.* Characteristics of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in China. *J. Dairy Sci* 2017; 101:1-9.
6. Koskinen MT, Wellenberg, *et al.* Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J. Dairy Sci* 2010; 93:5707-5715.
7. Bedolla CC, Ponce de León MER. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET* 2008; 4:1-26.
8. Kulkarni AG and Kliwal BB, Bovine mastitis: a review. *IJRSR* 2013;4(5): 543-548.
9. Trigo TFJ. Patología sistémica veterinaria. 5ta ed. México: Mc Graw Hill, 2011.
10. Ruíz-Romero RA. Mastitis bacteriana en ganado bovino; Etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. FMVZ-UNAM: Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes. Disponible en: https://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf, consultado última vez: 15 de diciembre de 2019.

11. Aqeela A and Muhammad I. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production* 2018, 50:1193-1202.
12. Jiménez MR, *et al.*, Caracterización molecular de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aislada de mastitis bovina en Michoacán, México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2017; 8(4): 387-396.
13. Cordoba IA, *et al.*, Production of milk and bovine mastitis. *Journal Advances in Dairy Research* 2017, 5:2.
14. De la Cruz JD. (2018). Caracterización histomorfológica de la mastitis bovina en la cuenca lechera de Tizayuca. Tesis de Licenciatura. UNAM.
15. Bonetto, C. (2014). Mastitis bovina causada por *Staphylococcus coagulasa* negativos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata.
16. Birhanu M, *et al.*, Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Research Notes* (2017) 201, 10:767
17. Fernández BOF, *et al.*, Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *REDVET* 2012; 13(11)
18. Barker AR, *et al.*, Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 1998, 81 (5): 1285-1290.
19. Hockett ME, *et al.*, Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Animal Reproduction Science* 2000, 58: 241-251.
20. Chaiyabutr, N (ed). *Milk production an Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health*, Chapter 17: Bovine Mastitis Pathogens: Prevalence and Effects on Somatic Cel Counts, In Tech Prepress, Rijeka, Croatia (2012): pp.359-368.

21. Lakshmi R. Bovine mastitis and its diagnosis. *International Journal of Applied Research* 2016; 2 (6): 213-216.
22. Galfi A, *et al.*, Electrical conductivity of milk and bacteriological findings in cows with subclinical mastitis. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2015, 31 (4): 533-541.
23. Tremblay YDN, *et al.*, Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science* 2013, 96 (1): 234-246.
24. Krishnamoorthy P, *et al.*, Coagulase Negative Staphylococcal Species Mastitis: An Overview. *Research Journal of Veterinary Sciences* 2016, 9 (1): 1-10.
25. Viveros PM (2017). Eficacia, toxicidad y farmacocinética en vacas con mastitis clínicas tratadas por vía intramamaria con enrofloxacin clorhidrato-dihidrato. Tesis de Maestría. FMVZ-UNAM.
26. Valeris R. Inmunobiología de la glándula mamaria. En: Cuaderno científico Girarz 10. Manejo de la mastitis bovina y programas de control. Julio Boscan Ocando (ed). Ediciones Astro Data S. A. Maracaibo 2011, Venezuela, pp. 27-38.
27. Martínez-Cortés I, Gutierrez L, Tapia G, Ocampo L and Sumano H. Serum and milk concentrations of enrofloxacin in cows intramammarily treated with a new enrofloxacin-polymorph. *Med Weter* 2016; 72: 686-692.
28. Du Preez JH. Bovine mastitis therapy and why fails. *JI S. Afr. Vet. Ass* 2000, 71(3): 201-208.
29. Aldred KJ, Kerns RJ and Osheroff. Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 2014; 53:1565-1574.
30. Campos SAE, Martínez EME y Mendoza PN. Quinolonas. *Rev Fac Med UNAM* 2008; 51(4): 173-177.

31. Chávez-Jacobo VM, Ramírez-Díaz MI, et al. Resistencia bacteriana a quinolonas: Determinantes codificados en plásmidos. REB 2015;34(1): 4-9.
32. Álvarez-Hernández DA, et al, Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. Rev Chilena Infectol 2015; 35 (5): 499-504.
33. Del Río Ávila C (2016). Identificación de genes plasmídicos y cromosomales asociados a resistencia a quinolonas en cepas de *E. coli* patógena aviar (APEC). Tesis de Doctorado. FMVZ-UNAM.
34. Sierra OJM (2005). Bases moleculares de la resistencia a quinolonas en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Corynebacterium spp.* Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
35. Rodríguez-Martínez JM (2006). Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos en *Enterobacteriaceae*. Tesis de Doctorado. Universidad de Sevilla.
36. Sumano LHS y Ocampo CL. Farmacología Veterinaria. 2da ed. México: Mc Graw Hill, 1997.
37. Troughon T and Lefebvre S. A review of enrofloxacin for veterinary use. Open Journal of Veterinary Medicine, 2016, 6, 40-58.
38. Otero JL, et al., Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. Analecta Veterinaria 2001; 21, 1:31-41.
39. Persson Y, et al., Efficacy of enrofloxacin for the treatment of acute clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. Veterinary Record 2015.
40. Carrascosa A, et al., Efficacy of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride-dihydrate against leptospirosis in a hamster model. American Society for Microbiology, 2017.

41. Ciesielczuk H, Hornsey M, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for eight plasmid-mediated quinolone-resistance determinants. *Journal of Medical Microbiology* 2013; 62: 1823-1827.
42. Tingting Q, *et al.*, Newest data on fluoroquinolone resistance mechanism of *Shigella flexneri* isolates in Jiangsu Province of China. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 2017; 6:97.
43. Correia S, *et al.*, Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology* 2017; 66: 551-559.
44. Satu Pyörälä and Suvi Taponen, Coagulase-negative staphylococci- Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology* 2009; 134: 3-8.
45. Majlesi A, *et al.*, Detection of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Enterocateriaceae* strains in Hamadan, West of Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2018; 25: 426- 430
46. Picazo JJ (editor). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Madrid (España): Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2000.