



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PRODUCCIÓN Y SALUD DE LOS BOVINOS

Evaluación de un preparado a base de enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (enro-c), dimetil-sulfóxido (DMSO) y chitosán, para el tratamiento de mastitis bovina por *Staphylococcus aureus* formador de biofilm

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
DIANA CÓRDOVA GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL
HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
EDGAR ALFONSECA SILVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
LAURA HERNÁNDEZ ANDRADE
INIFAP – CENID – SALUD ANIMAL E INOCUIDAD

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

Las familias son la brújula que nos guía. Son la inspiración para llegar a grandes alturas, y nuestro consuelo cuando ocasionalmente fallamos. Brad Henry.

A mi padre, **José Luis Córdova Velázquez**, eres un gran ser humano, tú me has enseñado el valor de la amistad, la familia, la salud y la libertad, voy a seguir tu ejemplo para que te sientas orgulloso de mi hoy y siempre, gracias por luchar por tu salud para ver culminado este paso más en mi desarrollo profesional.

A mi madre, **María Reyna de los Remedios González de Florencio**, eres y serás siempre mi mejor amiga, tu ejemplo de valentía y amor lo llevo siempre en el corazón, tus brazos me dan aliento y tus palabras me reconfortan siempre, gracias por no dejarte vencer en pandemia para que el día de hoy veas concretado este proyecto.

A mi hermano, **José Luis Córdova González**, carnal me siento bien orgullosa de ti, vas a llegar lejos porque te estas preparando para ello, tu inteligencia y carisma te harán despegar en grande y la perseverancia es lo que te hará mantener el vuelo, te amo mucho y aunque ya no compartiremos el mismo lugar para pelarnos y ser felices juntos, siempre puedes contar conmigo.

Al amor de mi vida, **Héctor A. Vázquez Sandoval**, no tengo como pagarle a la vida poder compartir un logro más contigo, te amo con el corazón y siento una profunda admiración y gran respeto por ti. Agradezco tu apoyo y el respeto que muestras a mi trabajo, espero hacerte muy feliz y que en esta nueva etapa de nuestra vida que estamos por iniciar juntos sigamos avanzando personal y profesionalmente, eres mi corazón.

A mi niño consentido, **Emiliano González Hernández**, platicar contigo sobre todos los grandes sueños que tienes planeados para tu futuro me inspira a perseguir los míos, sé que cumplirás todo lo que te propongas porque tienes unas alas enormes y fuertes que tu mamá ha sabido construir en todos estos años, tu papá donde quiera que se encuentre está muy orgulloso de ti, te amo.

A mi abuelita, **Teodora Sofía De Florencio Cano** y a mi tío, **Federico Ricardo González Florencio**, su ejemplo me acompaña a donde quiera que voy, todos los días trato de ser mejor persona que el día anterior ya que es la mejor forma que tengo para honrar su legado. Un beso hasta el cielo, algún día nos volveremos a ver y tendremos mucho de que platicar.

AGRADECIMIENTOS

Mientras el río corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido. Publio Virgilio.

A mis padres **José Luis** y **Reyna**, así como a mi hermano **Pepe** por todo su apoyo y colaboración no solo en mi vida personal, también en la realización de este proyecto. Agradezco sus desvelos, su apoyo moral, económico y los recursos que me brindaron en esta etapa para lograr terminar mis estudios de posgrado en tiempo y forma.

A mi novio **Héctor** por ser mi copiloto, mi compañero y mi mejor amigo, sentir tu respaldo durante estos dos años de maestría me fortalecieron demasiado, vamos a luchar por seguir avanzando juntos, gracias amor.

A mi tutor principal el **Dr. Héctor S. Sumano López** y a la **Dra. Lilia Gutiérrez Olvera** por integrarme en este gran equipo de trabajo y por la confianza que depositaron en mí para la realización de este proyecto, todos sus consejos, enseñanzas, empatía y palabras de aliento los llevaré siempre conmigo y prometo regresar pronto para realizar el doctorado.

A los miembros de mi comité tutor, al **Dr. Edgar Alfonseca Silva** por permitirme trabajar en su laboratorio, por todas sus enseñanzas, consejos, regaños, comprensión, empatía y sobre todo por la paciencia que me tuvo, mil gracias. A la **MC Laura Hernández Andrade** por todos los consejos, las observaciones y atribuciones que realizó en cada evaluación tutorial, las cuales enriquecieron el presente trabajo.

Al **MC Eduardo Posadas Manzano** por su amistad invaluable y por ser el puente de enlace para conseguir el lugar ideal para la realización de la fase de campo. Al **MVZ EPA Antonio Flores Pérez**, al **MVZ Juan José Estudillo**, a **sus alumnos** y **los dueños de los establos visitados en Chipilo, Puebla** por la apertura, el apoyo y las facilidades brindadas en la realización de la parte clínica de este estudio.

A la **Dra. Graciela Tapia Pérez** por toda la asesoría en estadística que me proporcionó para el correcto procesamiento de los resultados obtenidos.

Al departamento de **Fisiología y Farmacología** por permite elaborar en sus instalaciones los fármacos empleados en esta tesis, a la **Dra. Lizbeth Yesenia Carrillo González** por el apoyo que me brindó en la parte administrativa para la obtención de los recursos empleados y a la **Sra. Feliza Carlota González** por su apoyo en el trabajo realizado en el laboratorio de Farmacología.

Al departamento de **Microbiología e Inmunología** por abrirme las puertas de sus instalaciones para poder aprender y realizar los protocolos establecidos en el presente proyecto, así como al personal del **Área de Medios y Cultivos** que me facilitaron el trabajo con la elaboración de los medios de cultivo necesarios para este trabajo.

A **Laboratorios Aranda** por proporcionar los insumos necesarios para la realización de esta tesis y al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** por la beca que me asignó durante mis estudios de Maestría en Ciencias.

A mis sinodales, **Dra. María Josefa Bernad Bernad, Dr. Héctor Salvador Sumano López, Dr. Edgar Alfonseca Silva, Dr. Miguel Angel Quiroz Martinez y Dr. Fernando Osnaya Gallardo** por la revisión del presente escrito y sus observaciones.

A todo el **Team Rumiantes** por estar siempre presentes y echarme porras cuando ha sido necesario, valoro mucho su amistad.

RESUMEN

La mastitis bovina se considera crónica cuando el recuento celular excede las 200000 células/ml durante dos meses consecutivos o hay más de tres tratamientos fallidos en el cuarto mamario durante la lactancia, suele asociarse a *Staphylococcus aureus* formador de biopelícula y aunque se recomienda eliminar del hato aquellos animales con cuadros crónicos, en México es una práctica poco realizada por lo que en este estudio se evaluó la eficacia *in vitro* e *in vivo* del preparado intramamario con Enro-C/DMSO/chitosán para proponerlo como posible alternativa de tratamiento ante casos de difícil resolución clínica y bacteriológica. Se tomaron muestras de leche de 15 bovinos con mastitis crónica y se identificó al agente etiológico y su capacidad fenotípica y genotípica de producir biopelícula. Se formó un grupo control tratado con Enro-C/DMSO y el grupo experimental con Enro-C/DMSO/chitosán. Los tratamientos se administraron BID 8 días consecutivos y se evaluó la eficacia clínica y bacteriológica final 10 días después de la primera dosis. El tratamiento experimental logró una eficacia clínica del 100%, con una cura bacteriológica del 80%. El grupo control logró una cura clínica y bacteriológica del 41.7% y una falla clínica y bacteriológica del 25%. Se consideró una de las cepas de alta producción de biopelícula aislada de los bovinos tratados y se evaluó el efecto antimicrobiano de Enro-C/DMSO/chitosán sobre *S. aureus* planctónico y contenido en la biocapa, así como su efecto sobre la producción y degradación de biopelícula de manera *in vitro*, observándose que el preparado propuesto tiene un excelente efecto antibacteriano sobre ambos estilos de vida bacteriana, inhibe la formación de biopelícula y degrada la biopelícula madura. El preparado propuesto es una alternativa alentadora para casos crónicos, sin embargo, es necesario elaborar estudios de campo más robustos para obtener mayor evidencia de su eficacia clínica y bacteriológica.

Palabras clave: mastitis crónica, enrofloxacin clorhidrato dihidrato, dimetil sulfóxido, chitosan, preparado intramamario.

ABSTRACT

Bovine mastitis is considered chronic when the cell count exceeds 200,000 cells/ml for two consecutive months or there are more than three failed treatments in the mammary quarter during lactation. It's usually associated with biofilm-forming *Staphylococcus aureus* and although it's recommended to eliminate it from the herd, those animals with chronic conditions, in Mexico it's a practice rarely carried out, so in this study the *in vitro* and *in vivo* efficacy of the intramammary preparation with Enro-C/DMSO/chitosan was evaluated to propose it as a possible treatment alternative in cases of difficult clinical and bacteriological resolution. Milk samples were taken from 15 bovines with chronic mastitis and the etiological agent and its phenotypic and genotypic capacity to produce biofilm were identified. A control group treated with Enro-C/DMSO and the experimental group with Enro-C/DMSO/chitosan were formed. The treatments were administered BID 8 consecutive days and the final clinical and bacteriological efficacy was evaluated 10 days after the first dose. The experimental treatment achieved a clinical efficacy of 100%, with a bacteriological cure of 80%. The control group achieved a clinical and bacteriological cure of 41.7% and a clinical and bacteriological failure of 25%. One of the strains with high production of biofilm isolated from treated bovines was considered and the antimicrobial effect of Enro-C/DMSO/chitosan on planktonic *S. aureus* and content in the biofilm was evaluated, as well as its effect on production and degradation of biofilm *in vitro*, observing that the proposed preparation has an excellent microbicidal effect on both styles of bacterial life, inhibits biofilm formation and degrades mature biofilm. The proposed preparation is a promising alternative for chronic cases, however, more robust field studies are needed to obtain further evidence of its clinical and bacteriological efficacy.

Key words: chronic mastitis, enrofloxacin hydrochloride-dihydrate, dimethyl sulfoxide, chitosan, intramammary preparation.

CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
CONTENIDO	VI
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	5
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
Elaboración del preparado de uso intramamario a base de Enro - C, dimetil sulfóxido y chitosán (Enro - C/DMSO/chitosán).	7
Descripción de la población de estudio	9
Prueba de California para mastitis.....	10
Toma y envío de muestras	12
Identificación bacteriológica por género y especie.....	13
Determinación fenotípica cualitativa de las cepas productoras de biopelícula.	14
Determinación fenotípica cuantitativa de las cepas productoras de biopelícula.	15
Extracción y purificación de DNA	18
Técnica de PCR	19
Microorganismo.....	20
Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano y de inhibición de la formación de biopelícula del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula	21
Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano y de degradación de la biopelícula madura del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula.....	22

Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	27
Evaluación clínica de la ubre y prueba de California para mastitis.....	27
Identificación bacteriológica por género y especie.....	30
Determinación fenotípica cualitativa de las cepas productoras de biopelícula.	33
Determinación fenotípica cuantitativa de las cepas productoras de biopelícula.	34
Identificación genotípica de las cepas productoras de biopelícula.	35
Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano y de inhibición de la formación de biopelícula del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula	36
Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano y de degradación de la biopelícula madura del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula.....	40
Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula	45
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÉNDICE	65
Tinción Gram.....	65
Primo aislamiento bacteriológico en Agar Sangre.....	68
Identificación del género <i>Staphylococcus</i> mediante la prueba actividad catalasa.....	70
Prueba de factor de agregación celular	71
Prueba actividad coagulasa.....	72
Aislamiento selectivo y diferencial en Agar sal manitol	73
Agar manitol anaerobio	75
Prueba de Agar P.....	77
Prueba CAMP-Esculina (CAMP: Christie Atkins Munch-Petersen y Esculina).....	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Formulación y pH de los preparados de prueba Enro-C/DMSO/chitosán con diferente concentración de chitosán	8
Cuadro 2. Formulación y pH del preparado para el grupo control (Enro-C/DMSO) y el grupo experimental (Enro-C/DMSO/chitosán).....	9
Cuadro 3. Interpretación de resultados de la Prueba de California para mastitis (Pampariene y <i>col</i> , 2016).	12
Cuadro 4. Secuencias de iniciadores para los genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula.....	20
Cuadro 5. Componentes de las suspensiones empleadas para la evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula.....	23
Cuadro 6. Evaluación clínica de la ubre y prueba de California en los bovinos con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.	27
Cuadro 7. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de inhibición sobre la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno de 96 pocillos	37
Cuadro 8. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de degradación sobre la biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos	41
Cuadro 9. Eficacia clínica y bacteriológica del preparado Enro-C/DMSO/chitosán en comparación con Enro-C/DMSO para casos de mastitis bovina crónica en Chipilo, Puebla.	46
Cuadro 10. Eficacia del preparado Enro-C/DMSO/chitosán en comparación con Enro-C/DMSO sobre bacterias productoras y no productoras de biopelícula obtenidas de casos de mastitis bovina crónica en Chipilo, Puebla.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prueba de California para mastitis.....	11
Figura 2. Representación de la detección de biopelícula en Agar Rojo Congo modificado por Mariana y col. (2009).....	15
Figura 3. Escala de producción de biopelícula propuesta para la clasificación de las cepas de <i>Staphylococcus</i> spp obtenidas de los casos de mastitis crónicas de Chipilo, Puebla.	17
Figura 4. Microplaca de poliestireno de 96 pocillos empleada para la técnica de micro titulación de producción de biopelícula.	18
Figura 5. Esquema del empleo de la microplaca de poliestireno de 96 pocillos en los ensayos de efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula.....	23
Figura 6. Esquema del empleo de la microplaca de poliestireno de 96 pocillos en las diluciones decuples realizadas para el conteo de UFC en los ensayos del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre <i>Staphylococcus aureus</i> productor de biopelícula.....	24
Figura 7. Distribución de los cuartos mamarios evaluados con base en la estimación del conteo de células somáticas a través de la prueba de California para mastitis en Chipilo, Puebla.....	30
Figura 8. Distribución de las etiologías de los casos clínicos de vacas con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.	31
Figura 9. Distribución de bacterias del género <i>Staphylococcus</i> spp de los casos clínicos de vacas con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.	32
Figura 10. Distribución de bacterias del género <i>Streptococcus</i> spp de los casos clínicos de vacas con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.	32
Figura 11. Clasificación de cepas productoras y no productoras de biopelícula con base en resultados obtenidos del Agar Rojo Congo modificado, en aislamientos de casos de mastitis crónica en bovinos lecheros de Chipilo, Puebla.....	33
Figura 12. Cepas del género <i>Staphylococcus</i> spp clasificadas como altas, moderadas, bajas y no productoras de biopelícula con base en la prueba cuantitativa de micro titulación de biopelícula en placa modificada.....	34
Figura 13. Detección por PCR multiplex en gel de agarosa al 2% de genes bacterianos <i>icaA</i> (321 pb) e <i>icaD</i> (78 pb) asociados a la producción de biopelícula de <i>S. aureus</i> aislados de leche de vaca con mastitis crónica.	35

Figura 14. Cepas del género <i>Staphylococcus</i> spp obtenidas de Chipilo, Puebla, clasificadas con base en la presencia o ausencia de genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> para producción de biopelícula.	36
Figura 15. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de inhibición sobre la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno de 96 pocillos.	38
Figura 16. Efecto de inhibición del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán sobre la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno de 96 pocillos.....	39
Figura 17. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de degradación de biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos.	42
Figura 18. Efecto de degradación del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán sobre la biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (ensayo a 1 día).	43
Figura 19. Efecto de degradación del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán sobre la biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (ensayo a 3 días).	44
Figura 20. Técnica de tinción Gram realizada en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ – UNAM.....	67
Figura 21. Morfología macroscópica de bacterias Gram (+) en primo cultivo en Agar Sangre.....	69
Figura 22. Lectura de la prueba bioquímica Catalasa.	71
Figura 23. Lectura de la prueba bioquímica Coagulasa.	73
Figura 24. Lectura de la prueba de aislamiento selectivo y diferencial Agar Sal y Manitol.	74
Figura 25. Lectura de la prueba bioquímica Manitol Anaerobio.	76
Figura 26. Lectura de la prueba Agar P.	77
Figura 27. Lectura de la prueba CAMP-Esculina.	79

INTRODUCCIÓN

La mastitis de los bovinos productores de leche es una enfermedad con alta prevalencia a nivel mundial y se considera como la afectación económicamente más significativa que impacta a la industria lechera al estimarse que sus costos oscilan entre 19.7 y 32.3 millones de dólares anuales (Saeed y *col.*, 2023). Los costos que se erogan en hatos lecheros de la Unión Europea con 100 cabezas de ganado por concepto de mastitis ascienden a los € 4 896.00 anuales/hato, mientras que en Estados Unidos se estima que la prevalencia de la enfermedad es del 45%, con costos que fluctúan de \$106 a \$867 USD por caso, de los cuales el 70% se asocian a la reducción de la producción de leche (Kalińska y *col.*, 2018). Además de la reducción y descarte de leche proveniente de vacas con mastitis, se contempla dentro de los costos derivados de esta enfermedad la atención médica, el costo de los tratamientos aplicados, la disminución de la calidad de la leche, las recaídas y la eutanasia prematura de la vaca (Aghamohammadi y *col.*, 2018).

La mastitis clínica se caracteriza por la presentación de signos clínicos evidentes de inflamación severa de la ubre que se acompaña de un aumento del conteo de células somáticas en la leche (Nagahata y *col.*, 2011). Las células somáticas son células epiteliales de la glándula mamaria, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos hallados en la leche, aún en condiciones normales. No obstante, en el caso de una infección o inflamación, estas células migran al tejido glandular mamario por la quimiotaxis inducida que conlleva los procesos de adhesión y colonización del agente patógeno al tejido mamario (Nagahata y *col.*, 2011). Si no hay resolución autolimitante o provocada por la intervención médica, hay persistencia de la respuesta inflamatoria y tiende a desarrollarse tejido de granulación. Esto se considera entonces, una mastitis crónica (Ramírez, 2001). Los parámetros que se pueden evaluar para caracterizar al proceso inflamatorio como crónico son el alto recuento de células somáticas (mayor a 200 000 células/ml) durante más de dos meses consecutivos o por la aparición de tres o más casos repetidos de mastitis clínica en el mismo cuarto mamario durante la lactancia (Kampa y *col.*, 2010; Cardozo y *col.*, 2015). En estos casos es común encontrar como agente etiológico a *Staphylococcus aureus*, y a menudo estas son

cepas formadoras de biopelícula (Gussmanna y col., 2019). Así pues, es que dentro de los agentes etiológicos causales de mastitis bovina de gran importancia en la industria lechera se puede mencionar las bacterias que pertenecen al género *Staphylococcus*, las cuales se pueden clasificar como especies coagulasa positivas y negativas con base en su capacidad de producir dicha enzima. Las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus* spp coagulasa negativos (SCN) no siempre causan signología clínica. Sin embargo, existen especies capaces de inducir una reacción inflamatoria fuerte o son capaces de persistir por tiempos prolongados en la glándula mamaria (Piessens y col., 2012). De las especies de SCN que mejor se han adaptado a la glándula mamaria bovina se puede nombrar a *S. chromogenes* y *S. epidermidis*, mientras que especies como *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. simulans* que afectan también a los bovinos, se consideran como oportunistas ambientales (Piessens y col., 2012). Uno de los agentes contagiosos causales de mastitis perteneciente a las bacterias coagulasa positivas y que es de gran preocupación a nivel mundial es *S. aureus*. Solo basta citar que se encuentra presente en el 25.4% de las muestras de leche (Gussmanna y col., 2019). Es de mencionarse que existen cepas bacterianas del género *Staphylococcus* que se pueden aglomerar en comunidades bacterianas contenidas en una matriz extracelular de exopolisacáridos adheribles al epitelio de la glándula mamaria, misma que se conoce como biopelícula (*biofilm* en inglés) (Bohl y col., 2021). Estas cepas se asocian a la presentación de infecciones persistentes por que la biopelícula les confiere la capacidad para evadir al sistema inmune del hospedero, una mayor resistencia a la acción de los antimicrobianos en comparación con las bacterias planctónicas no asociadas a esta estructura. La biopelícula altera el crecimiento bacteriano dentro de ella dado que se limita el paso y con ello la disponibilidad de nutrientes, se modifica el pH del medio, hay una perfusión de oxígeno distinta, se generan diversas fuentes de carbono y la osmolaridad es distinta en la biopelícula. Así, cuando esta estructura alcanza una masa crítica, las capas más externas se desprenden y las bacterias contenidas en ellas se adhieren a otros sitios y entonces habrá persistencia del proceso infeccioso no solo en el tejido glandular mamario, sino que también en material inerte que esté en contacto directo con la glándula mamaria durante la ordeña, exceptuando al acero inoxidable no agrietado (Babra y col., 2013; Gussmanna y col., 2019; Pasachova y col., 2019; Bohl y col., 2021).

En la mastitis del ganado bovino una de las partes fundamentales de su diagnóstico es la identificación del agente etiológico. Una vez que se establece al *S. aureus* como el agente causal a través de la realización de cultivos microbiológicos selectivos, la observación microscópica del agente y la realización de diversas pruebas microbiológicas específicas como la prueba de catalasa, hemólisis, coagulasa, fermentación de carbohidratos y resistencia a polimixina B (Aguilar y col., 2014), resulta también importante identificar aquellos casos en los que se involucre una cepa productora de biopelícula. Para ello, se pueden realizar técnicas microbiológicas cualitativas como la de Agar Rojo Congo (Atshan y Shamsudin, 2011) y técnicas cuantitativas como formación de biopelícula en placa y en tubo e incluso correlacionar los datos con resultados derivados de mediciones espectrofotométricas (Christensen y col., 1982), y de técnicas moleculares como PCR para la identificación de genes asociados a la producción de exopolisacáridos (biopelícula) (Hortaç y col., 2020).

Se sabe que el tratamiento a base de antimicrobianos en mastitis crónicas relacionadas con *S. aureus* formador de biopelícula no tiene el éxito esperado por la protección que le confiere esta matriz extracelular al agente patógeno, la *American Association of Bovine Practitioners* (AABP) recomienda no tratar los casos crónicos y/o subclínicos dado que los porcentajes de eficacia en el tratamiento son muy bajos y el riesgo de contagio horizontal es elevado (Rosyter y Wagner, 2015). No obstante, se ha experimentado con ceftiofur intramamario por 8 días consecutivos como opción pertinente (Alfonseca-Silva y col., 2021). La vía de administración de elección es la intramamaria, pues logra altas concentraciones del antimicrobiano en la glándula, tiene poca o nula absorción, se reduce la dosis total utilizada y se evitan efectos adversos sistémicos (Bhattarai y col., 2021). Sin embargo, se sabe que la resistencia a los antimicrobianos disminuye el efecto del fármaco sobre el agente etiológico y que la presencia de biopelícula afecta la penetración del antimicrobiano al sitio infectado. Por ello, se estudian vehículos farmacéuticos que destruyan o debiliten la biopelícula sin afectar el tejido glandular y de esta manera aumentar la eficacia y difusión del principio activo al sitio problema (Babra y col., 2013; Bhattarai y col., 2021).

Con base en lo sugerido en la literatura, se postula en este ensayo que combinar agentes anti-biopelícula con antimicrobianos, puede mejorar la eficacia en el tratamiento de la mastitis crónica, en particular la producida por *S. aureus* productor de biopelícula (Skogman y col., 2012). Un agente que recientemente se incorporó con éxito al tratamiento intramamario de la mastitis es la enrofloxacin clorhidrato-dihidrato (Enro-C) (Patente UNAM 472715 - INPI, México). Este agente es un solvato más hidrosoluble que la enrofloxacin base, no irrita la glándula mamaria, tiene un pH de 6.5 en suspensión a razón de 30 mg/mL, presenta mayor capacidad de disolución acuosa que la enrofloxacin base y logra concentraciones elevadas en tejido mamario, produciendo alta eficacia contra *S. aureus* y *S. coagulasa* negativos (Miranda-Calderón y col., 2014; Martínez-Cortés y col., 2016; Viveros y col., 2017). En un ensayo con bacterias resistentes a enrofloxacin se encontró que la administración intramamaria de Enro-C 2 veces al día por 5 días consecutivos lograba una eficacia clínica y bacteriológica en casos de mastitis crónicas (65%), aun cuando la infección fue causada por bacterias genotípica y fenotípicamente resistentes a la enrofloxacin. Adicionalmente, en las vacas no curadas, la posterior asociación con un esquema de rescate a base de ceftiofur-HCl intramamario 2 veces al día durante 5 días adicionales, resultó en 100% de eficacia en relación con la cura bacteriológica (Alfonseca-Silva y col., 2021).

Uno de los vehículos que se consideran como clave para lograr una destrucción eficiente de la biopelícula es el dimetil sulfóxido (DMSO). Este es un vehículo-diluyente de fármacos con actividad antimicrobiana y aceptable inocuidad celular (Hebling y col., 2015; Yahya y Karsani, 2018; Deutch, 2019). De manera similar se han logrado efectos anti-biopelícula con el quitosán de bajo peso molecular (BPM) (Silva-Dias y col., 2014). Como es sabido, este polímero es un derivado de la quitina y es el segundo polisacárido más abundante del mundo después de la celulosa. El quitosán es una sustancia biocompatible, biodegradable y no tóxica, que se obtiene del exoesqueleto de crustáceos marinos y se ha reconocido que reduce biopelículas preformadas, además de que limita la adhesión de patógenos a los epitelios, incluyendo el mamario (Silva-Dias y col., 2014). Por estas propiedades del quitosán y del DMSO se postula en este estudio que ambos vehículos estabilizados en una

fórmula con Enro-C, pueden tener una eficacia superior a la observada con Enro-C sola (Enromastic®, de Laboratorios Aranda S.A. de C.V.) en un esquema de tratamiento de 8 días (Alfonseca-Silva y *col.*, 2021).

JUSTIFICACIÓN

A pesar de las recomendaciones de la AABP de no tratar a las vacas con mastitis crónicas dado el peligro de la diseminación horizontal, es de destacarse que en México pocas veces están dispuestos los productores y aún los Veterinarios a desechar a las vacas que muestren datos de padecer una mastitis crónica en la que estén involucradas bacterias productoras de biopelícula. Más aún, en condiciones habituales es poco común que se hagan las pruebas necesarias para llegar a este diagnóstico. De manera tal que es difícil predecir el impacto que esta enfermedad genera en la producción de leche en los diferentes tipos de unidades de producción, intensivas o semi-intensivas. Por esto, es importante tratar de lograr curas bacteriológicas y clínicas en este tipo de vacas. No obstante, como se ha comentado la biopelícula es una estructura altamente especializada para disminuir la eficacia de los antibacterianos y obviamente mantienen la eficacia antibacteriana limitada. Se postula en este ensayo que la combinación en un diseño farmacéutico intramamario de enrofloxacin clorhidrato - dihidrato (Enro C), dimetil sulfóxido (DMSO) y chitosán de bajo peso molecular, puede presentar una mejora en su actividad antibacteriana al afectar la síntesis y favorecer la degradación de la biopelícula en infecciones producidas por bacterias que la producen (principalmente *Staphylococcus* spp) y con ello lograr mejores tasas de curación clínica y bacteriológica.

HIPÓTESIS

1. Las cepas del género *Staphylococcus* spp aisladas de casos de bovinos lecheros que cursan con mastitis crónica en Chipilo, Puebla tienen la capacidad fenotípica y genotípica para producir biopelícula.
2. El preparado con Enro-C/DMSO/chitosán tiene la capacidad de inhibir *in vitro* la formación de biopelícula, degradar la biopelícula madura y generar un efecto

antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* planctónico y contenido en el interior de la matriz de exopolisacáridos, y su eficacia clínica y/o bacteriológica es superior al tratamiento de referencia con Enro-C/DMSO para casos de mastitis crónica por *Staphylococcus* spp productor de biopelícula en tratamientos extendidos de 8 días consecutivos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia clínica y bacteriológica del preparado Enro-C/DMSO/chitosán tras su aplicación intramamaria por 8 días consecutivos en casos de mastitis bovina clasificada como crónica, así como determinar el efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* planctónico y el contenido en el interior de la matriz de exopolisacáridos, mediante la determinación del efecto de la combinación sobre la inhibición de la síntesis de biopelícula y la degradación de biopelícula madura *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clasificar por su fenotipo y genotipo, cepas de *Staphylococcus* spp aisladas de casos clínicos de mastitis crónica en bovinos lecheros, como productoras y no productoras de biopelícula.
2. Identificar por PCR los genes *icaA* y *icaD* del operón *ica*, asociados a la producción de exopolisacáridos extracelulares, en cepas de *Staphylococcus* spp aisladas de casos de mastitis crónica en bovinos lecheros.
3. Evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano del preparado con Enro-C/DMSO/chitosán sobre *S. aureus* planctónico y contenido en el interior de la matriz de exopolisacáridos, así como la capacidad de inhibición de producción de biopelícula y degradación de biopelícula madura.
4. Evaluar la eficacia clínica y/o bacteriológica del preparado intramamario con Enro-C/DMSO/chitosán y compararla con el tratamiento de referencia Enro-C sola en casos de mastitis crónica por *Staphylococcus* spp productor de biopelícula.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de Posgrado, Cuidado y Uso de Animales Experimentales, de acuerdo con la Regulación Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y se llevó a cabo con base en los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, cumpliendo con los aspectos relativos a su cuidado, manejo y uso establecidos por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Protocolo Número SICUAE.MC-2021/4-2).

La elaboración de los preparados intramamarios se realizó en el Laboratorio de Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ-UNAM ubicada en Ciudad Universitaria, en la Ciudad de México. El diagnóstico bacteriológico y la evaluación *in vitro* de los fármacos empleados se realizó en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología en Inmunología de la FMVZ-UNAM. La evaluación *in vivo* de los preparados se realizó en la localidad de Chipilo de Francisco Javier Mina, en el municipio de San Gregorio Atzompa, en el estado de Puebla, que se encuentra 12 km al sur de la ciudad de Puebla, se localiza entre el paralelo 19° 00' de latitud norte, el meridiano 98° 19' de longitud oeste y una altitud de 2139 m.s.n.m. Cuenta con un rango de temperatura de 12 a 26° C, su precipitación promedio anual es de 1398 mm y se caracteriza por tener un clima templado subhúmedo (INAFED, 2020).

Elaboración del preparado de uso intramamario a base de Enro - C, dimetil sulfóxido y chitosán (Enro - C/DMSO/chitosán).

Para la realización del presente estudio se prepararon cuatro compuestos con diferentes concentraciones de chitosán (Véase Cuadro 1). La elaboración de los preparados llevó la siguiente secuencia:

1. En una base de 75 ml de agua destilada se incorporaron 3 g de Enro-C (producida bajo Patente UNAM 472715 - INPI, México), los cuales se disolvieron con el empleo del

mezclador magnético de placa caliente a temperatura ambiente hasta su completa disolución.

2. Posteriormente, se incorporó por agitación constante de forma lenta y bajo previa pulverización en malla 20, chitosán de bajo peso molecular (Pharmachem S.A., de C.V.®) a temperatura ambiente hasta disolver de forma completa.
3. Después se agregaron gota a gota 0.05 ml de DMSO al 99% de pureza (Riedel-de Haën ®), se aforó el preparado con agua destilada hasta 100 ml y se mantuvo la agitación de la mezcla el tiempo necesario hasta obtener una suspensión relativamente estable, de la cual 48 h después de la agitación se hicieron visibles las 2 capas de la suspensión por la segregación de los componentes sólidos de esta, para lo cual solo fue necesario volver a agitarla para resuspender.
4. Se procedió a medir el pH de cada uno de los preparados elaborados.

Cuadro 1. Formulación y pH de los preparados de prueba Enro-C/DMSO/chitosán con diferente concentración de chitosán

Primer preparado	Segundo preparado
Enro-C 3 g	Enro-C 3 g
Chitosán 0.05 g	Chitosán 0.1 g
DMSO 0.05 ml	DMSO 0.05 ml
pH 4.37	pH 4.75
Tercer preparado	Cuarto preparado
Enro-C 3 g	Enro-C 3 g
Chitosán 0.2 g	Chitosán 0.5 g
DMSO 0.05 ml	DMSO 0.05 ml
pH 4.27	pH 5.23

Composición por cada 100 ml de preparado

Con base en la facilidad de disolución de los componentes, el pH del preparado y la estabilidad de sus fases se seleccionó el preparado que contiene una concentración de chitosán al 0.5%, sin embargo, se requiere que para su empleo en tratamientos

intramamarios su pH sea cercano a 6 para evitar generar daño en el tejido glandular mamario al momento de su administración, por lo que se adicionaron 5 ml de buffer pH 7.

Adicionalmente a esto se elaboró un segundo preparado sin chitosán, con el fin de emplearlo como fármaco del grupo control para la fase clínica del ensayo. La composición del preparado seleccionado para las pruebas en el laboratorio y en campo se describe en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Formulación y pH del preparado para el grupo control (Enro-C/DMSO) y el grupo experimental (Enro-C/DMSO/chitosán).

Preparado intramamario para el grupo control (Enro-C/DMSO)	Preparado intramamario para el grupo experimental (Enro-C/DMSO/chitosán)
Agua destilada csp 100 ml	Agua destilada csp 100 ml
Buffer de pH 7 5 ml	Buffer de pH 7 5 ml
Enro-C 3 g	Enro-C 3 g
DMSO 0.05 ml	Chitosán 0.5 g
pH 6.16	DMSO 0.05 ml
	pH 6.23

Composición por cada 100 ml de preparado

Descripción de la población de estudio

La selección de los animales que se incluyeron en el estudio se realizó durante el mes de octubre del 2022. Se seleccionaron un total de 15 bovinos lecheros del establo de Chipilo, todos de la raza Holstein Friesian en producción de 2° y 3° parto, los cuales cumplieron con el primer criterio de inclusión de detección de tres o más casos repetidos de mastitis clínica en el mismo cuarto mamario durante la lactancia en curso para determinar que el proceso inflamatorio fuera crónico, además de no haber recibido tratamiento alguno en los 10 días previos a la evaluación de los animales (Kampa y *col.*, 2010; Cardozo y *col.*, 2015). Se realizó la evaluación física de las glándulas mamarias con el fin de identificar su conformación al momento de tomar la muestra, así como la prueba de tazón de fondo oscuro para determinar mastitis clínica e identificar posibles alteraciones organolépticas en la muestra de leche obtenida.

Para lograr una caracterización completa del proceso inflamatorio por el que cursaron los animales incluidos en el estudio, se realizó la estimación de células somáticas a través de la prueba de California para mastitis, considerando aquellos animales que presentaron un conteo de células somáticas (CCS) superior a las 200 000 céls / ml, lo que corresponde a una clasificación como trazas, 1, 2 ó 3, de acuerdo con lo establecido en la interpretación de resultados de la prueba (Pampariene y *col.*, 2016).

Prueba de California para mastitis

Se realizó la limpieza de la zona a través del lavado, enjuague y secado de la región que rodea el pezón de la ubre y fue de suma importancia el lavado y desinfección de las manos de la persona encargada de realizar la prueba, así como el uso de guantes de nitrilo en todo momento para evitar contaminación de la muestra (Véase Figura 1.1 y 1.2). Utilizando torundas de algodón remojadas en una solución de alcohol al 70%, se desinfectaron los pezones y se dejaron secar durante 2 min (Véase Figura 1.3). Se realizó el despunte de todos los cuartos de la glándula mamaria, desechando los primeros dos o tres chorros de leche obtenida del estímulo para su eyección (Véase Figura 1.4). Se ordeñaron en cada una de las placas de la paleta para prueba de California dos chorros de leche de cada cuarto y se inclinó la paleta a modo de retirar el excedente de leche (Véase Figura 1.5). En cada placa se añadió la misma cantidad de reactivo de California (compuesto por alquil aril sulfonato de sodio, detergente que causa la liberación del DNA de los leucocitos presentes en la muestra a través de su lisis y púrpura de bromocresol como indicador de pH) y se mezcló con la muestra de leche para detectar la reacción de gelificación que desencadena la combinación del DNA de los leucocitos lisados con las proteínas propias de la leche (Véase Figura 1.6). Una vez que se realizó la lectura de la prueba, se retiró el contenido de la paleta y se enjuagó la misma previo a la continuación de la prueba en la siguiente vaca. La interpretación de los resultados observados se realizó con base en lo descrito en el Cuadro 3.



Figura 1. Prueba de California para mastitis 1.1 Limpieza de la ubre. 1.2. Lavado, enjuague y secado del pezón. 1.3. Desinfección de pezones con alcohol al 70%. 1.4. Despunte. 1.5. Toma de muestra en paleta para prueba de California. 1.6. Adición del reactivo de California y lectura de la prueba.

Cuadro 3. Interpretación de resultados de la Prueba de California para mastitis (Pampariene y col, 2016).

Escala	Cambios en la consistencia de la mezcla	Intervalo relativo del nivel de células somáticas (células/ml)	Porcentaje de leucocitos polimorfonucleares
Negativo	Consistencia homogénea, líquida, sin cambios visibles.	< 200 000	25 %
Trazas	Aparecen grumos menores, que desaparecen al girar la placa.	200 000 – 500 000	30 %
1	Se forman coágulos menores, la viscosidad de la mezcla aumenta.	500 000 – 1 500 000	30 – 40 %
2	La mezcla es viscosa, un coágulo es visible al girar el lugar y se localiza en un lugar.	1 500 000 – 5 000 000	40 – 70 %
3	Se forma una mezcla gomosa y viscosa, se ve claramente un coágulo de la forma de albúmina y se cae al verter la mezcla fuera de la placa.	> 5 000 000	70 – 80 %

Toma y envío de muestras

Posterior a la realización de la prueba de California para mastitis y con el fin de aprovechar la limpieza, antisepsia y despunte que se realizó en la glándula mamaria, se colectaron 20 ml de leche directamente de cada cuarto de las vacas diagnosticadas con mastitis crónica en tubos cónicos para centrifuga Falcon TM de 50 ml estériles, teniendo la debida precaución de que el tubo no roce con el pezón para evitar contaminación de la muestra. Los tubos fueron debidamente identificados y conservados a 4° C para su transporte al Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM. Para la identificación de las muestras se consideró la fecha y hora de obtención de la muestra, el número del arete de SINIIGA y/o del arete interno de la UPP que le corresponde a cada bovino incluido en el estudio y la glándula mamaria a la que corresponde la muestra (siendo CAD el cuarto anterior derecho, CAI cuarto anterior izquierdo, CPD cuarto posterior derecho y CPI cuarto posterior izquierdo). Las muestras fueron procesadas el mismo día de su recolección y se preservó la leche en temperatura de

congelación (-20° C) durante el tiempo que llevó la realización del diagnóstico bacteriológico. Una vez que se concluyó con la identificación del agente etiológico de los casos de mastitis y su preservación en leche descremada con glicerol al 10%, las muestras de leche fueron inactivadas con hipoclorito de sodio al 1% para su posterior desecho.

Identificación bacteriológica por género y especie

En el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, se realizó la identificación de las cepas de *Staphylococcus* spp que se encontraron en las muestras obtenidas de los casos de mastitis crónica previamente seleccionados a través de la realización de un primo aislamiento cuantitativo en Agar Sangre para identificar las características morfológicas macroscópicas propias del género de interés y realizar el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por cada 20 µl inoculados en el agar, tinción Gram para identificar las características morfológicas microscópicas de los microorganismos contenidos en la muestra y aislados del primo aislamiento, prueba de Catalasa para la identificación de las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, prueba coagulasa y factor de agregación celular para diferenciar las cepas de *Staphylococcus* spp coagulasa positivas de las coagulasa negativas y como parte de la diferenciación entre las cepas de *S. aureus* con el resto de las especies coagulasa positivas del género se realizó un aislamiento cuantitativo en Agar Manitol y Sal como cultivo selectivo y diferencial de la especie, así como un cultivo puro en agar Manitol Anaerobio y agar P (Aguilar y col., 2014).

En aquellas colonias bacterianas que se desarrollaron en el primocultivo en Agar Sangre, cuya morfología macroscópica no era concordante con el género *Staphylococcus* spp, se realizó tinción Gram para verificar si el tipo de morfología microscópica era semejante a la presentada por el género *Streptococcus* spp, posteriormente se realizó la prueba de catalasa y sembraron las colonias en Agar CAMP-Esculina con el fin de determinar si las colonias clasificadas dentro de este género pertenecían a *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* o *S. uberis* (Aguilar y col., 2014).

Determinación fenotípica cualitativa de las cepas productoras de biopelícula.

Con el apoyo del Área de Preparación de Medios y Cultivos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, se elaboró el medio de cultivo para la prueba de Agar Rojo Congo modificado con base en la fórmula propuesta por Mariana y *col.* (2009), en la cual por cada litro del medio preparado se emplearon 40 g de base de agar sangre (BD Bioxon ®, México), 0.4 g del colorante Rojo Congo (Sigma de México ®) y 10 g de glucosa (DIBICO ®), esto con el fin de determinar la capacidad de las cepas aisladas de *Staphylococcus* spp de producir biopelícula que afectan a los animales considerados en el estudio.

Se realizó la activación de las cepas obtenidas a partir de las muestras de leche a través de un cultivo puro en Agar Sangre, incubando a 37° C por 24 h. Con un asa microbiológica previamente esterilizada se obtuvo una colonia de cada cepa de interés y se inoculó en el Agar Rojo Congo modificado empleando la técnica de estriado continuo. El medio de cultivo se incubó a 37° C por 24 h, una vez transcurrido este tiempo, se sacó de la incubadora y se dejó durante 24 h más a temperatura ambiente para posteriormente realizar la lectura de la prueba.

La clasificación de las cepas a través de esta técnica se determinó de la siguiente forma: las cepas que formaron colonias negras en su totalidad se consideraron como productoras de biopelícula, mientras que las cepas que formaron colonias rojas brillantes en su totalidad se consideraron como no productoras de biopelícula (Véase Figura 2).

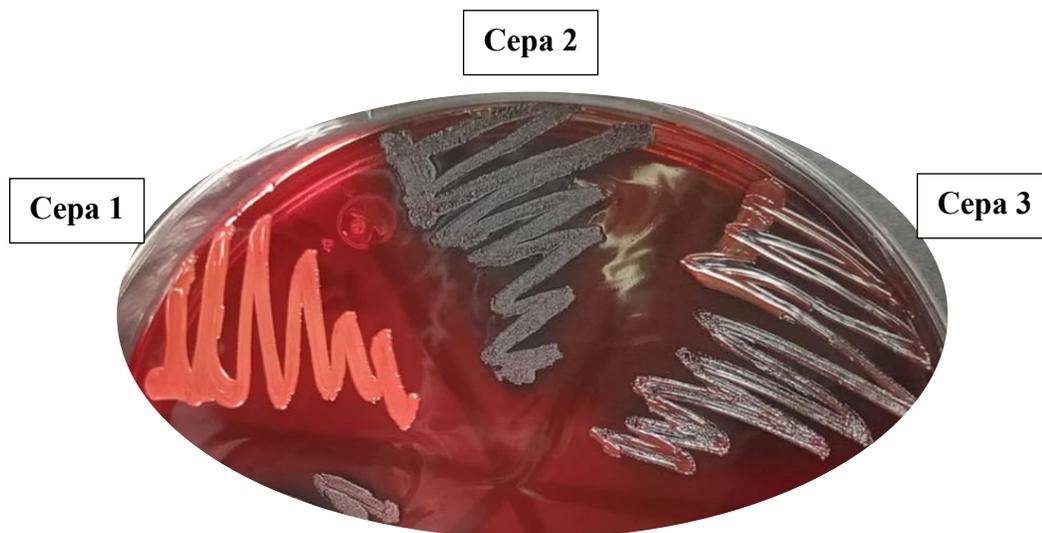


Figura 2. Representación de la detección de biopelícula en Agar Rojo Congo modificado por Mariana y col. (2009). La cepa 1 corresponde a *S. aureus* no productor de biopelícula (colonias color rojo brillante), la cepa 2 corresponde a *S. aureus* Cowan productora de biopelícula como control (+) de la prueba (colonias color negro opaco), la cepa 3 corresponde a *E. coli* no productora de biopelícula como control (-) de la prueba (colonias color gris mucoides).

Determinación fenotípica cuantitativa de las cepas productoras de biopelícula.

Haciendo uso de la capacidad que tienen las cepas de *Staphylococcus* spp productoras de biopelícula para adherirse a superficies inertes, se realizó la técnica de micro titulación de la producción de biopelícula en una placa de cultivo de tejido de fondo plano con 96 pocillos (Greiner Bio - One, Alemania), con base en lo descrito por Peña y Uffo (2013).

Se realizó la activación de las cepas obtenidas de las muestras de leche que se procesaron a través de un cultivo puro en Agar Sangre (BD Bioxon®, México), incubando el cultivo a 37° C por 24 h.

Se inoculó una colonia de la cepa de interés en 3 ml de caldo de Soya Trypticaseína (BD Bioxon®, México) con 1% de glucosa (TSB glucosado), se mezcló vigorosamente y se incubó por 24 h a 37° C.

Posteriormente se realizó una dilución 1:40 en tres tubos que contenían 1 ml de medio fresco de TSB glucosado cada uno y se mezclaron bien por agitación. De cada tubo de dilución 1:40 de TSB glucosado inoculado con las cepas de interés, se tomaron tres alícuotas de 200 µl de la suspensión del aislado y se inocularon individualmente en la placa. En cada placa se incluyeron además de las cepas de interés, tres pocillos con TSB glucosado sin inocular como control positivo del pocillo, se dejaron tres pocillos vacíos como control negativo del pocillo, se inocularon tres pocillos con la cepa *S. aureus* Cowan como control positivo de cepa productora de biopelícula y tres pocillos con la cepa de *E. coli* como control negativo a producción de biopelícula. Las placas se incubaron a 37° C por 24 h.

Después de la incubación de las placas se removió el contenido de los pocillos por decantación y se enjuagaron tres veces con Solución Buffer de Fosfatos (PBS). Las placas se dejaron secar en posición invertida a temperatura ambiente. Con el fin de fijar las bacterias adheridas al fondo de los pocillos, se incubaron las placas a 65° C por una hora. Posteriormente, las placas se tiñeron empleando 160 µl de solución Cristal Violeta al 0.5% en cada pocillo. Se dejó actuar el colorante durante 15 min y se enjuagaron las placas con agua destilada hasta eliminar todo el exceso de colorante. Para decolorar el fondo de los pocillos se añadieron 160 µl de una solución de metanol al 10% y ácido acético al 7.5%, se dejó actuar por 1 min y se enjuagaron las placas con agua destilada hasta eliminar todo el exceso y se dejaron secar.

Se midió la densidad óptica (DO) a 620 nm, ya que el valor de la DO se considera proporcional a la formación de biopelícula en la placa por parte de las cepas que se inocularon en ella. Se consideró una escala de 0.00 a 1.00 para la producción de biopelícula y su relación con la DO obtenida. Se definió un Valor de Corte Inicial por DO (DO_{ic}) para identificar a las cepas no productoras de biopelícula, considerando el valor de la media del blanco más tres desviaciones estándar por encima de la misma. Para poder definir cuáles cepas bacterianas son altas, medias o bajas productoras de biopelícula se establecieron dos puntos de corte de la siguiente manera: primero se definió el intervalo de Densidad Óptica de Producción de Biopelícula (DO_{pb}), restando el DO_{ic} al valor más alto de la escala que

se está empleando (1.00). Después se dividió la DO_{pb} entre 3 para calcular el Valor de cada Punto de Corte (DO_{vpc}). El primer punto de corte se calculó sumando el DO_{Ic} más el DO_{vpc}, mientras que el segundo punto de corte se calculó sumando el DO_{Ic} más el doble del DO_{vpc}. Las cepas se clasificaron con base en el siguiente criterio (Véase Figura 3 y 4):

- No productoras de biopelícula ($DO \leq DO_{Ic}$).
- Bajas productoras de biopelícula ($DO_{Ic} < DO \leq$ Primer punto de corte).
- Medias productoras de biopelícula (Primer punto de corte $< DO \leq$ Segundo punto de corte).
- Altas productoras de biopelícula (Segundo punto de corte $< DO$).

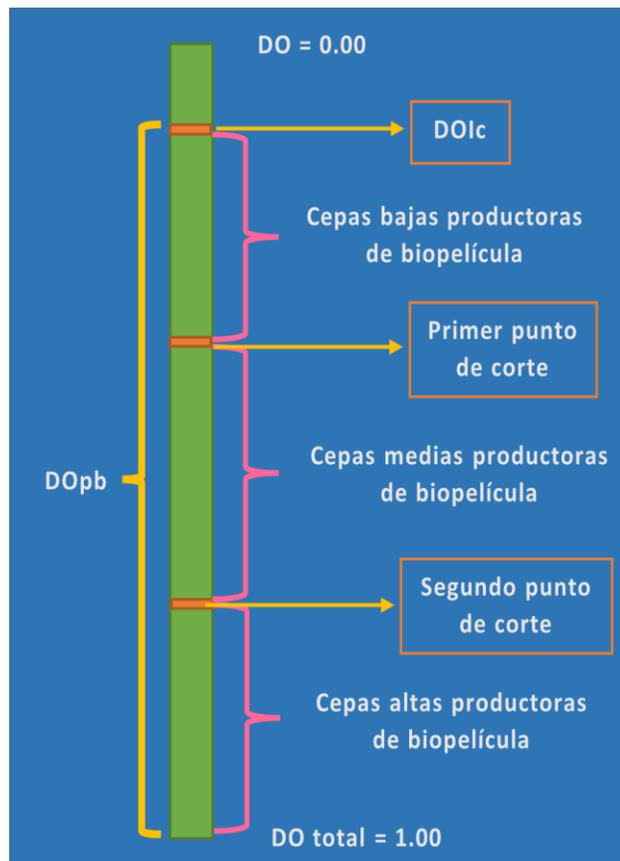


Figura 3. Escala de producción de biopelícula propuesta para la clasificación de las cepas de *Staphylococcus* spp obtenidas de los casos de mastitis crónicas de Chipilo, Puebla. DO: densidad óptica. DOIc: valor de corte inicial por $DO = \mu$ del control negativo de pocillo + $3(\text{DES.V. EST. de la } \mu \text{ del control negativo de pocillo})$. DO_{pb}: DO de prod. de biopelícula. DO_{vpc}: DO_{pb}/3. Primer punto de corte: DOIc + DO_{vpc}. Segundo punto de corte: DOIc + 2(DO_{vpc}).

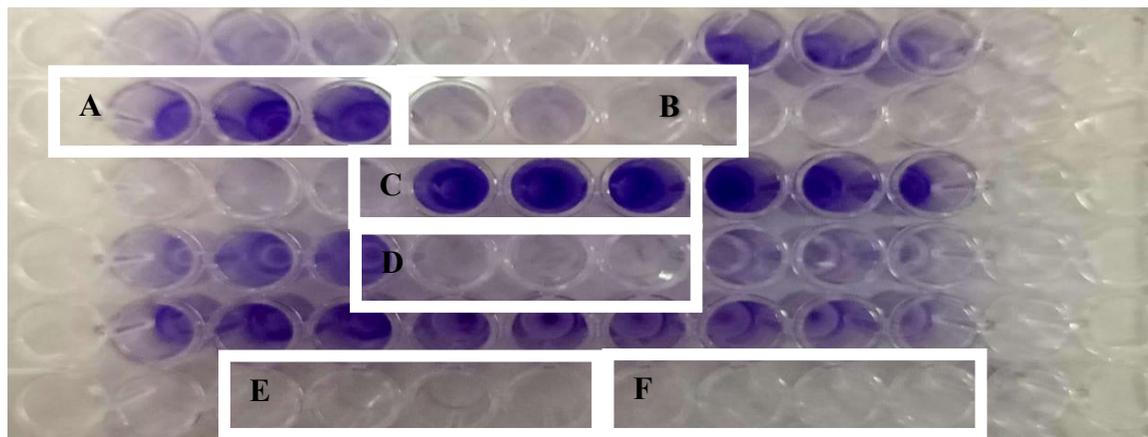


Figura 4. Microplaca de poliestireno de 96 pocillos empleada para la técnica de microtitulación de producción de biopelícula. A: control positivo de cepa (*S. aureus* Cowan). B: control negativo de cepa (*Escherichia coli*). C: cepa *S. aureus* alta productora de biopelícula. D: cepa *S. coagulans* (-) no productora de biopelícula. E: control positivo del pocillo (inoculado con TSB glucosado). F: control negativo del pocillo (sin inocular).

Extracción y purificación de DNA

Se colocaron varias colonias bacterianas de la cepa a analizar en 1 ml de buffer de Tris-EDTA (TE), se mezcló la solución hasta su disolución. Para inactivar a las bacterias se puso el tubo en baño María a 80° C por 20 min y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se centrifugó por 5 min a 10 000 rpm y después se desechó el sobrenadante por decantación.

Se agregaron 400 µl de solución buffer TE y se resuspendió el sedimento formado previamente. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó 1 hora a 37°C, después se agregaron 75 µl de SDS al 10% y 50 µl de proteinasa K (1 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó por 20 min a 65° C, a la par del inicio del precalentamiento de la solución CTAB a 65°C para disolver previo a su uso.

Se añadieron 100 µl de NaCl 5M y se mezclaron suavemente, después se añadieron 100 µl de la solución CTAB/NaCl precalentada, se pasó por el vórtex hasta que la solución tomó un color blanco y se incubó a 65 °C por 10 min.

Se añadieron 750 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y luego se centrifugó por 5 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Al terminar, se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo con pipeta de 200 µl y se repitió la extracción con 1 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).

Se volvió a transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo y se le añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Se mezcló suavemente por inversión y se colocó por 30 min a -20°C.

Se centrifugó la mezcla a 10 000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. Al terminar, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% frío mezclando manualmente por inversión.

Se centrifugó la mezcla por 5 min a 10 000 rpm a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante secando bien el tubo, para después disolver la pastilla en 30 µl de agua libre de DNAsas.

Se realizó la cuantificación del DNA extraído y la valoración de su pureza con el empleo del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific ®), en un rango de lectura de 260 - 280 nm y se preservó a temperatura de congelación (-20° C) para su uso posterior en la identificación de los genes de interés a través de la PCR.

Técnica de PCR

Una vez conocidas las concentraciones de DNA de las muestras, todas se estandarizaron a 40 ng/µl y se realizó la PCR múltiplex para la detección de genes *icaA* e *icaD*. Los iniciadores que se utilizaron fueron diseñados a través del Primer - BLAST del NCBI y se encuentran descritos en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Secuencias de iniciadores para los genes *icaA* e *icaD* de *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

Gen	Tamaño del amplicón	Secuencia de los iniciadores
<i>ica A</i>	321 pares de bases	F - TTA GCA CAA TGA AAA CGA AAA GGT.
		R - CGA CAA GAA CTA CTG CTG CGT.
<i>ica D</i>	78 pares de bases	F - AGC CCA GAC AGA GGG AAT AC
		R - ACG ATA TAG CGA TAA GTG CTG TTT.

Las condiciones de la PCR fueron: activación a 95° C por 2 min, desnaturalización a 95° C por 45 segundos, alineación a 62° C por 30 segundos, amplificación a 72° C por 45 segundos (25 ciclos) y una extensión final de 72° C por 2 minutos. Posteriormente se comprobó el tamaño de los amplicones por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (teñido con DiamondTM PROMEGA). La electroforesis se corrió a 80 volts por 45 min, para posteriormente colocar el gel en un transiluminador y observar los amplicones obtenidos de la PCR.

Microorganismo

Para la valoración *in vitro* del efecto del preparado Enro - C/DMSO/chitosán en el presente estudio, se descongeló del cepario del laboratorio un tubo que contiene preservada en leche descremada la cepa de *S. aureus* clasificada por sus características fenotípicas y genotípicas como alta productora de biopelícula. Esta bacteria fue aislada de una de las muestras clínicas obtenidas de uno de los casos de mastitis bovina crónica de Chipilo, Puebla, la cual se identificó con el número 10. La bacteria se sembró sobre una placa de Agar Sangre incubada a 37 ° C por 24 h para su posterior procesamiento.

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano y de inhibición de la formación de biopelícula del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

La bacteria previamente activada en agar sangre y cultivada 16 h en caldo TSB glucosado se utilizó para estandarizar un inóculo bacteriano con una concentración del 0.5 del nefelómetro de MacFarland. Se empleó una placa de poliestireno con 96 pocillos. Se colocaron 200 µl del inóculo en cada pocillo en presencia del preparado de Enro-C/DMSO/chitosán utilizando dos concentraciones diferentes (concentración baja y media) del producto basados en su contenido de Enro-C (Véase Cuadro 5) y como control de la prueba se utilizó el inóculo de bacterias sin adición del preparado para evidenciar la formación de la biopelícula al fondo del pocillo. Para cada concentración se emplearon dos pocillos en los cuales se evaluó el efecto del preparado sobre la inhibición de la biopelícula y su actividad microbiana sobre bacterias planctónicas, dos pocillos para evaluar el efecto del preparado sobre la inhibición de la biopelícula y su actividad microbiana sobre bacterias contenidas en el interior de la biopelícula formada al fondo del pocillo y dos pocillos más sin preparado como control para observar la formación de biopelícula (Véase Figura 5). La placa se incubó a 37 °C por 24 h. Posterior a la incubación, se realizó la siembra en agar TSA para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en los pocillos inoculados. Previo a la siembra de los agares, en los pocillos destinados a la valoración antimicrobiana del preparado sobre las bacterias presentes al interior de la biopelícula se les realizó un raspado con empleo de un cepillo interdental (Oral-B Expert Interdental Mini ®) con la finalidad de deshacer la biopelícula que pudiera estar presente al fondo del pocillo y liberar en el sobrenadante a las bacterias contenidas en la matriz. Posteriormente, se realizaron diluciones decuples a partir del sobrenadante obtenido de los pocillos inoculados, considerando que las diluciones fueron realizadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} (Véase Figura 6). Después, las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} de cada uno de los pocillos se inocularon por duplicado en agar TSA tomando 10 µl de cada pocillo para la cuenta de UFC en gota. Los agares se incubaron a 37° C por 24 h y al término de la incubación se realizó el conteo del número de UFC que creció en la gota inoculada. La determinación de la formación de

biopelícula en los pozos se realizó como se describió previamente (Véase la sección Determinación fenotípica cuantitativa de las cepas productoras de biopelícula). El ensayo completo se realizó por triplicado.

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano y de degradación de la biopelícula madura del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

La activación de la bacteria a emplear y la preparación del inóculo se realizó como se describió para el ensayo anterior. Se agregaron 200 µl del inóculo bacteriano sin preparado en el mismo número de pocillos contemplados para la prueba de inhibición, considerando también los pocillos necesarios para el conteo de bacterias planctónicas, contenidas en el interior de la biopelícula y el control de la prueba (Véase Figura 5) y se incubó a 37 ° C por 24 h. Después de la incubación, se agregó el preparado a la microplaca utilizando las dos concentraciones empleadas en la evaluación de la inhibición de síntesis de biopelícula (Véase Cuadro 5), mientras que en los pocillos control solo se agregó TSB glucosado y se volvieron a incubar las placas a 37 °C durante otras 24 h (una vez el tratamiento por día). Se realizó el ensayo en dos placas, una se empleó para cuantificar el efecto de un día del preparado aplicado en los pocillos sobre la biopelícula y la segunda para cuantificar el efecto de tres días del preparado aplicado. Para el ensayo de un día se repitió el procedimiento del conteo de UFC descrito en la prueba de inhibición de síntesis de biopelícula (Véase Figura 6), mientras que para el ensayo de tres días se retiró diariamente el sobrenadante y se aplicó de nuevo TSB glucosado más el preparado a la concentración correspondiente en cada pocillo. Además, adicionalmente se emplearon tres suspensiones con diferentes concentraciones de los componentes del preparado intramamario (concentración baja, media y alta) (Véase Cuadro 5). Al finalizar los procedimientos correspondientes a cada placa se realizó la determinación de la formación de biopelícula en las placas como se describió previamente (Véase la sección Determinación fenotípica cuantitativa de las cepas productoras de biopelícula).

Cuadro 5. Componentes de las suspensiones empleadas para la evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

Suspensión	Componente	Concentración
Preparado de baja concentración	Enro-C	10 µg
	DMSO	0.00017 µl
	Chitosán	1.67 µg
Preparado de media concentración	Enro-C	50 µg
	DMSO	0.00083 µl
	Chitosán	8.33 µg
Preparado de alta concentración	Enro-C	100 µg
	DMSO	0.0017 µl
	Chitosán	16.67µg

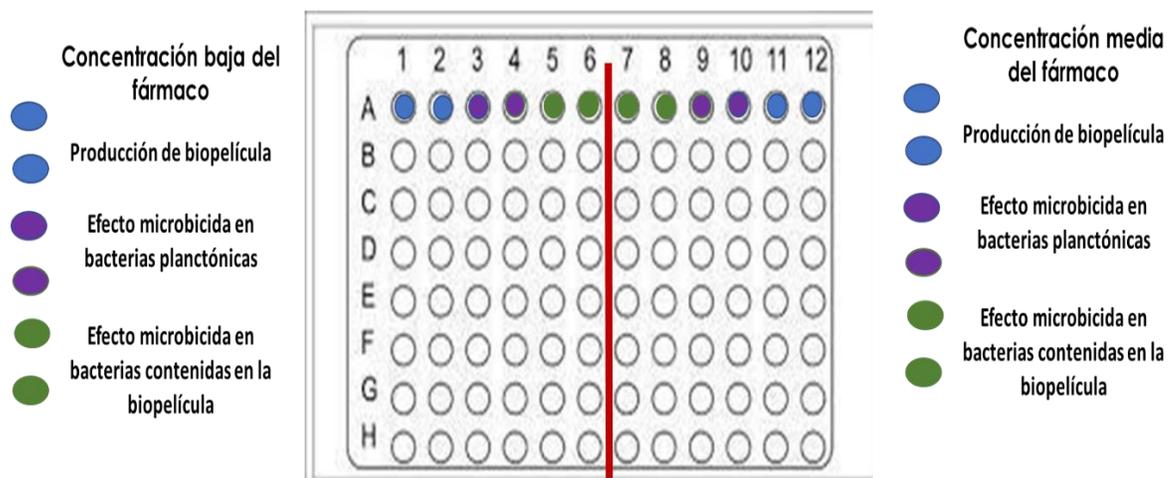


Figura 5. Esquema del empleo de la microplaca de poliestireno de 96 pocillos en los ensayos de efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

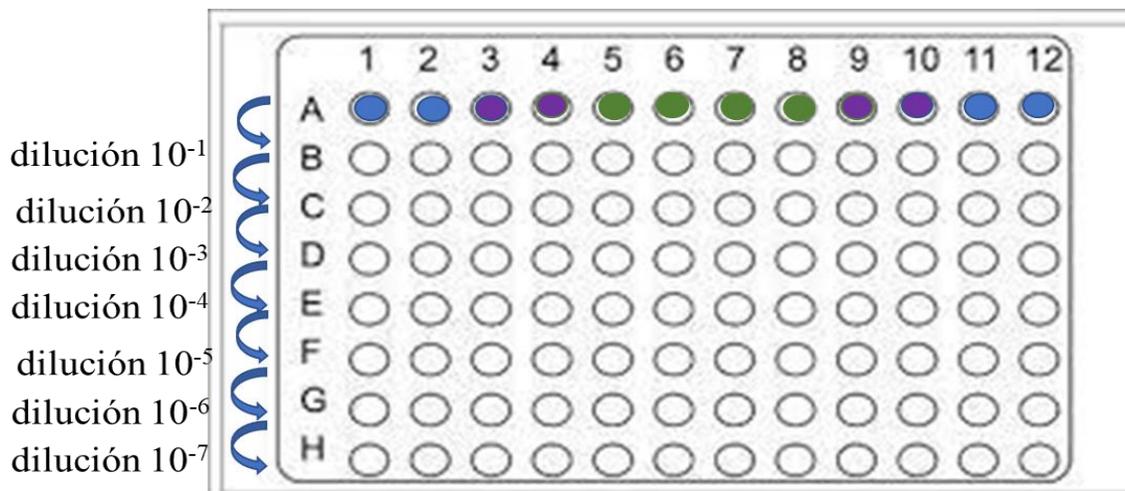


Figura 6. Esquema del empleo de la microplaca de poliestireno de 96 pocillos en las diluciones decuples realizadas para el conteo de UFC en los ensayos del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula.

Evaluación *in vivo* del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

Para la fase clínica del presente estudio, al total de animales seleccionados en Chipilo, Puebla les fueron asignados los tratamientos de manera aleatoria, habiéndose asignado números corridos y respetando lo más posible los bloques de características de la biopelícula (<https://www.calculator.net/random-number-generator.html>). Durante el tiempo de tratamiento se realizó la evaluación clínica diaria de la conformación de la ubre, se revisaron las características organolépticas de la leche y se realizaron pruebas de California, así como evaluaciones para determinar si los casos se agravaron o tendían a mejorar. Para determinar la eficacia clínica se consideraron los criterios: leche sin alteraciones organolépticas, glándula sin dolor e inflamación, prueba de California con calificación cero (sin datos de inflamación) y Conteo de Células Somáticas con valores aceptables < 200,000 CS/mL (Bedolla y col., 2007; Pampariene y col., 2016). La eficacia bacteriológica se evaluó repitiendo las técnicas de aislamiento e identificación del agente causal, para verificar la ausencia del patógeno o en su defecto la disminución del número de UFC / ml

de leche obtenida como muestra (Viveros y col., 2017). Por cuestiones propias del manejo zootécnico de los establos, se realizó la valoración final de la eficacia clínica y bacteriológica del tratamiento 10 días después de la primera aplicación del preparado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete IBM ® SPSS ® Statistics Versión 25 Edición de 64 bits, 2017.

Para la evaluación *in vitro* de la eficacia del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre *S. aureus* productor de biopelícula se realizaron todos los experimentos por triplicado. Para cada experimento se calcularon los valores extremos no atípicos, percentiles 25 y 75 y la mediana.

En la evaluación de la actividad microbiana en los ensayos para inhibición de formación de biopelícula y degradación de biopelícula madura de 1 día se empleó como variable de respuesta el número de UFC/ml obtenido de cada grupo. Para la capacidad de inhibición de formación de biopelícula y de degradación de la biopelícula madura de 1 y 3 días se empleó como variable de respuesta la cantidad de biopelícula que se produjo en cada grupo. Se determinó mediante la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes la significancia estadística para la evaluación de la actividad microbiana en inhibición y degradación de biopelícula, así como para la capacidad de inhibición de formación de biopelícula con una $p < 0.05$ para considerar que existen diferencias significativas. La significancia estadística para la capacidad de degradación de biopelícula madura de 1 y 3 días se determinó mediante la prueba de comparaciones múltiples con el método de Tukey con una $p < 0.05$ para considerar que existen diferencias significativas entre los grupos.

Para la evaluación *in vivo* de la eficacia del preparado Enro-C/DMSO/chitosán en casos de mastitis bovina crónica provocados por *S. aureus* productor de biopelícula se consideró como unidad experimental a los 15 bovinos del establo de Chipilo, Puebla, considerando como unidad de observación las glándulas mamarias funcionales que presentaron inflamación crónica con base en los criterios de inclusión establecidos. Los casos

procesados se dividieron de forma aleatoria en dos grupos de acuerdo con el fármaco aplicado. Para el grupo tratado con Enro-C/DMSO/chitosán se incluyeron 20 glándulas mamarias y para el grupo tratado con Enro-C/DMSO se incluyeron 24 glándulas mamarias.

Considerando los datos recabados y que se tienen dos variables dicotómicas de respuesta, el estado clínico final de la glándula (eficacia clínica con dos valores 1 = cura clínica y 0 = falla clínica) y la eficacia bacteriológica de la muestra de leche obtenida (con dos valores 1 = cura bacteriológica y 0 = falla bacteriológica) primero se realizó un análisis de concordancia empleando el coeficiente de contingencia para verificar si en la respuesta del tratamiento en el conjunto de datos total y entre cada uno de los preparados empleados concuerdan la cura clínica con la cura bacteriológica, así como la falla clínica con la falla bacteriológica.

Para determinar la eficacia clínica y bacteriológica de los casos tratados entre ambos preparados administrados se consideraron como variables el preparado intramamario administrado, la eficacia clínica y la eficacia bacteriológica obtenida en cada grupo, por lo que para establecer la significancia estadística de los resultados se empleó una χ^2 de Pearson y en aquellos grupos donde $n < 5$ se consideró la razón de verosimilitud, con una $p < 0.05$ para considerar que existen diferencias significativas entre los grupos.

Respecto a la valoración del efecto del fármaco sobre el agente etiológico causal de la mastitis con base en su capacidad de producción de biopelícula, se consideraron como variables el preparado intramamario administrado, la clasificación de la cepa aislada con base en su capacidad de producir biopelícula y la eficacia bacteriológica registrada por lo que para establecer la significancia estadística de los resultados se empleó una χ^2 de Pearson y en aquellos grupos donde $n < 5$ se consideró la razón de verosimilitud, con una $p < 0.05$ para considerar que existen diferencias significativas entre los grupos.

RESULTADOS

Evaluación clínica de la ubre y prueba de California para mastitis

Dentro de la evaluación clínica que se realizó a los bovinos incluidos en el estudio, se consideró un examen físico general y la evaluación de la conformación e integridad de la ubre, así como la valoración de las características organolépticas de la leche obtenida de cada cuarto, los resultados de dicha evaluación clínica se observan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Evaluación clínica de la ubre y prueba de California en los bovinos con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.

Nº vaca	Descripción clínica	Prueba de California			
		CAI*	CAD*	CPI*	CPD*
381	Temperatura corporal de 37.9 ° C, 29 rpm, 45 lpm, TLLC 2 seg y 2 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre firme, secreción amarilla sin cambios organolépticos aparentes en CAI, CPI y CPD, presencia de tolondrones en la leche obtenida del CAD y mastitis sin dolor.	Traza	Traza	Traza	1
337	Temperatura corporal de 37.8 °C, 22 rpm, 50 lpm, TLLC 2 seg y 2 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre endurecida, secreción amarillenta con tolondrones pequeños en la leche obtenida de todos los cuartos y mastitis con dolor.	2	2	2	2
76	Temperatura corporal de 37 °C, 25 rpm, 53 lpm, TLLC 2 seg y 3 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre firme, secreción mamaria hemorrágica obtenida de todos los cuartos y mastitis sin dolor.	3	Ciego	3	3
216	Temperatura corporal de 37.9 °C, 32 rpm, 52 lpm, TLLC 2 seg y 2 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre endurecida, secreción amarilla sin cambios organolépticos aparentes en todos los cuartos y mastitis con dolor.	Traza	Traza	Traza	Traza

16	Temperatura corporal de 38.6 °C, 37 rpm, 51 lpm, TLLC 2 seg y 3 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre endurecida, secreción mamaria con tolondrones medianos en CAI, CAD y CPD, secreción amarilla sin tolondrones en CPI.	3	3	2	3
364	Temperatura corporal de 38.7 °C, 32 rpm, 69 lpm, TLLC 2 seg y 3 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre endurecida, secreción mamaria hemorrágica en todos los cuartos con mastitis sin dolor.	3	3	3	3
277	Temperatura corporal de 38.2 °C, 30 rpm, 55 lpm, TLLC 2 seg y 2 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre firme, secreción mamaria sin cambios organolépticos aparentes en todos los cuartos funcionales, mastitis con dolor.	1	Ciego	Traza	Traza
352	Temperatura corporal de 37.9 °C, 36 rpm, 61 lpm, TLLC 2 seg y 2 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre endurecida, secreción mamaria con presencia de tolondrones y mastitis con dolor	2	3	2	2
175	Temperatura corporal de 39 °C, 29 rpm, 62 lpm, TLLC 2 seg y 4 movimientos ruminales cada 2 minutos. Ubre endurecida, secreción purulenta en CAD, CPI y CPD y mastitis sin dolor.	Negativo	1	Traza	2
531	Temperatura corporal de 38.3 °C, constantes fisiológicas normales. Ubre endurecida, la leche del CAI y CPD se observó blanca con pequeños tolondrones amarillos. La leche del CAD y CPI se observó sin cambios organolépticos aparentes.	3	N	N	3
135	Temperatura corporal de 38.6 °C, constantes fisiológicas normales. Los cuartos izquierdos presentaron una consistencia normal a la palpación y la leche obtenida de ellos no presentó cambios organolépticos perceptibles, mientras que los cuartos derechos se palparon endurecidos con secreción blanca presentó coágulos grandes color amarillo.	N	3	N	3

75	Temperatura corporal de 38.9 ° C, constantes fisiológicas normales. Todos los cuartos se palparon endurecidos y presentaron leche color amarilla.	2	T	1	3
15	Temperatura corporal de 38.0 ° C, constantes fisiológicas normales. Los cuartos CAI, CAD y CPI se palparon endurecidos y presentaron leche blanca con suero y tolondrones grandes. El CPD presentó a la palpación consistencia normal y las características organolépticas de la leche no cambiaron.	3	3	3	N
48	Temperatura corporal de 38.1 ° C, constantes fisiológicas normales. Los CAI, CAD y CPD presentaron a la palpación consistencia normal y las características organolépticas de la leche no cambiaron. Solo el CPI se palpó endurecido y la leche obtenida era blanca con tolondrones pequeños amarillos.	N	N	3	N
478	Temperatura corporal de 38.3 ° C, constantes fisiológicas normales. Los CAI, CPI y CPD se palparon endurecidos con leche blanca con tolondrones pequeños amarillos. El CAD presentó una consistencia normal a la palpación y no presentó cambios organolépticos en la leche.	3	N	2	3

*CAI: cuarto anterior izquierdo. CAD: cuarto anterior derecho. CPI: cuarto posterior izquierdo. CPD: cuarto posterior derecho.

De los 15 bovinos lecheros que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos para caracterizar el proceso inflamatorio como crónico, 13 presentaron todos los cuartos funcionales y 2 presentaron 1 cuarto ciego. Se evaluaron todos los cuartos mamarios funcionales (58 en total) a través de la prueba de California, con la cual se estableció que 15% (9/58) se clasificaron como Negativo, 21% (12/58) se clasificaron como Trazas, 7% (4/58) se clasificaron como Grado 1, 19% (11/58) se clasificaron como Grado 2 y 38% (22/58) se clasificaron como Grado 3 (Véase Figura 7).

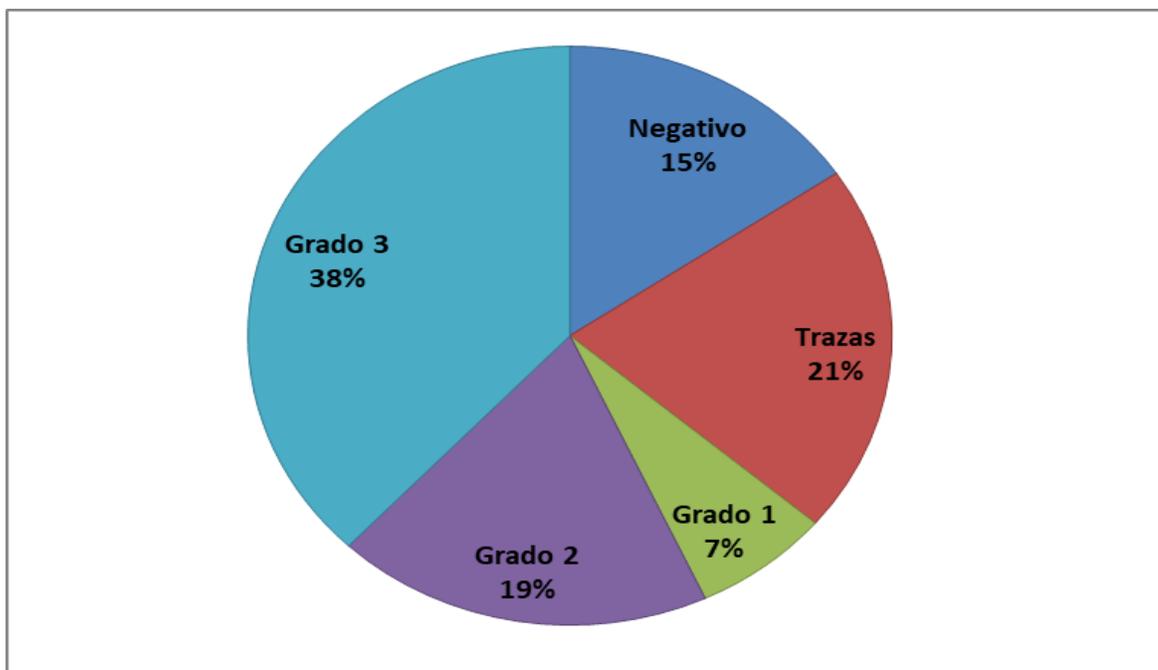


Figura 7. Distribución de los cuartos mamarios evaluados con base en la estimación del conteo de células somáticas a través de la prueba de California para mastitis en Chipilo, Puebla.

Identificación bacteriológica por género y especie

Con base en los resultados de las pruebas realizadas a las 49 muestras procesadas, 57% (28/49) pertenecen al género *Staphylococcus* spp, 25% (12/49) pertenecen al género *Streptococcus* spp, 8% de las muestras (4/49) presentaron una infección mixta (*Staphylococcus* spp coagulasa (-) con *S. agalactiae*) y el 10% de las muestras procesadas (5/49) no mostraron crecimiento bacteriano (Véase Figura 8).

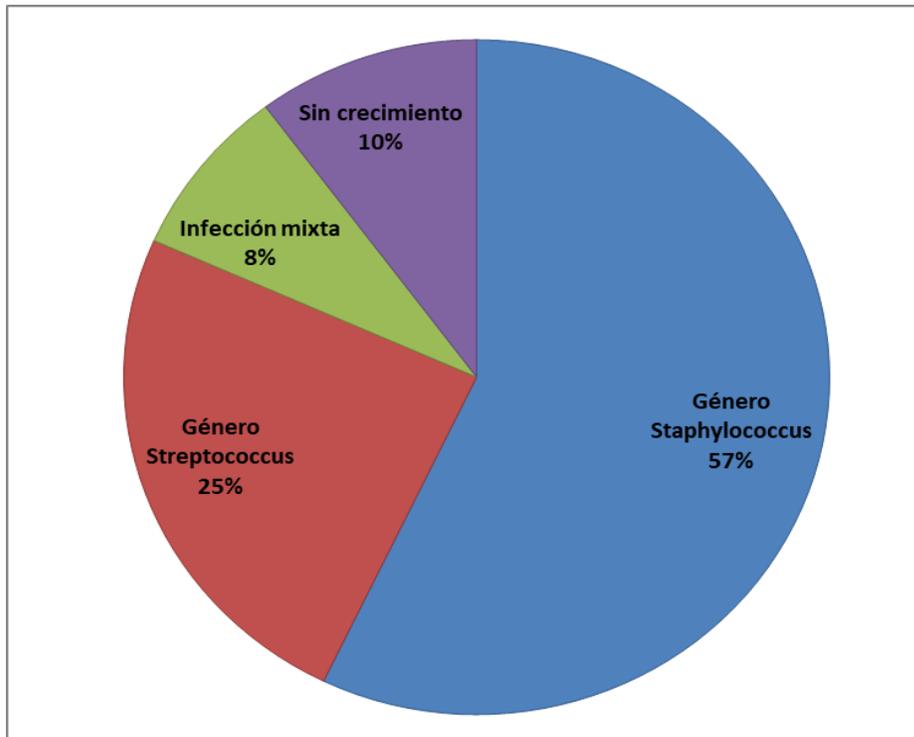


Figura 8. Distribución de las etiologías de los casos clínicos de vacas con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.

De las 28 muestras en las que se identificaron bacterias del género *Staphylococcus* spp, 50% (14/28) fueron positivas a *S. aureus*, 46% (13/28) corresponden a *Staphylococcus* spp coagulasa (-) y solo el 4% (1/28) se identificó *S. pseudintermedius* (Véase Figura 9), mientras que de las 12 muestras en las que se identificaron bacterias del género *Streptococcus* spp, 66% (8/12) fueron positivas a *S. uberis* y 33% (4/12) corresponden a *S. agalactiae* (Véase Figura 10).

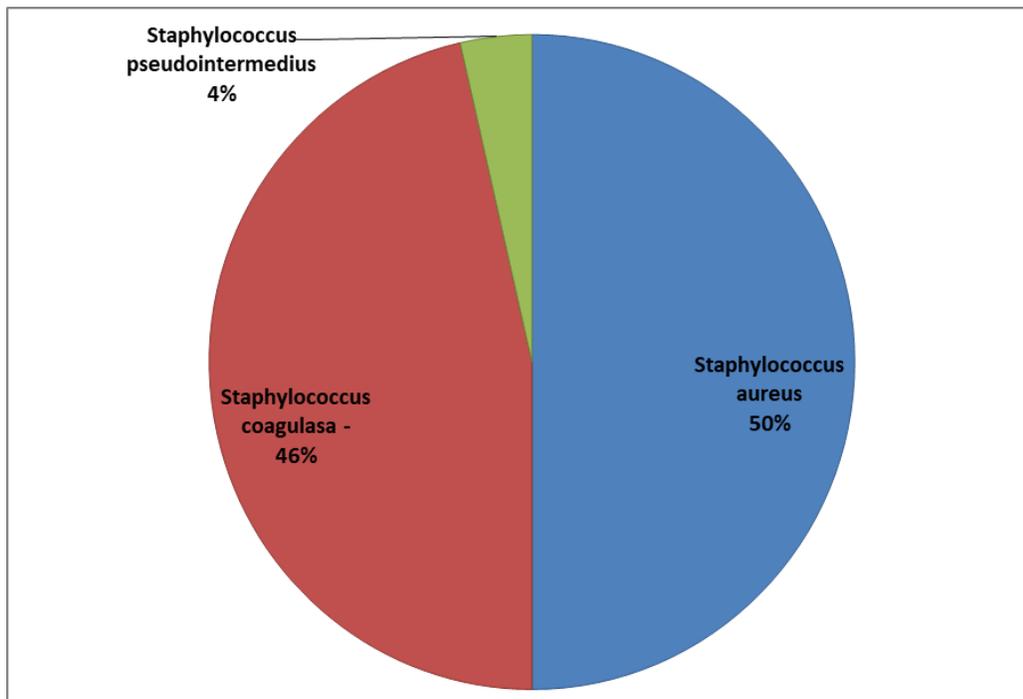


Figura 9. Distribución de bacterias del género *Staphylococcus* spp de los casos clínicos de vacas con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.

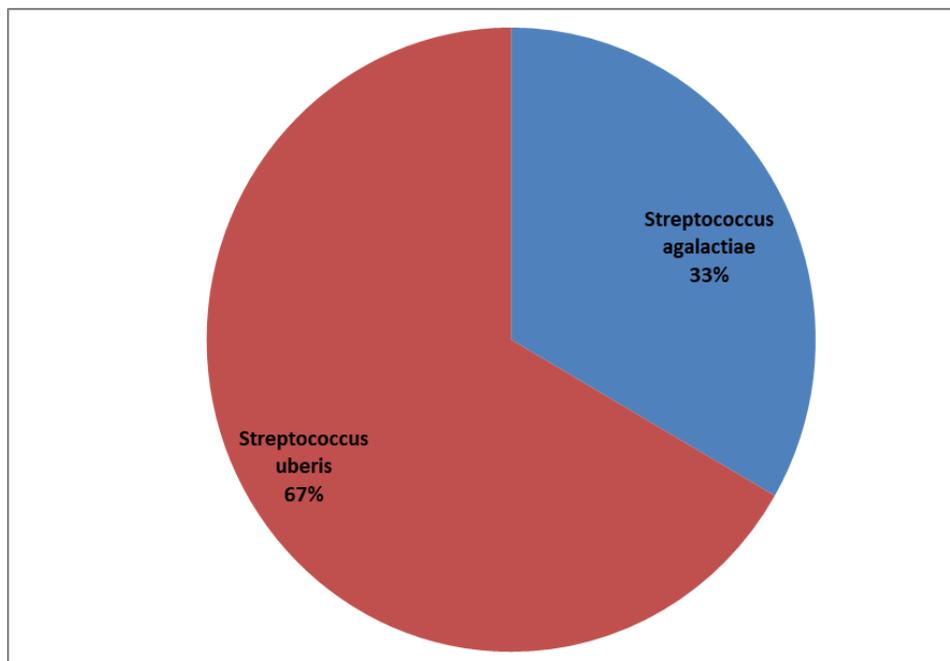


Figura 10. Distribución de bacterias del género *Streptococcus* spp de los casos clínicos de vacas con mastitis crónica en Chipilo, Puebla.

Determinación fenotípica cualitativa de las cepas productoras de biopelícula.

De acuerdo con lo obtenido en esta prueba, el 100% (14/14) de las cepas positivas a *S. aureus* se clasificaron como productoras de biopelícula, mientras que de las 13 muestras que pertenecen a *Staphylococcus* spp coagulasa (-), el 77% (10/13) se clasificaron como productoras de biopelícula y el 23% (3/13) como no productoras de biopelícula, de igual forma la cepa que se identificó como *S. pseudointermedius* se clasificó como no productora (Véase Figura 11). Por otro lado, de las 8 cepas que se identificaron como *S. uberis*, el 37.5% (3/8) se clasificaron como productoras de biopelícula y el 62.5% (5/8) como no productoras de biopelícula, mientras que el 100% (4/4) de las cepas identificadas como *S. agalactiae* fueron productoras de biopelícula (Véase Figura 11).

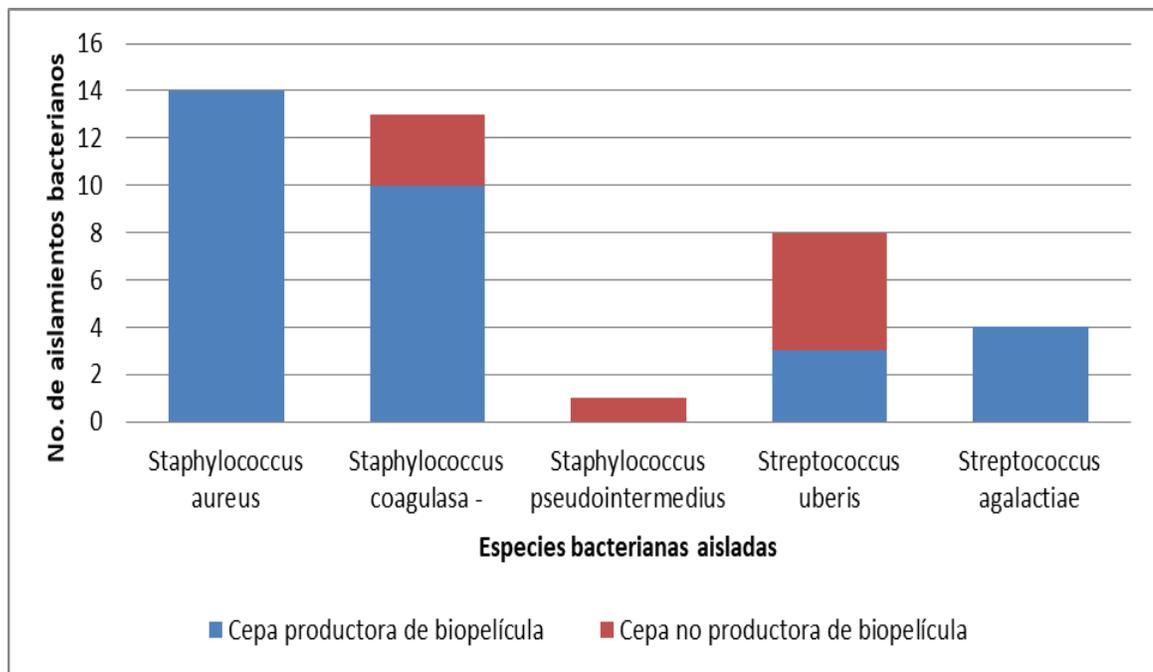


Figura 11. Clasificación de cepas productoras y no productoras de biopelícula con base en resultados obtenidos del Agar Rojo Congo modificado, en aislamientos de casos de mastitis crónica en bovinos lecheros de Chipilo, Puebla.

Determinación fenotípica cuantitativa de las cepas productoras de biopelícula.

La técnica de formación de biopelícula en placa modificada se realizó sólo en las cepas del género *Staphylococcus* spp. De las 14 muestras positivas a *S. aureus* el 7.14% (1/14) se consideró como no productora, 50% (7/14) se consideraron como bajas productoras, 21.42% (3/14) como moderadas productoras y 21.42% (3/14) como altas productoras; mientras que de las 11 muestras positivas a *Staphylococcus* spp coagulasa (-) el 63.63% (7/13) se consideraron como no productoras, 18.18% (2/13) como bajas productoras, 9.09% (2/13) como moderada productora y 9.09% (2/13) como alta productora, mientras que la cepa clasificada como *S. pseudointermedius* se consideró como no productora de biopelícula (Véase Figura 12).

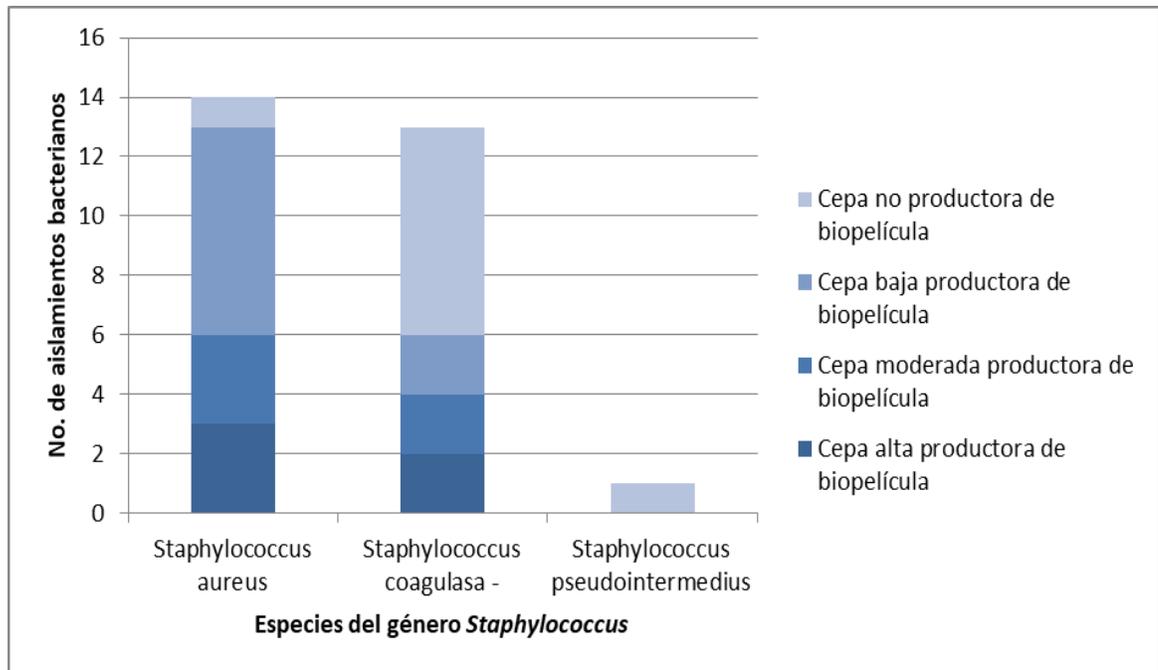


Figura 12. Cepas del género *Staphylococcus* spp clasificadas como altas, moderadas, bajas y no productoras de biopelícula con base en la prueba cuantitativa de micro titulación de biopelícula en placa modificada.

Identificación genotípica de las cepas productoras de biopelícula.

La determinación de los genes *icaA* e *icaD* que intervienen en la producción de biopelícula se realizó para las cepas del género *Staphylococcus* spp provenientes de los casos de mastitis crónica en bovinos de Chipilo, Puebla a través de la realización de PCR multiplex y posteriormente una electroforesis en gel de agarosa al 2%. En la Figura 13 se observa un gel de agarosa con los resultados obtenidos de una cepa de *S. aureus* con ambos genes, una cepa de *Staphylococcus aureus* sin ambos genes, *Staphylococcus* spp coagulasa (-) con ambos genes, una cepa de *Staphylococcus* spp coagulasa (-) sin ambos genes y como controles de la prueba se anexan la cepa *S. aureus* Cowan como control (+) a la presencia de los dos genes, *Escherichia coli* como control (-) a la presencia de ambos genes y el producto de una PCR sin DNA como control negativo de reacción.

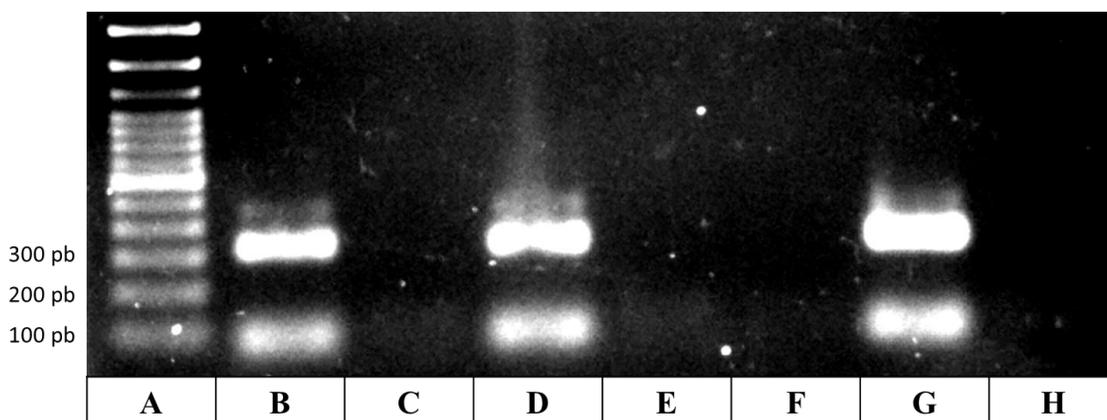


Figura 13. Detección por PCR multiplex en gel de agarosa al 2% de genes bacterianos *icaA* (321 pb) e *icaD* (78 pb) asociados a la producción de biopelícula de *S. aureus* aislados de leche de vaca con mastitis crónica. A: Marcador de Peso Molecular 100 pb; B: DNA de *S. aureus*: genes *icaA* e *icaD*; C: DNA de *S. aureus*: negativo; D: DNA de *Staphylococcus* spp coagulasa (-): genes *icaA* e *icaD*; E: DNA de *Staphylococcus* spp coagulasa (-): negativo; F: DNA de *E. coli*: control negativo; G: DNA de *S. aureus* Cowan: control positivo genes *icaA* e *icaD*; H: sin DNA: control negativo.

De acuerdo con lo obtenido en las PCR realizadas, de las 14 muestras positivas a *S. aureus*, el 86% (12/14) presentaron ambos genes mientras que el 14% restante (2/14) no los presentaron. Por el contrario, de las 13 muestras que pertenecen a *Staphylococcus* spp coagulasa (-), el 77% (10/13) no presentaron los genes y el 23% (3/13) presentó ambos genes. La cepa de *S. pseudointermedius* no presentó los genes (Véase Figura 14).

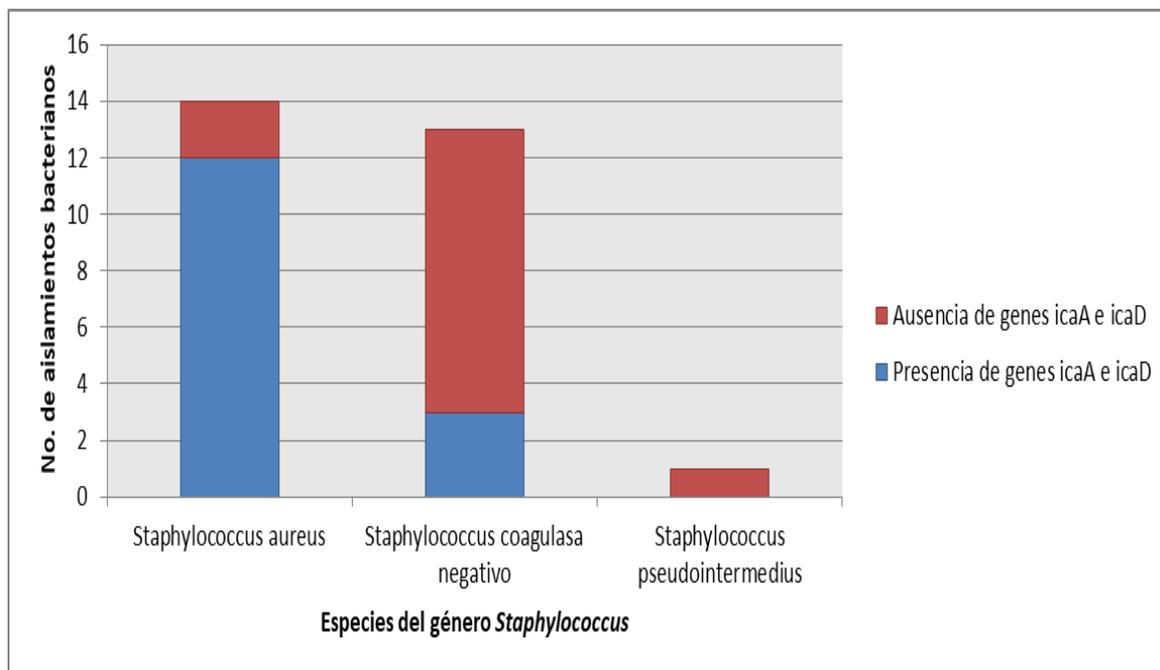


Figura 14. Cepas del género *Staphylococcus* spp obtenidas de Chipilo, Puebla, clasificadas con base en la presencia o ausencia de genes *icaA* e *icaD* para producción de biopelícula.

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano y de inhibición de la formación de biopelícula del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

Al exponer el inóculo inicial de *S. aureus* productor de biopelícula a las dos concentraciones de la suspensión de Enro-C/DMSO/chitosán que se probaron en este trabajo, se observó una disminución en la cantidad de UFC/ml tanto en bacterias de vida libre (planctónicas) como en bacterias contenidas en la biopelícula. En el caso del efecto del preparado intramamario sobre las bacterias planctónicas se observaron diferencias significativas entre las UFC/ml de los grupos experimentales con el grupo control ($p = 0.016$ para el efecto del fármaco de baja concentración y $p = 0.0001$ para el efecto del fármaco de media concentración). En el caso del efecto del preparado intramamario sobre las bacterias contenidas en la biopelícula se observaron diferencias significativas entre las

UFC/ml de los grupos experimentales y el porcentaje de UFC/ml obtenido del cultivo control al que no se le agregó el preparado es estadísticamente significativa ($p = 0.016$ para el efecto del fármaco de baja concentración y $p = 0.0001$ para el efecto del fármaco de media concentración). De igual forma, en ambos estilos de vida bacteriana se observó que existen diferencias significativas al comparar la cantidad de UFC/ml obtenidas en ambos grupos experimentales ($p = 0.016$ para ambos casos), demostrándose que cuando la biopelícula se encuentra en un estado de formación existe un efecto bactericida del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre bacterias planctónicas y bacterias contenidas al interior de la biocapa, siendo mejor el efecto a una mayor concentración de los componentes de la suspensión del preparado intramamario (Véase Cuadro 7 y Figura 15).

Cuadro 7. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de inhibición sobre la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Medianas de las UFC/ml obtenidas en cada tratamiento).

Dosis	Bacterias planctónicas	Bacterias contenidas en la biopelícula
Sin fármaco	1.8 x 10 ⁸ a	2.5 x 10 ¹¹ A
Fármaco con baja concentración	4.1 x 10 ⁵ b	6.4 x 10 ⁷ B
Fármaco con media concentración	4 x 10 ⁴ c	2.5 x 10 ⁶ C

Literales minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias planctónicas ($p < 0.05$). Literales mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias contenidas en la biopelícula ($p < 0.05$).

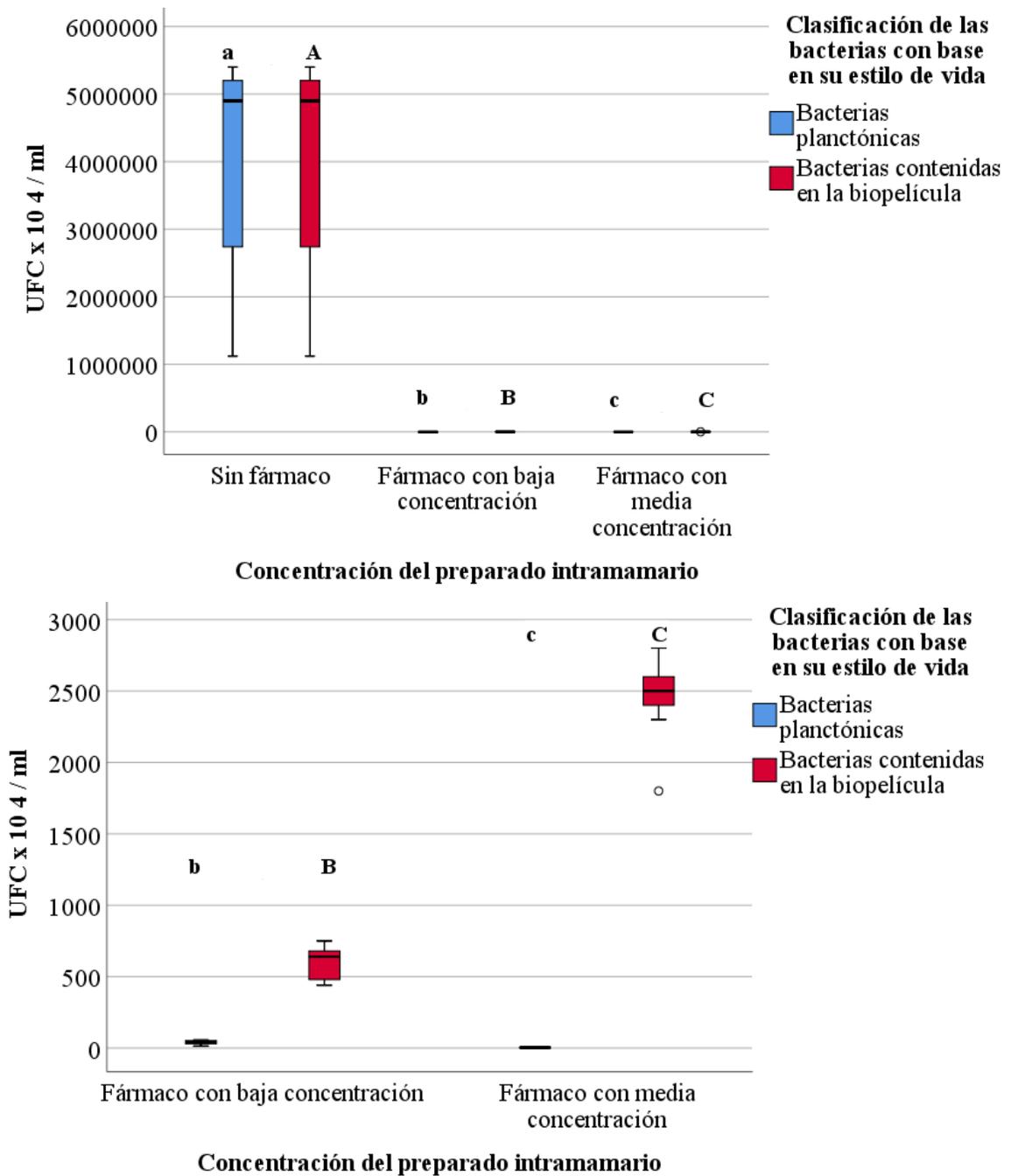


Figura 15. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de inhibición sobre la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. Los resultados mostrados a través de los diagramas de caja representan los valores extremos no atípicos, percentiles 25 y 75 y la mediana de tres experimentos independientes. Literales minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias planctónicas ($p < 0.05$). Literales mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias contenidas en la biopelícula ($p < 0.05$).

Como se muestra en la Figura 16, la reducción de la biopelícula que se logró en las dos concentraciones de la suspensión de Enro-C/DMSO/chitosán probadas en este trabajo fue estadísticamente significativa ($p = 0.003$ para el efecto inhibitorio del fármaco de baja concentración y $p = 0.002$ para el efecto inhibitorio del fármaco de media concentración), por lo que se puede inferir que la capacidad que tiene el preparado para inhibir el crecimiento bacteriano de *S. aureus* productor de biopelícula favorece la inhibición de la formación de biopelícula en el fondo de los pocillos. Al hacer la comparación entre ambos grupos experimentales se observan diferencias no significativas ($p = 1.000$).

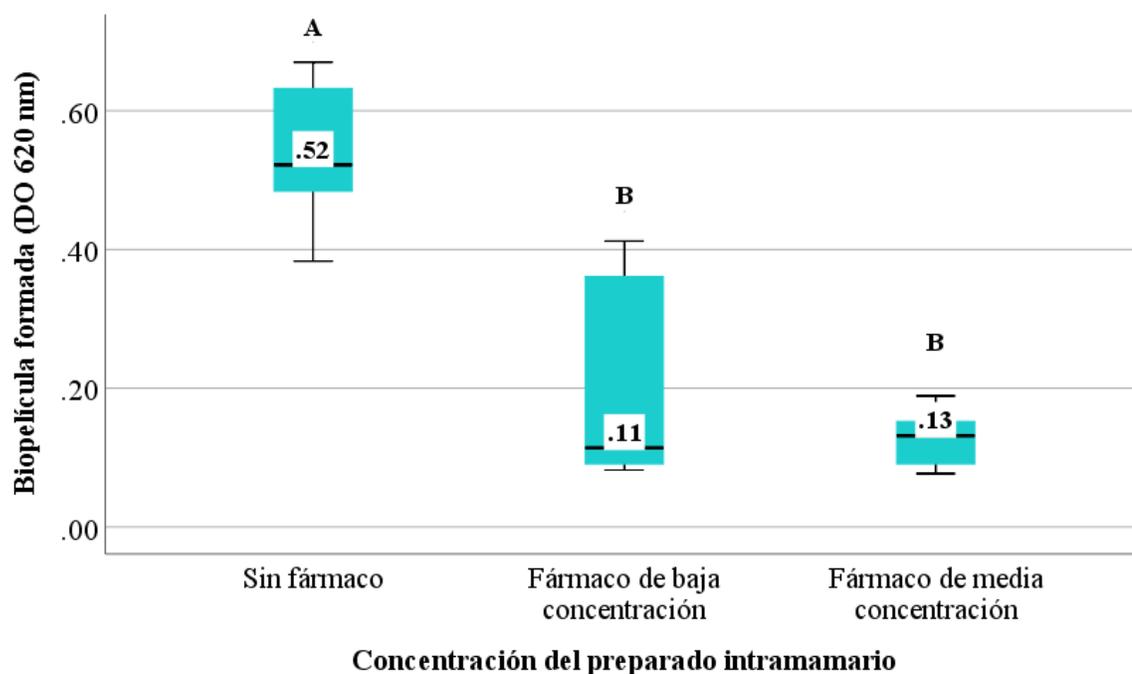


Figura 16. Efecto de inhibición del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán sobre la formación de biopelícula en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. Los resultados mostrados a través del diagrama de caja representan los valores extremos no atípicos, percentiles 25 y 75 y la mediana de tres experimentos independientes. Literales mayúsculas diferentes implican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$).

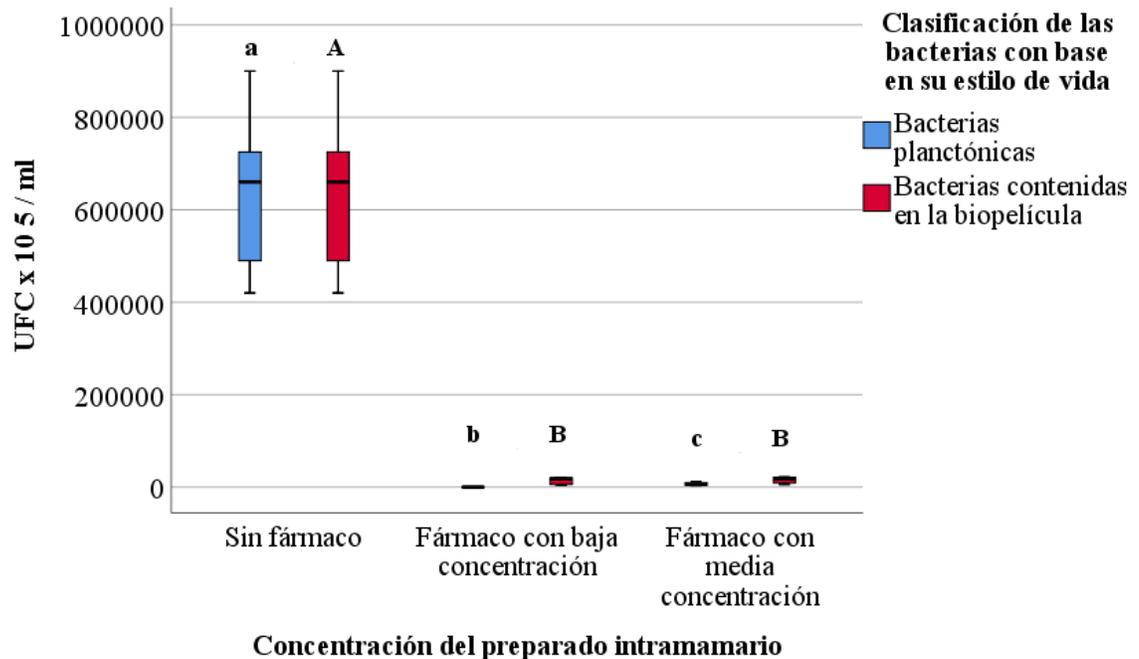
Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano y de degradación de la biopelícula madura del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

Al incubar el inóculo inicial de *S. aureus* productor de biopelícula a 37 ° C por 24 h y posteriormente enfrentar los cultivos a ambas concentraciones de la suspensión de Enro-C/DMSO/chitosán que se probaron en este trabajo por 24 h más a 37 ° C (correspondiente a 1 día de tratamiento), se observó una menor cantidad de UFC/ml tanto en bacterias de vida libre (planctónicas) como en bacterias contenidas en la biopelícula. En el caso del efecto del preparado intramamario sobre las bacterias planctónicas se observó que la diferencia entre las UFC/ml de los grupos experimentales y el porcentaje de UFC/ml obtenido del cultivo control al que no se le agregó el preparado es estadísticamente significativa ($p = 0.016$ para el efecto del fármaco de baja concentración y $p = 0.0001$ para el efecto del fármaco de media concentración). En el caso del efecto del preparado intramamario sobre las bacterias contenidas en la biopelícula se observó que la diferencia entre las UFC/ml de los grupos experimentales y el porcentaje de UFC/ml obtenido del cultivo control al que no se le agregó el preparado es estadísticamente significativa ($p = 0.0001$ para ambos casos), por lo que se puede inferir que el preparado tienen un buen efecto antimicrobiano contra *S. aureus* productor de biopelícula de vida libre y contenido en la matriz de exopolisacáridos madura de 1 día de desarrollo. Al comparar ambos grupos experimentales se observó que para el estilo de vida planctónico existen diferencias significativas entre ambas concentraciones del fármaco empleadas ($p = 0.016$), sin embargo al comparar el efecto de los grupos experimentales en las bacterias contenidas en la biocapa no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 1.000$), demostrándose que cuando la biopelícula se encuentra en un estado de formación existe un efecto bactericida del preparado Enro-C/DMSO/chitosan sobre bacterias planctónicas y bacterias contenidas al interior de la biocapa, aunque el efecto sobre bacterias dentro de la biocapa no mejora al aumentar la concentración de los componentes de la suspensión del preparado intramamario (Véase Cuadro 8 y Figura 17).

Cuadro 8. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de degradación sobre la biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Medianas de las UFC/ml obtenidas en cada tratamiento).

Dosis	Bacterias planctónicas	Bacterias contenidas en la biopelícula
Sin fármaco	1.3×10^{11} a	1.8×10^{12} A
Fármaco con baja concentración	6.7×10^8 b	1.8×10^9 B
Fármaco con media concentración	5.4×10^6 c	1.7×10^9 B

Literales minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias planctónicas ($p < 0.05$). Literales mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias contenidas en la biopelícula ($p < 0.05$).



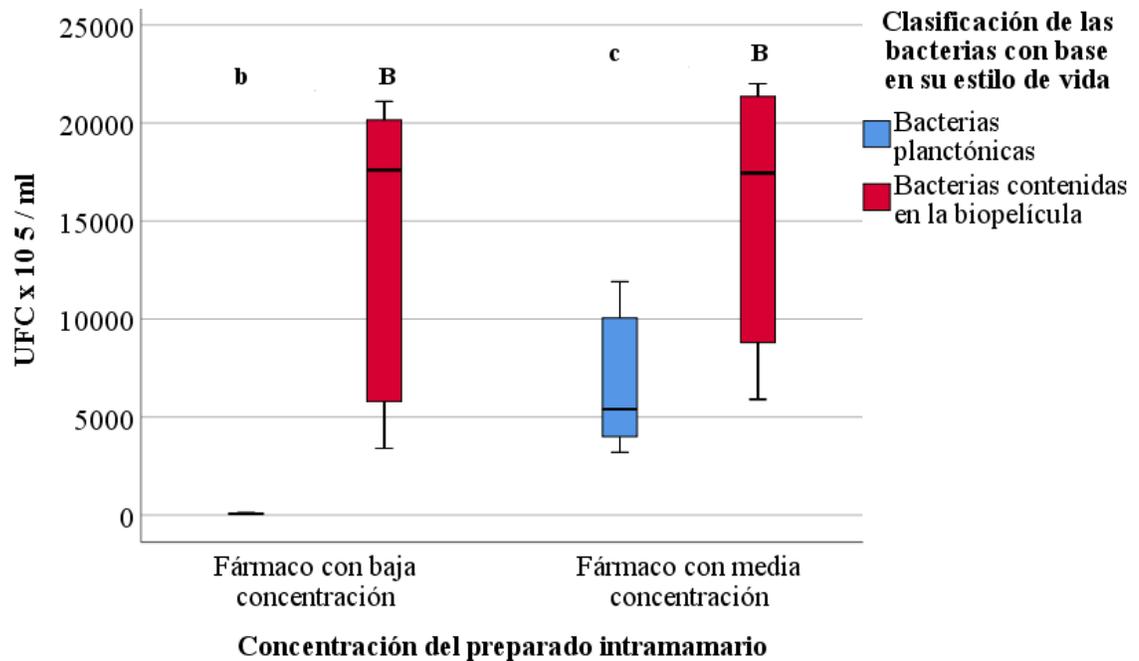


Figura 17. Actividad antibacteriana del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán observada en el ensayo de efecto de degradación de biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. Los resultados mostrados a través de los diagramas de caja representan los valores extremos no atípicos, percentiles 25 y 75 y la mediana de tres experimentos independientes. Literales minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias planctónicas ($P < 0.05$). Literales mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de bacterias contenidas en la biopelícula ($P < 0.05$).

Al observar la Figura 18 se puede notar que la reducción de la biopelícula se logró en las dos concentraciones de la suspensión de Enro-C/DMSO/chitosán probadas en este trabajo ($p = 0.008$ para el fármaco de baja concentración y $p = 0.0001$ para el fármaco de media concentración), por lo que se puede inferir que el preparado intramamario a una concentración baja y media de sus componentes tiene la capacidad de degradar la biopelícula madura de un día formada por *S. aureus* en el fondo de los pocillos. También es posible observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la DO de biopelícula formada obtenidas en ambos grupos experimentales ($p = 0.562$).

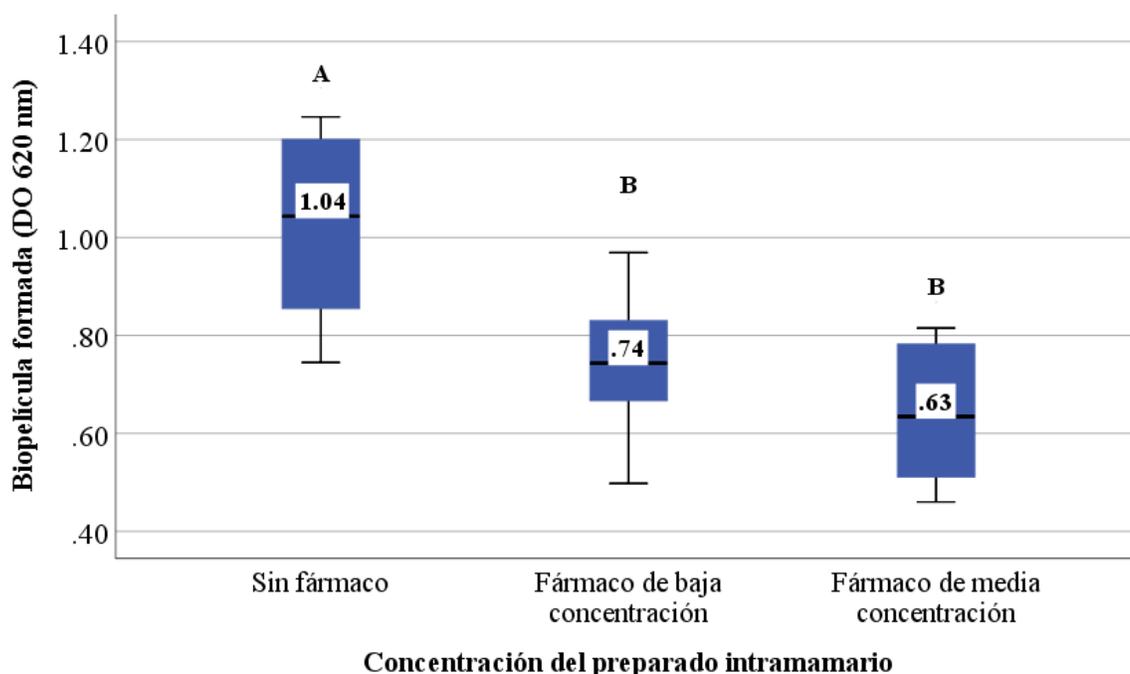


Figura 18. Efecto de degradación del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán sobre la biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (ensayo a 1 día). Los resultados mostrados a través de la gráfica de barras representan los valores extremos no atípicos, percentiles 25 y 75 y la mediana de tres experimentos independientes. Literales diferentes implican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$).

Al incubar el inóculo inicial de *S. aureus* productor de biopelícula a 37 ° C por 24 h y posteriormente enfrentar los cultivos a tres concentraciones diferentes de la suspensión de Enro-C/DMSO/chitosán por 24 h más a 37 ° C (correspondiente a 1 día de tratamiento), repitiendo la dosis del tratamiento en cada pocillo y volviendo a incubar la placa durante tres días seguidos, se observó que la reducción de la biopelícula se logró en las tres concentraciones de la suspensión de Enro-C/DMSO/chitosán probadas en esta parte del trabajo, siendo significativo el resultado solo en la concentración media y alta del preparado ($p = 0.05$ y 0.003 , respectivamente), mas no así con la concentración baja ($p = 0.812$), por lo que se puede inferir que el preparado intramamario a una media y alta de sus componentes, siendo administrado por tres días seguidos tiene la capacidad de degradar la biopelícula madura de tres días que fue formada por *S. aureus* en el fondo de los pocillos. También es posible observar diferencias entre las medias de los porcentajes de biopelícula

formada obtenidas en los tres grupos experimentales, sin embargo, estas diferencias sólo resultaron estadísticamente significativas entre la exposición del cultivo al preparado de concentración baja y alta ($p = 0.035$), por lo que se infiere que la concentración más alta probada en el presente estudio funciona mejor para la degradación de la biopelícula madura de tres días (Véase Figura 19).

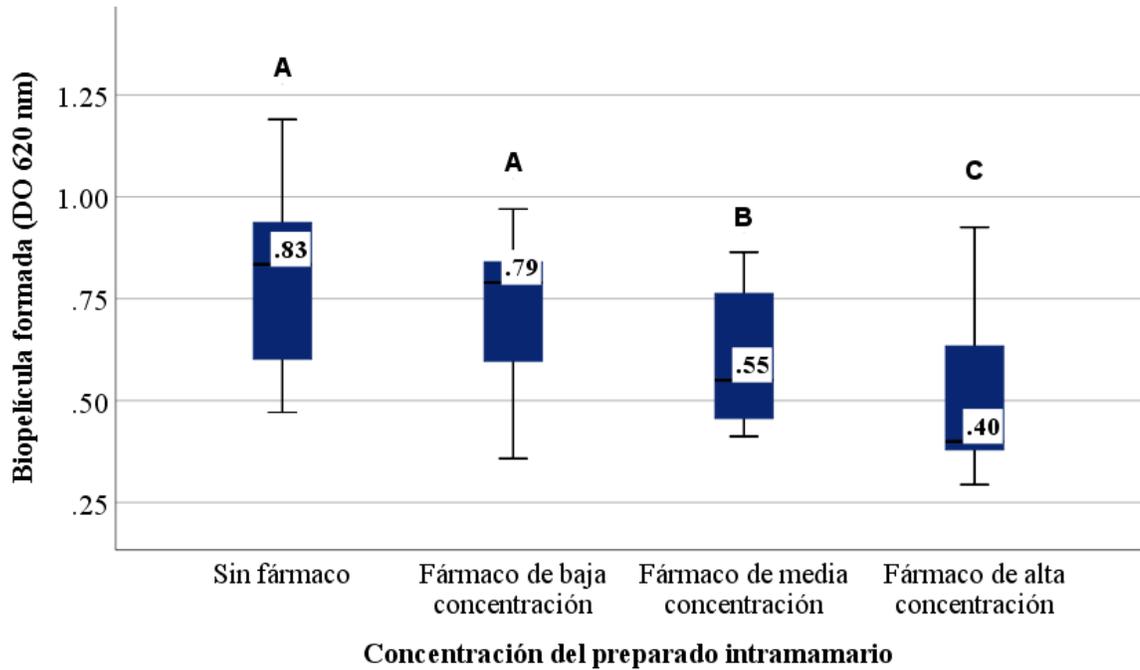


Figura 19. Efecto de degradación del preparado intramamario Enro-C/DMSO/chitosán sobre la biopelícula madura en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (ensayo a 3 días). Los resultados mostrados a través del diagrama de caja representan los valores extremos no atípicos, percentiles 25 y 75 y la mediana de tres experimentos independientes. Literales mayúsculas diferentes indican diferencias significativas de los grupos experimentales con el grupo control (sin fármaco) ($P < 0.05$).

Evaluación *in vivo* del efecto antibacteriano del preparado Enro-C/DMSO/chitosán sobre *Staphylococcus aureus* productor de biopelícula

Al cumplirse diez días de la primera aplicación del producto, se realizó una evaluación general de la conformación de las glándulas mamarias en las vacas tratadas y se evaluaron las características organolépticas de la leche proveniente de estas. Para la valoración de la eficacia clínica y bacteriológica se consideró el diagnóstico inicial por género y en el caso de las bacterias del género *Staphylococcus* spp se consideró la capacidad de producción de biopelícula. En el análisis de concordancia que se realizó se encontró que la relación es débil (coeficiente de contingencia = 0.302).

De manera general se puede decir que en ambos tratamientos se observó una mejora de las características organolépticas de la leche. Las muestras de leche de todos los cuartos tratados con el preparado experimental se observaron blancas y sin tolondrones (eficacia clínica del 100%), aunque solo en el 80% de estas hubo eficacia bacteriológica, mientras que en el 20% restante solo se logró disminuir la cantidad de UFC/ml de las muestras de leche procesadas. Por otro lado, de los 24 cuartos tratados con el preparado control, en el 41.7% de las muestras se logró cura clínica y bacteriológica, el 25% de las muestras presentaron falla clínica y bacteriológica, en el 20.8% no se mejoraron las características organolépticas de la leche, pero si hubo cura bacteriológica total y en el 12.5% de las muestras restantes hubo cura clínica con disminución en el número de Unidades Formadoras de Colonias comparado con lo observado en los primo aislamientos realizados ($p > 0.05$) (Véase Cuadro 9). Como se puede observar, los resultados presentados no son estadísticamente significativos, por lo que se realizó una simulación Monte Carlo con base en los porcentajes de eficacia obtenidos para determinar la cantidad de cuartos mamarios necesarios para lograr la significancia estadística, obteniendo como resultado que se requiere un mínimo total de 30 glándulas mamarias por cada tratamiento empleado para obtener diferencias significativas.

Referente a la eficacia bacteriológica de los preparados con base en la capacidad de producción de biopelícula por parte de las bacterias aisladas se observó que en los

aislamientos positivos a *Streptococcus* spp y *Staphylococcus* spp moderado productor de biopelícula la cura bacteriológica es una constante, teniendo un mejor porcentaje de eficacia en el caso de *Streptococcus* spp con el preparado control y un mejor porcentaje de eficacia en el caso de *Staphylococcus* spp moderado productor de biopelícula con el preparado experimental. En los aislamientos positivos a *Staphylococcus* spp bajo productor de biopelícula se observó un 22.2% de cura bacteriológica en el preparado experimental, 33.3% de cura bacteriológica en el preparado control, hubo falla bacteriológica del 44.4% en el preparado control ($p > 0.05$). Para los aislamientos positivos a *Staphylococcus* spp alto productor de biopelícula la eficacia bacteriológica del preparado experimental fue superior (40%) en comparación con el preparado control (20%), sin embargo, en el caso de la falla bacteriológica se obtuvo el mismo porcentaje en ambos tratamientos (20%) ($p > 0.05$). En el caso de las infecciones mixtas que se registraron en el estudio la falla bacteriológica se presentó en los casos tratados con el preparado experimental (50%), mientras que la eficacia bacteriológica fue del 25% en ambos tratamientos aplicados ($p > 0.05$) (Véase Cuadro 10). Los resultados observados no son estadísticamente significativos, por lo que se realizó una simulación Monte Carlo con base en los porcentajes de eficacia bacteriológica obtenidos para determinar la cantidad de cuartos mamarios necesarios para obtener significancia estadística. Se requiere un mínimo total de 20 glándulas mamarias por cada factor de agente etiológico causal de la mastitis con base en su capacidad de producción de biopelícula para lograr la obtención de diferencias significativas.

Cuadro 9. Eficacia clínica y bacteriológica del preparado Enro-C/DMSO/chitosán en comparación con Enro-C/DMSO para casos de mastitis bovina crónica en Chipilo, Puebla.

	Eficacia	Cura bacteriológica	Falla bacteriológica	Total	P Razón de verosimilitud
Enro-C/DMSO/chitosán	Cura clínica	80%	20%	100% (20 GM)	--
Enro-C/DMSO	Cura clínica	41.7%	12.5%	100% (24 GM)	0.110
	Falla clínica	20.8%	25%		

Cuadro 10. Eficacia del preparado Enro-C/DMSO/chitosán en comparación con Enro-C/DMSO sobre bacterias productoras y no productoras de biopelícula obtenidas de casos de mastitis bovina crónica en Chipilo, Puebla.

Bacteria aislada	Eficacia bacteriológica	Preparado		Total	P
		Enro-C/DMSO/chitosán	Enro-C/DMSO		Razón de verosimilitud
<i>Streptococcus</i>	Cura	41.7%	58.3%	100% (12 GM)	--
<i>Staphylococcus</i> no productor de biopelícula	Cura	33.3%	11.1%	100% (9 GM)	0.091
	Falla	11.1%	44.4%		
<i>Staphylococcus</i> bajo productor de biopelícula	Cura	22.2%	33.3%	100% (9 GM)	0.094
	Falla	0.0%	44.4%		
<i>Staphylococcus</i> moderado productor de biopelícula	Cura	60.0%	40.0%	100% (5 GM)	--
<i>Staphylococcus</i> alto productor de biopelícula	Cura	40.0%	20.0%	100% (5 GM)	0.710
	Falla	20.0%	20.0%		
Infección mixta	Cura	25.0%	25.0%	100% (4 GM)	0.189
	Falla	50.0%	0.0%		
Total	Cura	36.4%	34.1%	100% (44 GM)	0.200
	Falla	9.1%	20.5%		

DISCUSIÓN

La hipótesis que se estableció para este estudio fue que al combinar agentes anti-biopelícula como el quitosán con un antimicrobiano de probada eficacia como la Enro-C y un vehículo como el DMSO que además de proporcionar a los componentes una mejor difusión tisular también posee propiedades anti-biopelícula (Yahya y Karsani, 2018; Hoang y *col.*, 2021), se podría lograr un efecto anti-biopelícula, tanto en el proceso de formación como en la degradación de esta, y de magnitud cuantificable *in vitro*. A su vez, se postuló la posibilidad de que se aumentara la eficacia del antimicrobiano a nivel clínico, en casos de mastitis bovina crónica en la que se hubiera demostrado que era causada por patógenos formadores de biopelícula. Es importante destacar que los agentes que se eligieron para el efecto anti-biopelícula ya han mostrado esta acción y se le considera repetible y confiable. Con base en lo mencionado por Khan y *col.* (2020), la propiedad anti-biopelícula del quitosán se explica por su naturaleza policatiónica de la estructura de este polímero. Se postula que sus cargas positivas debidas a los grupos amino (NH^{2+}) reaccionan de manera electrostática con componentes de la biopelícula como las proteínas exopoliméricas (EPS), otras proteínas e incluso con el ADN que tienen una carga negativa. Esta interacción inhibe el desarrollo de la biopelícula bacteriana. Además, Confederat y *col.* (2021) indican que el quitosán de bajo peso molecular tiene mejor solubilidad en agua y atraviesa la pared celular bacteriana e inhibe la síntesis de ARNm y la transcripción de ADN de manera más eficiente que quitosán de cadena larga. El quitosán es además capaz de quelar cationes metálicos y nutrientes esenciales para el crecimiento bacteriano. Por su parte, la elección del antimicrobiano se basó en que la enrofloxacin y particularmente la Enro-C (Miranda-Calderón y *col.*, 2014) son consideradas *zwitteriones* (compuesto químico eléctricamente neutro, pero que tiene cargas positivas y negativas sobre átomos diferentes). Esta propiedad da lugar a una buena distribución fuera del espacio plasmático cuando se le administra parenteralmente, pero dado que en este estudio la aplicación fue intramamaria, las concentraciones depositadas en la cisterna de la glándula son elevadas y se postula que puede difundir tanto al espacio intersticial donde se encontraría la biopelícula e incluso puede llegar a nivel intracelular (Sumano y Gutiérrez, 2015). Teniendo como enfoque

principal el efecto de la biopelícula en el establecimiento y persistencia de procesos inflamatorios infecciosos en bovinos, Horiuk y col. (2019) evaluaron el efecto de antimicrobianos en bacterias planctónicas y contenidas en la biopelícula. Observaron que existe una disminución del efecto antibacteriano de penicilinas, aminoglucósidos y macrólidos frente a bacterias contenidas en la biopelícula. En contraste, la exposición a enrofloxacin inactivó bacterias a este nivel, en particular del género *Streptococcus* spp y *Staphylococcus* spp. Más aún, cabe destacar que ya existe un producto comercial (Enromastic ®; Laboratorios Aranda S.A. de C.V.) y hay datos de su eficacia en la literatura en el tratamiento de mastitis clínica no complicada (Viveros y col., 2017), mastitis crónica (Martínez-Cortés y col., 2016) y mastitis por patógenos multi-resistentes (Alfonseca-Silva y col., 2021).

Para identificar la capacidad para producir biopelícula por parte de los patógenos aislados de mastitis consideradas crónicas en el hato, se eligió la técnica fenotípica cualitativa de cultivo en Agar Rojo Congo. En ella, se emplea al Rojo Congo que es un colorante diazótico, sal sódica del azoderivado y soluble en agua. Se le puede utilizar como indicador de pH, debido a un cambio de color de azul a rojo a pH 3.0-5.2, y se ha demostrado que esto es un indicador de la presencia de fibrillas amiloides y en el caso de las biopelículas de *S. aureus* detecta la producción del polisacárido de adhesión intercelular (PIA) (adhesina de polisacárido, que según su estructura básica se denomina poli-N-acetilglucosamina (PNAG)) mediante la formación de puentes de hidrógeno entre este polisacárido y el colorante (Lee y col., 2016). El uso de esta técnica con la modificación de componentes en la fórmula del agar propuesta por Mariana y col. (2009) se ha descrito como una de las mejores opciones para detectar la formación de biopelícula ya que la interacción del colorante, el polisacárido de la biopelícula y la base de agar sangre dan lugar a una mejor pigmentación de color negro de las colonias positivas a la formación de la biopelícula y optimiza los costos en comparación con otros medios de cultivo sugeridos en la literatura. Por otro lado, como técnica cuantitativa se empleó la microtitulación en placa de poliestireno. Ésta es considerada la prueba estándar de oro y se basa en la cuantificación de la unión del colorante cristal violeta a las células bacterianas en una placa de poliestireno

(Lee y *col.*, 2016), empleando la técnica modificada de Peña y Uffo (2013), la cual hace uso de la capacidad de las bacterias para formar biopelícula en superficies inertes y se fijan con calor las bacterias a la placa previa su tinción con colorante cristal violeta al 0.5% para evitar que se pierdan células bacterianas y polisacáridos adheridos al fondo de los pocillos.

Para agregar certeza a las metodologías anteriores, se realizaron extracciones de ADN y PCR para la determinación de los genes *icaA* e *icaD* que se relacionan con la producción del PIA que es el principal componente de la biocapa de *S. aureus* (Muhammad y *col.*, 2021).

La técnica de micro titulación en placa de poliestireno se empleó también como base para evaluar la capacidad anti-biopelícula del prototipo elegido para este ensayo, debido a que se ha empleado en otros estudios que tienen la misma finalidad con resultados confiables (Felipe y *col.*, 2019; Saeed y *col.*, 2023). La determinación de la realización de estos estudios a 1 y 3 días se basó en lo reportado en el estudio realizado por Yang y *col.* (2017), en él se identificó que en condiciones *in vitro* después de 1 día de cultivo a 37 °C se obtiene una buena cantidad de biopelícula, la cual alcanza su punto máximo en el 3° día de cultivo.

Por otro lado, con base en lo reportado en el estudio de Felipe y *col.* (2019), la CMI de chitosán de bajo peso molecular frente a *S. aureus* planctónico y contenido en la biopelícula proveniente de casos de mastitis bovina subclínica fue de 800 µg/ml, mientras que el efecto de inhibición de biopelícula se logró a una concentración de 100 µg/ml y el efecto sobre biopelículas establecidas se logró a una concentración de 1600 µg/ml. Es de destacarse para este trabajo que las concentraciones empleadas de chitosán (de bajo peso molecular) fueron inferiores a las mencionadas en otros estudios y con buenos efectos sobre la inhibición y degradación de la biopelícula probablemente por el efecto sinérgico de todos los componentes del prototipo que se propone. En principio, se estableció que el prototipo en este estudio muestra un excelente efecto antibacteriano *in vitro* sobre *S. aureus* aislado de mastitis bovina crónica tanto en bacterias planctónicas como en aquellas contenidas dentro de la biopelícula. Este efecto es similar al establecido por Breser y *col.* (2018) quienes evaluaron *in vitro* la combinación de chitosán y cloxacilina-Na frente a aislamientos de *Staphylococcus* coagulasa negativos, causales de mastitis bovina crónica y determinaron

que la combinación de ambos componentes aumentaba significativamente la eficacia del efecto antibacteriano del antibiótico reduciendo la concentración necesaria para actuar en ambos estilos de vida bacterianos.

En el presente trabajo se evidenció la capacidad que tiene el prototipo propuesto para inhibir la formación de biopelículas probablemente por la eliminación de bacterias en los inóculos preparados y obviamente por su capacidad para degradar biocapas establecidas con una maduración de 1 y 3 días. Más aún, se estableció una relación de concentración-actividad de los componentes del prototipo evaluado. Curiosamente, el efecto fue más notorio en concentraciones medias y altas y no solo en estas últimas. Este efecto es también similar a lo reportado por Breser y *col.* (2018) quienes indican que el chitosán y la cloxacilina por separados tienen la capacidad de reducir la biopelícula formada, sin embargo, la degradación completa se logró con la combinación de estos dos componentes en concentraciones medias y altas.

En una segunda fase de este estudio y que poco se informa en la literatura de ensayos similares fue la evaluación clínica y bacteriológica de la eficacia que puede mostrar el prototipo en ensayo en casos de campo. Hay trabajos que de manera empírica sugieren el uso de terapias prolongadas de diversos antimicrobianos, pero en ninguno de ellos se definieron con precisión las características de ambos, las vacas y sus casos de mastitis crónica (más de 3 casos de mastitis en un ciclo de lactación) y las características formadoras de biopelícula de los patógenos involucrados. Por lo tanto, no es aventurado postular que lo obtenido tiene una elevada confiabilidad en cuanto a eficacia clínica y bacteriológica. Por lo dicho, es complicado comparar las eficacias obtenida en este ensayo con otros como el realizado por Martínez-Cortés y *col.* (2016); Viveros y *col.* (2017) y Alfonseca-Silva y *col.* (2021). Esto es, las eficacias clínicas obtenidas en dichos ensayos con Enro-C no demostraron la presencia de patógenos formadores de biopelícula.

En contraste a lo dicho, una parte de este estudio que pudiera haberse mejorado hubiese sido el aislamiento de las vacas para que, fuera del ambiente que las contaminó en primera instancia, pudiera verse si permanecían con cura bacteriológica un tiempo importante que según Martínez-Cortés y *col.* (2016) y Viveros y *col.* (2018) es de al menos 21 días. En este

estudio no fue posible evaluar el valor de la recontaminación que obviamente es un factor de gran influencia en los resultados logrados. De cualquier forma, el haber logrado un 80% de eficacia en cura bacteriológica es de destacarse y es un resultado superior a lo que se tiene visualizado por la *American Academy of Bovine Practitioners* (AABP), que considera a las vacas que padecen mastitis crónica como de desecho (Rosyter y Wagner, 2015). Así pues, tomando los resultados *in vitro* e *in vivo* de este ensayo de manera conjunta, es factible postular que el prototipo utilizado es único en su eficacia. No obstante, es evidente que existen áreas de oportunidad a considerar para mejorar este preparado; por ejemplo, nanoparticularizando los elementos incluidos y quizá agregando otros vehículos y materiales antibiopelícula como la oritavancina, lipoglicopeptido semisintético, cuaternarios de amonio de cuarta generación no citotóxicos a células eucariotas y muchos más (Verderosa y col., 2019). Más aún, es factible proponer que mediante una liberación prolongada/programada, se puedan tener prototipos anti-biopelícula que se administren durante el periodo de secado y que duren liberando los principios activos de 45 a 60 días. Se sabe que uno de los periodos de mayor peligro en cuanto al surgimiento de mastitis sobre todo considerando patógenos formadores de biopelícula es el periodo de secado. El prototipo propuesto en este ensayo no está diseñado para esta etapa de la lactación. Se sabe que para tener un producto de elevada eficacia se requiere que el preparado intramamario sea de una muy larga duración, considerando que un secado corto es de 45 días y uno largo de 60 días aproximadamente (Sumano y col. 2015). En ese sentido será necesario reformular el prototipo desarrollado en este ensayo para dicho propósito, lo cual es factible de lograr mediante matrices que proporcionen liberación sostenida de los elementos empleados y quizá la nanoparticularización de ellos (Tan y col., 2018; Maruthupandy y col., 2020; Abd El-Aziz y col., 2021; Ranjani y col., 2022).

Por otro lado, resta definir desde el punto de vista de manejo de un hato la elección de los animales que deben entrar a un protocolo de tratamiento como el establecido en este ensayo. Si los criterios se ajustan a lo que recomienda la AABP las consideraciones acerca de que una vaca debe o no tratarse no tiene sustento, pues acorde con el punto de vista de esta asociación, las vacas deben desecharse. Sin embargo, la producción intensiva o semi

intensiva en México se rige por criterios distintos a los recomendados por dicha asociación. En nuestro medio, la tendencia más observada es que ni los productores ni los veterinarios están dispuestos a eliminar del hato a un ejemplar con esta problemática de mastitis crónica. Esto se debe tanto a la falta de información en cuanto a eficacias clínicas, así como al desconocimiento de la definición y diagnóstico de cuando considerar a una vaca como portadora de un caso crónico. En la toma de decisiones debe ponderarse lo informado por Martins y *col.* (2020) quienes analizaron las repercusiones económicas de las mastitis subclínicas y crónicas en las unidades de producción pecuaria por concepto de pérdidas en la producción de leche y que fluctúan entre el 9 al 24.1% en comparación con los bovinos sanos. Además, se deberán ponderar las pérdidas erogadas por afectación en la calidad de la leche que a menudo se traducen en menores rendimientos de sólidos totales en leche, con excepción del porcentaje de grasa. De tal suerte que amén de que es necesario continuar realizando estudios como el presente, se deben mejorar las técnicas diagnósticas y se deberán definir los criterios de inclusión para que una vaca con mastitis crónica entre a protocolos de tratamiento tan prolongados como el descrito en este ensayo o similares.

Indudablemente que este ensayo se enfocó a la parte microbiológica y clínica. De tal suerte que no se tienen los datos suficientes como para recomendar un tiempo de retiro o algunos esquemas de tratamiento secuencial como el de enro/ceftiofur propuesto por Alfonseca y *col.* (2021), por lo que como siguiente trabajo se requerirá un estudio multicéntrico que permita detectar rasgos del tratamiento que no están definidos en el estudio presentado dado el número de animales empleado. En ese sentido es importante recalcar que el prototipo desarrollado se hizo a nivel de escala de laboratorio y la preparación no llevó mayor dificultad que mezclar los elementos en orden. Sin embargo, resta llevar a cabo estudios de estabilidad y quizá de la adición de algunos elementos que mejoren su eficacia y que sean compatibles con la formula, como la vitamina D3 (Téllez-Pérez y *col.*, 2012; Yue y *col.*, 2017; Merriman y *col.*, 2017 y 2018) y se hace énfasis en que de llegar a mercado tendrá que ser validado su tiempo de retiro de ordeña. Finalmente, es evidente que se requieren estudios de impacto económico del esquema de tratamiento propuesto en este ensayo, así como estudios de la tasa de resistencias bacterianas en el hato.

CONCLUSIONES

Con base en la caracterización del agente etiológico causal de mastitis crónica en los bovinos incluidos en el presente estudio se puede concluir que el principal agente bacteriano relacionado con mastitis bovina crónica es *S. aureus*, seguido por *Staphylococcus* spp coagulasa negativos. La producción de biopelícula resulta el factor de virulencia relacionado con el cuadro inflamatorio crónico. Además, los aislamientos positivos a *S. aureus* tienen la presencia de los genes *icaA* e *icaD* asociados a la capacidad de la bacteria para producir biopelícula.

Los resultados de la evaluación *in vitro* sugieren que el preparado con Enro-C/DMSO/chitosán tiene un efecto antibacteriano sobre *S. aureus* planctónico y contenido en el interior de la biopelícula, además su empleo en cultivos en placa de *S. aureus* logra la inhibición de la formación de biopelícula y degrada la biopelícula con maduración de 1 y 3 días, logrando un mejor efecto al emplear concentraciones medias y altas de los componentes del preparado. Se sugiere por la naturaleza de los componentes que el efecto antimicrobiano y anti-biopelícula que estos tienen por separado es sinérgico al momento de interactuar como parte de la suspensión propuesta.

La valoración del preparado Enro-C/DMSO/chitosán *in vivo* sugiere que su empleo tiene una mayor eficacia tanto clínica como bacteriológica en los casos de mastitis bovina crónica descritos en el estudio en comparación con el empleo del preparado Enro-C/DMSO. La eficacia bacteriológica considerando la clasificación de las bacterias con base en su capacidad de producción de biopelícula sugiere que el preparado Enro-C/DMSO/chitosán tiene buen efecto frente a *Staphylococcus* spp productor y no productor de biopelícula, siendo mejor el efecto frente a *Staphylococcus* spp moderado y alto productor de biopelícula, mientras que el preparado Enro-C/DMSO tiene una mayor eficacia frente a infecciones causadas por *Streptococcus* spp y su respuesta es más deficiente frente a *Staphylococcus* spp no productor y bajo productor de biopelícula.

Se sugiere la elaboración de estudios más robustos en cuanto a la cantidad de bovinos incluidos en cada tratamiento administrado y en cada nivel de producción de biopelícula para obtener significancia estadística en los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abd El-Aziz NK, Ammar AM, El-Naenaeey Es YM, El Damaty HM, Elazazy AA, Hefny AA, Shaker A, Eldesoukey IE. Antimicrobial and antibiofilm potentials of cinnamon oil and silver nanoparticles against *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis: new avenues for countering resistance. BMC Vet Res. [online] 2021, 17(136). Disponible en: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-021-02842-9#>

Aghamohammadi M, Haine D, Kelton DF, Barkema HW, Hogeveen H, Keefe GP, Dufour S. Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. Front. Vet. Sci. [online] 2018, 5:100-112. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2018.00100>

Aguilar RF, Anguiano BR, Atilano LD, Bazán ME, Castañeda RA, Castañón OLR, Chávez GG, Corona BE, De la Peña MA, Espinosa GME, Espinosa MLG, Figueroa OIM, García DGA, García OMA, Guzmán CRE, Jaramillo ML, Maldonado CE, Mena BR, Mojica SMA, Ovando FD, Rodríguez CSD, Rodríguez SMC, Rosario CC, Santillán FMA, et. al. Atlas Fotográfico de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinaria. FMVZ. UNAM. 2014. ISBN 978-607-02-5587-8, Páginas 90–93, 168, 171, 175, 180.

Alfonseca-Silva E, Cruz-Villa JC, Gutiérrez L, Sumano H. Successful treatment of recurrent subclinical mastitis in cows caused by enrofloxacin resistant bacteria by means of the sequential intramammary infusion of enrofloxacin HCl-2H₂O and ceftiofur HCl: a clinical trial. J Vet Sci. [online] 2021, 22(6):e78. Disponible en: <https://vetsci.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2021.22.e78>

Atshan SS, Shamsudin MN. Evaluation of phenotypic and genotypic detection methods for biofilm-forming methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Annals of Microbiology [online] 2011, 61:825–831. Disponible en: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007%2Fs13213-011-0201-1#article-info>

Babra C, Tiwari JG, Pier G, Thein TH, Sunagar R, Sundareshan S, Isloor S, Hegde NR, De Wet S, Deighton M, Gibson J, Costantino P, Wetherall J, Mukkur T. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiologica* [online] 2013, 58:469–474. Disponible en: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007%2Fs12223-013-0232-z>

Bhattarai S, Perumal D, Rathbone MJ, Bunt CR, Alany RG. On the Biocompatibility and Teat Retention of In Situ Gelling Intramammary Formulations: Cattle Mastitis Prevention and Treatment. *Pharmaceutics* [online] 2021, 13:10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8539992/#>

Bedolla CC, Castañeda VH, Wolter W. Métodos de detección de la mastitis bovina. *Revista Electrónica Veterinaria*. [online] 2007, VIII:9. Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/12-mastitis.pdf

Breser ML, Felipe V, Bohl LP, Orellano MS, Isaac P, Conesa A, Rivero VE, Correa SG, Bianco ID, Porporatto C. Chitosán and cloxacillin combination improve antibiotic efficacy against different lifestyle of coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from chronic bovine mastitis. *Sci Rep*. [online] 2018, 8(5081). Disponible en: <https://www-nature-com.pbidi.unam.mx:2443/articles/s41598-018-23521-0#citeas>

Bohl LP, Breser PIML, Orellano MS, Correa SG, Tolosa de Talamoni NG, Porporatto C. Interaction between bovine mammary epithelial cells and planktonic or biofilm *Staphylococcus aureus*: The bacterial lifestyle determines its internalization ability and the pathogen recognition, *Microbial Pathogenesis*. [online] 2021, 152:104604. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401020309700>

Cardozo LL, Thaler Neto A, Souza GN, Picinin LCA, Felipus NC, Reche NLM, Schmidt FA, Werncke D, Simon EE. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *Journal of Dairy Science* [online]

2015, 98(11):7675-7685. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021500586X>

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal Of Clinical Microbiology* [online] 1985, 22(6):996-1006. Disponible en: <https://journals-asm-org.pbidi.unam.mx:2443/doi/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>

Confederat LG, Tuchilus CG, Dragan M, Sha'at M, Dragostin OM. Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosán and Its Derivatives: A Concise Review. *Molecules* [online] 2021, 26(12):3694. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/12/3694>

Deutch CE. Inhibition of urease activity in the urinary tract pathogens *Staphylococcus saprophyticus* and *Proteus mirabilis* by dimethylsulfoxide (DMSO). *Journal of Applied Microbiology* [online] 2019, 128(5):1514-1523. Disponible en: <https://sfamjournals-onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/10.1111/jam.14560>

Felipe V, Breser ML, Bohl LP, Rodrigues Da Silva E, Morgante CA, Correa SG, Porporatto C. Chitosán disrupts biofilm formation and promotes biofilm eradication in *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *International Journal of Biological Macromolecules* [online] 2019, 126:60-67. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S014181301836015X?via%3Dihub#s0010>

Gussmanna M, Steeneveldb W, Kirkebya C, Hogeveenb H, Farred M, Halasaa T. Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for subclinical and clinical mastitis. *Preventive Veterinary Medicine* [online] 2019, 166:78-85. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587718308961>

Hebling J, Bianchi L, Basso FG, Scheffel DL, Soares DG, Carrilho MRO, Pashley DH, Tjäderhane L, De Souza Costa CA. Cytotoxicity of dimethylsulfoxide (DMSO) in direct contact with odontoblast-like cells. *Dental materials* [online] 2015, 31:399-405. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25681221/>

Hoang C, Nguyen AK, Nguyen TQ, Fang W, Han B, Hoang BX, Tran HD. Application of Dimethyl Sulfoxide as a Therapeutic Agent and Drug Vehicle for Eye Diseases. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics [on line] 2021, 37(8). Disponible en: <https://www-liebertpub-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/10.1089/jop.2021.0043>

Horiuk Y, Kukhtyn M, Kovalenko V, Kornienko L, Horiuk V, Liniichuk N. Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs. Independent Journal of Management & Production [online] 2019, 10(7). Disponible en: <http://www.ijmp.jor.br/index.php/ijmp/article/view/1012/1076>

Hortaç İE, Alişkan HE, Başustaoğlu A. Determination of Biofilm Formation Properties of Methicillin Sensitive and Resistant Staphylococcus aureus Isolates by Conventional and Molecular Methods. Mikrobiyol Bul [online] 2019, 54(2):223-234. Disponible en: http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2020-02/2020-54-2-223-234.pdf

Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal (INAFED). San Gregorio Atzompa, Estado de Puebla. Enciclopedia de los Municipios de México. [online] 2020, México, disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM20puebla/index.html>

Kalińska A, Wójcik A, Slószar J, Kruzińska B, Michalczyk M, Jaworski S, Wierzbicki M, Gołębiewski M. Occurrence and aetiology of staphylococcal mastitis – A review. Animal Science Papers and Reports [online] 2018, 36:263-273. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/327939845_Occurrence_and_aetiology_of_staphylococcal_mastitis_-_A_review

Kampa J, Sukolapong V, Chaiyotwittakun A, Rerk-u-suke S, Polpakdee A. Chronic Mastitis in Small Dairy Cattle Herds in Muang Khon Kaen. Thai J. Vet. Med [online] 2010, 40(3):265-272. Disponible en: https://www.vet.chula.ac.th/dept/tjvm/full_text/v40/v403/403_PDF/05%20TJVM_40_3_Original3.pdf

Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Manivasagan P, Oh J, Kim YM. Chitosán and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online] 2020, 185(1). Disponible en: [https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0927776519307714?via%3Dihub#sec0015](https://www.sciencedirect.com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0927776519307714?via%3Dihub#sec0015)

Lee JS, Bae YM, Han A, Lee SY. Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. *Food Science and Technology LWT* [online] 2010, 73:707-714. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0023643816301591?via%3Dihub>

Mariana NS, SA Salman. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*. [online] 2009, 3(6):330-338. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/228649141_Evaluation_of_modified_Congo_red_agar_for_detection_of_biofilm_produced_by_clinical_isolates_of_methicillin-resistance_Staphylococcus_aureus

Martínez-Cortés I, Gutierrez L, Tapia G, Ocampo L, Sumano H. Serum and milk concentrations of enrofloxacin in cows intramammarily treated with a new enrofloxacin-polymorph. *Med Weter*. [online] 2016, 72(11):686-692. Disponible en: <http://www.medycynawet.edu.pl/index.php/archives/386/5587-summary-med-weter-72-11-686-692-2016>

Martins L, Barcelos MM, Cue RI, Anderson KL, Veiga dos Santos M, Gonçalves JL. Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. *Journal of Dairy Research* [online] 2020, 87(3):298-305. Diponible en: <https://www.cambridge-org.pbidi.unam.mx:2443/core/journals/journal-of-dairy-research/article/chronic-subclinical-mastitis-reduces-milk-and-components-yield-at-the-cow-level/F3512FB8A8703C671F5DEAE62D0C970C>

Maruthupandy M, Rajivgandhi G, Kadaikunnan S, Veeramani T, Alharbi NS, Muneeswaran T, Khaled JM, Jun-Li W, Alanzi KF. Anti-biofilm investigation of graphene/chitosán

nanocomposites against biofilm producing *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Carbohydrate Polymers [online] 2020, 230(15):115646. Disponible en: [https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0144861719313141?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0144861719313141?via%3Dihub)

Merriman KE, Poindexter MB, Kweh MF, Santos JEP, Nelson CD. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. [online] 2017, 173:33-41. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0960076017300420?via%3Dihub>

Merriman KE, Powell JL, Santos JEP, Nelson CD. Intramammary 25-hydroxyvitamin D3 treatment modulates innate immune responses to endotoxin-induced mastitis. Journal of Dairy Science. [online] 2018, 101(8):7593-7607. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0022030218304211?via%3Dihub>

Miranda-Calderón JE, Gutiérrez L, Flores-Alamo M, García-Gutiérrez P, Sumano H. Enrofloxacin hydrochloride dihydrate. Acta Crystallographica Section E. [online] 2014, 70(4):0468-0469. Disponible en: <https://journals.iucr.org/e/issues/2014/04/00/is5348/is5348fig2.html>

Muhammad I, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. Int J Environ Res Public Health. [online] 2021, 18(14):7602, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8304105/>

Nagahata H, Kawai H, Higuchi H, Kawai K, Yayou K, Chang CJ. Altered Leukocyte Responsiveness in Dairy Cows with Naturally Occurring Chronic *Staphylococcus aureus* Mastitis. Journal of Veterinary Medical Science [online] 2011, 73(7):885-894, Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/73/7/73_10-0379/article

Ortega E, Alfonseca-Silva E, Posadas E, Tapia G, Sumano H. A non-inferiority study evaluating a new extended-release preparation of tilmicosin injected subcutaneously vs. ceftiofur administered intramammary, as dry-cow therapy in Holstein Friesian cows.

Journal of Veterinary Science [online] 2020, 21(4):e87. Disponible en: <https://vetsci.org/DOIX.php?id=10.4142/jvs.2020.21.e87>

Pampariene I, Veikutis V, Oberauskas V, Zymantiene J, Zelvyte R, Stankevicius A, Marciulionyte D, Palevicius P. Thermography based inflammation monitoring of udder state in dairy cows: sensitivity and diagnostic priorities comparing with routine California mastitis test. Journal of Vibroengineering, [online] 2016, 18(1):511-521. Disponible en: <https://www.jvejournal.com/article/16750>

Pasachova GJ, Ramírez MS, Muñoz LM. Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA. [online] 2019, 17(32):25-38. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-25.pdf>

Peña J, Uffo O. Producción de biofilme en genotipos de Staphylococcus aureus aislados de mastitis bovina en Cuba. Rev. Salud Animal. [online] 2013, 35(3):189-196. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000300007

Piessens V, De Vlieghe S, Verbist B, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, Van Coillie E. Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. Journal of Dairy Science [online] 2012, 95(12):7027-7038 Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030212006911>

Ramírez RD. Eficacia clínica de la danofloxacin en el tratamiento de mastitis bovina. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2001. Disponible en: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3510910>

Ranjani S, Priya PS, Veerasami M, Hemalatha S. Novel Polyherbal Nanocolloids to Control Bovine Mastitis. Appl Biochem Biotechnol. [online] 2022, 194:246–265. Disponible en: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007/s12010-021-03748-w>

Rosyter E, Wagner S. Treatment of Mastitis in Cattle, Veterinary Clinics. Food Animal Practice, [online] 2015, 31:17–46. Disponible en: [https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0749072014000905?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0749072014000905?via%3Dihub)

Saeed SI, Vivian L, Zalati CWSCW, Sani NIM, Aklilu E, Mohamad M, Noor AAM, Muthoosamy K, Kamaruzzaman NF. Antimicrobial activities of graphene oxide against biofilm and intracellular Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. BMC Vet Res. [online] 2023, 19(1):10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36641476/>

Silva-Dias A, Palmeira-de-Oliveira A, Miranda IM, Branco J, Cobrado L, Monteiro-Soares M, Queiroz JA, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosán hydrogel against Candida species. Medicine Microbiology Immunology. [online] 2013, 203:25–33. Disponible en: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007%2Fs00430-013-0311-4#citeas>

Skogman ME, Vuorela PM, Fallalero A. Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against Staphylococcus aureus biofilms The Journal of Antibiotics [online] 2012, 65:453–45. Disponible en: <https://www-nature-com.pbidi.unam.mx:2443/articles/ja201249#citeas>

Sumano LHS, Gutiérrez OL, inventores. Universidad Nacional Autónoma de México, propietario. Complejo Recristalizado de Clorhidrato de Enrofloxacin Dihidratado, y Método para Obtener el Mismo. México, patente WO 2015/088305 A1. 2015 junio 18.

Sumano LHS, Ocampo CL, Gutiérrez OL. Farmacología Veterinaria. Edición 4th ed. Ciudad de México, México. 2015.

Tan Y, Ma S, Leonhard M, Moser D, Haselmann GM, Wang J, Eder D, Schneider-Stickler B. Enhancing antibiofilm activity with functional chitosán nanoparticles targeting biofilm cells and biofilm matrix. Carbohydrate Polymers. [online] 2018, 200(15):35-42. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0144861718308646?via%3Dihub>

Téllez-Pérez AD, Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Veterinary Microbiology*. [online] 2012, 160(1–2):91-98. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S037811351200301X?via%3Dihub>

Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial biofilm eradication agents: A current review. *Front. Chem.* [online] 2019, 7:824. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00824/full>

Viveros M, Lopez-Ordaz R, Gutiérrez L, Miranda-Calderón JE, Sumano H. Efficacy assessment of an intramammary treatment with a new recrystallized enrofloxacin vs ceftiofur and parenteral enrofloxacin in dairy cows with nonsevere clinical mastitis. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [online] 2018, 41(1):e1-e9. Disponible en: <https://onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/10.1111/jvp.12441>

Yahya MFZRAZ, Karsani SA. Antibiofilm activity and mode of action of DMSO alone and its combination with afatinib against Gram-negative pathogens. *Folia Microbiol.* [online] 2018, 63(1):23-30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28540585/>

Yang B, Lei Z, Zhao Y, Ahmed S, Wang C, Zhang S, Fu S, Cao J, Qiu Y. Combination Susceptibility Testing of Common Antimicrobials *in Vitro* and the Effects of Sub-MIC of Antimicrobials on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *Front. Microbiol. Sec. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy.* [online] 2017, 8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02125/full>

Yue Y, Hymøller L, Jensen SK, Lauridsen C, Purup S. Effects of vitamin D and its metabolites on cell viability and *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*. [online] 2017, 203:245-251. Disponible en: <https://www.sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0378113516305855?via%3Dihub>

APÉNDICE

Tinción Gram

Para realizar el procesamiento de las muestras de leche que se obtuvieron de los casos de mastitis bovina crónica en Chipilo Puebla, se comenzó con la técnica de tinción de Gram, con el fin de evidenciar la presencia de microorganismos dentro de la muestra de leche a procesar. La tinción Gram se repitió tomando una colonia de los primo aislamientos para identificar las características morfológicas microscópicas de las bacterias aisladas (Aguilar y *col.* 2014).

Materiales:

- ✓ Muestra de leche o colonias bacterias.
- ✓ Mezclador.
- ✓ Mechero de Bunsen o lámpara de alcohol.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Portaobjetos.
- ✓ Marcador de cera.
- ✓ Reactivos para tinción Gram.
 - Cristal violeta.
 - Bicarbonato de sodio.
 - Yodo.
 - Alcohol – acetona.
 - Fucsina básica.
- ✓ Agua destilada.
- ✓ Microscopio óptico.
- ✓ Aceite de inmersión.

Procedimiento: las muestras de leche se incubaron por 15 min a 37°C y agitaron vigorosamente con el fin de romper las micelas de grasa que contiene la leche, mismas en las que pudieran quedar atrapadas las bacterias contenidas en la muestra. Con un asa

microbiológica se recolectó una gota de leche y se colocó en un portaobjetos, se esparció la gota y se dejó secar a temperatura ambiente. Para el caso de las colonias bacterianas que se obtuvieron de los primeros aislamientos, con un asa microbiológica fría previamente esterilizada se tomó una colonia del medio de cultivo y se colocó en un portaobjetos que contenía una gota de agua destilada estéril, se esparció la gota y se dejó secar a temperatura ambiente. En ambos casos, se fijó la muestra del portaobjetos mediante calor por 1 seg en una llama abierta, repitiendo en 3 ocasiones, teniendo como precaución el no sobrecalentar la muestra.

Como colorante primario, se agregó a la muestra dos gotas de cristal violeta y para mejorar la retención del colorante se adicionaron dos gotas de bicarbonato de sodio, dejando actuar a ambos compuestos por 15 seg, para después enjuagar con agua destilada hasta retirar el excedente del colorante primario.

Se agregó una gota de yodo para favorecer la formación de un complejo cristal violeta - yodo que impida la salida del colorante primario en las bacterias Gram positivas que pudieran encontrarse en la muestra al saturar los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana, se dejó actuar por 15 segundos, para después enjuagar con agua destilada.

Con el fin de destruir la membrana externa de las bacterias Gram negativas que pudieran encontrarse en la muestra, deshidratar su pared bacteriana y cerrar los poros de esta se colocó una gota de la mezcla de alcohol-acetona, dejándola actuar por no más de 3 segundos, para después enjuagar con agua destilada hasta que ya no se elimine el colorante primario.

Como colorante secundario se emplearon dos gotas de fuscina básica, con el fin de teñir las bacterias que no retuvieron el complejo cristal violeta – yodo, se dejó actuar por 15 seg, para después enjuagar con agua destilada hasta retirar el excedente del colorante.

Al concluir con la tinción de la muestra se realizó la observación de la afinidad tintorial que adquirieron los microorganismos presentes, para lo cual se agregó una gota de aceite de inmersión sobre la muestra, se colocó el portaobjetos en la platina del microscopio y con el objetivo 100x se observó la muestra teñida. Las bacterias del género *Staphylococcus* spp se

consideran Gram +, por lo que para la administración de los tratamientos se consideraron a aquellos animales cuyas muestras presentaron bacterias de color morado – violeta. Además, se observó la morfología microscópica de las bacterias teñidas, considerando que las bacterias del género *Staphylococcus* spp presentan una morfología en forma de cocos inmóviles con agrupación en racimos (Aguilar y col. 2014).

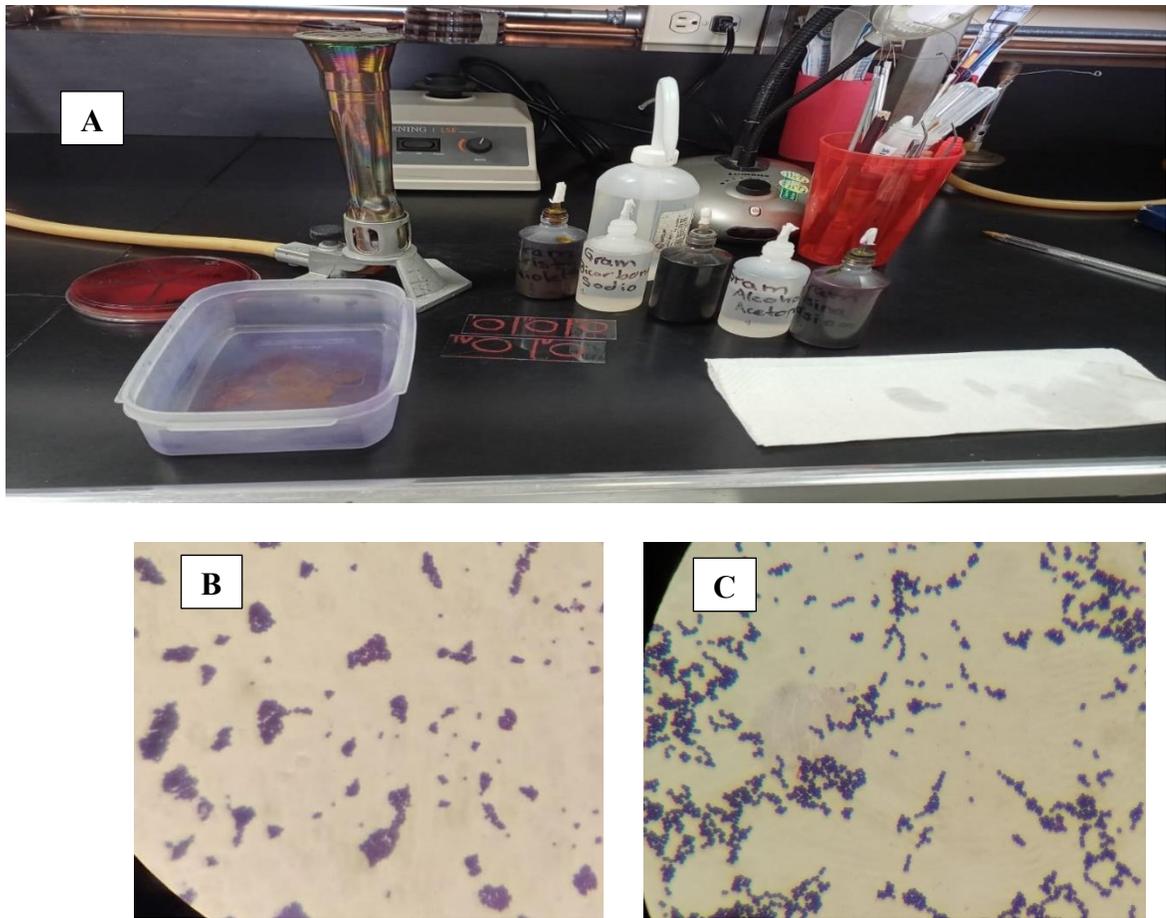


Figura 20. Técnica de tinción Gram realizada en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ – UNAM.
A: Elemento empleados para la técnica de tinción Gram en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ – UNAM. B. Morfología microscópica de *Staphylococcus* spp por la técnica tinción Gram. C. Morfología microscópica de *Streptococcus* spp por la técnica tinción Gram.

Primo aislamiento bacteriológico en Agar Sangre

El primo aislamiento de las muestras de leche se realizó en el medio de cultivo Agar Sangre, el cual contiene peptona de caseína, soya y 5 a 8% de sangre desfibrinada de bovino como fuente de nutrientes necesarios para su crecimiento, además de contener cloruro de sodio que mantiene un balance osmótico (Aguilar y *col.* 2014). El procedimiento se realizó de la siguiente forma:

Materiales

- ✓ Muestra de leche.
- ✓ Agar sangre.
- ✓ Marcador de punto fino con tinta permanente.
- ✓ Mezclador.
- ✓ Pipeta graduada de 20 μ l.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Incubadora.

Procedimiento: se dividió el medio de cultivo en cuatro partes, las cuales fueron identificadas con el número correspondiente a la muestra que se procesó. Se incubaron las muestras de leche por 15 min a 37°C y se agitaron. Con una pipeta graduada se obtuvieron 20 μ l de la muestra a inocular y se colocaron en un punto dentro de la zona del agar que le corresponde a la muestra. Con un asa microbiológica se esparció el inóculo, realizando la técnica de estriado para el aislamiento de las colonias y se incubaron en condiciones aerobias a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se realizó la lectura, con el fin de identificar el crecimiento de bacterias del género *Staphylococcus* spp en el medio de cultivo cuya morfología corresponde a colonias de 1 a 2 mm de diámetro, redondas, brillantes, con bordes regulares, convexas, que pueden o no presentar un pigmento y generar zonas de hemólisis (Aguilar y *col.* 2014). Además, se realizó el conteo de colonias que se desarrollaron dentro del agar, con el fin de definir que el establecimiento de un proceso

infeccioso en la glándula mamaria al observar el aislamiento bacteriano de 3 o más Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por cada 20 μ l de inóculo (Ortega y *col.* 2020).



Figura 21. Morfología macroscópica de bacterias Gram (+) en primo cultivo en Agar Sangre. A: Morfología macroscópica de *Staphylococcus* spp por la técnica de primo aislamiento bacteriológico en Agar Sangre. B: Morfología microscópica de *Streptococcus* spp por la técnica de primo aislamiento bacteriológico en Agar Sangre.

Identificación del género *Staphylococcus* mediante la prueba actividad catalasa

Se realizó esta prueba con el fin de evidenciar la producción de la enzima catalasa por parte de las bacterias del género *Staphylococcus* al exponerlas a una solución de peróxido de hidrógeno (Aguilar y col. 2014).

Materiales

- ✓ Primo aislamiento de la muestra de interés.
- ✓ Portaobjetos.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Peróxido de hidrógeno al 3% (agua oxigenada).

Procedimiento: se colocó en un portaobjetos limpio una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y con un asa microbiológica se tomó una colonia del medio de primo aislamiento, teniendo la debida precaución de no tocar el medio de cultivo para evitar que la reacción genere un falso positivo por el contenido de sangre del agar y se colocó la colonia del asa microbiológica en el portaobjetos, mezclándolo con el peróxido de hidrógeno para observar si se lleva a cabo la reacción de la enzima. Las bacterias aisladas en las que se evidenció el burbujeo inmediato en la solución fueron consideradas como catalasa (+), por lo que se clasificaron como pertenecientes al género *Staphylococcus* spp. En aquellas donde la mezcla que se observó fue lechosa y no hubo burbujeo se consideró a reacción como catalasa negativa (-), por lo que no se clasificaron como pertenecientes al género *Staphylococcus* spp (Aguilar y col. 2014).

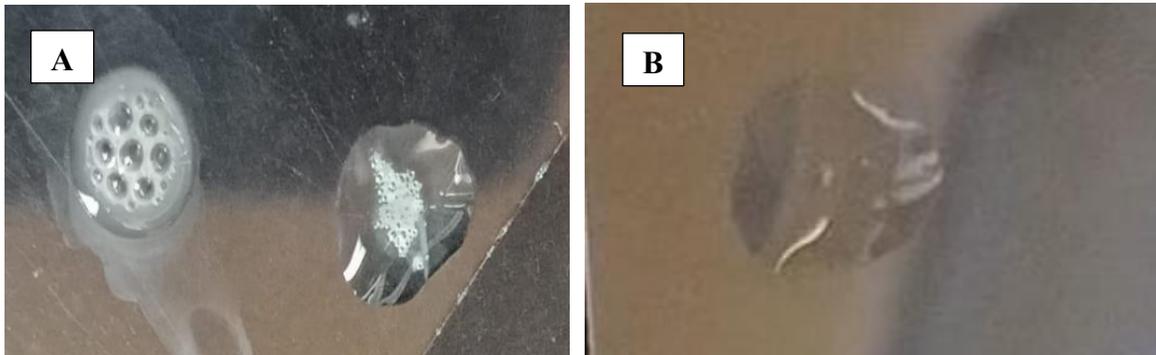


Figura 22. Lectura de la prueba bioquímica Catalasa. A: Muestra de *Staphylococcus* spp positiva a la prueba bioquímica Catalasa. B: Muestra de *Streptococcus* spp negativa a la prueba bioquímica Catalasa.

Prueba de factor de agregación celular

Se realizó esta prueba con el fin de detectar la producción del factor de agregación por parte de la bacteria. El factor de agregación celular es una proteína situada en la parte externa de la pared celular bacteriana, la cual activa el fibrinógeno en fibrina, con el fin de generar un conglomerado celular que se observe a simple vista (Aguilar y *col.* 2014).

Materiales

- ✓ Primo aislamiento de la muestra de interés.
- ✓ Portaobjetos.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Plasma sanguíneo de bovino.

Procedimiento: con un asa microbiológica fría previamente esterilizada se tomaron dos gotas de plasma sanguíneo de bovino y se colocaron en un portaobjetos. Después, con el asa microbiológica fría previamente esterilizada se tomó una colonia del medio de cultivo del primo aislamiento, se inoculó sobre el plasma sanguíneo de bovino del portaobjetos y se mezcló la colonia con el plasma para obtener una suspensión homogénea. Al final se observó la preparación a contraluz para realizar la lectura. En las muestras donde se

observó la formación de pequeños agregados dentro de la suspensión se consideró que la prueba fue positiva (+), mientras que en las muestras donde no fue posible observar la formación de grumos en la prueba y se observó una solución opaca, se consideró el resultado como negativo (-) (Aguilar y *col.* 2014).

Prueba actividad coagulasa

Se realizó la prueba actividad coagulasa, la cual tiene como finalidad la detección de la enzima coagulasa libre de diversas especies del género de interés como es el caso de *S. aureus*, la cual va a reaccionar con el factor de reacción de la coagulasa (CRF) presente en el plasma sanguíneo, formando un complejo coagulasa – CRF el cual convierte de forma indirecta al fibrinógeno en fibrina para la formación de un coágulo (Aguilar y *col.* 2014).

Materiales

- ✓ Primo aislamiento de la muestra de interés.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Tubo de ensayo con 0.5 ml de plasma sanguíneo de bovino.
- ✓ Marcador de punto fino con tinta permanente.
- ✓ Incubadora.

Procedimiento: utilizando un asa microbiológica fría previamente esterilizada se tomó una colonia del medio de cultivo del primo aislamiento y se inoculó por agitación del asa en 0.5 ml de plasma sanguíneo de bovino contenido en un tubo de ensayo, el cual fue previamente identificado de acuerdo con la muestra correspondiente. Se incubó el tubo por 24 h a 37°C, realizando lecturas de la prueba a las 2, 4, 6, 12 y 24 h, con la finalidad de observar la formación del coágulo a través del tiempo de incubación de la prueba ya que este se puede deshacer debido a las fibrinolisinias bacterianas, lo que se puede considerar como un falso negativo si no se tiene la precaución de realizar lecturas repetidas. Se consideró como una lectura positiva a coagulasa aquella en la que se observó la formación del coágulo en el contenido del tubo de ensayo, por lo que la bacteria del aislamiento se consideró como coagulasa positiva (+), confirmando así que la muestra procesada puede provenir de

animales infectados con *S. aureus*, *S. intermedius* o *S. hycus*. En las muestras donde no fue posible observar la formación del coágulo en ninguna de las lecturas realizadas a la prueba, se considera como coagulasa negativa (-), por lo que se confirmó que la muestra proviene de animales infectados con cepas de *Staphylococcus* spp coagulasa negativo (Aguilar y col. 2014).

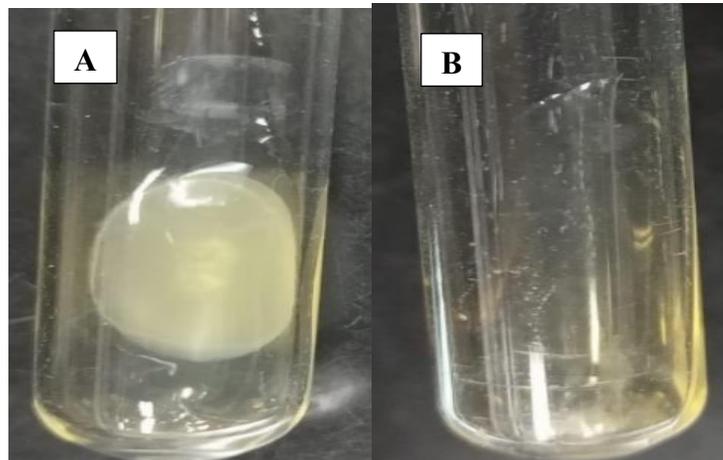


Figura 23. Lectura de la prueba bioquímica Coagulasa. A: Muestra de *Staphylococcus* spp positiva a la prueba bioquímica Coagulasa. B: Muestra de *Staphylococcus* spp negativa a la prueba bioquímica Coagulasa.

Aislamiento selectivo y diferencial en Agar sal manitol

Para comenzar con la diferenciación por especies del género *Staphylococcus* spp se utilizó como medio de cultivo selectivo y diferencial la siembra de la muestra en agar Sal y Manitol, ya que las características del medio permiten inhibir el crecimiento de la mayoría de los géneros bacterianos, especialmente de los Gram negativos, gracias a su contenido de cloruro de sodio (7.5%) como sal inhibidora, además de contener como indicador de pH rojo fenol y estar adicionado con D-manitol como carbohidrato que permite diferenciar a *S. aureus* de otras especies del género (Aguilar y col. 2014).

Materiales

- ✓ Muestra de leche.
- ✓ Agar Sal Manitol.
- ✓ Marcador de punto fino con tinta permanente.
- ✓ Vórtex.
- ✓ Pipeta graduada de 20 µl.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Incubadora.

Procedimiento: se realizó el mismo procedimiento que ya se describió previamente para el primo aislamiento. En esta técnica la lectura consistió en observar el crecimiento de las bacterias fermentadoras de manitol que resisten el efecto de la sal inhibidora como *S. aureus*, las cuales desarrollan colonias cremosas de color amarillo en el agar, a diferencia de otras bacterias que no son capaces de fermentar el manitol como en el caso de *S. epidermidis*, en las que el crecimiento de colonias se observa de color rosa. Las muestras en las que no se observó crecimiento de colonias pueden sugerir una infección con bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, debido a que este tipo de microorganismos no son capaces de resistir el efecto del cloruro de sodio (Aguilar y col. 2014).

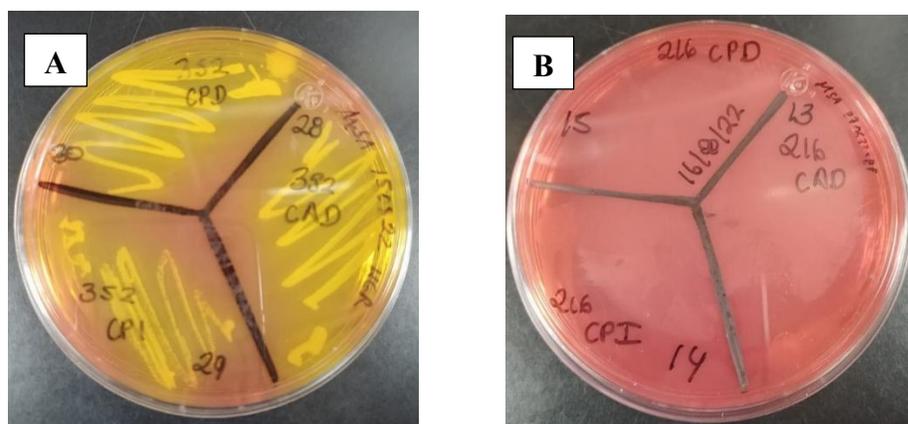


Figura 24. Lectura de la prueba de aislamiento selectivo y diferencial Agar Sal y Manitol. A: Muestra de *Staphylococcus aureus* positiva a la prueba de aislamiento selectivo y diferencial MSA. B: Muestra de *Staphylococcus coagulans* (-) negativa a la prueba de aislamiento selectivo y diferencial MSA

Agar manitol anaerobio

Para poder distinguir a *S. aureus* de otras especies coagulasa positivas, se buscó evidenciar el metabolismo anaeróbico del carbohidrato D – manitol por parte de *S. aureus* (Mossel, 1962; Roberson y col., 1992), a través del siguiente procedimiento:

Materiales

- ✓ Primo aislamiento de la muestra de interés.
- ✓ Agar Manitol semisólido en tubo cerrado.
- ✓ Aceite mineral estéril.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica recta.
- ✓ Marcador de punto fino con tinta permanente.
- ✓ Incubadora.

Procedimiento: empleando un asa microbiológica recta fría previamente flameada se tomó una colonia del medio de cultivo del primo aislamiento y se inoculó introduciendo el asa en el agar de forma tal que el inóculo cubriera en línea recta dos terceras partes del tubo. Se agregó una capa de 2 cm aceite mineral sobre el agar inoculado, se identificó el tubo de ensayo de acuerdo con la muestra correspondiente, se incubó durante 24 h a 37 °C y se realizó la lectura de los resultados. Se consideró como una prueba positiva aquella en la que se observó un cambio de color en el medio semisólido a amarillo (Mossel, 1962; Roberson y col., 1992).

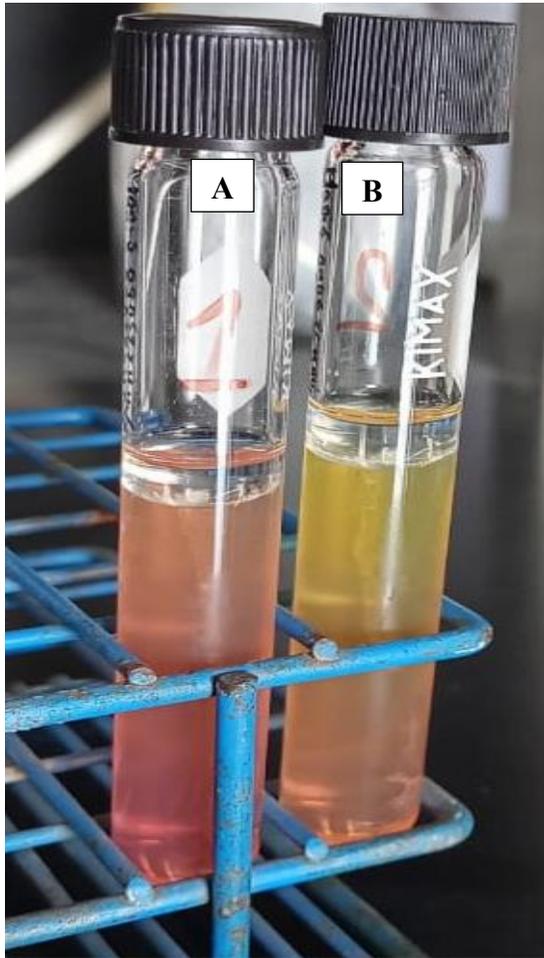


Figura 25. Lectura de la prueba bioquímica Manitol Anaerobio. A: Muestra de *Staphylococcus coagulasa* (-) negativa a la prueba bioquímica Manitol Anaerobio. B: Muestra de *Staphylococcus aureus* positiva a la prueba bioquímica Manitol Anaerobio.

Prueba de Agar P

Para poder diferenciar a *S. aureus* de otras especies coagulasa positivas, se empleó esta prueba complementaria ya que el contenido de Acriflavina en el agar favorece sólo el crecimiento *S. aureus*, inhibiendo así el crecimiento de alguna otra especie estafilocócica coagulasa positiva.

Materiales

- ✓ Primo aislamiento de la muestra de interés.
- ✓ Agar P (peptona de caseína, extracto de levadura, cloruro de sodio, glucosa y 7 µg/ml de acriflavina).
- ✓ Marcador de punto fino con tinta permanente.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Incubadora.

Procedimiento: con un asa microbiológica se tomó una colonia del medio de cultivo del primo aislamiento y se esparció el inóculo, realizando una estría continua en la parte correspondiente a la muestra y se incubaron en condiciones aerobias a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se realizó la lectura, con el fin de identificar el crecimiento de bacterias las cuales corresponden únicamente a la especie *S. aureus* en el medio de cultivo. En las siembras donde no sea evidente el crecimiento de colonias bacterianas se confirmó la infección por *S. pseudointermedius* (Aguilar y col. 2014).



Figura 26. Lectura de la prueba Agar P. A: Muestra de *S. pseudointermedius* negativa a la prueba de Agar P. B: Muestra de *Staphylococcus aureus* positiva a la prueba de Agar P.

Prueba CAMP-Esculina (CAMP: Christie Atkins Munch-Petersen y Esculina)

Esta prueba busca la potencialización de la hemólisis en bacterias Gram (+) y con la adición de esculina al medio se busca evidenciar su hidrólisis a esculetina que con iones hierro forman un precipitado fenólico color negro en el agar (Aguilar y *col.* 2014). El procedimiento se realizó de la siguiente forma:

Materiales

- ✓ Primo aislamiento de la muestra de interés.
- ✓ Cultivo de *S. aureus* beta toxina (previa identificación conocida).
- ✓ Agar CAMP-Esculina.
- ✓ Marcador de punto fino con tinta permanente.
- ✓ Mechero de Bunsen.
- ✓ Asa microbiológica.
- ✓ Incubadora.

Procedimiento: con un asa microbiológica se tomó una colonia de *S. aureus* beta toxina (cepa nodriza) y se sembró en el medio CAMP-Esculina una estría continua recta a todo lo largo del medio de cultivo de tal forma que lo divida en dos partes. Se tomó una colonia del medio de cultivo sugerente a *Streptococcus* spp y se sembró una estría recta perpendicular a la siembra de la cepa nodriza, teniendo la precaución de no tocar la línea de siembra de la cepa de *Staphylococcus*. Para hacer un uso eficiente del material de laboratorio, se sembraron hasta 8 cepas diferentes en el mismo medio de cultivo, las cuales fueron identificadas con el número correspondiente a la muestra que se procesó. Los cultivos se incubaron en condiciones aerobias a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se realizó la lectura, considerando que si se observa hemólisis completa en punta de flecha en el punto donde converge la cepa de interés con la cepa nodriza se considera que la bacteria es CAMP (+) como sucede en el caso de *Streptococcus agalactiae*, si se observa oscurecimiento alrededor de la siembra se considera que la bacteria es Esculina (+) como

sucede en el caso de *S. uberis* y si la prueba es CAMP (-) Esculina (-) se considera que la bacteria aislada es *S. dysgalactiae* (Aguilar y col. 2014).

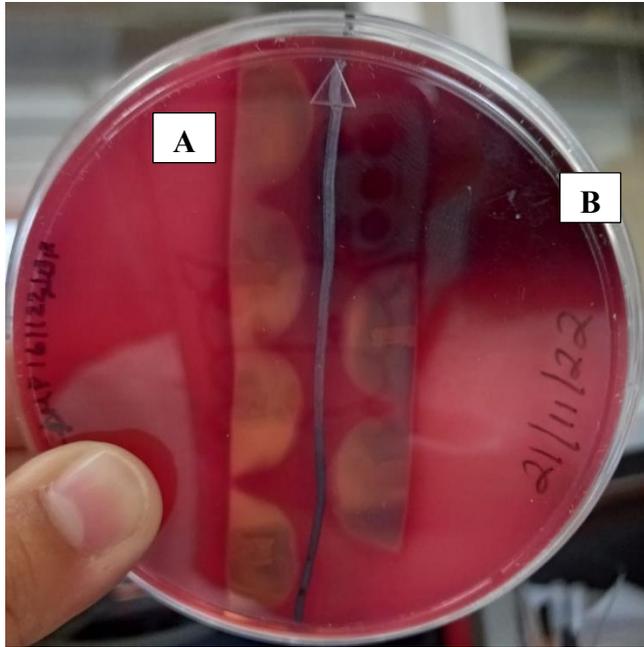


Figura 27. Lectura de la prueba CAMP-Esculina. A: Muestra de *S. agalactiae* positiva a la prueba de CAMP. B: Muestra de *S. uberis* positiva a la prueba Esculina