

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina. Revisión Sistemática.

Johnny Esteban Sánchez Pulgarín

**Trabajo de Grado para optar el título de:
Magister en Microbiología y Bioanálisis**

**Tutor
Leonardo Alberto Ríos Osorio**

**Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia
2014**

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina. Revisión Sistemática.

Johnny Esteban Sánchez Pulgarín¹, MSC (E); Leonardo Alberto Ríos Osorio¹, PhD

¹Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia.

Resumen

La mastitis infecciosa es considerada la enfermedad que más afecta al ganado bovino alrededor del mundo; siendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y algunos bacilos Gram negativos, los agentes etiológicos más prevalentes reportados en la literatura; de los cuales se han publicado numerosos estudios en los que se determinan los niveles de susceptibilidad antimicrobiana por medio de la implementación de diversas metodologías y la aplicación de diferentes criterios de interpretación de los resultados, lo que hace que los datos no sean comparables entre estudios, dificultando la recopilación y análisis de estos, y limitando la perspectiva del panorama global sobre la resistencia antimicrobiana en la medicina bovina, en donde el uso indiscriminado y no controlado de antibióticos, como medida de control y en el tratamiento de la enfermedad, ha ejercido una presión selectiva sobre los microorganismos implicados, seleccionando cepas resistentes que pueden ser transferidas entre animales o al humano y que funcionan como un potente reservorio de genes de resistencia. El objetivo general de esta revisión sistemática es describir el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos más prevalentes en la mastitis bovina, para lo cual se plantea una metodología (estrategia de búsqueda, criterios de inclusión y de exclusión y plan de recolección y extracción de datos) enfocada en dar respuesta a la pregunta de investigación; describiendo los niveles de resistencia reportados en la literatura científica en los últimos 10 años, determinados a partir de pruebas tanto fenotípicas (proporción de resistencia) como genotípicas (frecuencia de genes y mecanismos de resistencia) y su distribución geográfica.

Palabras claves: Mastitis bovina, Susceptibilidad Antimicrobiana, Resistencia, Antibióticos.

Introducción

La mastitis bovina se define como una reacción inflamatoria del parénquima de la glándula mamaria que puede ser de carácter infecciosa, tóxica o traumática;⁽¹⁾ la mastitis infecciosa es considerada la enfermedad que más afecta al ganado bovino alrededor del mundo, siendo la causa de grandes pérdidas económicas para la industria lechera,^(2, 3) al disminuir la producción, alterar directamente la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda e incrementar los gastos en servicios veterinarios, tratamientos y medidas de control; aunque estos costos varían geográficamente, debido a factores tales como clima, raza, infraestructura, sistemas de producción, entre otros, los principios económicos detrás de ellos son los mismos. En los últimos 5 años se han publicado una serie de estimaciones de pérdidas económicas con un rango que varía desde € 61 a € 97 por vaca/año, con diferencias entre algunos países, como es el caso de los países bajos, donde las pérdidas variaron entre € 17 y € 198 por vaca/año, en la gran mayoría de estos datos, solo se tuvieron en cuenta las pérdidas por disminución en la producción, lo que sugiere que las cifras podrían ser mayores, al omitir gastos como mano de obra, tratamientos terapéuticos, asistencia médica, entre otros.⁽³⁾

Otro de los factores que influye en las pérdidas económicas generadas por la mastitis está relacionado con las manifestaciones de la enfermedad, estas pueden presentarse de forma clínica o subclínica, siendo esta última la más frecuente, por cada caso clínico se presentan de 25 a 40 subclínicos, con una disminución en la producción láctea de hasta un 48%.^(2, 3)

Tanto en su forma clínica como subclínica, los agentes etiológicos reportados en la literatura científica como los más prevalentes son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y algunos bacilos Gram negativos.⁽⁴⁻⁶⁾

Como medida de control de estos agentes infecciosos se describe, la terapia antibiótica suministrada durante el periodo de secado, como la más implementada a nivel mundial; tan solo en los Estados Unidos, se estima que es utilizada en más del 72% de los hatos lecheros,^(5, 6) los cuales la emplean para eliminar las infecciones presentes en la lactancia tardía o para prevenir nuevas infecciones intramamarias durante este periodo, en el cual la ubre se encuentra más susceptible.⁽⁶⁾

Tanto en la terapia del periodo de secado como en el tratamiento de la mastitis clínica, el uso indiscriminado y no controlado de antibióticos ejerce una presión selectiva sobre los agentes etiológicos de la mastitis bovina, lo que ha llevado a la aparición de mecanismos de resistencia a dichos antibióticos,^(5, 7, 8) representando un grave problema tanto para la salud del animal por el fracaso terapéutico en la resolución de la enfermedad, como para la salud pública, ya que se han descrito bacterias aisladas de animales que pueden ser

transferidas a humanos por contacto directo o por productos alimenticios contaminados; y que funcionan como un potente reservorio de genes de resistencia.⁽⁹⁻¹¹⁾

En la literatura científica se encuentran numerosos estudios que determinan los niveles de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas a partir de muestras tomadas de animales que presentan mastitis bovina alrededor del mundo; variables como la metodología utilizada para la determinación del nivel de susceptibilidad y los criterios aplicados para la interpretación de los resultados, dificultan la recopilación y análisis de la literatura existente acerca del tema, limitando la perspectiva que se tiene sobre el panorama global de la resistencia bacteriana en la medicina bovina; debido a esto, se planteó una revisión sistemática, en la cual se describa el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos más prevalentes en la mastitis bovina, explorando el nivel de resistencia, determinado a partir de pruebas fenotípicas (proporción de resistencia) como genotípicas (frecuencia de genes y mecanismos de resistencia) y su distribución geográfica; con el fin de dar respuesta a la pregunta de investigación ¿Cuáles son los niveles de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos más prevalentes de la mastitis bovina que se han reportado en la literatura científica en los últimos 10 años alrededor del mundo?.

Materiales y métodos

Estrategia de búsqueda

El estudio se llevó a cabo en conformidad con la declaración PRISMA.^(12, 13) En septiembre de 2012, se realizó una búsqueda sistemática de literatura en las bases de datos MEDLINE (motor de búsqueda Pubmed) y ScienceDirect, por especificidad utilizando descriptores MeSH y por sensibilidad utilizando la combinación mediante operadores booleanos de términos determinados de acuerdo a la pregunta de investigación.

Se realizó la búsqueda con los términos “Mastitis AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle)”, cruzados mediante el operador “AND” con los términos “Antimicrobial susceptibility” “Microbial sensitivity test” y el termino truncado “resist*” que abarca “resistente” y “resistance”. Tanto en Pubmed como en ScienceDirect se utilizó los límites de tiempo “last 10 years” y “2002 to present” respectivamente, para abarcar la literatura científica publicada entre Septiembre 2002 y Septiembre 2012. Las rutas de búsqueda para Pubmed y ScienceDirect se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Rutas de búsqueda

Pubmed

(((((mastitis AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle)) AND antimicrobial susceptibility)) OR ((mastitis AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle)) AND resist*[Title])) OR ((mastitis AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle)) AND microbial sensitivity test [MeSH])

Filters activated: published in the last 10 years

ScienceDirect

((Mastitis AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle)) and TITLE-ABSTRACTKEY(antimicrobial susceptibility)) OR ((Mastitis AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle)) and TITLE (resist*)) OR ((Mastitis AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle)) and (microbial sensitivity test))

Date Range: "2002 to present"

Las citas encontradas junto con su respectivo resumen se importaron al software de gestión de referencias RefWorks, en el cual se eliminaron las citas duplicadas entre ambas bases de datos.

El protocolo de búsqueda fue aplicado por dos revisores de forma independiente, cuyas diferencias fueron analizadas y resueltas por mutuo acuerdo. Adicional a los artículos que arrojó el protocolo de búsqueda en las bases de datos, también se tuvieron en cuenta las referencias de los artículos seleccionados, como posibles fuentes de artículos que se filtraron en la búsqueda inicial.

Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron solo artículos originales reportados en la literatura científica en los últimos 10 años (Septiembre 2002 a Septiembre 2012), escritos en el idioma inglés, los cuales reportaran los resultados de la determinación de los niveles de susceptibilidad frente a antibióticos por parte de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y bacilos Gram negativos aislados directamente a partir de muestras de leche de vacas con mastitis, tanto en su forma clínica como subclínica; se tuvieron en cuenta los artículos que reportaran fenotipo y/o genotipo de cualquier patrón de resistencia antimicrobiana independientemente de la metodología utilizada para su determinación.

Se excluyeron los artículos cuya metodología no estuviera correctamente descrita, y todos aquellos en los no se pudiera extraer el dato de la determinación de los niveles de susceptibilidad.

Recolección y extracción de datos

Los datos de cada publicación fueron extraídos y tabulados para su posterior análisis, en un formulario de recolección de información (tabla 2)

<p>Datos generales 1. Título 2.Revista 3.Año de publicación 4.País</p> <p>Caracterización de la población de estudio 5. Raza 6. Número de muestras 7. Tipo de muestra 8. Tipo de muestreo 9. Lugar de muestreo 10. Duración del estudio 11. Clasificación de la mastitis</p> <p>Aislamiento y caracterización 12. Metodología aislamiento 13. Método de tipificación 14. Bacterias aisladas</p> <p>Pruebas de susceptibilidad fenotípica 15. Descripción metodología utilizada 16. Antibióticos evaluados con su respectiva concentración 17. Criterio de interpretación (Puntos de corte clínico <i>Breakpoints</i>, Valor de corte epidemiológico <i>ECOFF</i>) 18. Evaluación cuantitativa (halos de inhibición, Concentración inhibitoria mínima) 19. Interpretación cualitativa de la susceptibilidad 20. Porcentaje de resistencia por combinación bacteria-antibiótico</p> <p>Pruebas de susceptibilidad genotípica 21. Descripción metodología utilizada 22. Gen amplificado 23. Mecanismo de resistencia implicado 24. Correlación feno-genotípica 25. Frecuencia del gen evaluado</p> <p>Información adicional 26. Observaciones</p>

Tabla 2 Formulario de recolección de datos aplicado a cada artículo

Resultados y Discusión

La implementación del protocolo de búsqueda mediante las rutas descritas previamente, arrojó un total de 974 publicaciones (MEDLINE Pubmed 295, ScienceDirect 679). Posterior a la eliminación de 81 referencias duplicadas entre las bases de datos (Gestor de referencias RefWorks), 893 publicaciones se evaluaron en base a título y resumen, de las cuales 794 fueron descartadas, al no cumplir con los criterios de inclusión determinados de acuerdo a la pregunta de investigación. 99 artículos se analizaron en texto completo, de los cuales 15 fueron excluidos, 10 de los artículos no contenían explícito el resultado de los niveles de susceptibilidad o el dato no estaba bien definido para bacterias aisladas a partir de leche cruda bovina,⁽¹⁴⁻²³⁾ en cuatro de los artículos los resultados indicaban una “n” diferente para cada antibiótico evaluado,⁽²⁴⁻²⁷⁾ y uno en el que la descripción de la

metodología para la determinación de los niveles de susceptibilidad no era clara.⁽²⁸⁾ Un total de 84 artículos fueron incluidos en la revisión sistemática (Figura 1).⁽²⁹⁻¹¹²⁾

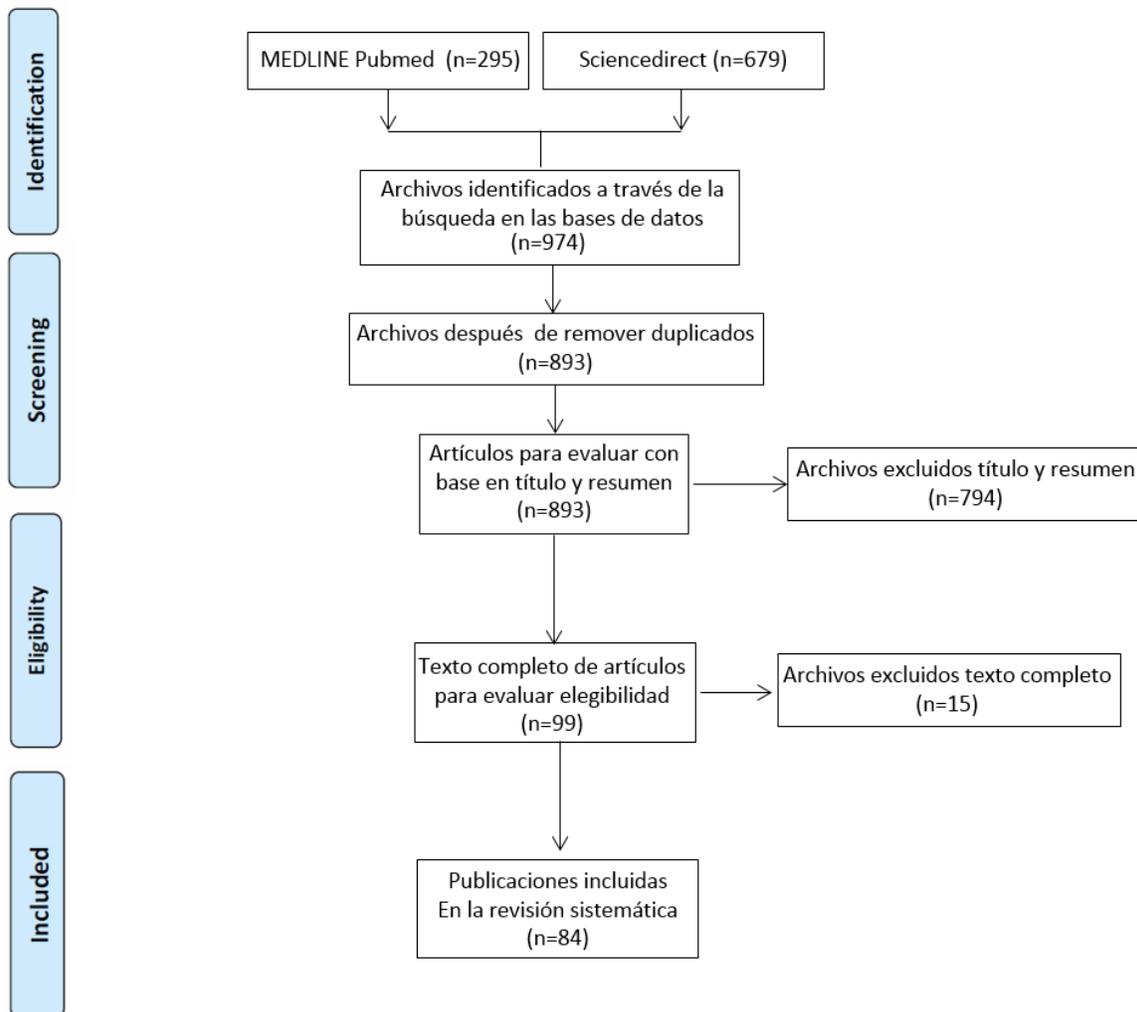


Figura 1. Flujograma estrategia de búsqueda.

De acuerdo con las condiciones de la pregunta de investigación y los criterios de inclusión y exclusión, los artículos incluidos en este estudio no son comparables entre sí, debido a las diferentes características propias de la metodología utilizada para cada estudio, como es el caso de las pruebas implementadas para la medición de los niveles de susceptibilidad antimicrobiana y los criterios de interpretación de los resultados (Ver: *Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana y Criterios de interpretación de resultados (Puntos de corte clínicos Breakpoints y Valores de corte epidemiológico ECOFF)*), y a otras variables como el número y familia de antimicrobianos evaluados en cada estudio y la presentación clínica de la enfermedad, en donde se reportaron niveles de susceptibilidad en microorganismos aislados de bovinos con mastitis clínica 11.9%, subclínica 16.7%, clínica y subclínica dentro del mismo estudio 28.6% y un 42.9% de estudios en donde no se reportó el dato sobre la

clasificación de la mastitis. (Ver Tabla 3, 4, 5 y 6); sin embargo teniendo en cuenta la naturaleza de este estudio, estas variables fueron tenidas en cuenta con el fin de enriquecer la descripción sobre la forma en la que se está investigando el tema alrededor del mundo.

Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina.

Staphylococcus aureus.

Staphylococcus aureus es considerado el microorganismo patógeno más prevalente y contagioso causante de infecciones intramamarias en ganado bovino alrededor del mundo,^(29, 46, 113) por esta razón es también el más investigado, de las 84 publicaciones seleccionadas dentro de los últimos 10 años, el 62% de los artículos se limitan a describir fenotípica y/o genotípicamente los niveles de susceptibilidad de *S. aureus* aislado a partir de leche cruda en 31 países,⁽²⁹⁻⁸⁰⁾ reportando microorganismos implicados, tanto en infecciones subclínicas crónicas^(34-36, 38, 49, 56) como en mastitis con manifestaciones clínicas.^(42, 48, 50, 57, 69)

El tratamiento implementado contra *S. aureus* ha demostrado bajas tasas de curación tanto en la etapa de secado como durante la lactancia^(29, 113, 114) esta falla terapéutica podría explicarse por la presencia de un mecanismo de resistencia que actúe directamente contra el medicamento o por la ineficacia de este para llegar a su blanco de acción, sea por la alteración del blanco,⁽¹¹⁵⁾ la formación de biopelículas,^(116, 117) o la ubicación intracelular de algunas cepas específicas de *Staphylococcus aureus*,⁽¹¹⁸⁾ los estafilococos no presentan resistencia antimicrobiana intrínseca, por lo que naturalmente deberían ser susceptible a la mayoría de antibióticos, excepto a aquellos que tienen espectro contra Gram negativos exclusivamente,^(119, 120) en Estados Unidos los antibióticos más utilizados para las infecciones intramamarias incluyen representantes del grupo de β -lactámicos (Penicilina G, Amoxicilina, Ampicilina, Cefapirina, Ceftiofur y Cloxacilina), Macrólidos (Eritromicina) y Lincosamidas (Pirlimicina)^(27, 113, 121, 122) siendo los β -lactámicos los de primera línea para utilizar frente *S. aureus* susceptible. El éxito del tratamiento radica entonces en la determinación de los niveles de susceptibilidad como base para la toma de decisiones, sumado a diferentes factores inherentes a la naturaleza de la infección, del patógeno y del bovino.^(5, 118, 123, 124)

La determinación fenotípica de los niveles de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* se evaluó en 43 de los 84 artículos,⁽²⁹⁻⁷¹⁾ de los cuales se extrajo el porcentaje de resistencia frente a los medicamentos evaluados (Tabla 3); en la sumatoria de los artículos, un total de 77 antibióticos fueron utilizados, siendo Penicilina G el más evaluado (40 artículos), seguido por Tetraciclina, Eritromicina, Oxacilina, Gentamicina, Ampicilina, Trimetoprim sulfa y Cefalotina evaluados en 37, 33, 27, 25, 22, 22 y 19 artículos respectivamente.

La resistencia a Penicilina G es la más común en los aislamientos de *S. aureus*, reportando niveles de resistencia que varían considerablemente entre países, México 100% (31/31)⁽³⁴⁾, Korea 81.1% (505/623)⁽⁴⁰⁾, Reino Unido 41.3% (580/1406)⁽⁷¹⁾ y Noruega 2.6% (6/231)⁽⁶⁴⁾. Cuando la comparación se realiza entre investigaciones realizadas en el mismo país, los niveles de resistencia tienden a estar más relacionados, como es el caso de Brasil en 2004 (87.4%),⁽³⁵⁾ 2005 (55.1%)⁽³⁶⁾ y 2012 (81.9%)⁽³⁷⁾, Korea en 2007 (73%),⁽³⁹⁾ 2007 (81.1%)⁽⁴⁰⁾ y 2011 (66.4%)⁽⁴¹⁾ e Irán en 2007 (57.4%),⁽⁴⁷⁾ 2007 (66.6%)⁽⁴⁸⁾ y 2011 (56%),⁽⁴⁹⁾ lo que es lógico, puesto que cada país cuenta con una normativa y prácticas propias a la hora de instaurar tratamientos antimicrobianos,^(113, 122, 123) las discrepancias entre y dentro de los países de estudio se podrían explicar por las diferentes metodologías utilizadas,⁽¹¹⁸⁾ la implementación de diferentes técnicas de susceptibilidad antimicrobiana, criterios de interpretación de los resultados cuantitativos (Concentración inhibitoria mínima CIM) o cualitativos (Halos de inhibición), técnicas de aislamiento de patógenos, metodologías en la recolección de muestras y la localización geográfica de los aislamientos, son algunos de los puntos claves que no permiten la comparación de los datos encontrados.^(6, 113, 123, 125)

La resistencia a las Penicilinas, tanto las de bajo espectro (Penicilina G) como las de amplio espectro (Amoxicilina, Ampicilina) en *S. aureus* está mediada principalmente por la expresión de β -lactamasas tipo Penicilinasas que hidrolizan el anillo β -lactámico del antibiótico anulando sus propiedades antimicrobianas; esta enzima es codificada por el gen *blaZ*,⁽¹²⁶⁾ este tipo de resistencia es tan común, que la determinación de β -lactamasas del tipo Penicilinasas no se realiza rutinariamente en los laboratorios,⁽¹¹⁸⁾ una sola publicación reportó la expresión fenotípica de β -lactamasas en 57.3% de sus cepas⁽⁵⁰⁾ y en dos describieron la presencia del gen *blaZ* en 40%⁽⁶⁹⁾ y 43%⁽⁶³⁾ de los *Staphylococcus aureus* aislados.

Dentro del grupo de los β -lactámicos, Ampicilina y Cefalotina fueron los segundos antibióticos en los que más se evaluó el nivel de susceptibilidad de *St. aureus*; Ampicilina mostro niveles de resistencia en todos los estudios en los que se evaluó dentro de un rango entre 2.6%(15/562)⁽³²⁾ y 100% (31/31)⁽³⁴⁾, mientras que en las diecinueve publicaciones en las que se evaluó Cefalotina, una reportó un 32.3%,⁽³⁴⁾ siete fueron inferiores a 4.5%,^(31, 37, 39-41, 52, 58) y los once restantes presentaron una susceptibilidad del 100%.^(29, 30, 32, 33, 36, 38, 43, 57, 59, 62, 64)

Otro de los grupos de antibióticos evaluados y de los más utilizados para el tratamiento de la mastitis bovina como se describió anteriormente son los Macrólidos y Lincosamidas, estos antibióticos son químicamente distintos pero comparten un mecanismo de acción similar, su espectro de actividad es principalmente frente a cocos Gram positivos,⁽¹²⁷⁾ dentro de estos grupos los antibióticos más utilizados para el tratamiento de la mastitis bovina son Eritromicina, Tilmicosina, Espiramicina, Clindamicina⁽⁴²⁾ y Pirlimicina.⁽¹²²⁾ La Eritromicina fue el representante de los Macrólidos más evaluado dentro de los últimos 10 años, con reporte de niveles de susceptibilidad fenotípica de *S. aureus* en 33 artículos, de los cuales 27 describían algún grado de resistencia con rangos que van desde 0.3%⁽⁷¹⁾ hasta 93.1%⁽⁴²⁾ y seis mostraban una susceptibilidad del 100%.^(35, 38, 59, 64, 69, 71) Los

antibióticos Lincosamidas evaluados fueron Clindamicina, Pirlimicina y Lincomicina, los cuales presentaron porcentajes de resistencia muy variables con rangos de 0.5%⁽⁶²⁾-88.2%⁽⁵⁵⁾ 2.4%⁽³²⁾-4.3%⁽³¹⁾ y 0.5%⁽⁶⁸⁾-45.8%⁽⁴²⁾ respectivamente. La resistencia a estos grupos se puede presentar por la modificación del blanco sea por la metilación o mutación que impide la unión del antibiótico a su objetivo ribosomal, lo que conduce a una resistencia cruzada a Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B, llamado fenotipo MLSB, esta resistencia esta codificada por el gen erm (erythromycin ribosome methylase) el cual cuenta con cuatro clases principales en microorganismos patógenos erm(A), erm(B), erm(C) y erm(F),⁽¹²⁷⁾ 4 estudios reportaron la presencia de genes erm en *S. aureus* aislado de mastitis bovina, erm(A) 17.4%,⁽⁵¹⁾ 0%,^(42, 45) erm(B) 3.2%,⁽³⁴⁾ 23.9%,⁽⁴²⁾ 52.2%,⁽⁵¹⁾ erm(C) 3.2%,⁽³⁴⁾ 0%,⁽⁴⁵⁾ 88.1%⁽⁴²⁾ y 30.4%.⁽⁵¹⁾

Yang Wang et al. 2008 reportaron como la presencia del gen erm(B) y erm(C) en *S. aureus* aislado de mastitis bovina demostró una resistencia cruzada a la Eritromicina, Roxitromicina y Azitromicina, a pesar de que estos dos últimos nunca se han utilizado en la medicina veterinaria.⁽⁴²⁾ La resistencia cruzada que se presenta entre familias de antibióticos que comparten mecanismo de acción, es un grave problema, puesto que la mayoría de antibióticos utilizados en animales tienen análogos humanos.⁽⁷⁾ En algunos países como por ejemplo en Suiza, la utilización de algunos antibióticos como la Eritromicina (Macrólido) y Clindamicina (Lincosamida), ha sido prohibida en animales de producción, pero se permite la utilización de antibióticos de su mismo grupo, en algunos preparados para el tratamiento de la mastitis, como es el caso de Espiramicina (Macrólido) y Lincomicina (Lincosamida), lo que ha seleccionado una resistencia cruzada a ambos grupos de antibióticos.⁽⁶⁶⁾

Otro de los mecanismos de resistencia descritos en Macrólidos y Lincosamidas por parte de las bacterias, es la presencia de bombas de flujo del tipo transportadores ABC con especificidad solo para Macrólidos y Estreptograminas B, las cuales son codificada por los genes msr(A)/msr(B) que se han sido identificados en *S. aureus* aislado de mastitis bovina, msr(A) en 3.2%,⁽³⁴⁾ 26.6%⁽⁴⁵⁾ y 78%,⁽⁵¹⁾ msr(B) 46.1%⁽⁴⁵⁾ y msr(A)/msr(B) 1.5%.⁽⁴²⁾ Por ultimo también se puede dar la inactivación directa del antibiótico por parte de enzimas fosfotransferasas codificadas por el gen mph (C) 30.4%⁽⁵¹⁾ y 1.5%⁽⁴²⁾ y Lincosamidas nucleotidiltransferasas codificadas por lnu(A) 6.5%,⁽³⁴⁾ 51.6%,⁽⁴⁵⁾ 34.8%⁽⁵¹⁾ y 3%,⁽⁴²⁾ ambas confieren resistencia a la Lincomicina.

Treinta y siete artículos reportan los niveles de resistencia que *S. aureus* presenta frente a Tetraciclina con un rango de 0.4%⁽⁶⁴⁾ a 42.8%,⁽⁴⁸⁾ y con 5 publicaciones en las que la susceptibilidad fue del 100%,^(35, 38, 57, 69, 71) dos diferentes determinantes genéticos de resistencia a tetraciclina fueron reportados, tetK 30.5% y tetM 3.9%⁽⁴⁵⁾ implicados en la expresión de una bomba de flujo y de proteínas de protección ribosomal, respectivamente.

***Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (MRSA)**

La resistencia a la Meticilina en *Staphylococcus aureus* aislado de humanos fue reportada por primera vez en 1961, poco después de la introducción del fármaco a la medicina humana⁽⁴⁰⁾, y desde entonces su diseminación ha sido generalizada, constituyéndose en uno de los principales problemas de resistencia antimicrobiana a nivel mundial, llegando al punto de considerar al *Staphylococcus aureus* meticilino resistente como un agente etiológico emergente.⁽¹²⁸⁾

MRSA se informó en animales por primera vez en 1971, precisamente en un brote de mastitis bovina,⁽¹²⁹⁾ y desde entonces son muchos los reportes aislamientos en porcinos, caninos, felinos, equinos y bovinos.^(10, 40, 75, 76) La presencia de MRSA en animales domésticos es causa de una gran preocupación, ya que el constante intercambio de material genético entre bacterias, mediante la transferencia horizontal de genes ha sido el principal medio para la difusión de determinantes de resistencia antimicrobiana y de factores de virulencia entre patógenos de interés humano y veterinario,⁽¹³⁰⁾ diferentes estudios moleculares y epidemiológicos han demostrado una estrecha relación filogenética entre cepas aisladas de humanos y bovinos,^(9, 46, 75, 131, 132) comenzando a asociar a las cepas de MRSA no solo con el hospital y la comunidad, sino también como un patógeno zoonótico emergente.⁽¹⁰⁾

En los últimos 10 años, alrededor del mundo, diferentes estudios de corte transversal han reportado la prevalencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente aislado a partir de mastitis bovina, tanto en su forma clínica como subclínica, Canadá 0.06%(1/1802),⁽³²⁾ Turquía 17.2%(16/93),⁽⁷⁹⁾ Holanda 3.4%(62/1839),⁽⁷²⁾ Bélgica 9.3%(11/118),⁽⁷⁷⁾ Japón 0.4%(1/236),⁽⁷⁴⁾ Suiza 1.4%(2/142),⁽⁸⁰⁾ entre otros.^(67, 75, 76, 78) Por otra parte, varios estudios han descrito niveles de MRSA, dentro de un mismo país en diferentes periodos cronológicos, como es el caso de Korea en 2007 2.5%(21/835),⁽⁴⁰⁾ 2007 3%(19/696)⁽³⁹⁾, y 2011 6.2%(24/402)⁽⁴¹⁾ e India en 2010 10.2%(13/128)⁽⁴⁵⁾ y 2011 13.4%(14/107),⁽⁴⁶⁾ los cuales a pesar de ser estudios transversales, y presentar condiciones diferentes que impiden su comparación, logran evidenciar una tendencia en el aumento de la resistencia a través de los años.

La resistencia a la meticilina en *Staphylococcus spp.* es atribuida a múltiples mecanismos, pero el más importante es la producción de una proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) que es expresada a nivel de pared celular bacteriana y tiene una baja afinidad por los antibióticos β -lactámicos, la expresión de PBP2a esta mediada por el gen *mecA*, el cual está localizado en el elemento genético móvil denominado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec)*.^(79, 115, 128) La caracterización molecular de la resistencia a meticilina comprende entonces la determinación del gen *mecA* y la tipificación del *SCCmec*; el gen *mecA* fue amplificado en varios estudios,^(32, 74, 77, 79) en los cuales se utilizó como referente para la clasificación de *Staphylococcus aureus* como resistente o susceptible a la meticilina; en otros estudios la determinación del gen *mecA* se utilizó para la confirmación de las pruebas fenotípicas de difusión en disco con Oxacilina o Meticilina,

en las cuales se encontraron varias discrepancias, Kumar et al. en dos estudios en la India en 2010⁽⁴⁵⁾ y 2011⁽⁴⁶⁾ de 13 y 14 aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina por pruebas fenotípicas, solo 10 cepas en cada estudio amplificaron el gen *mecA*; mientras que Turutoglu et al. en Turquía, 2009⁽⁷⁵⁾ de 18 aislamientos de MRSA determinado por pruebas fenotípicas, solo 3 amplificaron el gen *mecA*. La falta de correlación entre el fenotipo y el genotipo en estos aislamientos se podría explicar sea por la pobre expresión del gen implicado o por la presencia de algún mecanismo de resistencia distinto a la producción de PBP2a como puede ser la sobreproducción de β -lactamasas o la presencia de una nueva meticilinas (alteración de los subtipos PBP),^(45, 46, 75) por otra parte también se podría pensar en que la fiabilidad de la prueba de difusión en disco no es la mejor para detectar resistencia a Meticilina, ya que es la menos específica (80%) de las pruebas fenotípicas, dependiendo de condiciones estrictas en la implementación del método para evitar que la naturaleza heterogénea de la resistencia a la Meticilina limite la exactitud de la prueba de sensibilidad.^(115, 133)

Estafilococo Coagulasa Negativo (ECN)

El género *Staphylococcus* representa el grupo de bacterias más comúnmente aislado a partir de leche cruda de vacas mastíticas;⁽¹³⁴⁾ en el diagnóstico rutinario de la mastitis bovina, los Estafilococos se han dividido en dos grupos, basados en la capacidad de coagular el plasma,⁽¹³⁵⁾ Estafilococos Coagulasa Positivo refiriéndose tradicionalmente a *Staphylococcus aureus* y Estafilococos Coagulasa Negativo que reúne más de 39 especies;⁽¹³⁴⁾ esta clasificación ha sido cuestionada pues se han descrito cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa negativa,⁽¹³⁶⁾ así como otros estafilococos diferentes a *S. aureus* que también tienen la capacidad de coagular el plasma, como es el caso de *Staphylococcus hyicus*⁽¹³⁴⁾ y *Staphylococcus pseudointermedius*.⁽¹³⁷⁾ Dentro de las especies de ECN pueden haber diferencias en la susceptibilidad antimicrobiana, mecanismos de resistencia, factores de virulencia o en la respuesta del huésped frente a la infección,^(84, 138) por lo que se hace necesario la identificación de especies y la determinación de niveles de susceptibilidad individual, para seleccionar la terapia antimicrobiana apropiada; sin embargo, la mayoría de la veces los investigadores no discriminan hasta el nivel de especie y reportan la susceptibilidad de ECN como un grupo homogéneo;⁽¹³⁵⁾ 29 artículos reportaron los niveles de susceptibilidad de *Staphylococcus spp.* diferentes a *S. aureus*, aislados en muestras de leche cruda de vacas mastíticas,^(40, 47, 48, 51, 54, 55, 57-59, 62, 65, 66, 68, 81-96) de los cuales tan solo 9 describieron los resultados discriminados por especies,^(58, 81, 84, 85, 87-91) los demás agruparon todos los aislamientos como ECN; para efecto de la presentación del perfil de susceptibilidad antimicrobiano dentro de la revisión, los ECN fueron evaluados como un grupo uniforme, como se presentó en la gran mayoría de los artículos seleccionados.

Diferentes especies de Estafilococos Coagulasa Negativo son aislados como microbiota normal de piel de la ubre, pezones y otros sitios extramamarios como pelo, fosas nasales, vagina, entre otros.⁽¹³⁴⁾ ECN es considerado como un agente etiológico oportunista de

mastitis bovina, con más de diez especies implicadas, siendo las de mayor prevalencia *Staphylococcus chromogenes*, *St. hyicus*, *St. simulans*, *St. epidermidis*, *St. sciuri*, *St. haemolyticus*, y *St. xylosus*.^(58, 81, 84, 91)

Las manifestaciones clínicas de la infección por ECN en glándula mamaria son escasas, se presenta frecuentemente como una mastitis subclínica, con un ligero aumento en el recuento de células somáticas asociado con la disminución en la producción láctea o en algunos casos mastitis clínica, pero con manifestaciones leves,^(134, 135) por lo que es considerado como un patógeno de menor importancia en mastitis bovina;⁽¹³⁵⁾ A pesar de que las manifestaciones clínicas no son graves, la prevalencia de Estafilococo Coagulasa Negativo como agente etiológico de mastitis bovina sigue siendo una de las más altas alrededor del mundo, Estados Unidos 68.8%,⁽⁹⁵⁾ Finlandia 54%,⁽⁶²⁾ Francia 18.1%,⁽⁶⁸⁾ Suecia 29.6%⁽⁵⁹⁾ y Noruega 25.1%.⁽⁶⁵⁾

Las medidas terapéuticas frente a las infecciones intramamarias por ECN pueden variar dependiendo de diferentes factores que se describen a continuación: la severidad de las manifestaciones clínicas y la persistencia de la infección, son las principales causas para la instauración de tratamiento con antimicrobianos durante la lactancia o en el periodo de secado,⁽¹³⁵⁾ el cual ha reportado una alta tasa de curación pos tratamiento (80%-90%)^(82, 134) en ECN β -lactamasa negativo; el conteo de pocas unidades formadoras de colonia de ECN en el cultivo de leche cruda, puede ser indicio de contaminación de la muestra o infección con una carga bacteriana muy baja,⁽¹³⁵⁾ situación en la que no se utiliza tratamiento antibiótico, pues se han reportado tasas de curación espontánea relativamente altas (44%-72%).^(82, 135) A pesar de que el tratamiento antibiótico no es muy frecuente en mastitis bovina por ECN,^(134, 135) constantemente se reportan en la literatura niveles de resistencia frente a los antibióticos utilizados en infecciones intramamarias descritos anteriormente.^(5, 6, 27, 121)

Diferentes niveles de resistencia antimicrobiana de ECN se han reportado alrededor del mundo dentro de los últimos 10 años; la valoración fenotípica de la susceptibilidad de ECN frente a distintos grupos de antibióticos se evaluó en 26 artículos (tabla 4),^(40, 47, 48, 51, 54, 55, 57-59, 62, 65, 66, 68, 81-86, 88, 90, 92-96) en donde Penicilina G, Ampicilina, Eritromicina y Tetraciclina fueron los antibióticos más evaluados por los investigadores, reportando niveles de resistencia que varían dentro de rangos muy amplios, Penicilina G (12%⁽⁹⁶⁾-75.1%⁽⁹²⁾), Ampicilina (12%⁽⁹⁶⁾-88.9%⁽⁵⁵⁾), Eritromicina (2%⁽⁹³⁾-55.6%⁽⁵⁵⁾) y Tetraciclina (1%⁽⁵⁹⁾-75.1%⁽⁸¹⁾); en la sumatoria global de los artículos se evaluó el nivel de susceptibilidad del ECN frente a 52 antibióticos, representantes de los grupos β -lactámicos, Macrólidos, Lincosamidas, Aminoglucósidos, Sulfonamidas, entre otros.

En la literatura científica, algunos autores han reportado la tendencia de ECN a ser más resistente a los antimicrobianos que *S. aureus*, y a desarrollar más fácilmente multiresistencia;^(82, 134) en trece investigaciones se compararon los niveles de resistencia a diferentes antibióticos entre *S. aureus* y ECN aislados en las mismas condiciones dentro

de cada estudio; *S. aureus* mostró mayores niveles de resistencia frente a Penicilina G^(40, 47, 48, 54, 58, 62) y Eritromicina,^(40, 47, 48, 51, 55, 66) mientras que ECN se mostró más resistente a Ampicilina^(48, 54, 55) y Tetraciclina.^(40, 47, 54, 57, 62, 65, 66, 68)

Los diferentes determinantes genéticos de resistencia descritos previamente para *S. aureus* son transversales en el género *Staphylococcus*; se reportaron ECN con presencia de genes implicados en la resistencia a Macrólidos y Lincosamidas: *erm(A)* 1.6%,⁽⁵¹⁾ *erm(B)* 12.9%,⁽⁸³⁾ y 4.8%,⁽⁵¹⁾ *erm(C)* 29%,⁽⁸³⁾ 2,9%,⁽⁸⁵⁾ 2.7%,⁽⁸⁶⁾ y 4.8%,⁽⁵¹⁾ *msr(A)* 32.3%,⁽⁸³⁾ 0.6%,⁽⁸⁵⁾ 35.1%,⁽⁸⁶⁾ y 19.4%,⁽⁵¹⁾ *mph(C)* 32.3%,⁽⁸³⁾ 0.6%,⁽⁸⁵⁾ y 3.2%,⁽⁵¹⁾ *Inu(A)* 41.9%,⁽⁸³⁾ 20%,⁽⁸⁵⁾ y 3.2%;⁽⁵¹⁾ resistencia a penicilinas de bajo espectro (Penicilina G) y amplio espectro (Amoxicilina, Ampicilina): *blaZ* 80.6%,⁽⁸⁵⁾ 83.7%,⁽⁸⁶⁾ y 29% (determinación fenotípica de producción de β -lactamasas);⁽⁸⁷⁾ y adicional a estos, también se describió la presencia del gen *fusB* 2.7%⁽⁹⁰⁾ implicado en la reducción de la permeabilidad celular ocasionando resistencia bacteriana al Ácido fusídico.

La resistencia a la Meticilina, asociada con la expresión de una proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a), descrita anteriormente en *Staphylococcus aureus*, juega un papel muy importante en ECN, de hecho se ha descrito un gen homólogo a *mecA* (88% de similitud) en *Staphylococcus sciuri* pero con fenotipo susceptible a β -lactámicos, como un posible precursor evolutivo del gen *mecA* presente en las cepas de MRSA;⁽¹³⁹⁾ esto, junto a otras evidencias,⁽¹¹⁵⁾ apoyan la hipótesis de que el gen *mecA* se originó en ECN y fue transferido a *S. aureus* por transferencia horizontal, en el cual evolucionó por la presión selectiva ejercida con los antibióticos.⁽¹³⁰⁾ Estafilococos coagulasa negativo meticilino resistente (ECNMR) aislados como agentes etiológicos de mastitis bovina, han sido reportados ampliamente en la literatura científica alrededor del mundo, Polonia 20% (20/100),⁽⁸¹⁾ Estados Unidos 14% (64/460),⁽⁸²⁾ 10.1% (17/168),⁽⁸⁶⁾ Alemania 0.7% (2/298),⁽⁸³⁾ 13.2% (16/121),⁽⁹¹⁾ Turquía 22% (18/82),⁽⁹³⁾ 6.2% (5/81),⁽⁸⁹⁾ Holanda 27.6% (47/170),⁽⁸⁵⁾ Suecia 0.6% (1/154).⁽⁸⁷⁾ En 3 publicaciones se pudo observar la comparación entre la prevalencia de MRSA y ECNMR aislados en las mismas condiciones dentro de cada estudio, Francia MRSA 0% (0/417) y ECNMR 5.1% (7/217),⁽⁶⁸⁾ Korea MRSA 2.5% (21/835) y ECNMR 2.5% (19/763),⁽⁴⁰⁾ y Suecia MRSA 0% (0/211) y ECNMR 1.8% (1/56),⁽⁵⁷⁾ resultados que están de acuerdo con lo reportado por varios autores,^(82, 134, 140, 141) que describen la resistencia antimicrobiana como un fenómeno que se presenta y se desarrolla más rápidamente en ECN que en *Staphylococcus aureus*.

Streptococcus spp.

Las bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, son después de los Estafilococos, los agentes etiológicos de mayor prevalencia en la mastitis bovina, siendo *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* los principales implicados en procesos infecciosos intramamarios tanto clínicos como subclínicos.^(57, 58, 65, 68) Los agentes etiológicos de la mastitis bovina, se han clasificado en dos grupos de acuerdo a su distribución, epidemiología e interacción con la glándula mamaria,⁽¹⁴²⁾ patógenos

contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium spp.*)^(142, 143) y patógenos ambientales (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, Bacilos Gram negativos, entre otros);^(100, 142, 144) los patógenos contagiosos, habitan y se multiplican dentro y fuera de la glándula mamaria, y son transmitidos de vaca a vaca principalmente durante el ordeño;⁽¹⁴²⁾ mientras que los patógenos ambientales, son aquellos en los que el ambiente alrededor del bovino funciona como reservorio, y son capaces de infectar glándula mamaria cuando las condiciones son favorables, por lo que se describen como patógenos oportunistas.⁽¹⁴⁵⁾

S. uberis y *S. dysgalactiae* son considerados exclusivamente patógenos animales,⁽⁹⁷⁾ y son reconocidos como importantes agentes etiológicos emergentes de mastitis bovina en diferentes partes del mundo,⁽¹⁰⁰⁾ los cuales, se aíslan normalmente del medio ambiente y de diferentes lugares anatómicos del bovino como amígdalas, boca y vagina en el caso de *S. dysgalactiae*⁽¹⁴²⁾ y tracto genital, rumen y recto en *S. uberis*;⁽¹⁴⁴⁾ mientras que *S. agalactiae* es también un patógeno humano, implicado en neumonía, septicemia y meningitis en recién nacidos, infecciones significativas en mujeres embarazadas y ancianos y es una causa importante de mortalidad en adultos inmunocomprometidos;⁽¹⁴⁶⁾ a pesar de que *S. agalactiae* se ha aislado tanto de origen humano como bovino, varios investigadores han reportado las diferencias fenotípicas que presentan estas dos cepas,^(147, 148) Duarte, R. et al. en 2004⁽¹⁰²⁾ describieron cepas de *S. agalactiae* aisladas en leche cruda, las cuales no presentaban características fenotípicas comunes entre los aislados de otras fuentes, como la humana, tales como la actividad β -hemolítica o la resistencia a la bacitracina, lo que permite hablar de un ecovar adaptado a la especie bovina,⁽¹⁴⁹⁾ con enzimas y factores de virulencia que favorecen la patogenicidad y persistencia en la glándula mamaria,^(143, 149) ocasionando infecciones tanto clínicas como subclínicas crónicas, puesto que tiene la capacidad de adherirse al epitelio mamario, lo que favorece su permanencia por largos periodos de tiempo.⁽¹⁴³⁾

El tratamiento antibiótico contra *Streptococcus spp.* ha demostrado altas tasas de curación tanto en la etapa de secado como durante la lactancia.^(96, 121, 143) Las especies del género *Streptococcus* descritas como agentes etiológicos de mastitis bovina, reportan altos niveles de susceptibilidad a la terapia con casi cualquier fármaco antimicrobiano con espectro contra gérmenes Gram positivos,⁽¹⁴³⁾ siendo los antibióticos β -lactámicos y Macrólidos los más utilizados en la terapia de infecciones intramamarias por *Streptococcus spp.*⁽⁹⁹⁾ los cuales demuestran altos niveles de sensibilidad frente a Penicilina G, lo que la ubica como el medicamento de primera línea frente a estas infecciones.^(99, 122)

En veinte artículos se determinaron 39 niveles de susceptibilidad de las especies más prevalentes del género *Streptococcus* aisladas de leche cruda de vacas mastíticas,^(54, 58, 59, 62, 65, 66, 68, 71, 93-103) de las cuales 15 descripciones correspondían a *Sp. uberis*, 12 *S. dysgalactiae*, 9 *S. agalactiae* y en 3 artículos en los que se agruparon los resultados de

diferentes especies dentro de un grupo homogéneo denominado “*Streptococcus spp*”; los porcentajes de resistencia se extrajeron para cada una de las especies descritas (tabla 5). En la sumatoria de los artículos, un total de 40 antibióticos fueron utilizados, siendo Penicilina G el más evaluado (34 artículos), seguido por Tetraciclina y Eritromicina, evaluados en 33 y 31 artículos respectivamente.

En general, la resistencia a Penicilina G en estreptococos, fue la más baja dentro de los agentes etiológicos Gram positivos de la mastitis bovina (*Staphylococcus aureus*, ECN), reportándose niveles de resistencia menores al 8% en 21 de las 39 determinaciones de susceptibilidad, *S. agalactiae* 0% (Portugal,⁽⁹⁷⁾ Argentina⁽⁹⁹⁾ y Suecia⁽⁵⁷⁾), *S. uberis* 0% (Portugal,⁽⁹⁷⁾ Finlandia 2004⁽⁶²⁾ y 2008,⁽¹⁰⁰⁾ y Suecia⁽⁷¹⁾), 0.1% (Reino Unido⁽⁷¹⁾), 1.4% (Holanda⁽⁷¹⁾), 6% (Turquía⁽⁹³⁾) y 7.1% (Suiza⁽⁶⁶⁾) y por último *S. dysgalactiae* 0% (Portugal,⁽⁹⁷⁾ Argentina,⁽⁹⁹⁾ Suecia 2008⁽⁷¹⁾ y 2009,⁽⁵⁷⁾ Etiopia,⁽⁵⁴⁾ Noruega⁽⁶⁵⁾ Italia⁽⁷¹⁾ y Holanda⁽⁷¹⁾), 0.3% (Reino Unido⁽⁷¹⁾) y 7.7% (Suiza⁽⁶⁶⁾).

Algunos artículos reportan niveles altos de resistencia a Penicilina G en estreptococos, que varían considerablemente entre investigaciones realizadas dentro del mismo país, en Irán se reportó 73.3% de resistencia a Penicilina G en *Streptococcus spp.* (2007)⁽⁹⁴⁾ y 69.2% en *S. agalactiae*, 52.9% en *S. dysgalactiae* y 100% en *S. uberis* (2008)⁽⁹⁸⁾ y en Estados Unidos 90.9% (2004)⁽⁹⁵⁾ y 17% (2005)⁽⁸²⁾ de resistencia a Penicilina G en *Streptococcus spp.*

Otros grupos de antibióticos evaluados y de los más utilizados para el tratamiento de la mastitis bovina como se describió anteriormente son los Macrólidos y Lincosamidas, siendo Eritromicina y Clindamicina los antibióticos más evaluados de cada grupo respectivamente, con niveles de resistencia en rangos que varían ampliamente para Eritromicina en *S. agalactiae* (0%⁽⁹³⁾-69.2%⁽⁹⁸⁾), *S. dysgalactiae* (0%⁽⁷¹⁾-52.2%⁽⁹⁸⁾) y *S. uberis* (0%^(54, 62, 71)-66.6%⁽⁹⁸⁾) y Clindamicina en *S. agalactiae* (10.5%⁽¹⁰²⁾-61.5%⁽⁹⁸⁾), *S. dysgalactiae* (12.5%⁽⁹⁹⁾-58.8%⁽⁹⁸⁾) y *S. uberis* (0%^(62, 100) – 55.5%⁽⁹⁸⁾), todos los porcentajes más altos de resistencia a Eritromicina y Clindamicina se presentaron en el estudio de Ebrahimi, A. et al. en 2008⁽⁹⁸⁾, en el cual reportó los niveles de susceptibilidad fenotípica de 13 *S. agalactiae*, 17 *S. dysgalactiae* y 9 *S. uberis*, aislados en Irán de vacas con mastitis bovina en su forma clínica y subclínica, durante un periodo de 15 meses; lo que sugiere un problema de resistencia a Macrólidos y Lincosamidas en la región, el cual podría describirse mejor con una caracterización molecular que ayude a detectar los genes de resistencia que están ocasionando este fenotipo.^(127, 150)

Como se describió anteriormente para el género *Staphylococcus*, el fenotipo de resistencia MLSB es codificado por el gen *erm* y causa resistencia a antibióticos de los grupos Macrólidos, Lincosamidas y Estreptograminas B, por modificación del blanco;⁽¹²⁷⁾ el gen *erm* fue amplificado en *Streptococcus spp* provenientes de leche cruda, *S. agalactiae* *erm(A)* en 1.7%,⁽⁹⁷⁾ 66.6%,⁽¹⁰³⁾ 7.1%⁽¹⁰²⁾ y *erm(B)* en 16.7%,⁽⁹⁷⁾ 100%,⁽¹⁰³⁾ 10.6%,⁽¹⁰²⁾ *S. dysgalactiae* *erm(A)* en 5.6%⁽⁹⁷⁾ y *erm(B)* en 16.7%,⁽⁹⁷⁾ y *S. uberis* *erm(B)* en 26.7%,⁽⁹⁷⁾ 40%.⁽¹⁰¹⁾

Otros de los genes implicados en la resistencia a Lincosamidas, es el gen *linB*, el cual está implicado en la inactivación directa del antibiótico por parte de enzimas nucleotidiltransferasas, el gen *linB* se reportó en *Streptococcus spp* provenientes de leche cruda, *S. dysgalactiae* 16.7%⁽⁹⁷⁾ y *S. uberis* 30%⁽⁹⁷⁾ y 10%;⁽¹⁰¹⁾ este gen es conocido por ser transportado por un plásmido de *Enterococcus faecium*, lo que podría implicar la transferencia horizontal de genes entre estos microorganismos, puesto *E. faecium* que también ha sido aislado como patógeno ocasional de mastitis bovina.^(97, 151)

La resistencia a Tetraciclina fue de las comunes en los aislamientos de *Streptococcus spp.*, reportando niveles de resistencia que varían considerablemente entre especies, *S. agalactiae* (20%⁽⁹³⁾-56.7%⁽⁹⁷⁾), *S. dysgalactiae* (0%^(54, 57)-100%⁽⁹⁷⁾) y *S. uberis* (0%^(57, 66)-66.6%⁽⁹⁷⁾), una gran variedad de determinantes genéticos de resistencia a tetraciclina fueron reportados, los genes *tetM* en *S. agalactiae* (21.7%⁽⁹⁷⁾ 42.1%⁽¹⁰³⁾ y 18.8%⁽¹⁰²⁾), *S. dysgalactiae* (33.3%⁽⁹⁷⁾) y *S. uberis* (6.7%⁽⁹⁷⁾), *tetO* en *S. agalactiae* (33.3%⁽⁹⁷⁾ 71%⁽¹⁰³⁾ y 31.8%⁽¹⁰²⁾), *S. dysgalactiae* (33.3%⁽⁹⁷⁾) y *S. uberis* (30%⁽⁹⁷⁾) y *tetS* en *S. uberis* (26.7%⁽⁹⁷⁾), implicados en la expresión de proteínas de protección ribosomal; y los genes *tetK* en *S. agalactiae* (56.7%⁽⁹⁷⁾) y *tetL* en *S. agalactiae* (7.8%⁽¹⁰³⁾ y 3.5%⁽¹⁰²⁾), implicados en la expresión de bombas de flujo.⁽¹⁵²⁾

Bacilos Gram Negativos

Dentro de los patógenos ambientales descritos como agentes etiológicos de mastitis bovina, los Bacilos Gram Negativos (BGN) son considerados microorganismos oportunistas,⁽¹⁵³⁾ implicados principalmente en la forma clínica de la enfermedad;²⁴⁸ siendo *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* los BGN más frecuentemente aislados de infecciones intramamarias;^(153, 154) aunque también se han descrito géneros como *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, entre otros, implicados como agentes ocasionales de mastitis bovina.^(82, 98, 111, 155)

Los Bacilos Gram Negativos se distribuyen ampliamente en el ambiente alrededor del bovino;⁽¹⁵³⁾ diferentes bacterias como *E. coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*, se encuentran normalmente en tracto gastrointestinal de animales y humanos, por lo que se puede presentar contaminación fecal de suelos, agua, utensilios, etc. La infección intramamaria causada por BGN es entonces, el resultado de la exposición constante del pezón a estas bacterias ambientales, las cuales logran infectar la glándula mamaria, gracias a la presencia de factores de virulencia que favorecen la patogenicidad, colonización y supervivencia de estas bacterias en ubre.⁽¹⁵⁶⁾ El principal factor de virulencia de BGN implicado en la patogénesis de mastitis bovina es la endotoxina o lipopolisacárido,⁽¹⁵⁵⁾ el cual es un componente estructural único de la pared celular Gram negativa, que al ser liberado al momento de la multiplicación o lisis celular, provoca una reacción inflamatoria marcada y signos fisiopatológicos como fiebre, activación del complemento, aumento de la permeabilidad vascular, cambios en los niveles plasmáticos de metabolitos, reactantes de fase aguda, activación de macrófagos, entre otros.^(155, 156)

La gravedad de las manifestaciones clínicas de la mastitis bovina ocasionada por BGN, es mucho más preocupante que su incidencia; la infección por *E. coli* o *Klebsiella spp.* puede variar de una mastitis leve y autocontrolada a formas más graves e incluso mortales;⁽¹⁵³⁻¹⁵⁵⁾ la infección típica tiene un comienzo repentino, caracterizado por cambios en la apariencia de la leche y un elevado aumento de células somáticas; con manifestaciones locales en ubre como endurecimiento y sensibilidad y signos sistémicos como fiebre alta, aumento en la frecuencia cardíaca, falta de apetito, depresión y disminución en la producción de leche, que muchas veces dada la severidad y persistencia de la infección puede resultar en la pérdida permanente de la producción láctea. En algunos casos en infecciones muy severas no controladas, se han descrito complicaciones como bacteremia o endotoxemia, agravando la situación clínica y resolución de la enfermedad.^(155, 156)

En el tratamiento de la mastitis bovina, las aminopenicilinas y cefalosporinas poseen gran actividad contra bacterias Gram-negativas, siendo Ampicilina y Ceftiofur las más utilizadas frente a BGN sensibles;^(122, 126) aunque en ocasiones las infecciones clínicas por *E. coli* presentan una alta tasa de curación espontánea.⁽¹⁵⁵⁾

Los BGN, constituyen el grupo de bacterias, con más alto nivel de resistencia intrínseca; el "resistoma intrínseco" se ha definido como el conjunto de elementos que contribuyen directa o indirectamente a la resistencia a los antibióticos, y cuya presencia es independiente de la exposición previa a antibiótico o a la transferencia horizontal de genes;⁽¹⁵⁷⁾ el principal mecanismo de resistencia intrínseca exhibido en Gram negativos, es el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos MDR, en el que la membrana Gram negativa externa, es impermeable a muchas moléculas, sumado de la expresión de numerosas bombas de flujo de múltiples fármacos, que reducen eficazmente la concentración intracelular del antibiótico.⁽¹⁵⁸⁾ Los bacilos Gram negativos, en especial las Enterobacterias son intrínsecamente resistentes a Penicilina G, Glicopéptidos, Acido fusídico, Macrólidos, Lincosamidas, Estreptograminas, Rifampicina, Daptomicina y Linezolid.^(152, 159)

La determinación fenotípica y/o genotípica de los niveles de susceptibilidad de Bacilos Gram negativos se evaluó en 19 artículos, de los cuales se extrajo el porcentaje de resistencia frente a los antibióticos evaluados (Tabla 6);^(32, 48, 55, 57, 59, 65, 68, 94-96, 104-112) el 55% de los reportes, correspondían niveles de susceptibilidad establecidos para *Escherichia coli*, 15% a un grupo homogéneo denominado "Bacilos Gram negativos" el cual agrupaba los niveles de susceptibilidad de diferentes especies y 6% a *Klebsiella spp.* En la sumatoria de los artículos, un total de 64 antibióticos fueron utilizados, siendo Ampicilina y Tetraciclina los más evaluados (18 artículos), seguido por Gentamicina, Estreptomina, Cloranfenicol y Kanamicina, evaluados en 15, 15, 14 y 13 artículos respectivamente; reportando niveles de resistencia que varían dentro de rangos muy amplios, Ampicilina (5.9%⁽⁵⁹⁾-100%⁽³²⁾), Tetraciclina (4.9%⁽⁵⁷⁾-91.2%⁽¹¹¹⁾), Gentamicina (0%^(57, 59, 109, 110)-

70.6%⁽⁹⁴⁾), Estreptomina (5.6%⁽⁵⁹⁾-94.1%⁽¹¹¹⁾), Cloranfenicol (0%⁽⁵⁹⁾-76.5%⁽¹¹¹⁾) y Kanamicina(3.9%⁽¹⁰⁵⁾-70.6%^(94, 111)).

La Resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacterias Gram negativas es mediada principalmente por β -lactamasas;⁽¹¹¹⁾ estas están ampliamente distribuidas entre los grupos bacterianos, y juegan un papel importante en la resistencia intrínseca y adquirida en BGN, en los que esta codificada cromosómicamente o en plásmidos.⁽¹²⁶⁾ Diferentes β -lactamasas se han descrito, pero TEM-, SHV-, OXA-, -CMY, y CTX-M son las prevalentes en BGN.^(111, 126) Ahmed, M. et al. reportó varias β -lactamasas expresadas en BGN aislados a partir de muestras de leche, *bla*TEM-1, *bla*SHV-12, *bla*SHV-1, *bla*SHV-28, *bla*CMY-2, *bla*CTX-M-15 y *bla*OXA-30; muchas de las cuales confieren alta resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, lo que se constituye en un problema grave, pues las cefalosporinas son considerados antibióticos de primera línea para el tratamiento para la mastitis clínica por Gram negativos. Cefotaxima 38.2%, Ceftriaxona 35.3%, Cefoperazona 35.3%, Ceftazidima 26.5 y Cefpodoxima 58.8%.⁽¹¹¹⁾

Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana y Criterios de interpretación de resultados (Puntos de corte clínicos *Breakpoints* y Valores de corte epidemiológico *ECOFF*)

La eficacia del tratamiento antibiótico en la mastitis bovina, depende de factores inherentes del patógeno, la duración del tratamiento, factores del huésped, la concentración de la droga que se puede alcanzar y mantener en el sitio de la infección, entre otros.⁽¹⁶⁰⁾ La resistencia antimicrobiana presentada por los diferentes agentes etiológicos implicados en la mastitis bovina, es una de las razones potenciales del fracaso terapéutico y las bajas tasas de curación de la enfermedad;⁽¹⁶¹⁾ la toma de decisiones e instauración del tratamiento antibiótico dentro del hato lechero, a menudo se basa en los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*;^(121, 160, 161) la determinación de que un patógeno es sensible a un antibiótico no es garantía de curación, pero la identificación en este de algún tipo de resistencia puede ser un factor que predice una mayor probabilidad de falla terapéutica.⁽⁵⁾

La susceptibilidad antimicrobiana se puede determinar *in vitro* utilizando una variedad de métodos estandarizados, que incluyen difusión en disco, dilución en agar, dilución en caldo y difusión en gradiente de concentración (E-test).^(5, 123, 162) Independientemente de cual sea la metodología utilizada, esta debe ser estrictamente realizada conforme a un procedimiento internacionalmente aprobado, como los publicados por las instituciones *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, *British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC)*, *Deutsches Institut für Normung (DIN)*, *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)*, entre otros;⁽¹²³⁾ dentro de estas instituciones el CLSI es el único que produce documentos con alcance para microbiología humana y veterinaria por separado, ya que cuenta con un grupo de expertos "*Subcommittee on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing (VAST)*" encargado del estándar M31-A3 "*Performance*

Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals".⁽¹⁶³⁾

Dentro de los artículos científicos de los últimos 10 años, las metodologías más utilizadas para la determinación de los niveles de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos de la mastitis bovina, fueron la difusión en disco (55.4%), microdilución en caldo (40.5%), dilución en agar (1.6%) y el método de gradiente de concentración E-test (2.5%) (Tabla 3-6).

La prueba de difusión en disco o método Kirby-Bauer, se ha descrito como la metodología más utilizada en medicina veterinaria para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de patógenos de crecimiento rápido.^(25, 26) Los resultados de esta prueba son interpretados cualitativamente, clasificando a las bacterias dentro de las categorías de sensible, sensibilidad intermedia o resistente, basados en la medición del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de cada antibiótico testeado.⁽¹⁶²⁾ La difusión en disco es un método sencillo, práctico y el más económico, tiene como ventajas la posibilidad de elegir los antibióticos a evaluar, no requiere de equipos especiales y los resultados son fácilmente interpretados por su presentación categórica.⁽¹⁶²⁾ La principal limitación de la prueba, está en que el carácter cualitativo de los resultados, no permite detectar cambios sutiles en los niveles de susceptibilidad, lo que impide el monitoreo del desarrollo y evolución de la resistencia a través del tiempo^(25, 26, 29) o comparaciones válidas entre estudios.⁽¹²⁵⁾

La microdilución en caldo, dilución en agar y difusión en gradiente de concentración (E-test), son los métodos cuantitativos más utilizados para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de patógenos implicados en la mastitis bovina;⁽¹⁶¹⁾ los cuales se basan en la evaluación de la sensibilidad de un inóculo bacteriano estándar frente a diferentes concentraciones seriadas del antibiótico (<0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8> µg/mL), con el fin de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM),⁽¹⁶²⁾ la cual es definida como la concentración más baja de un antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano bajo condiciones in vitro.⁽⁵⁾

Métodos robustos como la macrodilución en caldo o la dilución en agar, son procedimientos tediosos, que requieren una gran cantidad de reactivos y un espacio amplio para su implementación; además de tener una alta probabilidad de error por la preparación manual de las concentraciones antibióticas. Con el desarrollo de metodologías a menor escala como la microdilución, se reduce la utilización de reactivos, espacios y tiempo, logrando un método más reproducible y eficaz, en donde la principal desventaja en la utilización de paneles comerciales estándar, sería la poca flexibilidad a la hora de seleccionar los antibióticos requeridos, teniendo que evaluar los medicamentos preestablecidos en el panel por cada casa comercial;^(161, 162) en situaciones en las que solo se necesita conocer la CIM de tan solo uno o dos medicamentos, el método de difusión en

gradiente de concentración (E-test) es el más adecuado, puesto que permite elegir los antibióticos a evaluar y ha demostrado una buena correlación con CIM generadas por pruebas de dilución en caldo y agar.⁽¹⁶²⁾

Los resultados arrojados por las diferentes pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, sea el diámetro de los halos de inhibición o la concentración inhibitoria mínima, deben ser analizados en base a unos criterios de interpretación aprobados, los cuales ayudan a categorizar el nivel de susceptibilidad de la bacteria frente a cada antibiótico evaluado.^(123, 164) En la actualidad, dos tipos de criterios de interpretación están disponibles, los puntos de corte clínicos *Breakpoints* y los valores de corte epidemiológico *ECOFF*,⁽¹⁶⁵⁾ el alcance de la investigación y las necesidades por las cuales se evaluaron de los niveles de susceptibilidad, determinan que criterio debe aplicarse para la interpretación de los resultados dentro de cada estudio.^(123, 165) Los puntos de corte clínicos *Breakpoints*, se deben aplicar, si el objetivo de la interpretación del dato es la de guiar al médico veterinario para la instauración de un tratamiento antibiótico, basado en los niveles de susceptibilidad que mejor predigan el éxito terapéutico.⁽¹⁶⁵⁾ Los valores de corte epidemiológico *ECOFF*, se aplican cuando el alcance y los resultados de la investigación no tienen ningún uso clínico y solo pretenden describir la distribución de la CIM dentro de una población bacteriana, para monitorear la aparición y desarrollo de la resistencia antimicrobiana con fines netamente epidemiológicos.^(123, 165)

Los puntos de corte clínicos *Breakpoints*, son determinados y aprobados por diferentes instituciones internacionales de normalización, siendo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* y *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*, las dos principales organizaciones encargadas tanto de la evaluación de los datos necesarios para establecer los puntos de corte para cada combinación bacteria/antibiótico, como de la publicación periódica de estándares, directrices e instructivos para la implementación e interpretación de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.⁽¹⁶⁴⁾ La interpretación de los resultados sea el diámetro de los halos de inhibición o la concentración inhibitoria mínima, mediante los puntos de corte clínicos *Breakpoints*, ayuda a categorizar la bacteria como susceptible (actividad antimicrobiana asociada con una alta probabilidad de éxito terapéutico), susceptibilidad intermedia (actividad antimicrobiana asociada con efecto terapéutico incierto, la infección puede ser tratada adecuadamente en los sitios fisiológicos donde el antibiótico se concentra o cuando una alta dosis de medicamento puede ser utilizado) o resistente (actividad antimicrobiana asociada con una alta probabilidad de fracaso terapéutico).^(163, 166, 167)

Los valores de corte epidemiológico *ECOFF*, son determinados y aprobados por la organización *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*; al ser utilizados como criterios de interpretación de la CIM, separan la población salvaje (*Wild type WT*, aquella bacteria que no tiene ningún mecanismos de resistencia adquirido o mutacional) de la subpoblación que ha adquirido susceptibilidad reducida (*Non-Wild Type NWT*, aquella bacteria con la presencia de un mecanismo de resistencia adquirida o

mutacional para el fármaco que se está evaluando). Como se mencionó anteriormente este dato no tiene ninguna aplicación clínica, la susceptibilidad reducida en la subpoblación “no salvaje” no siempre implica resistencia clínica; así como la bacteria de tipo salvaje puede o no responder clínicamente al tratamiento.^(57, 167) Para algunas combinaciones bacteria/antibiótico el punto de corte clínico y epidemiológico pueden ser similares o incluso idénticos, pero este debe ser analizado según el alcance de la investigación.⁽¹²³⁾

El 96.8% de los artículos científicos de los últimos 10 años ha utilizado puntos de corte clínicos *Breakpoints* para la interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos de la mastitis bovina, el 3.2% restante utilizó valores de corte epidemiológico *ECOFF*. (Tablas 3-6)

Como se mencionó anteriormente el CLSI es la única organización que produce documentos con alcance para microbiología veterinaria; el documento estándar M31-A3 “*Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*”, contiene un gran número los puntos de corte clínicos aprobados para bacterias aisladas de origen animal,⁽¹⁶³⁾ muchos de los cuales son exclusivos para el uso veterinario y fueron evaluados estrictamente para unas condiciones específicas de antibiótico/bacteria/enfermedad/huésped y no pueden ser utilizados bajo otras condiciones.^(5, 123) Tan solo en el 55.9% de las publicaciones, se utilizó el estándar CLSI M31, en cualquiera de sus 3 ediciones (A,A2 o A3); en el 44.1% restante se utilizaron estándares con puntos de corte clínicos o epidemiológicos aprobados para humanos, 32.3% estándares del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* diferentes a M31, 5.4% estándares de otras instituciones (*Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (SVARM)*, *Deutsches Institut für Normung (DIN)*, *Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)* y *Norwegian AFA group*), 3.2% puntos de corte clínicos desarrollados por las casas comerciales que fabrican los discos de sensibilidad y 3.2% valores de corte epidemiológico *ECOFF (EUCAST)*(Tabla 3-6).

Actualmente solo hay 3 compuestos antimicrobianos que cuentan con puntos de corte clínicos específicos para pruebas de sensibilidad de los patógenos causantes de mastitis bovina, que son Ceftiofur, Penicilina/Novobiocina y Pirlimicina.⁽¹⁶³⁾ Los criterios para interpretar los resultados de los demás antibióticos necesariamente se basan en puntos de corte clínicos aprobados para humanos o para veterinaria pero en diferentes especies y enfermedades.^(5, 31, 95, 123) Estos resultados no reflejan con precisión la eficacia del fármaco en el tratamiento de la mastitis bovina, ya que las condiciones de la leche son completamente diferentes a las del plasma humano;^(5, 95) propiedades de la leche como proteínas, lípidos, pH y las características iónicas pueden reducir la concentración del agente antimicrobiano activo,^(5, 124) el efecto de la leche en los resultados de los niveles de susceptibilidad antimicrobiana se ha evaluado, en donde la adición de leche al agar Mueller-Hinton en la prueba de difusión en disco, resultó en una disminución de los diámetros de los halos de inhibición para todos los antibióticos evaluados en comparación con el medio sin la adición de leche.⁽¹²⁴⁾

Resistencia antimicrobiana de los agentes etiológicos de la mastitis bovina.

La mastitis bovina es una de las principales condiciones clínicas que conlleva al uso de antibióticos en bovinos de producción lechera, correspondiendo aproximadamente a un tercio del total utilizado en la medicina veterinaria,⁽¹¹¹⁾ la presión ejercida por la utilización de antibióticos como promotores de crecimiento, prácticas como la terapia del periodo de secado o la implementación de tratamientos empíricos, han logrado seleccionar cepas resistentes, sea por la adquisición de genes externos o por mutaciones cromosómicas que regulan la expresión de mecanismos de resistencia^(82, 150); aunque la resistencia bacteriana frente a fármacos antibióticos, no es un tema reciente y se informó por primera vez poco después de que estos fueron aceptados para la implementación terapéutica en humanos y animales,⁽¹²⁵⁾ en los últimos años se ha convertido en un creciente problema de salud pública; diferentes bacterias aisladas a partir de muestras de origen animal se han descrito como posibles reservorios de genes de resistencia que pueden ser transmitidos a humanos por contacto directo o en alimentos,^(68, 82) tal es el caso de Enterococos con resistencia a vancomicina mediada por el gen vanA aislado en pollos de engorde⁽¹⁶⁸⁾ y ganado bovino,⁽⁶⁸⁾ *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) con una alta prevalencia en porcinos,⁽¹⁶⁹⁾ equinos y mascotas domésticas.⁽¹²⁹⁾

La resistencia antimicrobiana ha dejado de ser una situación local, para convertirse en un problema global, la evidencia de la diseminación de bacterias a través de las fronteras geográficas ha sido reportada en la literatura;⁽¹⁷⁰⁾ los niveles de susceptibilidad de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina reportados en la literatura durante los últimos diez años, dan cuenta de la distribución mundial de la resistencia, los 84 artículos describen resultados de bacterias aisladas en 35 países de 4 continentes (Europa, Asia, África y América, con 20, 6, 4 y 5 países respectivamente) dentro de los cuales Estados Unidos es el país en el que más se ha reportado con 10 publicaciones, seguido de Finlandia con 7, Suecia, Suiza, Korea y Turquía con 6 y Dinamarca, Alemania, Noruega, Brasil e Irán con 5 cada uno.

Como se mencionó anteriormente, la resistencia en aislados de origen bovino no es un problema reciente, artículos que describen los niveles de susceptibilidad entre los patógenos causantes de mastitis bovina se han publicado desde hace más de treinta años.⁽¹²⁵⁾ Sin embargo, en los últimos diez años, los nuevos alcances de las herramientas moleculares, el desarrollo de técnicas y equipos para la determinación de los niveles de susceptibilidad, así como la implementación de nuevos puntos de corte para la interpretación de los resultados en bacterias aisladas de animales, han favorecido el desarrollo de la investigación en este campo. Respecto al número de publicaciones por año se observó una distribución homogénea a lo largo de los 10 años, siendo el 2011, el año de mayor producción académica con el 19% de las publicaciones, y 2004 el de menor con tan solo 5.9%.

La literatura científica sobre resistencia bacteriana en los últimos años, ha descrito dentro del resistoma intrínseco bacteriano, un fenómeno denominado “Resistencia fenotípica” en la que ciertas condiciones como la formación de biopelículas, desarrollo de formas de persistencia bacteriana, desplazamiento tipo “*Swarming*”, entre otros, le confieren resistencia transitoria a una población bacteriana que generalmente es susceptible a los antimicrobianos.⁽¹⁵⁷⁾ Se describen entonces mecanismos fenotípicos de resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de leche cruda, independientes de la mutación o adquisición de determinantes genéticos; como la formación de biopelículas por parte de *Staphylococcus spp.*^(116, 117, 171) o la persistencia de *Staphylococcus aureus* variante de colonias pequeñas;^(172, 173) de donde parten nuevos enfoques para la investigación de la susceptibilidad antimicrobiana en medicina veterinaria, donde términos como Concentración mínima de erradicación de *Biofilm* o Concentración mínima inhibitoria de *Biofilm*, juegan un papel importante en el perfil de susceptibilidad antimicrobiano de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina.⁽¹¹⁷⁾

Bibliografía

1. Federation ID. Bovine Mastitis. Definitions and Guidelines for Diagnosis. Brussels, Belgium 1987.
2. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 2003;34(5):475-91.
3. Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ. Economic aspects of mastitis: new developments. *N Z Vet J.* 2011;59(1):16-23.
4. Ericsson Unnerstad H, Lindberg A, Persson Waller K, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M, et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet Microbiol.* 2009;137(1-2):90-7.
5. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16(4):383-407.
6. Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28(2):165-85.
7. Turnidge J. Antibiotic use in animals--prejudices, perceptions and realities. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(1):26-7.
8. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006;119(6 Suppl 1):S3-10; discussion S62-70.
9. Juhasz-Kaszanyitzky E, Janosi S, Somogyi P, Dan A, van der Graaf-van Bloois L, van Duijkeren E, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(4):630-2.
10. Stein RA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*--the new zoonosis. *Int J Infect Dis.* 13. Canada 2009. p. 299-301.
11. Djordjevic SP, Stokes HW, Roy Chowdhury P. Mobile elements, zoonotic pathogens and commensal bacteria: conduits for the delivery of resistance genes into humans, production animals and soil microbiota. *Front Microbiol.* 2013;4:86.

12. Urrútia G, Bonfill X. Declaración PRISMA: una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis. *Medicina Clínica*. 2010;135(11):507-11.
13. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *Bmj*. 2009;339:b2700.
14. Pereira V, Lopes C, Castro A, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*. 2009;26(3):278-82.
15. Ma YP, Chang SK, Chou CC. Characterization of Bacterial Susceptibility Isolates in Sixteen Dairy Farms in Taiwan. *Journal of dairy science*. 2006;89(12):4573-82.
16. Piessens V, De Vliegher S, Verbist B, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, et al. 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*. 2012(0).
17. Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K, Eguchi M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(6):2130-9.
18. Bhatt VD, Patel MS, Joshi CG, Kunjadia A. Identification and antibiogram of microbes associated with bovine mastitis. *Animal Biotechnology*. 2011;22(3):163-9.
19. Guerin-Faubleee V, Carret G, Houffschmitt P. In vitro activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. *The Veterinary record*. 2003;152(15):466-71.
20. van Duijkeren E, Box ATA, Heck MEOC, Wannet WJB, Fluit AC. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Veterinary microbiology*. 2004;103(1-2):91-7.
21. Wallmann J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2006;296 Suppl 41:81-6.
22. Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of dairy science*. 2006;89(7):2542-51.
23. Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Nishimori K, Uchida I, Higashide M, et al. Bacteriological Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Humans and Bulk Milk. *Journal of dairy science*. 2008;91(2):564-9.
24. Petrovski KR, Laven RA, Lopez-Villalobos N. A descriptive analysis of the antimicrobial susceptibility of mastitis-causing bacteria isolated from samples submitted to commercial diagnostic laboratories in New Zealand (2003-2006). *New Zealand veterinary journal*. 2011;59(2):59-66.
25. Makovec JA, Ruegg PL. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2003;222(11):1582-9.

26. Kalmus P, Aasmae B, Karssin A, Orro T, Kask K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011;53:4.
27. Pol M, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *Journal of dairy science*. 2007;90(1):262-73.
28. Garmo RT, Waage S, Sviland S, Henriksen BI, Osteras O, Reksen O. Reproductive performance, udder health, and antibiotic resistance in mastitis bacteria isolated from Norwegian Red cows in conventional and organic farming. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2010;52:11.
29. Tikofsky LL, Barlow JW, Santisteban C, Schukken YH. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2003;9 Suppl 1:S39-45.
30. Anderson KL, Lyman RL, Bodeis-Jones SM, White DG. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. *American Journal of Veterinary Research*. 2006;67(7):1185-91.
31. Oliveira L, Langoni H, Hulland C, Ruegg PL. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Journal of dairy science*. 2012;95(4):1913-20.
32. Saini V, McClure JT, Leger D, Keefe GP, Scholl DT, Morck DW, et al. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*. 2012;95(8):4319-32.
33. Saini V, McClure JT, Scholl DT, DeVries TJ, Barkema HW. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*. 2012;95(4):1921-9.
34. Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Lara PD, Torres-Rodriguez F, Loeza-Angeles H, Mascot-Chiquito N, Sanchez-Baca S, et al. Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008;94(2):199-206.
35. Cabral KG, Lammler C, Zschock M, Langoni H, de Sa ME, Victoria C, et al. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from Sao Paulo State, Brazil. *Canadian journal of microbiology*. 2004;50(11):901-9.
36. Rabello RF, Souza CR, Duarte RS, Lopes RM, Teixeira LM, Castro AC. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of dairy science*. 2005;88(9):3211-9.
37. Costa GM, Paiva LV, Figueiredo HC, Figueira AR, Pereira UP, Silva N. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Research in veterinary science*. 2012;93(2):733-5.
38. Reinoso EB, El-Sayed A, Lammler C, Bogni C, Zschock M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological research*. 2008;163(3):314-22.

39. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Joo YS, Park YH, et al. AntibioGram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of dairy science*. 2007;90(4):1716-24.
40. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, et al. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of dairy science*. 2007;90(3):1176-85.
41. Nam HM, Lee AL, Jung SC, Kim MN, Jang GC, Wee SH, et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *Foodborne pathogens and disease*. 2011;8(2):231-8.
42. Wang Y, Wu CM, Lu LM, Ren GW, Cao XY, Shen JZ. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary microbiology*. 2008;130(1-2):118-25.
43. Li JP, Zhou HJ, Yuan L, He T, Hu SH. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2009;10(10):753-60.
44. Shi D, Hao Y, Zhang A, Wulan B, Fan X. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. *Transboundary and emerging diseases*. 2010;57(4):221-4.
45. Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Current microbiology*. 2010;60(5):379-86.
46. Kumar R, Yadav BR, Singh RS. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *Journal of Biosciences*. 2011;36(1):175-88.
47. Gooraninejad S, Ghorbanpoor M, Salati AP. Antibiotic susceptibility of staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis. *Pakistan journal of biological sciences: PJBs*. 2007;10(16):2781-3.
48. Moniri R, Dastehgoli K, Akramian A. Increasing resistant coagulase negative staphylococci in bovine clinical mastitis. *Pakistan journal of biological sciences: PJBs*. 2007;10(15):2465-9.
49. Sahebkhitiari N, Nochi Z, Eslampour MA, Dabiri H, Bolfion M, Taherikalani M, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2011;58(2):113-21.
50. Guler L, Ok U, Gunduz K, Gulcu Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal of dairy science*. 2005;88(9):3149-54.
51. Aslantas O, Ozturk F, Ceylan A. Prevalence and molecular mechanism of macrolide and lincosamide resistance in staphylococci isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2011;73(12):1645-8.
52. Schmidt T. In vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains from dairy herds in KwaZulu-Natal. *Journal of the South African Veterinary Association*. 2011;82(2):76-9.

53. Shitandi A, Sternesjo A. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. *Journal of dairy science*. 2004;87(12):4145-9.
54. Getahun K, Kelay B, Bekana M, Lobago F. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. *Tropical animal health and production*. 2008;40(4):261-8.
55. Haftu R, Taddele H, Gugsu G, Kalayou S. Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia. *Tropical animal health and production*. 2012;44(7):1765-71.
56. Pengov A, Ceru S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and ovine mammary glands. *Journal of dairy science*. 2003;86(10):3157-63.
57. Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M, Waller KP. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary microbiology*. 2009;136(1-2):142-9.
58. Klimiene I, Ruzauskas M, Spakauskas V, Matusevicius A, Mockeliunas R, Pereckiene A, et al. Antimicrobial resistance patterns to beta-lactams of gram-positive cocci isolated from bovine mastitis in Lithuania. *Polish journal of veterinary sciences*. 2011;14(3):467-72.
59. Persson Y, Nyman AK, Gronlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011;53:36.
60. Vintov J, Aarestrup FM, Elsberg Zinn C, Olsen JE. Phage types and antimicrobial resistance among Danish bovine *Staphylococcus aureus* isolates since the 1950s. *Veterinary microbiology*. 2003;97(1-2):63-72.
61. Bennedsgaard TW, Thamsborg SM, Aarestrup FM, Enevoldsen C, Vaarst M, Christoffersen AB. Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2006;48:24.
62. Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of dairy science*. 2004;87(8):2433-41.
63. Haveri M, Suominen S, Rantala L, Honkanen-Buzalski T, Pyorala S. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Veterinary microbiology*. 2005;106(1-2):97-102.
64. Mork T, Tollersrud T, Kvitle B, Jorgensen HJ, Waage S. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(8):3979-84.
65. Osteras O, Solverod L, Reksen O. Milk culture results in a large Norwegian survey--effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *Journal of dairy science*. 2006;89(3):1010-23.
66. Roesch M, Perreten V, Doherr MG, Schaeren W, Schallibaum M, Blum JW. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *Journal of dairy science*. 2006;89(3):989-97.

67. Sakwinska O, Morisset D, Madec JY, Waldvogel A, Moreillon P, Haenni M. Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhone Valley. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(10):3428-32.
68. Botrel MA, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec JY, Calavas D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. *Foodborne pathogens and disease*. 2010;7(5):479-87.
69. Delgado S, Garcia P, Fernandez L, Jimenez E, Rodriguez-Banos M, del Campo R, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2011;62(2):225-35.
70. Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Veterinary microbiology*. 2003;95(1-2):133-47.
71. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D, Butaye P, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2008;50:28.
72. Feßler AT, Olde Riekerink RGM, Rothkamp A, Kadlec K, Sampimon OC, Lam TJGM, et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. *Veterinary microbiology*. 2012;160(1-2):77-84.
73. Fessler A, Scott C, Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Schwarz S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(4):619-25.
74. Baba K, Ishihara K, Ozawa M, Usui M, Hiki M, Tamura Y, et al. Prevalence and mechanism of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from diseased cattle, swine and chickens in Japan. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2012;74(5):561-5.
75. Turutoglu H, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Veterinary research communications*. 2009;33(8):945-56.
76. Spohr M, Rau J, Friedrich A, Klittich G, Fetsch A, Guerra B, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. *Zoonoses and public health*. 2011;58(4):252-61.
77. Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Veterinary microbiology*. 2010;144(1-2):166-71.
78. García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011;11(8):595-603.

79. Turkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses and public health*. 2010;57(3):197-203.
80. Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2010;15(16):19542.
81. Bochniarz M, Wawron W. Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Polish journal of veterinary sciences*. 2011;14(3):405-10.
82. Rajala-Schultz PJ, Torres AH, Degraives FJ, Gebreyes WA, Patchanee P. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Veterinary microbiology*. 2009;134(1-2):55-64.
83. Luthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006;57(5):966-9.
84. Nam HM, Lim SK, Kim JM, Kang HM, Moon JS, Jang GC, et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2010;20(10):1446-9.
85. Sampimon OC, Lam TJGM, Mevius DJ, Schukken YH, Zadoks RN. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary microbiology*. 2011;150(1-2):173-9.
86. Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Veterinary microbiology*. 2009;134(1-2):73-81.
87. Persson Waller K, Aspán A, Nyman A, Persson Y, Grönlund Andersson U. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Veterinary microbiology*. 2011;152(1-2):112-6.
88. Pate M, Zdovc I, Avbersek J, Ocepek M, Pengov A, Podpecan O. Coagulase-negative staphylococci from non-mastitic bovine mammary gland: characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus haemolyticus* by antibiotic susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis. *The Journal of dairy research*. 2012;79(2):129-34.
89. Unal N, Cinar OD. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical animal health and production*. 2012;44(2):369-75.
90. Yazdankhah SP, Asli AW, Sorum H, Oppegaard H, Sunde M. Fusidic acid resistance, mediated by *fusB*, in bovine coagulase-negative staphylococci. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006;58(6):1254-6.
91. Feßler AT, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(8):1576-82.

92. Thorberg BM, Kuhn I, Aarestrup FM, Brandstrom B, Jonsson P, Danielsson-Tham ML. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Veterinary microbiology*. 2006;115(1-3):163-72.
93. Bal EB, Bayar S, Bal MA. Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2010;48(3):267-74.
94. Ebrahimi A, Kheirabadi KH, Nikookhah F. Antimicrobial susceptibility of environmental bovine mastitis pathogens in west central Iran. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2007;10(17):3014-6.
95. Rajala-Schultz PJ, Smith KL, Hogan JS, Love BC. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary microbiology*. 2004;102(1-2):33-42.
96. Hoe FG, Ruegg PL. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2005;227(9):1461-8.
97. Rato MG, Bexiga R, Florindo C, Cavaco LM, Vilela CL, Santos-Sanches I. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Veterinary microbiology*. 2012.
98. Ebrahimi A, Nikookhah F, Nikpour S, Majiian F, Gholami M. Isolation of Streptococci from milk samples of normal, acute and subclinical mastitis cows and determination of their antibiotic susceptibility patterns. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2008;11(1):148-50.
99. Denamiel G, Llorente P, Carabella M, Rebuelto M, Gentilini E. Anti-microbial susceptibility of *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of veterinary medicineB, Infectious diseases and veterinary public health*. 2005;52(3):125-8.
100. Pitkala A, Koort J, Bjorkroth J. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. *Journal of dairy science*. 2008;91(10):4075-81.
101. Schmitt-Van de Leemput E, Zadoks RN. Genotypic and phenotypic detection of macrolide and lincosamide resistance in *Streptococcus uberis*. *Journal of dairy science*. 2007;90(11):5089-96.
102. Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MA, Teixeira LM. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(9):4214-22.
103. Duarte RS, Bellei BC, Miranda OP, Brito MA, Teixeira LM. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(1):97-103.
104. Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology*. 2003;91(1):73-84.
105. Srinivasan V, Gillespie BE, Lewis MJ, Nguyen LT, Headrick SI, Schukken YH, et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Veterinary microbiology*. 2007;124(3-4):319-28.

106. Wang GQ, Wu CM, Du XD, Shen ZQ, Song LH, Chen X, et al. Characterization of integrons-mediated antimicrobial resistance among *Escherichia coli* strains isolated from bovine mastitis. *Veterinary microbiology*. 2008;127(1-2):73-8.
107. Nam HM, Lim SK, Kang HM, Kim JM, Moon JS, Jang KC, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of dairy science*. 2009;92(5):2020-6.
108. Nam HM, Lim SK, Kim JM, Joo YS, Jang KC, Jung SC. In vitro activities of antimicrobials against six important species of gram-negative bacteria isolated from raw milk samples in Korea. *Foodborne pathogens and disease*. 2010;7(2):221-4.
109. Lehtolainen T, Shwimmer A, Shpigel NY, Honkanen-Buzalski T, Pyorala S. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. *Journal of dairy science*. 2003;86(12):3927-32.
110. Suojala L, Pohjanvirta T, Simojoki H, Myllyniemi AL, Pitkala A, Pelkonen S, et al. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Veterinary microbiology*. 2011;147(3-4):383-8.
111. Ahmed AM, Shimamoto T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. *Microbiology and immunology*. 2011;55(5):318-27.
112. Chuanchuen R, Wannaprasat W, Ajariyakhajorn K, Schweizer HP. Role of the MexXY multidrug efflux pump in moderate aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from *Pseudomonas* mastitis. *Microbiology and immunology*. 2008;52(8):392-8.
113. Roy JP, Keefe G. Systematic review: what is the best antibiotic treatment for *Staphylococcus aureus* intramammary infection of lactating cows in North America? *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2012;28(1):39-50, viii.
114. Kerro Dego O, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q*. 2002;24(4):181-98.
115. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(4):781-91.
116. Melchior MB, van Osch MH, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet Microbiol*. 2009;137(1-2):83-9.
117. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Vet Microbiol*. 2007;125(1-2):141-9.
118. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*. 2006;89(6):1877-95.
119. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000;16, Supplement 1(0):3-10.
120. Pitkala A, Salmikivi L, Bredbacka P, Myllyniemi AL, Koskinen MT. Comparison of tests for detection of beta-lactamase-producing staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):2031-3.

121. Apparao MD, Ruegg PL, Lago A, Godden S, Bey R, Leslie K. Relationship between in vitro susceptibility test results and treatment outcomes for gram-positive mastitis pathogens following treatment with cephapirin sodium. *J Dairy Sci.* 2009;92(6):2589-97.
122. Sarah W, Ron E. Antimicrobial drug use in bovine mastitis. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* Ames, Iowa: Blackwell; 2006.
123. Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol.* 141. Netherlands2010. p. 1-4.
124. Owens WE, Watts JL. Effects of milk on activity of antimicrobics against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine udders. *J Dairy Sci.* 1987;70(9):1946-51.
125. Erskine R, Cullor J, Schaellibaum M. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. National Mastitis Council Research Committee Report. In: *Proceedings of the National Mastitis Council.* Verona (WI): National Mastitis Council; 2004.
126. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 2007;121(3-4):197-214.
127. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis.* 2002;34(4):482-92.
128. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):616-87.
129. Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Layer F, Nubel U, Ohlsen K, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(2-3):109-17.
130. Brody T, Yavatkar AS, Lin Y, Ross J, Kuzin A, Kundu M, et al. Horizontal gene transfers link a human MRSA pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. *PLoS One.* 2008;3(8):e3074.
131. Grinberg A, Hittman A, Leyland M, Rogers L, Le Quesne B. Epidemiological and molecular evidence of a monophyletic infection with *Staphylococcus aureus* causing a purulent dermatitis in a dairy farmer and multiple cases of mastitis in his cows. *Epidemiol Infect.* 2004;132(3):507-13.
132. Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(11):6489-94.
133. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29(1):85-92.
134. Taponen S, Pyorala S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol.* 2009;134(1-2):29-36.
135. Pyorala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009;134(1-2):3-8.
136. Fox LK, Besser TE, Jackson SM. Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209(6):1143-6.

137. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):418-29.
138. Supre K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Vaneechoutte M, Piepers S, De Vliegher S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *J Dairy Sci.* 2011;94(5):2329-40.
139. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):222-35.
140. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sanchez-Conde M, Sanchez-Somolinos M, et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(11):4240-5.
141. Laverdiere M, Weiss K, Rivest R, Delorme J. Trends in antibiotic resistance of staphylococci over an eight-year period: differences in the emergence of resistance between coagulase positive and coagulase-negative staphylococci. *Microb Drug Resist.* 1998;4(2):119-22.
142. Calvino LF, Almeida RA, Oliver SP. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1998;61(1-2):93-110.
143. Keefe GP. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J.* 1997;38(7):429-37.
144. Leigh JA. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet J.* 1999;157(3):225-38.
145. Smith KL, Hogan JS. Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1993;9(3):489-98.
146. Johri AK, Paoletti LC, Glaser P, Dua M, Sharma PK, Grandi G, et al. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(12):932-42.
147. Finch LA, Martin DR. Human and bovine group B streptococci: two distinct populations. *J Appl Bacteriol.* 1984;57(2):273-8.
148. Merl K, Abdulmawjood A, Lammler C, Zschock M. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;226(1):87-92.
149. Devriese LA. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. *J Appl Bacteriol.* 1991;71(6):478-83.
150. Stefani S, Agodi A. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2000;13(3):143-53.
151. Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, et al. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):925-9.
152. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases.* 7th edition ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. 4028 p.

153. Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH, Zadoks RN. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):3964-71.
154. Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011;16(4):357-72.
155. Hogan J, Larry Smith K. Coliform mastitis. *Vet Res*. 2003;34(5):507-19.
156. Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res*. 2003;34(5):521-64.
157. Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, M BS, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2013;4:103.
158. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*. 2013.
159. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(2):141-60.
160. Constable PD, Morin DE. Use of antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens isolated from the milk of dairy cows with clinical mastitis to predict response to treatment with cephapirin and oxytetracycline. *J Am Vet Med Assoc*. 2002;221(1):103-8.
161. Saini V, Riekerink RG, McClure JT, Barkema HW. Diagnostic accuracy assessment of Sensititre and agar disk diffusion for determining antimicrobial resistance profiles of bovine clinical mastitis pathogens. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1568-77.
162. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009;49(11):1749-55.
163. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved standard M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
164. Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):391-408, table of contents.
165. Bywater R, Silley P, Simjee S. Antimicrobial breakpoints—Definitions and conflicting requirements. *Veterinary Microbiology*. 2006;118(1-2):158-9.
166. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Osterlund A, et al. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(2):145-8.
167. EUCAST. EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; [cited 2013 June]. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
168. Eisner A, Feierl G, Gorkiewicz G, Dieber F, Kessler HH, Marth E, et al. High prevalence of VanA-type vancomycin-resistant Enterococci in Austrian poultry. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(10):6407-9.
169. Smith TC, Male MJ, Harper AL, Kroeger JS, Tinkler GP, Moritz ED, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in midwestern U.S. swine and swine workers. *PLoS One*. 2009;4(1):e4258.

170. Okeke IN, Edelman R. Dissemination of antibiotic-resistant bacteria across geographic borders. *Clin Infect Dis.* 2001;33(3):364-9.
171. Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol.* 2005;107(3-4):295-9.
172. Atalla H, Gyles C, Mallard B. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.* 2010;143(2-4):319-28.
173. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 8):1067-73.