

# ESTUDIO DE RESISTENCIA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE MASTITIS SUBCLÍNICA BOVINA FRENTE A CINCO ANTIBIÓTICOS EN TRES SECTORES DE LA IX REGIÓN DE CHILE (NOTA TÉCNICA)

## A Study of the Resistance in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis to Five Antibiotics in Three Sectors of Region IX in Chile (Technical Note)

Oriana Betancourt, Cristián Scarpa y Karen Villagrán

Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Católica de Temuco.

Manuel Montt 56. Temuco, Chile. Fono: 205551. Fax: 227185. E-mail: obetanco@uct.cl

### RESUMEN

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de penicilina G, ampicilina, cloxacilina, neomicina y enrofloxacino para 39 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche de vacas afectadas con mastitis subclínica provenientes de 3 sectores de la IX Región de la Araucanía (Chile), con el propósito de evaluar *in vitro* sus patrones de resistencia. Para ello se utilizaron los métodos de difusión y dilución en agar, según las recomendaciones del NCCLS. Además, se determinó la presencia de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa mediante el método cromogénico de nitrocefina. Se detectó un alto porcentaje de cepas resistentes a penicilina G y ampicilina. Cloxacilina, neomicina y enrofloxacino mostraron actividad hacia todas las cepas. La mayoría de las cepas productoras de betalactamasa provenían del sector Chivilcán. Resultados como los obtenidos aquí, fortalecen la necesidad de establecer planes de monitoreo de resistencia para tratamientos aplicados en Medicina Veterinaria. Esto, adquiere mayor importancia si se considera el rol del médico veterinario en proteger la salud pública.

**Palabras clave:** Mastitis bovina, *Staphylococcus aureus*, MIC.

### ABSTRACT

Minimum inhibitory concentrations were determined for penicillin G, ampicillin, cloxacillin, neomycin and enrofloxacin against 39 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine sub-clinical mastitis in three locations of the IX Region of Araucanía (Chile), in order to evaluate their *in vitro* susceptibility patterns.

Agar diffusion and dilution tests were used according to NCCLS recommendations. Strains producing betalactamase were also determined by a chromogenic cephalosporin method. High resistance levels to penicillin G and ampicillin was detected. Cloxacillin, neomycin and enrofloxacin demonstrated activity against all strains. Results obtained here emphasize the necessity of establishing resistance plan monitoring for treatments applied in Veterinary Medicine. This concept, acquires greater importance considering the role of the veterinarian in public health protection.

**Key words:** Bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, MIC.

### INTRODUCCIÓN

En Chile, uno de los agentes causales predominantes en las mastitis clínicas y subclínicas es *Staphylococcus aureus* [9] el que además de provocar importantes pérdidas productivas se caracteriza por desarrollar resistencia frecuente frente a distintos antibióticos [6, 12, 16].

Existe una variedad de antimicrobianos para el tratamiento de mastitis bovina cuya elección se basa, en el conocimiento de las tendencias generales en susceptibilidad dentro de la práctica clínica [16]. Los más utilizados son betalactámicos, aminoglicósidos, y en Chile también la enrofloxacina [18].

Normalmente no se realiza aislamiento ni evaluación por antibiograma del agente causal de la infección intramamaria [16]. Esto, sumado al hecho de que la elección y suministro del fármaco muchas veces está en manos de una persona que no es el médico veterinario, puede hacer variar la sensibilidad bacteriana así como la recurrencia de presentación de los mi-

croorganismos asociados a esta patología [7, 9]. El análisis de la sensibilidad a los antimicrobianos tiene como objetivo guiar la terapia empírica teniendo presente sus características farmacocinéticas, e informar la generación de resistencia [5]. El fármaco elegido no sólo tiene que cumplir con las características de actuar sobre el germen adecuadamente sino también alcanzar concentraciones mínimas inhibitorias en el sitio de la infección, y asegurar un tiempo de permanencia del fármaco suficiente para determinar el desarrollo bacteriano [13].

La resistencia a antimicrobianos puede ser intrínseca (pertenece a la bacteria) o adquirida. La resistencia adquirida ocurre cuando una bacteria que ha sido sensible a un antibiótico desarrolla resistencia a éste ya sea por mutación o por adquisición de nuevo DNA. En este último caso la bacteria puede adquirir la capacidad de sintetizar una enzima, betalactamasa, la que inactiva el fármaco. La resistencia microbiana en Medicina Veterinaria es relevante si se consideran antecedentes que señalan que bacterias multirresistentes de origen animal pueden transferir esta cualidad a bacterias de importancia para la medicina humana, restringiendo su uso en cuadros infecciosos complicados [10, 23].

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) informa sobre el nivel de resistencia a un antimicrobiano alcanzado por una población bacteriana en un lugar geográfico particular, siendo la CMI<sub>50</sub> y la CMI<sub>90</sub> la concentración del fármaco que inhibe al 50% y 90% de la población en estudio, respectivamente. Muckle y col. [14] comparan CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> y determinan resistencia cuando CMI<sub>90</sub> es mucho mayor que CMI<sub>50</sub>. La ventaja de su determinación reside en que orienta hacia las dosis clínicas del antibiótico en estudio, lo que debe complementarse con conocimientos sobre la farmacocinética de la droga en una especie animal determinada [17]. El presente estudio tuvo como finalidad aportar antecedentes sobre los niveles de resistencia a antimicrobianos de uso en mastitis bovina presentadas por cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de vacas con mastitis subclínica en tres sectores de la IX Región de la Araucanía (Chile).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 39 cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de vacas con mastitis subclínica (según California Mastitis Test), de tres sectores lecheros rurales (Niágara, Pitrufrquén y Chivilcán, con 7, 21 y 11 cepas de cada uno) pertenecientes a la IX Región de la Araucanía, Chile. La identificación se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco. Para la identificación de las colonias sospechosas de *S. aureus* desarrolladas en agar sangre, se realizaron las pruebas de catalasa y coagulasa (en plasma de conejo liofilizado). Las colonias negras, sospechosas de *S. aureus* en agar Baird-Parker (suplementado con yema de huevo y telurito de potasio, Merck), fueron traspasadas a caldo Cerebro Corazón (Merck) a partir del

cual se realizaron las pruebas confirmatorias (correspondientes a coagulasa y producción de ácido en aerobiosis desde fructosa, xilosa, maltosa, lactosa, sucrosa y manitol) [3].

Para la determinación de la sensibilidad por el método de difusión en placa, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards [15]. Las cepas se cultivaron en caldo peptona por 18 h a 37°C y la suspensión se ajustó a una turbidez equivalente a 0,5 McFarland (correspondiente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) [1], la que fue sembrada en agar Mueller Hinton (Merck). Sobre el inóculo se depositaron sensibiliscos de penicilina G (10 IU/IE/UI), ampicilina (10 mcg), cloxacilina (1 µg), neomicina (30 mcg) y enrofloxacilina (10 mcg), incubándose por 18 h a 37°C. Se utilizó como cepa control *S. aureus* ATCC 25923. Los aislamientos fueron categorizados como susceptible (S), sensibilidad intermedia (SI) y resistente (R) basado en los criterios de la NCCLS [15].

Las cepas que resultaron resistentes a penicilina y ampicilina a la vez (14), fueron probadas para producción de betalactamasa utilizando el método del Nitrocefin (Oxoid), para lo cual una muestra de cada cepa se depositó en el extremo de una tira impregnada con Nitrocefin, una cefalosporina cromogénica, que vira de amarillo a rojo en presencia de la enzima.

Para la determinación de las CMI se utilizó el método de dilución en placa estandarizado por la NCCLS [15]. Se prepararon las soluciones madre de penicilina G, ampicilina, cloxacilina, neomicina y enrofloxacina de acuerdo a la fórmula "Cantidad de fármaco (mg) = 100 ml x 2000 µg/ml (2000 UI/ml) / Potencia de la droga (µg o UI/mg)", y los diluyentes señalados por la NCCLS [15] que se indican a continuación.

Droga pura	Solvente	Diluyente
Penicilina G potásica	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Cloxacilina	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Ampicilina	Buffer fosfato pH 8; 0,1 M	Buffer fosfato pH 6; 0,1 M
Neomicina	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Enrofloxacina	½ vol. Agua + gotas NaOH	Agua destilada estéril

Posteriormente se agregó 2 ml de cada dilución a un tubo que contenía 18 ml de agar Mueller Hinton fundido quedando en proporción droga: medio de cultivo de 1:10. Se dejaron 2 placas sin antibiótico como control, una de las cuales se sembró con la cepa *S. aureus* ATCC 25923. Posteriormente se inocularon las placas con las suspensiones estandarizadas de las cepas (0,5 unidades Mc Farland) por medio de un inó-

culo-replicador de Steers (700 µl de suspensión/depósito). Se consideró como CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> aquella dilución del antibiótico que inhibió el crecimiento bacteriano en un 50 y 90% respectivamente, a las 18 h a 37°C. Para interpretar los resultados de CMI, éstos se compararon con los estandarizados por la NCCLS [15] como se presenta en la TABLA II.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Chile, varios agentes antimicrobianos son corrientemente administrados para el tratamiento de mastitis bovinas, incluyendo betalactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas. El método más utilizado para determinar si un aislamiento proveniente de la glándula mamaria es susceptible o resistente a un antimicrobiano, corresponde al método de difusión en agar o de Kirby Bauer. Las 39 cepas provenientes de mastitis subclínica de este estudio mostraron diversidad en los porcentajes de sensibilidad frente a los antimicrobianos probados por este método (TABLA I). De las 14 cepas que mostraron resistencia a los betalactámicos penicilina G y ampicilina por este método, 12 resultaron positivas a betalactamasa, 9 de las cuales fueron de Chivilcan y 2 de Pitrufrquén. Watts y Salmon [24] informan resultados similares utilizando el mismo método. La relación entre presencia de betalactamasa y resistencia a penicilinas ha sido corroborada por otros autores [6, 24] y es predictivo de resistencia tanto a penicilinas como amino-, carboxi- y ureido-penicilinas [15]. En el caso de cloxacilina, penicilina antiestafilocócica que pertenece al grupo de la oxacilina, nafcilina y metilicina [15], la sensibilidad (97,4%) no fue tan afectada como en el caso de las otras penicilinas. Cepas productoras y no productoras de betalactamasa mostraron sensibilidad frente a cloxacilina lo que concuerda con resultados de Gutiérrez [8]. Esto podría deberse a la estabilidad de esta penicilina semi-sintética, frente a la enzima. Este resultado justificaría la elección de cloxacilina en terapia intramamaria en casos de mastitis originados por esta bacteria en todos los sectores muestreados.

Todas las cepas fueron sensibles a neomicina. El 89,7% fué sensible a enrofloxacino, resultado similar al informado por León [9] para el sur de Chile y por Salmon y col. [18], para ce-

pas provenientes de Nueva Zelanda. San Martín y col. [20] y Gutierrez [8], describen valores similares de sensibilidad a estos antimicrobianos en las Regiones V y Metropolitana (Chile, zona central).

Al analizar el comportamiento de las poblaciones de cepas frente a los antibióticos estudiados por sector (TABLA II), se observó que los patrones de sensibilidad a penicilina y ampicilina presentaban variaciones que diferenciarían su elección terapéutica por sector. En Niágara (7 cepas analizadas) se encontraron CMI<sub>90</sub> de 0,5 µg/ml para penicilina G y 0,25 µg/ml para ampicilina. En Chivilcán se observó la mayor proporción de cepas resistentes de un total de 11, obteniéndose CMI<sub>90</sub> de 16 µg/ml y de 8 µg/ml para los mismos antimicrobianos, respectivamente. En el sector Pitrufrquén, las 21 cepas aisladas requirieron CMI<sub>90</sub> de 0,13 µg/ml para penicilina G y 8 g/ml para ampicilina. Estos CMI<sub>90</sub> están por sobre los 0,25 y 0,5 µg/ml, respectivamente, utilizados para categorizar estafilococos como resistentes a esos compuestos [15], excepto en el caso de las cepas provenientes de Niágara frente a la ampicilina. La penicilina generalmente exhibe buena actividad contra cocos Gram positivos pero es afectada por la actividad betalactamasa. *S. aureus* es una bacteria que desarrolla rápidamente resistencia a antibióticos como la penicilina, sobre todo posterior a su uso terapéutico en terreno como el caso de los tratamientos de mastitis bovina, debido al aumento de la presión de selección sobre las susceptibles lo que es de gran preocupación en Medicina Veterinaria [6, 11, 23]. La ampicilina pertenece a un extenso grupo de penicilinas conocido como aminopenicilinas, similares en espectro de actividad a las penicilinas naturales, pero más resistente a betalactamasa [18, 24]. Así, los resultados muestran que la actividad de este antimicrobiano fue menos afectada que la de la penicilina G, lo que concuerda con otros autores [6, 11].

Los CMI<sub>90</sub> para cloxacilina, neomicina y enrofloxacino (CMI<sub>90</sub> 0.5-1 µg/ml) indicarían ausencia de resistencia en las tres localidades, ya que están por debajo de los puntos de cortes señalados por la NCCLS [15], y concuerdan con resultados de Zurich [25], por lo que pueden ser utilizados en terapia de mastitis por *S. aureus* en esos sectores geográficos. Aún cuando no está totalmente aprobada para su uso en tratamien-

TABLA I  
SENSIBILIDAD *IN VITRO* DE 39 CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVA*  
FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS (MÉTODO KIRBY-BAUER)

Droga	S <sup>1</sup>		MS		R	
	N	%	N	%	N	%
Penicilina G	25	64,1	—	—	14	35,9
Ampicilina	25	64,1	—	—	14	35,9
Cloxacilina	38	97,4	1	2,6	—	—
Neomicina	39	100	—	—	—	—
Enrofloxacino	35	89,7	4	10,3	—	—

<sup>1</sup>S sensible; SI sensibilidad intermedia; R resistente.

**TABLA II**  
**CONCENTRACIONES INHIBITORIAS MÍNIMAS CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) Y PUNTOS DE CORTE PARA PENICILINA G, AMPICILINA, CLOXACILINA, NEOMICINA Y ENROFLOXACINO SOBRE CEPAS AISLADAS EN LOS SECTORES DE NIÁGARA (n=7), CHIVILCÁN (n=11) Y PITRUFQUÉN (n=21) PERTENECIENTES A LA IX REGIÓN DE CHILE**

Droga	NIAGARA $\mu\text{g/ml}$			CHIVILCAN $\mu\text{g/ml}$			PITRUFQUEN $\mu\text{g/ml}$			CIM <sup>4</sup> Punto
	Rango	CIM <sub>50</sub> <sup>2</sup>	CIM <sub>90</sub> <sup>3</sup>	Rango	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Rango	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Corte
Penicilina G <sup>1</sup>	0,063 a 0,5	0,25	0,5	8 a 16	8	16	0,063 a 64	0,13	16	$\geq 0,25$
Ampicilina	0,13 a 0,25	0,25	0,25	4 a 8	4	8	0,13 a 8	0,25	8	$\geq 0,5$
Cloxacilina	0,25 a 0,5	0,5	0,5	0,5 a 0,5	0,5	0,5	0,25 a 1	0,5	1	$\geq 4$
Neomicina	0,5 a 1	1	1	0,25 a 1	1	1	0,5 a 1	1	1	$\geq 64$
Enrofloxacino	0,25 a 1	0,25	1	0,25 a 1	0,25	1	0,25 a 1	0,5	0,5	$>4$

<sup>1</sup>Expresado en UI/mL. <sup>2</sup>CIM<sub>50</sub> Mínima concentración que inhibe el 50% de los aislamientos probados. <sup>3</sup>CIM<sub>90</sub> Mínima concentración que inhibe el 90% de los aislamientos probados. <sup>4</sup>Según NCCLS [13].

tos de mastitis bovina, enrofloxacino (fluoroquinolona que inhibe la subunidad *gyrA* de la DNA girasa) se ha venido incorporado en la terapia de secado y se ha sugerido su uso para mastitis clínica por *S. aureus* [16, 18, 25]. Los resultados aquí obtenidos contribuirían a esta elección. No obstante, mientras permanecen en estudio los Límites Máximos de Residuo (LMR) para este antimicrobiano y se aclara su efecto residual, su uso debiera vigilarse.

La descripción de la actividad de los antibióticos sólo tiene carácter orientador, dado que la susceptibilidad de las cepas depende de variados factores siendo los más importantes, entre otros, las concentraciones en el sitio de localización de la bacteria, capacidad del antimicrobiano de penetrar la bacteria y ulterior unión a proteínas específicas de los gérmenes [21]. Desde el punto de vista epidemiológico, la resistencia varía entre regiones geográficas e, incluso, entre predios de una misma región [19]. Resulta importante realizar estudios *in vitro* de la sensibilidad y CMI de estos antibióticos frente a *S. aureus* para así obtener antecedentes cuantitativos que sumados a trabajos farmacocinéticos permitan reproducir CMI efectivas en el animal de acuerdo a ajustes posológicos adecuados asegurando así el éxito de las terapias. Resultados diferentes en CMI por localidad a los distintos antibióticos son explicables ya que el CMI se considera una respuesta individual de cada cepa y no de la especie.

El mantenimiento de altos niveles de sensibilidad a distintos antimicrobianos y la vigilancia de la aparición de resistencia en el tiempo y en diferentes localidades geográficas adquiere vital importancia en Medicina Veterinaria. El patrón de sensibilidad a distintos antibióticos puede ser diferentes para localidades geográficas distintas, aunque sean vecinas. Es primordial llevar registros de los antibióticos utilizados en cada predio y asegurar su uso correcto, así como mantener una rotación de los fármacos por sectores (disminuye la presión de selección), conservándose la susceptibilidad a éstos en distintas localidades. La tendencia actual aconseja usar antimicrobianos de espectro reducido, sobre

todo aquellos que son de primera línea de elección en infecciones graves en medicina humana [2, 22, 23].

El monitoreo de la resistencia por sí solo no provee la información necesaria para una intervención bien dirigida hacia el control de este problema, ya que se requiere información detallada tanto sobre la generación de resistencia como sobre el uso que se hace de los distintos antimicrobianos [2]. Además, orienta la elección terapéutica pero no asegura el éxito de la misma ya que deben considerarse además las interrelaciones con el ambiente interno del hospedero [4].

## CONCLUSIONES

Estos resultados sustentan la necesidad de investigar exhaustivamente el uso de antimicrobianos de uso potencial así como los patrones de resistencia que las cepas de *S. aureus* están desarrollando a ellos en la IX Región de Chile. Esto debido a que, aún cuando se trató de un número de cepas poco representativo, un porcentaje importante de cepas inhibió su crecimiento a CMI de penicilina G y ampicilina superiores al punto de corte establecido por la NCCLS (indicando resistencia) observándose diferencias por sector geográfico. Se confirma la necesidad de establecer en Chile planes de monitoreo de resistencia para tratamientos aplicados en Medicina Veterinaria con el fin de vigilar el uso racional de antimicrobianos y proteger la salud pública.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVAREZ, M.; BOQUET, E.; DE FEZ, M. **Manual de técnicas en microbiología clínica**. Ed. Garsi S.A. España. 314 pp. 1999.
- [2] BAGER, F. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. **Int. J. Antimicrobial Agents** 14:271-274. 2000.

- [3] CARTER, G.; COLE, J. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5° Ed. Academic Press, Inc. USA. 620 pp. 1990.
- [4] CRAVEN, N.; ANDERSON, C.; JONES, T. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet. Rec.** **118**: 290-291. 1986.
- [5] FRIGERIO, C.; BETTERA, S.; SCALISE, I.; GIRAUDO, J.; CALZOLARI, A. Resistencia a antibióticos de cepas de estafilococos aisladas en tres tambos de Córdoba, Argentina. **Revista Med. Vet.** **76**: 288-292. 1992.
- [6] GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; GOLALY, S.; REBUELTO, M.; DE GREGORIO, O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. **J. Dairy Sci.** **83**: 1224-1227. 2000.
- [7] GNANOU J.; SANDERS, P. Antibiotic resistance in bacteria of animal origin: methods in use to monitor resistance in EU countries. **Int. J. Antimicrobial Agents** **15**: 311-322. 2000.
- [8] GUTIERREZ, M. E. Estudio de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cefalosporinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* betalactamasa positivos y negativos aisladas de mastitis clínica bovina. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Escuela de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Clínicas. (Tesis de grado). 39 pp. 1991.
- [9] LEON, B. Frecuencia de aislamiento de los principales agentes de mastitis en el sur de Chile. II Seminario de Calidad de Leche Bovina. Colegio Médico Veterinario de Chile. Consejo Regional Osorno. Libro. 18-19 julio, Temuco. 34-43 pp. 1997.
- [10] LIRA, G.; GIGLIO, S.; ZÚÑIGA, M.; PINTO, E. Consumo de antimicrobianos y variación de resistencia de bacilos Gram negativos en un periodo de diez años. Hospital San Juan de Dios- Chile. **Rev. Chil. Infect.** **16**:199-210. 1999.
- [11] LIVERMORE, D. Antibiotic resistance in staphylococci. **Int. J. Antimicrobial Agents** **16**: S3-S10. 2000.
- [12] LYON, B.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiol. Rev.** **51**:88-134. 1987.
- [13] MERCER, H. D.; TESKE, R. H. Special considerations for the development of drugs for acute clinical mastitis. **JAVMA** **170** (10): 1190-1193. 1977.
- [14] MUCKLE, C.; PRESCOTT, J.; JOHNSTON, R. Susceptibility of *Escherichia coli* from bovine mastitis to new antimicrobial drugs. **Can. J. Vet. Res.** **50**: 543-544. 1986.
- [15] NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. NCCLS Document M31-A. Wayne. PA. 60 pp. 1999.
- [16] OWENS, W.; RAY, C.; WATTS, J.; YANCEY, R. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **J. Dairy Sci.** **80**: 313-317. 1997.
- [17] PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D. **Terapéutica antimicrobiana veterinaria**. Ed. Interamericana McGraw-Hill. 367 pp. 1988.
- [18] SALMON, S.; WATTS, J.; AARESTRUP, F.; PANKEY, J.; YANCEY, R. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. **J. Dairy Sci.** **81**: 570-578. 1998.
- [19] SANDHOLM, M.; KAARTINEM, L.; PYORALA, S. Bovine mastitis: why does antibiotic therapy not always work? An overview. **J. Vet. Pharmacol. Therapy.** **13**: 248-260. 1990.
- [20] SAN MARTIN, B.; BORIE, C.; ZURICH, L. Estudio de resistencia bacteriana frente a diferentes antibióticos utilizados en mastitis clínica bovina. **Mon. Med. Vet.** **13**(2): 49-52. 1991.
- [21] SEARS, P. *Staphylococcus aureus* Mastitis. 32<sup>ND</sup>. Annual Meeting, National Mastitis Council, Inc., Part 1 of 7. Kansas City Missouri. Febrero 15-17. 6 pp. 1993.
- [22] TUNGER, O.; DINC, G.; OZBAKKALOGLU, B.; ATMAN, U.; ALGUN, U. Evaluation of rational antibiotic use. **Int. J. Antimic. Agents** **15**: 131-135.2000.
- [23] VAN DEN BOGAARD, A.; STOBBERINGH, E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **Int. J. Antimic. Agents** **14**: 327-335. 2000.
- [24] WATTS, J.; SALMON, S. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection that produce B-lactamase. **J. Dairy Sci** **80**:788-791. 1997.
- [25] ZURICH, L. Mastitis bovina: análisis actualizado de la terapia sistémica y sus bases farmacológicas. **Mon. Med. Vet.** **14**(1): 11-19. 1993.