

PATOGENOS AISLADOS EN MUESTRAS DE LECHE DE VACA CON ELEVADO CONTENIDO CELULAR SOMATICO A TRAVES DE UN AÑO Y SU SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS ^a

Ulises Rojano Flores ^b

Laura Hernández Andrade ^c

Marcelo Pérez Domínguez ^b

RESUMEN.

Este trabajo tuvo como objetivo establecer la frecuencia, grado de importancia y sensibilidad a diferentes agentes quimioterapéuticos, de microorganismos aislados de leches con alto contenido celular somático. Se obtuvieron muestras de leche, en condiciones de asepsia, de cuartos mamarios que presentaron niveles de células mayores a 2.5 millones por ml. Este muestreo se efectuó mensualmente, durante un año, a partir de 2800 vacas de siete establos localizados en el Valle de México; se seleccionaron 1230 vacas con alto conteo celular, a estos animales se les hizo la prueba de Wisconsin por cuarto, eligiendo así el cuarto para aislamiento bacteriano. De los cuartos muestreados se obtuvieron 896 aislamientos. Los microorganismos aislados con más frecuencia fueron *Staphylococcus aureus* (31 %), *S. epidermidis* (19 %), *Bacillus cereus* (13 %) y *Escherichia coli* (10 %). Algunas especies de microorganismos dieron muestra del efecto de época del año. Las bacterias Gram positivas mostraron resistencias variables a los antibióticos, detectándose diferencia estadística entre éstos. Por otro lado, en el caso de bacterias Gram negativas, se notó una similar resistencia a antibióticos específicos, es decir, la mayoría de las bacterias de este grupo fueron resistentes a cefalosporinas, ampicilina y tetraciclina. Por el modo de acción de los quimioterapéuticos, sólo en las Gram negativas se notó diferencia estadística, siendo los antibióticos que inhiben las síntesis de ácidos nucleicos o los que actúan sobre la membrana celular los más efectivos.

Palabras Clave: Microorganismos asociados a mastitis, Sensibilidad a Quimioterapéuticos, Antibióticos Gram positivos, Gram negativos.

Tec. Pecu. Méx. Vol. 32 No. 1, (1994)

En la vaca lechera, la mayoría de las mastitis son causadas por microorganismos, generalmente bacterias, que invaden la ubre multiplicándose y produciendo toxi-

nas que generan lesiones. Otros tipos de microorganismos que también pueden causar mastitis son las levaduras y en ocasiones algas (1,2, 3). Se ha demostrado que las especies bacterianas que más frecuentemente infectan a la glándula mamaria son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, que forman parte del grupo de las llamadas bacterias contagiosas (2,3). Por otro lado bacterias menos comunes pueden ser las más prevalentes en cierta época del año, como es el caso de las coliformes, durante el periodo de lluvias (1,2,3,4). Algunas vacas son más

- a) Recibido para su publicación 8 de marzo de 1993.
b) CEVAMEX Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Chapingo, Edo. de México, C.P. 56230. Carretera México-Veracruz, Km 38.5
c) CENID-Microbiología, INIFAP-SARH; Departamento de Bacteriología, Km.15.5 carretera México-Toluca, Palo Alto Cuajimalpa, 05110, México, D.F.
Dirigir la correspondencia a QFB Laura Hernández Andrade.

susceptibles de contraer infecciones en la glándula mamaria; la frecuencia de esta enfermedad puede estar influenciada por diferentes factores como son: edad de la vaca, estadio del ciclo de lactación y época del año (2,5).

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud pública, que en México, al no existir control sobre el uso de quimioterapéuticos, es particularmente importante (6,7). Para combatir la mastitis y otras enfermedades del ganado lechero, los antibióticos son usados desmesuradamente produciendo una continua exposición a estos fármacos.

Esta situación impone presiones de selección sobre las poblaciones bacterianas, generando adaptaciones ecológicas hacia los quimioterapéuticos. Tal adaptación o resistencia se puede desarrollar con rapidez y por diferentes mecanismos (6,8,9,10).

Existen informes en la literatura indicando que, la incidencia de bacterias patógenas resistentes a los quimioterapéuticos tiende a ser mayor, tanto en patógenos causantes de enfermedades en el hombre como en los animales (7,11,12,13,14,15). Sin embargo, la magnitud de este problema en patógenos causantes de mastitis no se

ha establecido todavía en México.

El objetivo de efectuar este trabajo fue para establecer los siguientes parámetros: a) la frecuencia e importancia de patógenos aislados de casos de mastitis subclínica; b) el efecto de época del año sobre la frecuencia de los aislamientos; c) evaluar el grado de resistencia a los quimioterapéuticos por las bacterias aisladas; d) Determinar la relación entre el modo de acción de los quimioterapéuticos y el grado de resistencia.

Se tomaron muestras de leche mensualmente, durante un año en 2800 vacas de siete establos ubicados en el Valle de México, característicos de la zona, con ganado de raza Holstein ordeñado con máquina. El tamaño de los hatos variaba entre 200 a 600 vacas.

Estas muestras fueron inicialmente analizadas en cuanto al número de células somáticas; las vacas que presentaban más de 2.5 millones de células somáticas por ml fueron muestreadas nuevamente para realizar la prueba modificada de Wisconsin por cuarto y así poder elegir el cuarto par muestra bacteriológica. Un total de 1,230 vacas fueron muestreadas por un cuarto. Estas muestras fueron sembradas en agar sangre y las bacterias

CUADRO 1. CLASIFICACION DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE 1230 MUESTRAS DE LECHE CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS SOMATICAS POR ML DE ACUERDO CON SU FRECUENCIA DE AISLAMIENTO Y LA PRUEBA DE FRIEDMAN *.

Posición de acuerdo con la frecuencia de aislamiento	Posición de acuerdo con la prueba de Friedman
1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1 <i>Staphylococcus aureus</i>
2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>
3 <i>Bacillus cereus</i>	3 <i>Escherichia coli</i>
4 <i>Escherichia coli</i>	4 Levaduras
5 <i>Corynebacterium spp</i>	5 <i>Bacillus cereus</i>
6 Levaduras	6 <i>Corynebacterium spp</i>
7 <i>Streptococcus agalactiae</i>	7 <i>Streptococcus agalactiae</i>
8 <i>Streptococcus uberis</i>	8 <i>Enterobacter spp</i>
9 <i>Enterobacter spp</i>	9 <i>Streptococcus uberis</i>
10 <i>Klebsiella spp</i>	10 <i>Streptococcus spp</i>
11 <i>Streptococcus spp</i>	11 <i>Klebsiella spp</i>
12 <i>Pseudomonas spp</i>	12 <i>Pseudomonas spp</i>
13 <i>Pasteurella haemolytica</i>	13 <i>Pasteurella haemolytica</i>

* (p<0.05)

CUADRO 2. NUMERO DE AISLAMIENTOS EN 1230 MUESTRAS DE LECHE CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS SOMATICAS POR ML, OBTENIDAS A LO LARGO DE UN AÑO.

patógenos	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic	total
1 <i>Staphylococcus aureus</i>	31	28	19	28	37	16	21	17	30	30	10	10	277
2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	19	20	11	22	21	11	6	2	23	20	8	6	169
3 <i>Bacillus cereus</i>	0	15	5	25	32	12	1	1	26	33	0	0	120
4 <i>Escherichia coli</i>	6	4	6	19	12	12	13	9	13	4	5	7	90
5 <i>Corynebacterium</i> spp.	5	5	22	20	11	0	1	1	4	6	0	0	75
6 Levaduras	3	9	17	10	4	3	6	1	5	1	0	2	61
7 <i>Streptococcus agalactiae</i>	3	6	10	5	4	1	0	3	0	0	1	1	34
8 <i>Streptococcus uberis</i>	0	0	0	0	1	0	12	11	0	2	0	0	26
9 <i>Enterobacter</i> spp.	1	1	3	0	0	0	3	3	4	1	0	0	16
10 <i>Klebsiella</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	13
11 <i>Streptococcus</i> spp.	3	1	1	0	1	0	0	0	1	2	0	0	9
12 <i>Pseudomonas</i> spp.	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3
13 <i>Pasteurella haemolytica</i>	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3
Total por mes	74	89	94	119	123	45	66	61	106	69	24	26	896

fueron identificadas siguiendo procedimientos convencionales (16, 17, 18, 19). Las bacterias identificadas fueron sometidas a pruebas de sensibilidad a los quimioterapéuticos, siguiendo el método de Kirby-Bauer (20) y usando sensibilizadores comerciales.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico mediante tablas de contingencia (21) y al análisis de varianza de dos clasificaciones por grados de Friedman (22).

En el cuadro 1, aparece la clasificación de bacterias aisladas en 1230 muestras de leche, con más de 2.5 millones de células somáticas por ml, de acuerdo a dos criterios: en la columna de la izquierda, los microorganismos aparecen en orden de frecuencia de aislamientos obtenidos en este estudio; así, se puede observar que *S. aureus* fue la bacteria más frecuentemente aislada, seguida de *S. epidermidis*, la bacteria menos frecuente fue *P. haemolytica*.

Por otro lado, en la columna de la derecha, del mismo cuadro, los microorganismos aparecen clasificados de acuerdo a la prueba de Friedman. Una de las características de esta prueba, es la de clasificar las bacterias con base a la distribución de sus aislamientos a lo largo del año. Por lo

tanto, en el caso de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *Pseudomonas* spp y *P. haemolytica*, el lugar que ocupan en las dos clasificaciones es el mismo, pero con los otros patógenos su posición es diferente, según los dos criterios de clasificación. Por ejemplo, *B. cereus* ocupa la posición número 3 de acuerdo al número de aislamientos (120), pero ocupa el 5o lugar según la prueba de Friedman, debido a que como puede observarse en el Cuadro 2, más del 81 % de estos aislamientos tuvieron lugar solamente en los meses de febrero, abril, mayo y septiembre. A diferencia de *S. aureus* y *S. epidermidis* que fueron aislados en todos los meses del año, con más o menos la misma frecuencia.

El número de especies de microorganismos aislados de enero a diciembre, aparece en el cuadro 2. En total fueron 896 aislamientos y su distribución a lo largo del año fue variable, notándose una disminución de octubre a enero y un incremento de febrero a mayo. Por otra parte, hay patógenos que se aislaron solamente en determinados meses, como *Klebsiella* spp y *Streptococcus uberis* y otros que fueron aislados en todos los meses, como *S. aureus* y *E. coli*.

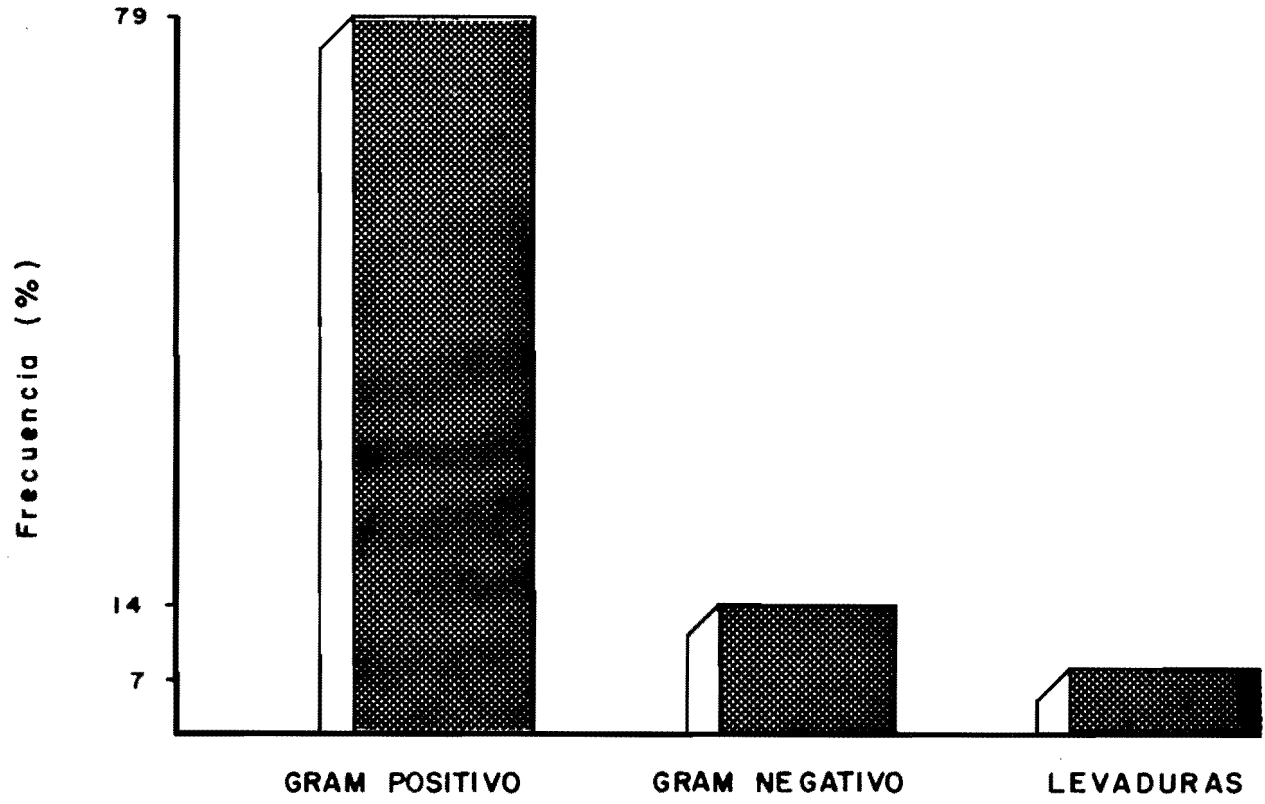


Figura 1. Frecuencia de patógenos aislados de 1230 muestras de leche con mas de 2.5 millones de células somáticas agrupadas según la tinción de Gram y otras características morfológicas.

La frecuencia de patógenos aislados, agrupados de acuerdo a la tinción de Gram y a otras características morfológicas, se presenta en la figura 1. Puede verse que el mayor porcentaje de aislamientos fueron del grupo de los Gram positivos, seguido por los Gram negativos y levaduras.

CUADRO 3. PORCENTAJE DE RESISTENCIA A DIFERENTES QUIMIOTERAPEUTICOS DE 710 CEPAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE LECHE CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS SOMATICAS POR ML

QUIMIOTERAPEUTICOS	RESISTENCIA (%)
Ampicilina	28
Lincomicina	28
Estreptomicina	28
Cloxacilina	24
Penicilina	19
Sulfametoxazol-trimetropina	14
Eritromicina	12
Tetraciclina	12
Cefotaxima	8
Kanamicina	6
Cefalospirina	5
Gentamicina	1

El porcentaje de resistencias encontradas para cada quimioterapéutico en el grupo de las bacterias Gram positivas se encuentra en el cuadro 3. Los quimioterapéuticos a los que se observó mayor resistencia fueron ampicilina, lincomicina y es-

treptomocina; mientras que a la gentamicina, cefalosporina y kanamicina la resistencia fue menor. En el cuadro 4 sin embargo, el análisis por tablas de contingencia, indica que, considerando a todas las bacterias Gram positivas, no hay diferencia significativa entre las resistencias encontradas a los diferentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, *B. cereus* presenta mayor resistencia a lincomicina mientras que *S. uberis* a la cloxacilina, o bien *S. agalactiae* a sulfametoxazol - trimetropin. Igualmente, en este mismo cuadro se puede apreciar que con excepción de *Corynebacterium* spp, en las otras especies bacterianas si hay diferencia significativa en las resistencias mostradas a los quimioterapéuticos estudiados.

La resistencia mostrada por las bacterias Gram negativas fue diferente a las Gram positivas. Como puede verse en el cuadro 5, las bacterias Gram negativas muestran la mayor resistencia a los mismos quimioterapéuticos; se observó mayor resistencia a la cefalosporina, ampicilina y tetraciclina. Debido a esta respuesta homogénea de las bacterias Gram negativas, cuando se consideran como grupo, si se detectan diferencias significativas entre las resistencias mostradas a los quimioterapéuticos estudiados (cuadro 6).

CUADRO 4. PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS QUE DEMUESTRAN DIFERENTES BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE LECHE CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS SOMATICAS POR ML

Significancia		CEF	EST	PEN	S-T	CTX	AMP	ERI	CLOX	TET	GEN	LIN	KAN
S**	<i>S. aureus</i>	4	39	24	16	4	37	15	26	15	2	24	6
S**	<i>S. epidermidis</i>	5	35	21	14	11	30	12	32	18	1	27	10
S**	<i>B. cereus</i>	6	6	18	9	10	27	10	7	3	0	48	3
NS	<i>Corynebacterium</i> spp	5	8	4	7	3	5	0	8	4	1	11	1
S**	<i>S. agalactiae</i>	0	15	9	29	6	0	6	15	6	3	18	3
S*	<i>S. uberis</i>	19	50	27	38	35	42	27	77	23	0	42	12
NS	<i>Streptococcus</i> spp	0	0	0	0	0	11	11	11	11	0	0	0

* (P <0.05) Diferencia entre antibióticos

** (P <0.01) Diferencia entre antibióticos

CEF Cefalospirina, EST Estreptomocina, PEN Penicilina, S-T Sulfametoxazol- Trimetropin, CTX Cefotaxima, AMP Ampicilina, ERI Eritromicina, CLOX Cloxacilina, TET Tetraciclina, GEN gentamicina, LIN Lincomicina, KAN Kanamicina.

CUADRO 5. PORCENTAJE DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS QUE DEMUESTRAN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DE LECHE CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS SOMATICAS POR ML

Significancia		CEF	S-T	CTX	AMP	TET	GEN	FUR	CAR	NAL	COL	OXO	CLOR
S**	<i>E. coli</i>	31	21	2	65	38	1	3	20	9	3	2	12
S**	<i>Enterobacter</i> spp	38	19	6	56	44	6	6	19	6	13	0	13
S**	<i>Klebsiella</i> spp	54	23	8	62	69	0	0	23	8	0	8	46
S	<i>Pseudomonas</i>	33	33	0	33	33	0	0	0	0	0	0	0
S**	<i>P. haemolytica</i>	33	0	0	100	67	0	0	33	0	0	0	0

** (P <0.01) Diferencia entre antibióticos

CEF Cefalosporina, S-T Sulfametoxazol-trimetropin, CTX Cefotaxima, AMP Ampicilina, TET Tetraciclina, GEN Gentamicina, FUR Furadantina, CAR Carbenicilina, NAL Acido Nalidixico, COL Colimicina, OXO Acido oxolírico, CLOR Clorafenicol.

CUADRO 6. PORCENTAJE DE RESISTENCIA A DIFERENTES QUIMIOTERAPEUTICOS DE 104 CEPAS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS AISLADAS DE LECHE CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS SOMATICAS POR ML

Quimioterapeúticos	Resistencia (%)*
Ampicilina	64
Tetraciclina	43
Cefalospirina	34
Sulfam ^o toxazol-trimetropim	21
Carbencilina	20
Cloranfenicol	15
Acido Nalidixico	8
Colimicina	4
Cefotaxima	3
Furadantina	3
Acido oxolírico	3
Gentamicina	1

* (P<0.05)

El número de bacterias Gram negativas y Gram positivas resistentes a los quimioterapéuticos estudiados, agrupados por modo de acción, aparecen en los cuadros 7 y 8. En el caso de las bacterias Gram positivas, no se detectó relación estadística entre el modo de acción de los quimioterapéuticos y el grado de resistencia. Caso contrario es el grupo de las Gram negativas, en las que sí se detectó el efecto estadístico por modo de acción. En éstas últimas, se encontró mayor resistencia a los quimioterapéuticos, cuyo modo de acción es la inhibición de la pared celular, de la síntesis de proteínas, así como la inhibición de enzimas metabólicas.

En la literatura (3,5,23,24) se han notificado frecuencias de aislamientos similares a las de este estudio, aunque en el caso de algunas bacterias como *Streptococcus agalactiae*, su frecuencia es más baja a lo señalado generalmente (2, 3, 5, 25). Por otro lado, considerando a todos los aislamientos, no se encontró efecto de mes del año sobre la frecuencia de aislamientos. Aunque en el caso de algunas bacterias específicas, sí se nota un efecto de época del año. Tal es el caso de *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* spp, levaduras, *Streptococcus uberis* y *Klebsiella* spp. *Escherichia coli* se presentó durante todos los meses del año y las levaduras sólo en un mes no se presentaron; considerándose más importante la aparición de microorganismos que la cantidad con que se presentan, ya que esto indica que el patógeno no se puede eliminar y se presenta mes con mes, comparado con otro que se presenta en gran cantidad en un mes, pero que no aparece en los siguientes meses.

No todas las bacterias presentaron resistencias a los mismos quimioterapéuticos, por ejemplo, *B. cereus* mostró mayor resistencia a lincomicina, mientras que *Streptococcus uberis* a la cloxacilina, o bien *Streptococcus agalactiae* a sulfametoxazol - trimetropin.

CUADRO 7. NUMERO DE BACTERIAS AISLADAS DE LECHES CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS POR ML. RESISTENTES A QUIMIOTERAPEUTICOS AGRUPADOS POR MODO DE ACCION

	Pared celular	Ribo-soma	Meta-bolismo	ADN-ARN	Mem-brana
<i>E. coli</i>	75	40	20	9	3
<i>Enterobacter</i> spp	13	9	3	1	2
<i>Klebsiella</i> spp	11	10	3	2	0
<i>Pseudomonas</i> spp	1	1	1	0	0
<i>P. haemolytica</i>	3	2	0	0	0

* (P<0.01) Diferencia significativa entre modos de acción.

Las resistencias mostradas por las bacterias en este trabajo, son similares a las informadas por otros autores (1,4,7,11) y aun cuando se considera que no son muy elevadas, tomando en cuenta las normas estipuladas por diferentes agencias mundiales de la salud (10,26,27,28), se sugiere que, para un efectivo tratamiento de la mastitis en casos severos o crónicos, se cuente con el apoyo de un laboratorio que realice aislamientos de los patógenos que estén causando la infección, así como pruebas de sensibilidad que permitan hacer un mejor uso de los quimioterapéuticos.

CUADRO 8. NUMERO DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS AISLADAS DE LECHES CON MAS DE 2.5 MILLONES DE CELULAS POR ML. RESISTENTES A QUIMIOTERAPEUTICOS AGRUPADOS POR MODO DE ACCION.

	Pared celular	Ribosoma	Metabolismo
<i>S. aureus</i>	143	142	42
<i>S. epidermidis</i>	82	82	23
<i>B. cereus</i>	34	63	11
<i>Corynebacterium</i> spp	9	10	5
<i>S. agalactiae</i>	7	7	10
<i>S. uberis</i>	28	19	10
<i>Streptococcus</i> spp	2	3	0

Otro aspecto importante para racionalizar el uso de antibióticos, es mejorar las

condiciones en las que se encuentra el ganado, haciendo mas eficiente la rutina de ordeño, para evitar las infecciones de la glándula mamaria (5) y no pretender controlar la mastitis con el uso exclusivo de quimioterapéuticos.

SUMMARY

In order to establish the frequency, the importance and the sensitivity of microorganisms isolated from the mammary gland with high cell counts to antimicrobial agents, monthly sterile quarter milk samples with more than 2.5 million somatic cell counts were obtained from seven dairy herds over a year. A total of 1230 had high cell counts from which 896 isolates were obtained. The most frequently isolated pathogens were: *Staphylococcus aureus* (31 %), *S. epidermidis* (19 %), *Bacillus cereus* (13 %) and *E. coli* (10 %). A season effect was found for only a few pathogens. The Gram positive bacteria showed variable resistance to different antimicrobial agents allowing for statistical differences among antimicrobial agents. On the other hand Gram negative bacteria showed similar resistance to the same antibiotics. Most of the pathogens of this group were resistant to cephalosporin, ampicillin, and tetracycline. Finally, only Gram negative bacteria showed statistical differences among antibiotics grouped by mode of action. Antibiotics that inhibit synthesis of nucleic acids and those that act on cell membrane were the most effective.

Key Words: Etiological Agents, Bovine Mastitis, Antibiotic Resistance, Gram Negative Bacteria, Gram Positive Bacteria.

REFERENCIAS

1. National Mastitis Council. Current Concepts Of Bovine Mastitis. 1987.
2. Schalm P W. Bovine mastitis. 1a Ed. Philadelphia; Lea & Febiger, 1971:50.
3. Watt L J. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 1988;38:41.
4. Rowe B. Drug resistance in Gram negative aerobic bacilli. Br. Med. Bull. 1984; 40:68.
5. Bramley A J, Dood F H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control, progress and prospects. J. Dairy Res. 1984; 51:481
6. Datta N. Introduction to antibiotic resistance. Br. Med. Bull. 1984; 40:1.
7. Linton A H. Antibiotic resistance bacteria in animal husbandry. Br. Med. Bull. 1984; 40:91.
8. Davis J, Smith I D. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. An. Rev. Microbiol. 1978; 32:469.
9. Hays V W, Black A C. Antibiotics for animal. The antibiotic resistance issue. Comments from CAST. 1989.

10. Koch A L. Evolution of antibiotic resistance gene function. *Microbiol. Rev.* 1981; 45:355.
11. Lacey R M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Streptococci*. *Br. Med. Bull.* 1984; 40:77.
12. Lambert H P. Impact of bacterial resistance to antibiotics in therapy. *Br. Med. Bull.* 1984; 40:102.
13. Lyons T R. Biotecnología: La ruta natural para incrementar la productividad en la industria lechera. Tercer Congreso Internacional sobre Ganado Lechero. México, D.F., 1987.
14. Saunders J R. Genetics and evolution of antibiotic resistance. *Br. Med. Bull.* 1984; 40:56
15. Sykes R B, Bonner D P. Counteracting antibiotic resistance. *Br. Med. Bull.* 1984; 40:96.
16. Carter G R. Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology. 2a. Ed. Chicago: Charles C. Thomas Publisher 1978:90.
17. Cowan S T, Steel K J. Manual para la identificación de Bacterias de Importancia Médica. 2a. Ed. México: CECSA, 1979:78.
18. Harmon M S, Eberhart R J, Jasper D E, Langlois B E, Wilson R A. Microbiological Procedures for the Diagnosis of bovine Udder Infection . 3a. Ed. Arlington: Nat. Mast. Council. Inc. 1990:5.
19. Murillo S E, Pérez D M, Campos R V. Identificación de patógenos de la glándula mamaria. 1a. Ed. Edo. de México: 1984:6.
20. Dupont H C. Uso Práctico de antibióticos. 1a. Ed. México: Interamericana, 1980:27.
21. Siegel S. Estadística no Paramétrica. 2a. Ed. México; Trillas, 1985:30.
22. Steel G C, Torrie U J H. Principles and Procedures of Statistics, a Biometrical Approach. 2a. Ed. Tokio: Mc. Graw Hill, Kogakisha-ltd, 1980.
23. Kisner J S. Perspective and the use of antibiotics in animal feeds. *J. Anim. Sci.* 1976; 42:1058.
24. Morales R J M. Efectividad de la combinación gentamicina meglumina de flunixin en el tratamiento de mastitis clínicas en vacas lecheras. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1989.
25. Heidrich H J. Enfermedades de las Glándulas mamarias de los animales domésticos. 1a. Ed. USA: Labor, 1969.
26. Ahmed A K, Chasis S, Mcberrnette S. Petition of the Natural Resources Defense Council Inc., to the Secretary of Health and Human services requesting immediate suspension of Approval of the subtherapeutic Use of Penicillin and Tetracyclines in Animal. Feeds. Nat. Res. Def. Council. 1984.
27. Chopra I, Howe T. Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microb. Rev.* 1978; 42:707.
28. Commissioner of the Food and Drogs Administrations. Fase Report on the Use of Antibiotics in Animal Feeds. Department of the Health, education and Welfare. Washington 1968.