

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Determinación de la Incidencia de Mastitis Bovina en la
Región de Cobachi, Sonora, Mediante la Validación de Tres
Métodos de Diagnóstico para su Detección: Prueba de
California, Medición de Conductividad Eléctrica (MAS-D-TEC)
y Cultivo Microbiológico**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presentan:

KENIA ITUARTE ROBLES

MANUEL SANTOS BRACAMONTE MENDOZA

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Kenia Ituarte Robles hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado "Determinación de la incidencia de mastitis bovina en la región de Cobachi, Sonora, mediante la validación de tres métodos de diagnóstico para su detección: Prueba de California, medición de conductividad eléctrica (MAS-D-TEC) y cultivo microbiológico" y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dra. Evelia Acedo Félix
Presidente del Jurado

M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Secretario

M.C. Moisés Navarro Navarro
Vocal

M.C. Reyna Isabel Sánchez Maríñez
Suplente

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Manuel Santos Bracamonte Mendoza hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “Determinación de la incidencia de mastitis bovina en la región de Cobachi, Sonora, mediante la validación de tres métodos de diagnóstico para su detección: Prueba de California, medición de conductividad eléctrica (MAS-D-TEC) y cultivo microbiológico” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico

Atentamente:

Dra. Evelia Acedo Félix
Presidente del jurado

M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Secretario

M.C. Moisés Navarro Navarro
Vocal

M.C. Reyna Isabel Sánchez Maríñez
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a Dios por la vida y por permitirnos hacer lo que nos gusta.

A la Universidad de Sonora por ser la institución que nos abrió las puertas para poder llevar a cabo nuestros estudios y formarnos como profesionales.

Este trabajo se llevó a cabo con el financiamiento del proyecto CONACYT 18 8865 del Laboratorio de Innovación para la Producción Inocua y Sustentable de Alimentos en Comunidades Rurales.

Gracias a nuestros sinodales M.C. Moisés Navarro Navarro, M.C. Reyna Isabel Sánchez Martínez y por último a M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra, por aportar sus conocimientos a nuestra tesis y ayudarnos a realizar este trabajo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por permitirnos formar parte de su grupo de investigación y darnos las herramientas para nuestro trabajo de tesis, gracias por darnos la oportunidad de conocer más de la ciencia.

Al laboratorio de Microbiología molecular por ese espacio brindado para que pudiéramos desarrollar y hacer un hecho nuestro trabajo experimental.

A la Dra. Evelia Acedo por poner en nuestras manos el proyecto de la Mastitis Bovina y darnos la confianza de llevarlo a cabo, gracias por la atención que nos brindó.

A Q.B.C. Rosalva Pérez por instruirnos en el trabajo experimental, por sus regaños para que las cosas se hicieran tal y cual deben ser, por todo ese conocimiento que nos compartió en la parte práctica; gracias también por inculcarnos la responsabilidad y ponernos el ejemplo siempre de lo que usted nos exigía, gracias por enseñarnos todo lo que conlleva sacar -el mundo de trabajo- y por contagiarnos ese amor y dedicación por la microbiología.

Agradezco a la Dra. Itzamná Baqueiro Peña por los comentarios y aportaciones en la Revisión de este documento.

Agradecemos a la Dra. María Del Carmen Hernández del CIAD, A. C. por las facilidades y el apoyo para la realización de este trabajo, así mismo agradecemos a Martin Carrasco del Departamento de Mantenimiento del CIAD, A. C. por el apoyo técnico brindado durante los traslados para la toma de muestra.

Muy especialmente a los productores de queso de la Región de Cobachi, Sonora, sin el apoyo de los cuáles no hubiera sido posible la realización de este trabajo, gracias por todo su apoyo técnico, sus conocimientos y experiencias brindadas, por hacernos sentir como alguien de su familia al abrirnos las puertas de sus casas, son apoyos invaluable, no decimos nombres por temor a omitir a alguno de ustedes.

DEDICATORIAS

Dedico mi trabajo de tesis a mis papas Humberto y Sylvia que han sido mi ejemplo a seguir. Gracias por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, repaso todos mis momentos importantes y no encuentro alguno donde no hayan estado presentes apoyándome. Gracias por la educación que me dieron, por demostrarme que se puede crecer profesionalmente aun sin mucho en la bolsa. Gracias inmensas por todo su amor y su dedicación. A mi hermana Talía por acompañarme en mi vida, porque me enseña a amar sin condiciones aun cuando las diferencias sean muchas, gracias por tu apoyo en esta etapa de nuestras vidas. A mis abuelos Bertha y José “Don Che”, siempre los traigo en mi pensamiento y en mi corazón.

Dedico y agradezco profundamente a mis tíos y primos en general, porque de algún modo y en algún momento a lo largo de estos años han estado presentes para brindarme apoyo. Gracias especiales a mis tíos Lauro y Socorro que siempre nos apoyaron a mi hermana y a mí cuando necesitamos algo por más mínimo que fuera, siempre nos hicieron sentir que teníamos a quien acudir. De forma especial incluyo en esta dedicatoria a mis tías Ana, Lucía, Nachyta y Alicia, porque sin su apoyo físico y emocional en el momento que más lo necesitamos mi familia y yo, especialmente mi mama, hubiera sido menos llevadero y más complicado. Gracias, siempre muchas gracias por haber estado con nosotros. Gracias también a mi tíos Severo, Chepe y Memo, por ayudarnos cuando algo estaba mal. Víctor y Beto, siempre están presentes en mi mente y esto se los dedico a ustedes también. A toda mi familia, los quiero con todo mi corazón.

A mis amigos que ya tenía antes de entrar a la universidad Alie, Jazin, Karla, Baresse, Brianda, Ángel y Anahí, me agrada la idea de saber que siempre estuvieron conmigo aun con la distancia de por medio, gracias por su apoyo. A mis amigos de la universidad, que juntos conformábamos un famoso grupo: Martha, Santos, Eduardo, Javier, Sarahí, Elihu, Magui, Sue, Elier, Jaudiel: Esta etapa de mi vida no hubiera tenido el mismo sabor y la misma entrega si no los hubiera conocido, gracias por enseñarme tantas cosas en estos años donde compartimos tantas horas al día juntos, con ustedes aprendí lo que la lealtad significa, podría dedicarles muchas palabras para cada uno de ustedes, pero sé que ustedes saben lo que para mi significan. Carlos, Jessica, Alex, Geovanna y Enrique gracias también por su amistad. A Alan De La Paz gracias por ser mi amigo y por tu apoyo siempre, de igual modo a Héctor Macías y a Juan Luis: Su amistad me llego un poco después que todas las demás, pero es igual de especial, gracias por su apoyo y por los momentos de “sana” diversión compartidos. A todos siempre los llevare

en mi corazón. Gracias por ser mi segunda familia que me hizo sentir querida y apoyada siempre. A las mamás de mis amigas: Martha Amparano y Martha Márquez, por abrirme las puertas de su casa, gracias por sus atenciones, se les valora mucho.

Incluyo en mis dedicatorias, a mi compañero de tesis Manuel Santos, porque tuve con quien batallar y superar todos los obstáculos que se nos presentaron, fuiste con quien aprendí a ser más paciente y sobretodo de quien aprendí muchas cosas entre ellas la nobleza y la humildad que te caracterizan. Gracias por tu gran amistad y por aguantar mis regañones (poquitos), por hacer esto más agradable a la hora de trabajar, Lo logramos!. También a Renán, por ser mi compañero especial y mi amigo durante todos estos años, por apoyarme pese a todo, gracias por siempre creer en mí, pase lo que pase siempre serás alguien muy importante para mí. A todas esas personas que en algún momento me han escuchado y me han apoyado pero que tengo poco tiempo de conocerlos y aun así empiezo a formar una amistad solida, gracias.

Y por último y no menos importante, dedico mi trabajo de tesis y agradezco a Dios, por darme la oportunidad de encontrar lo que más me gusta hacer, espero siempre estar tomada de su mano para todo lo que realice en mi vida como profesionista y como persona. Gracias por poner en mi vida a todas estas personas importantes para mí, y por permitirme culminar mi carrera con este trabajo de tesis en donde aprendí mucho.

Con cariño y agradecimiento a todos ustedes

Kenia Ituarte Robles

Dedico mi trabajo de tesis primeramente a Dios, por la vida que me ha prestado, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida y porque en todo momento está presente, decidiendo que poner o no en mi camino.

A mis padres, Francisco y Luz Aide, porque gracias a ustedes he llegado a donde estoy ahora; gracias por su apoyo incondicional, por tener siempre esa fe en mí e incluso anteponer mis cosas antes que las de ustedes; no hay palabras para expresar todo lo que quisiera decirles, simplemente gracias por todo, los quiero mucho.

A mis hermanas Carmen y Yeye porque han sido mis amigas, confidentes y compañeras desde siempre, compartiendo los buenos y los malos ratos, gracias por aguantarme todo este tiempo y estar conmigo cuando las necesito. Y a las pequeñas de la familia, Lupita y María, que con su inocencia y travesuras siempre alegran mis días.

A mis abuelos, que gracias a Dios los cuatro están con vida y me muestran su sabiduría ante la vida. En especial, gracias a mi nana Reme por ser alguien admirable, por todo ese cariño, sus cuidados y el apoyo que me ha brindado en esta etapa tan especial para mí.

A mis tíos, gracias por hacernos un campito en sus casas y brindarnos un techo, especialmente a mi tía Esthela y mi tío Jorge, que además de brindarme un techo siempre estuvieron al pendiente de mí y de mis hermanas y saber que podíamos contar con ustedes.

A mi compañera de tesis, Kenia, por convertirte en una hermana para mí, por enseñarme que una amistad puede ser incondicional, con la que además de compartir este logro he compartido muchas vivencias más y mostrarme la pasión y el compromiso que hay que ponerle a las cosas y a la vida. Gracias también por considerarme en este trabajo cuando me contaste e invitaste para formar parte de él y por hacer que fuera más divertido y llevadero a la vez.

A mis amigos de QBC-307: Martha, Magui, Kenia y Sue, gracias por convertirse en mis mejores amigas, por esa amistad fiel y generosa, por su comprensión, por tener esa confianza en mí y brindarme ese cariño tan especial, las quiero con todos mis átomos; a Sara, Javier, Elihu, Eduardo, Elier, Carlos, Jessica y Jaudiel que también se convirtieron en hermanos para mí, gracias por su amistad y sé que cada vez que recuerde a QBC siempre estarán allí ya que formaron parte de cada momento vivido en esta etapa tan bonita de nuestras vidas. A Victoria,

gracias por convertirte en una buena amiga para mí. A Juan Luis, por ser un gran amigo y a quien aprecio mucho, por compartir tanto los momentos de escuela como los de locura y diversión.

A mis amigos de la prepa, Juanjo y Cheyo que siempre he contado con ustedes y aunque duremos mucho tiempo sin vernos, cuando volvemos a hacerlo es como si no pasara el tiempo.

Y a estas nuevas personas, en especial a Carlos, porque empezaron a formar parte de este proyecto y de mi vida.

Gracias.

Manuel Santos

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
RESUMEN	14
INTRODUCCION	16
OBJETIVOS	18
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	18
ANTECEDENTES	19
La Leche y sus Propiedades	19
Mastitis Bovina	21
Etiología de la Mastitis Bovina	21
Clasificación de la Mastitis Bovina	22
Mastitis contagiosa	22
Mastitis ambiental	22
Mastitis clínica	22
Mastitis subclínica	23
Microorganismos Patógenos Transmitidos por la Leche	23
<i>Streptococcus agalactiae</i>	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	24
<i>Listeria monocytogenes</i>	25
<i>Brucella spp</i>	25
Diagnóstico de la Mastitis Bovina	26
Prueba de California	26
Medición de Conductividad Eléctrica	28
MAS-D-TEC	28
Conteo de Células Somáticas	28
Examen Bacteriológico	29
Caracterización del Agente Causal de Mastitis por Técnicas Moleculares	30
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	30
Fragmentos repetitivos de ADN	31
(GTG) ⁵	31

Sensibilidad Antimicrobiana	32
Perdidas Económicas en México a Causa de la Mastitis Bovina	33
MATERIALES Y METODOS	34
Preparación de la Ubre para la Realización de las Pruebas de Campo	35
Pruebas de Campo para la Detección de Mastitis Bovina (Comparación de los tres Métodos)	35
Prueba de California	35
Prueba con el MAS-D-TEC	35
Pruebas de Laboratorio	37
Análisis Microbiológico	37
Técnicas de Biología Molecular	37
Extracción de ADN	37
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	38
Electroforesis	38
Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana	39
Técnica de Disco-Difusión	39
Preparación del Inóculo	39
Diseño y Análisis Estadístico	40
RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
Incidencia de Mastitis Bovina	41
Comparación de Tres Métodos de Detección de Mastitis Bovina	42
Análisis Microbiológico	43
PCR(GTG) ⁵ y Dendograma	45
Sensibilidad Antimicrobiana	45
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Composición nutrimental de la leche	20
2.	Relación del número de células somáticas con la Prueba de California	27
3.	Antibióticos utilizados.	40
4.	Número de vacas detectadas con mastitis bovina por cada método	42
5.	Medias de los halos de inhibición para cada de uno de los antibióticos analizados	49

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Mapa de la localización de Cobachi en el estado de Sonora	34
2.	Procedimiento para realizar la Prueba de California	36
3.	Utilización del dispositivo MAS-D-TEC	36
4.	Comparación de los métodos de detección de Mastitis Bovina	44
5.	Crecimiento de bacterias obtenidas de las muestras de leche recolectadas en Cobachi, Sonora	44
6.	Dendograma que muestra la variabilidad genómica del ADN de cepas causantes de Mastitis Bovina, amplificado con el primer (GTG) ₅ y separado mediante electroforesis convencional	48

RESUMEN

La mastitis es considerada la enfermedad infecciosa más costosa de las vacas lecheras, debido a que induce a una disminución en la producción del 4 al 30% de leche y baja su calidad, además de incrementar los costos del cuidado de la salud del hato y un desecho prematuro de animales genéticamente mejorados. Esto la hace un problema que debe de ser estudiado, para reducir las pérdidas económicas que esto conlleva. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia de mastitis bovina en el municipio de Cobachi, Sonora mediante la validación de tres métodos para su detección: Prueba de California, medición de conductividad eléctrica de la leche con el dispositivo MAS-D-TEC y examen bacteriológico. Para esto se procedió a trabajar con 5 productores de esta región, llevando primeramente un diagnóstico de la enfermedad mediante dos pruebas de campo: Prueba de California y con el dispositivo MAS-D-TEC, después se tomaron muestras de leche de las vacas diagnosticadas y se analizaron con el examen microbiológico, que es considerado el método estándar para la detección de la mastitis. Para hacer una discriminación de los aislamientos obtenidos se recurrió a las pruebas moleculares empleando la PCR (GTG)⁵ que consiste en la utilización de fragmentos repetitivos (microsatélites) en el ADN para amplificar las regiones entre cada uno de ellos en el genoma bacteriano ayudando a encontrar similitudes o diferencias de todos los aislados.

En base a lo anterior, se analizó un total de 502 muestras de leche y se obtuvieron 199 aislamientos, con lo que encontramos, una incidencia del 65.80% tomando en cuenta el total de vacas detectadas por el cultivo microbiológico. En la comparación de los métodos de detección, la prueba de California y el MAS-D-TEC arrojaron resultados muy similares entre sí, ($p \geq 0.05$); es decir, estas dos pruebas de campo pueden ser utilizadas indistintamente por los productores para llevar un monitoreo de la enfermedad en el hato lechero.

En base a un perfil electroforético realizado por las técnicas de PCR, se encontró de cada amplificado 91 aislamientos distintos pudiéndose observar una gran variabilidad genética.

A estos aislamientos se le realizaron pruebas de sensibilidad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer (disco-difusión en agar) usando los antibióticos comúnmente para el tratamiento de la mastitis clínica; de donde la mayor sensibilidad fue para fosfomicina, seguidos de penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina, cefalozina sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina, eritromicina y gentamicina en orden de importancia. Cabe destacar que la ceftriaxona fue el antibiótico al cual mostraron resistencia.

En base a lo anterior, se concluye que en lo referente al municipio de Cobachi, Sonora, hay una alta incidencia de mastitis, por lo que es importante la implementación de un control de esta enfermedad mediante el uso de pruebas de campo que los productores puedan llevar a cabo de forma rápida, como lo son la Prueba de California o el MAS-D-TEC, y con ello, garantizar la

efectividad del tratamiento para evitar resistencia a los antibióticos por estas bacterias y así, hacer más fácil su control.

INTRODUCCIÓN

La leche es considerada uno de los alimentos más completos que existen, ya que contiene proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas y sales minerales, los cuales presentan un alto valor alimenticio. Por otro lado, la leche y los productos lácteos han sido asociados históricamente a importantes enfermedades humanas y pueden considerarse dentro de los alimentos más perecederos. El consumo de leche y otros productos lácteos son básicos en la dieta de la población mundial. Debido al incremento poblacional se ha visto la necesidad de satisfacer la demanda creciente de productos lácteos incrementando la producción y por ende, se ha aumentado el tamaño promedio del hato lechero, aumentando también así la propagación de enfermedades y otras situaciones adversas en la producción de leche (Lucy, 2001). Todos los alimentos tienen posibilidades de transmitir enfermedades, y la leche y los productos lácteos pueden ser también una fuente de transmisión de microorganismos patógenos. Una de las enfermedades que afecta a las vacas y que es una vía de transmisión de enfermedades al humano es la mastitis bovina.

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria, causada principalmente por infección bacteriana que puede producir una elevada cuenta de células somáticas, coincidiendo con la disminución en la producción de leche y así como una disminución en la calidad de la misma. De acuerdo a los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), a nivel mundial los problemas de mastitis no han disminuido, y las causas de su alta prevalencia son multifactoriales: manejo animal, alimentación, clima, higiene, edad, lactancia, técnicas de ordeña (ordeño mecánico, manual, sobre ordeño, escurrido), factores genéticos (conformación estructura de la ubre), etc. La mastitis bovina puede ser clínica y subclínica, la primera puede ser detectada fácilmente, ya que el animal presenta diversas manifestaciones aparentes, mientras que la segunda es difícil de detectar a simple vista. (Huijps, 2009).

Los patógenos que causan la mastitis están dentro de los grupos bacterianos y no bacterianos como micoplasmas, hongos, levaduras, clamidias, virus, entre otros (Wellenberg y col., 2002). Este padecimiento no solo afecta la salud de la vaca, sino también altera la composición de la leche debido a la infección presente ya sea sistémica o en la glándula mamaria del animal hospedero. Un alto nivel de células somáticas es un indicativo de la presencia de la enfermedad, lo cual reduce la calidad de la leche y los productos lácteos, afectando la vida media de la leche, el sabor y deteriorando propiedades fisicoquímicas del producto. Incluso, la leche proveniente de una vaca con mastitis contiene patógenos y toxinas bacterianas y su consumo puede aumentar directa o indirectamente el riesgo de enfermedades transmitidas por estos productos. (Skrzypek, 2004).

La mastitis bovina es considerada mundialmente como la enfermedad más costosa en el hato lechero, esto es por que ocasiona una disminución en la producción de leche y genera alto costo en el tratamiento (Correa y col., 2002; Boulanger y col., 2003). En Estados Unidos de Norteamérica, se ha estimado un costo superior a los 2 billones de dólares al año y en México las pérdidas se estiman en varios miles de millones de pesos, siendo críticas en los establos pequeños y medianos (Romero, 2004). En Sonora, hasta donde se sabe, sólo se ha encontrado un informe de la incidencia y costo de la mastitis realizado en un establo de Santa Ana, Sonora (Gerlach y col., 2009), se concluye que el costo total de la enfermedad representa una tercera parte de la producción anual obtenida en el establo, con incidencia de 18.3% en mastitis subclínica, mientras que la clínica representa un 5.35%.

Por otra parte, Sonora es un importante productor de leche y productos lácteos; uno de los pueblos que dentro de sus actividades económicas esta la ordeña y la producción de queso regional es Cobachi (Municipio de La Colorada), la cual es una actividad que realizan todo el año y de la que obtienen la mayor parte del ingreso para el sostenimiento diario de su familia. El ganado no está especializado en producción de leche, la mayor parte es cruza de criollo con alguna raza europea productora de carne, sin embargo tienen un alto grado de conversión leche-queso (Hernández y col., 2010). Por ello, se hace relevante investigaciones en esta área con la finalidad de reducir la incidencia de mastitis bovina y las considerables pérdida económicas causadas por la enfermedad. Es por esto que el tener acceso a datos referentes a mastitis clínica y subclínica es esencial para el monitoreo de la salud de la ubre, por vaca y/o a nivel del hato lechero, convirtiéndose en un prerrequisito para la evaluación económica y control de esta enfermedad (Bedolla, 2004).

Con este estudio piloto en el municipio de Cobachi, Sonora, se propuso el objetivo de realizar el diagnóstico de la incidencia de mastitis bovina a partir de la validación de tres métodos distintos para su detección: Prueba de California, prueba con el MAS-D-TEC y cultivo microbiológico; así como llevar a cabo una selección por técnicas moleculares con la PCR (GTG)⁵ para conocer la variabilidad de los aislamientos y determinar la resistencia antimicrobiana de éstos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la incidencia de mastitis bovina en la región de Cobachi, Sonora, mediante la validación de tres métodos de diagnóstico para su detección: Prueba de California, medición de conductividad eléctrica (MAS-D-TEC) y cultivo microbiológico.

Objetivos Particulares

1. Validar los tres métodos de análisis para la detección de mastitis: Prueba de California, MAS-D-TEC y microbiológica clásica
2. Caracterizar las bacterias aisladas de las muestras de leche, mediante la técnica de perfiles electroforéticos de secuencias repetidas Rep-PCR (PCR (GTG)⁵).
3. Evaluar la resistencia antimicrobiana de los aislamientos seleccionados por el método de Kirby-Bauer.

ANTECEDENTES

La leche y sus Propiedades

La leche es un producto natural completo, contiene proteínas de primera calidad, carbohidratos, lípidos, vitaminas, inmunoglobulinas, compuestos biodisponibles como el calcio, y presenta propiedades antimicrobianas. La leche, es uno de los productos que confiere más nutrientes en un sistema sencillo de administración, versátil en su uso y agradable al paladar (Bertino, 2007).

La composición de la leche y las características microbiológicas son factores importantes para el productor, debido a que esto determina la calidad de la leche cruda, del mismo modo sucede para la industria láctea por los procesos a los que posteriormente es sometida, así como el destino final que es el consumidor, asegurando la salud del mismo. La composición de la leche varía en función de factores tales como la raza, la edad, el estado nutricional de la vaca, el estado de la glándula mamaria, etapa de gestación o lactancia, y aspectos relacionados directamente con la salud del animal (Allen, 2000).

La leche de vaca, que según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization), representa cerca del 83% de la producción mundial, proporciona nutrientes esenciales para una buena alimentación y es una fuente importante para la obtención de energía, proteínas de origen animal y lípidos. Además de lo anterior, contiene diversas vitaminas y minerales esenciales para una buena salud, como calcio, magnesio, selenio, vitamina B12. En la tabla 1, se muestran los componentes de la leche y en algunos productos lácteos, así como ciertos aspectos relevantes de cada uno (Aranceta, 2004).

Uno de los principales productos derivados de la leche cruda es el queso artesanal para su consumo, así como venta y distribución. En Sonora así como en muchos estados de México, esta actividad es utilizada como sustento económico entre las poblaciones rurales.

La elaboración del queso está basada en la coagulación de la caseína, para lo cual se utilizan diferentes métodos como la acidificación, la proteólisis con enzimas o la acidificación con efecto térmico. El contenido de grasa de este tipo de productos puede variar en un intervalo del 10% (descremado) al 60% (con alto contenido de grasa) (Eck, 2000).

Tabla 1. Composición nutrimental de la leche.

Componentes (porción de 250 ml)	Cantidad
Contenido energético	130 cal
Proteínas	6.0 g
Carbohidratos	9.4 g
Grasas	7.6 g
Calcio	248 mg
Potasio	314 mg
Vitamina A	92 mg
Ácido Fólico	11 mg

(Aranceta, 2004)

El contenido de grasa es el que proporciona la consistencia al queso. Estos se encuentran de forma emulsificada en el queso debido al alto contenido de agua; condición que facilita su digestión una vez consumidas. La lipólisis, durante la maduración, otorgan los sabores fuertes de quesos como el feta o el azul (Akuzawa, 2009).

Hay diversos tipos de queso como el panela que es queso fresco pero elaborado con leche pasteurizada de vaca. Aun así, es considerado un alimento altamente perecedero por su alto contenido de humedad que puede ser hasta un 58% además, pH bajo que no ayuda en la inhibición bacteriana. Otro tipo de queso es el chihuahua, que es elaborado con leche entera de vaca, pasteurizada pero con aditamentos de fermentación láctica. Al igual que el queso panela, deben conservarse en refrigeración, si no se cumple con este requisito es contaminado fácilmente por agentes microbianos (Juárez, 2002). Es por todo esto, que la leche cruda debe manejarse con mucha higiene, desde el momento de la ordeña hasta su conversión a queso u otros productos lácteos.

Un padecimiento comúnmente encontrado en la vaca y que afecta la calidad de la leche, es la mastitis bovina, la cual consiste en una infección presente en el animal donde los agentes causales son fácilmente transmitidos a la leche cruda y sus derivados posteriores.

Mastitis Bovina

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, incluyendo no sólo los tejidos intramamarios; sino las estructuras anatómicas relacionadas como los pezones, areolas mamarias, conductos de la leche, etc., causada por un agente infeccioso (Fetherston, 2001). El término mastitis se deriva de *Masto*, que hace referencia a la glándula mamaria, e *itis*, que significa inflamación (Kitchen, 1981).

Esta enfermedad afecta negativamente a las características físico químicas de la leche, su composición y producción (Cunha y col., 2008). Estas alteraciones se atribuyen a los cambios en la permeabilidad vascular debido al proceso inflamatorio y el daño de células epiteliales, que son responsables de la síntesis de los componentes de la leche, así como los cambios en la acción enzimática de células somáticas o microorganismos en la glándula mamaria infectada (Kitchen, 1981).

La industria láctea se enfrenta a un gran conjunto de problemas debido a la alta prevalencia e incidencia de la mastitis en animales lecheros. La mastitis subclínica afecta la calidad y cantidad de la leche causando grandes pérdidas económicas para los productores (Swinkels y col., 2005; Halasa y col., 2007).

Etiología de la Mastitis Bovina

La mastitis bovina es producto de la interacción entre el animal, el ambiente y los microorganismos, es decir, es una triada epidemiológica. El hombre tiene un papel importante en la presencia de la enfermedad, ya que es responsable al aplicar malas prácticas de higiene dentro del establo en el cuidado y manejo del ganado como en la ordeña y posterior elaboración de productos lácteos artesanales (SAGARPA, 2011). En esta enfermedad están implicados virus, parásitos, hongos y bacterias (Watts, 1988).

La mastitis puede ser causada por más de 137 especies bacterianas; entre las más comunes están *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*; otros agentes etiológicos menos frecuentes son *Arcanobacterium pyogenes*, *Prototheca*, nocardias, levaduras y micoplasmas (SAGARPA, 2011).

Los *Staphylococcus* son las bacterias más comúnmente aisladas de mastitis subclínica. En el diagnóstico de la mastitis, se dividen en *Staphylococcus* coagulasa positivos (como *S. aureus* y *S. hyicus*) y *Staphylococcus* coagulasa negativos (Devriese y col., 2005).

Clasificación de la Mastitis Bovina

La clasificación de la mastitis puede ser referida en relación con el hábitat de los patógenos que la causan (mastitis contagiosa y mastitis ambiental) o, bien de acuerdo a las manifestaciones clínicas (mastitis clínica y mastitis subclínica) (SAGARPA, 2011).

Mastitis contagiosa. Es causada por bacterias que viven en la piel del pezón y en el interior de la ubre, transmitida de una vaca a otra durante el ordeño, por ejemplo *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus agalactiae*.

Mastitis ambiental. Es causada por patógenos ambientales que normalmente se encuentran en los alrededores de la vaca, tales como estiércol, el suelo y en el alimento que consumen cotidianamente, por ejemplo *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* o *Klebsiella spp.* (Jain, 1979).

Mastitis clínica. La mastitis clínica es la enfermedad más común y más costosa en la producción de leche en los países industrializados (Osteras, 2006). Es definida como una anomalía observada por los productores en cualquiera de los dos casos: la leche y/o la ubre (Tollersrud, 2000).

La mastitis clínica se caracteriza por signos de inflamación en la glándula mamaria que incluye hiperemia, dolor, y el aumento de tamaño de la glándula y la densidad de la leche; además de que las bacterias contaminan el líquido, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente (Heringstad y col., 2000). Estos síntomas pueden estar acompañados o no por signos sistémicos, como la fiebre. Este tipo de mastitis generalmente es identificada por los productores, debido a los cambios en las características organolépticas, es decir, cambios físicos en la leche (Kemper y Gerjets, 2009).

Además de los cambios físicos ya mencionados tanto en la ubre como en la leche, la mastitis clínica puede presentarse de manera aguda y crónica. En su forma aguda, se caracteriza por su condición de aparición repentina, la leche es de apariencia anormal, hay enrojecimiento, hinchazón, y dolor en la ubre, con o sin síntomas sistémicos (Djabri y col., 2002). Afecta a las vacas lecheras en todo el mundo y tiene un impacto sustancial en la economía de las granjas, calidad de la leche y en el bienestar de las vacas (Morin, 2004). En la forma crónica, se presenta una infección de la ubre de larga duración con leche de apariencia anormal y/o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre (Schrack y col., 2001).

Mastitis subclínica. La mastitis subclínica se caracteriza por la ausencia de cambios inflamatorios externos, una secreción de leche reducida, incremento en la relación de los iones sodio/potasio (Na^+/K^+) y un alto conteo de bacterias en una muestra de leche obtenida

manualmente (Willumsen y col., 2003; Filteau y col., 1999). La glándula mamaria y la leche suelen presentar un aspecto normal, razón por la cual pasa desapercibida para el productor.

La mastitis subclínica es sutil y difícil de corregir, la vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación y la leche parece normal, sin presentar alteraciones físicas. El número de células somáticas en la leche, indicativo de la respuesta inflamatoria, se encuentra elevado, al igual que el número de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de la leche, así como de la alteración de la composición de dicho producto. Comúnmente es de larga duración, difícil de detectar por su característica de apariencia normal y por lo tanto, es difícil de tratar con antibióticos debido a que la enfermedad avanza, de igual modo reduce drásticamente la producción de leche, afecta a la calidad del producto lácteo, y puede servir como un reservorio para infectar a otros animales en el rebaño lechero (Heringstad y col., 2000; Valera y col., 2005).

Cuando los signos no son visibles, la presencia de patógenos y las modificaciones citológicas de la leche traen como resultado una mastitis subclínica (Djabri y col., 2002), por lo que las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico se vuelven indispensables para detectar la infección e inflamación ocasionada (Barker y col., 1998). Hay pruebas de campo muy útiles para una detección temprana de la mastitis subclínica, como la llamada Prueba de California (SAGARPA, 2011).

Como se ha mencionado a lo largo del trabajo, es de suma importancia cuidar este tipo de enfermedades presentes en la vaca que pueden alterar la composición de la leche en forma negativa, conteniendo bacterias que son posteriormente consumidas por el humano.

Microorganismos Patógenos Transmitidos por la Leche

La leche por su valor nutricional, es un excelente medio para el desarrollo y preservación de una gran variedad de microorganismos pertenecientes a diversas especies bacterianas. El hecho de que se puedan reproducir depende directamente del número, sus productos de metabolismo y de la temperatura. La temperatura de 10 °C o menos inhibe a la mayoría de los microorganismos patógenos, por lo que la leche cruda debe ser conservada a esta temperatura. Es muy importante conocer la carga inicial microbiana de la leche, sobre todo, porque hay patógenos importantes tales como *Mycobacterium tuberculosis*, y *Brucella sp.*, que no se pueden reproducir en la leche, pero, si hay una carga elevada inicial de estos microorganismos logran algunos sobrevivir dentro del líquido.

Los microbios de la leche pueden proceder de la vaca lechera, la persona que ordeña y maneja a la vaca y del medio ambiente.

Para protección de la salud humana la leche debe ser sometida al proceso de pasteurización, pero cuando, por razones prácticas, esto no sucede, debe hervirse antes de ser consumida. (Castañeda, 2004).

A continuación, se describen algunas de las especies más comúnmente encontradas en la leche contaminada.

Streptococcus agalactiae

Este agente es clásicamente asociado con la mastitis bovina y es altamente contagioso, pertenece al grupo B de la clasificación de Lancefield. En el humano generalmente causa los mismos padecimientos que *Streptococcus pyogenes* como septicemia, síndrome de choque tóxico, fiebre puerperal, entre otras complicaciones; Se han encontrado en bacteremias, meningitis y endocarditis en neonatos (Romero, 2007). Coloniza la región del tracto gastrointestinal y vías respiratorias así como el área urogenital en la mujer. Se ha comprobado la transmisión mutua entre bovinos y humanos de *Streptococcus agalactiae*, y los casos más comunes son de personas que consumen leche cruda. Se ha logrado aislar en bovinos con problemas de salud en la glándula mamaria (Castañeda, 2004).

Staphylococcus aureus

A nivel mundial es el agente patógeno contagioso más importante asociado con la mastitis bovina. Existe una contaminación primaria de la leche, pero no se descarta la contaminación secundaria realizada por el hombre. El *S. aureus* ocasiona una intoxicación alimenticia debido a las enterotoxinas que son estables al calor, y el síndrome de choque tóxico debido a la toxina TSST-1. Para que la infección se establezca, debe haber un mínimo de 10^6 bacterias por mililitro, lo que conduce a una buena producción de enterotoxinas (Castañeda, 2004).

En México, como en muchos países latinoamericanos hay un gran descontrol de los alimentos que se venden en la vía pública. Algunos de los agentes patógenos más comunes en los alimentos son *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*, y aunque es más frecuente encontrar bacterias causantes de infecciones gastrointestinales, *S. aureus* tiene un papel importante en los alimentos contaminados (Caballero y col., 1998).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) es un patógeno oportunista Gram-positivo que ha sido aislado en muchos entornos naturales y humanos (Farber y Peterkin, 1991). Las cepas patógenas y no patógenas de *Listeria* son ubicuos en la naturaleza y pueden ser aisladas de los suelos, las verduras y las aguas naturales, así como de animales sanos y del hombre (Roberts y Wiedmann, 2003). *L. monocytogenes* es la especie más patógena de este género, aunque las infecciones se producen principalmente en los recién nacidos, mujeres embarazadas, e individuos inmunocomprometidos (McLaughlin, 1997). El principal modo de transmisión de *L. monocytogenes* a los seres humanos es el consumo de alimentos aunque estén mínimamente contaminados por esta bacteria (Schlech, 2000; Kathariou, 2002; Shen y col., 2006). A lo largo de la historia ha habido brotes de listeriosis asociados a alimentos comerciales contaminados, como verdura, leche, y productos cárnicos, y es que esta bacteria se puede multiplicar soportando bajas temperaturas y esto le brinda mayor resistencia aunque los alimentos estén conservados a baja temperatura (Schuchat y col., 1991).

L. monocytogenes está presente en la leche de animales infectados y animales sanos (Wagner y col., 2000), y la contaminación de la leche puede también deberse a la contaminación ambiental de la granja y a la presencia de materia fecal por malas prácticas de higiene en el establo; su hábitat natural es el suelo o el intestino de los mamíferos. (Hassan y col., 2001). Los productos alimenticios más frecuentemente asociados con la listeriosis son quesos blandos, especialmente los elaborados con leche sin pasteurizar, y listo para ser ingeridos por el consumidor directo. El riesgo más grande de consumir un alimento contaminado por este patógeno es el de causar el aborto en una mujer embarazada (Kaclikova y col., 2001).

Brucella spp.

La brucelosis es una zoonosis causada por *Brucella*, una bacteria que se transmite fácilmente entre los animales domésticos como el ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, y búfalos. (Corbel, 2006). Esta enfermedad tiene importantes efectos sobre la salud humana y la salud animal, y repercute con grandes pérdidas económicas en la producción de alimentos debido a que puede ocasionar aborto, esterilidad, disminución la producción de leche y el costo de la eliminación de los animales (Gwida y col., 2010).

En los humanos, la adquisición de la enfermedad ocurre por contacto con fluidos de animales infectados o por el consumo de productos de origen animal como la leche cruda y sus

derivados no pasteurizados, así como productos cárnicos insuficientemente cocinados. (Malik, 1997; Eahart y col., 2009).

Diagnóstico de la Mastitis Bovina

La mastitis clínica puede ser detectada por el agricultor, pero la mastitis subclínica sólo puede ser detectado por la medición de componentes inflamatorios y agentes patógenos en la leche.

Diferentes métodos han sido sugeridos para la detección de la mastitis subclínica, tales como la Prueba de California para Mastitis (CMT), la conductividad eléctrica ,el conteo de células somáticas, algunos métodos bioquímicos y la presencia de agentes patógenos en la leche (Bastan y col., 2010; Lafi, 2006). En los últimos tiempos se ha recurrido a la utilización de técnicas moleculares que ayuden a un diagnóstico más oportuno y preciso de las enfermedades. Para el control y manejo de la mastitis bovina en la actualidad se han aplicado técnicas de biología molecular que proporcionen la información exacta del microorganismo que está involucrado siendo mucho más rápido y preciso que los otros métodos mencionados. Estas metodologías son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores o enzimas de restricción.

Prueba de California

La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Morresey, 1999; Radostits, 2000; Medina y Montaldo, 2003). Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valoración aproximada del recuento de células somáticas de la leche. No proporciona un resultado cuantitativo, sino más bien un resultado cualitativo (Blowey, 1999).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el aril alquil sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre, y éste se convierte, en combinación con agentes proteicos de la leche, en un complejo gelatinoso. Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases: desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado, en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifican (Seran, 2000; Medina CM y Montaldo VH, 2003).

El reactivo de California para la prueba de mastitis posee entre sus componentes un tensoactivo que disminuye la tensión superficial de los leucocitos presentes en la leche de la vaca con mastitis, por lo que al disminuir la tensión superficial se produce el estallido de los leucocitos

y su contenido, que al ponerse en contacto con el producto, forma el complejo gelatinoso en la paleta de prueba (Noquera, 1999; Baez, 2002).

A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto, mayor será el grado de gelificación, es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo de california con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes, permitiendo evaluar cada cuarto por separado (Wolter, 2004; Seran, 2000). Los resultados se leen como Negativos, Traza (sospechoso), 1+, 2+ y 3+, según la cantidad de formación en la muestra, tal cual se detalla en la Tabla 2 (SAGARPA, 2011).

La Prueba de California provee una predicción confiable del recuento de células somáticas y proporciona una advertencia en sistemas de detección temprana de nuevos casos de mastitis subclínica y medidas correctivas que pueden ser iniciadas antes de que la enfermedad llegue a ser crónica. El uso de la Prueba de California es, por consiguiente, un método económico y efectivo para reducir el riesgo de mastitis subclínica en los hatos lecheros (Jaramillo, 2007).

Tabla 2. Relación del número de células somáticas con la Prueba de California.

Reacción	Células somáticas por ml de leche
Negativo	0-200,000
Traza	150,000-500,000
1+	400,000-1'500,000
2+	800,000-5'000,000
3+	> 5'000,000

(SAGARPA, 2011).

Medición de conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica de la leche aumenta debido a la mastitis presente en las vacas lecheras, es también uno de los métodos de diagnóstico para la detección de mastitis subclínica. Se determina por la concentración de aniones y cationes.

En la presencia de mastitis aumenta debido a los cambios en las concentraciones iónicas. Como resultado de los daños en el tejido de la ubre, las concentraciones de lactosa y K^+ disminuyen y las concentraciones de Na^+ y Cl^- aumentan (Kitchen, 1981).

Se le encuentra como parte de algunos equipos de ordeño computarizados dentro de las salas de ordeño así como también en forma de medidores portátiles, lo que permite el monitoreo individual por cuarto (Medina y Montaldo, 2003; Norger y col., 2004).

MAS-D-TEC. Es un analizador manual de leche para detectar la mastitis en las ubres de las vacas lecheras a niveles subclínicos; mide la conductividad eléctrica en una pequeña muestra de leche.

Los cuartos (pezones) que se consideran infectados de forma subclínica, muestran incrementos en los componentes indeseables de la leche (sodio, cloruro, lipasa, inmunoglobulinas, oligosacáridos) y una disminución en los componentes deseables (lactosa, proteínas totales, la caseína, las grasas, calcio, fósforo, potasio y afecta la estabilidad térmica). Este aumento en los componentes en la leche hace que la conductividad eléctrica de la leche sea mayor. (Philpot, 1978)

El MAS-D-TEC arroja resultados inmediatos, de forma objetiva, fáciles de leer, sin químicos ni aditivos utilizados. La rapidez y facilidad de uso lo hacen ideal para llevar a cabo estas pruebas de una forma frecuente, lo que lo hace muy accesible para los productores. La detección temprana de mastitis subclínica permite mantener los niveles de productividad de la leche y evitar las grandes pérdidas de producción asociadas a esta enfermedad.

Conteo de células somáticas

El recuento individual de células somáticas (SCC) se utiliza actualmente para detectar el estado de la mastitis a nivel de rebaño y de la vaca, ya que es ampliamente disponible para los productores de leche y es menos costoso que el cultivo microbiológico (Schukken y col., 2003).

La leche de una ubre sana presenta pocas células somáticas. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes (polimorfonucleares neutrófilos, granulocitos, macrófagos, linfocitos). La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en la cuenta de células somáticas en la leche. (Philpot, 2001; Bedolla, 2004).

Aunque estas pruebas de monitoreo no diagnostican la causa o tipo de infección o si hay una lesión presente, si alertan al ganadero y al veterinario de que un problema se está desarrollando, por lo que se debe poner mucha atención al respecto (Bedolla, 2004).

Examen bacteriológico

El procedimiento de laboratorio donde se incuba un volumen estándar de leche recolectada asépticamente, que ha sido sembrada en un medio de cultivo de agar previamente, ha constituido el método diagnóstico estándar para la mastitis bovina por muchos años. De hecho, el uso del cultivo bacteriológico ha sido ampliamente diseminado como un medio para la determinación del estado de salud de la ubre (National Mastitis Council, 1995), ya que permite conocer cuáles son los microorganismos causales de la enfermedad, además de que los resultados que ofrece son importantes para orientar las medidas de control, que incluyen recomendaciones para la terapia (Ponce y Armenteros, 2000).

El éxito de un diagnóstico bacteriológico depende en gran medida de la adecuada toma de la muestra, garantizando una recolección aséptica, y una correcta identificación, expedición y conservación de la misma. Para ello, cuando se va a tomar la muestra, se eliminan dos o tres chorros de leche del cuarto en cuestión, se lava y seca la porción inferior de la ubre y se desinfectan los pezones frotándose con un algodón empapado en alcohol al 70%, procediéndose a la colección de la leche en tubos de ensayo estériles tras haber secado el pezón nuevamente (Hogan y col., 1990; Philpot y Nickerson, 1993; Tirante y col., 1998). Las muestras deben refrigerarse hasta ser llevadas al laboratorio.

La metodología estándar en la mayoría de los laboratorios, incluye la siembra de una muestra de leche individual (0.01ml) en uno de los cuatro cuadrantes de una placa de agar sangre, usando un aplicador de algodón estéril o un asa flameada. Las placas son incubadas a 37°C por 18 o 24 horas y más, para el crecimiento lento de los microorganismos (National Mastitis Council, 1995). En sentido general, el agar sangre es el medio de cultivo más utilizado como rutina para la siembra de la leche ya que permite una adecuada identificación de cepas de *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. (Kowalski, 1977; Schalm y col., 1987).

Asociada al resultado obtenido en análisis bacteriológico se realiza una prueba de sensibilidad antibiótica o antibiograma. Los resultados de esta prueba proporcionan información acerca de qué antibióticos inhiben el crecimiento de los organismos diagnosticados. Ésta puede emitir una valiosa información al veterinario, ya que sabiendo qué antibióticos son eficaces en el laboratorio, puede indicar el tratamiento adecuado (Gilson, 1995). Tales pruebas usan discos de difusión o ensayos de concentraciones inhibitorias mínimas (Morin y Hurley, 1994), pero generalmente se realizan por el método de los discos de papel de Kirby Bauer (François, 1999).

Caracterización del Agente Causal de Mastitis por Técnicas Moleculares

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

El análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene varias ventajas sobre los métodos fenotípicos, incluyendo: la detección directa y la identificación sin cultivo; tiempo de respuesta rápido; capacidad de alto rendimiento; alta precisión, reproducibilidad, y la sensibilidad o la especificidad. La PCR no sólo es útil para la identificación de las cepas bacterianas; sino también, para predecir la capacidad de los organismos para expresar las toxinas o los determinantes de virulencia o la resistencia a los antibióticos (Mehrotra y col., 2000; Martineau y col., 2001; Strommenger y col., 2003; Tristán y col., 2003; Morot - Bizot y col., 2004; Giammarinaro y col., 2005; Lee y col., 2008; Sasaki y col., 2010; Hirotaki y col., 2011; Shome y col., 2011; Chiang y col., 2012).

Otra de las aportaciones de la PCR es que se ha utilizado para la detección de genes específicos de resistencia a los antibióticos, y de este modo, ayuda a la aplicación de tratamientos adecuados evitando así que aumente la resistencia antimicrobiana entre las especies (Ng y col., 1999; Zhao y col., 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica prometedora que ayuda incluso a establecer pruebas rápidas para la detección de fragmentos de ADN de microorganismos muertos en leche que ya fue pasteurizada.

Como el número de agentes patógenos responsables de la mastitis es grande y muchos de ellos están genéticamente muy relacionados, la diferenciación de las diferentes especies dentro de este grupo tan grande es difícil incluso con las técnicas moleculares (Koskinen y col., 2009). Por otra parte, la identificación basada en las diferencias fenotípicas no es del todo confiable por la falta de marcadores bioquímicos únicos para la identificación de especies (Capurro y col., 2009). Aunque los métodos moleculares de secuenciación de ADN han demostrado ser competentes en un enfoque para la identificación de especies bacterianas, la identificación por métodos que son rápidos y exactos sigue siendo una necesidad (Cremonesi y col., 2009; Zadoks y Watts, 2009).

Estudios recientes muestran que importantes enfermedades que durante toda la vida han ocasionado problemas en la salud tanto de los animales como en los seres humanos por su transmisión en alimentos contaminados, como es la brucelosis, hay indicadores de que el uso de PCR cualitativo comparado con el cultivo microbiológico, presenta una mayor sensibilidad que las pruebas serológicas que habitualmente se utilizan para diagnosticar esta enfermedad en los seres vivos. (Godfroid y col., 2005).

Fragmentos Repetitivos de ADN

La PCR proporciona una gran variedad de metodologías que permiten identificar de diferentes modos a las bacterias, por ejemplo, las técnicas de elementos repetitivos de ADN, ya que se ha encontrado que las bacterias poseen secuencias repetitivas intercalados de ADN, que se encuentran en la mayoría de los microorganismos (Versalovic y col.,1991). Las secuencias repetitivas intercaladas de ADN encontradas en las bacterias tienen un alto grado de variabilidad y pueden servir como sitios de cebadores para la amplificación genómica por PCR diseñada para amplificar regiones ubicadas entre los elementos repetitivos vecinos. Numerosos estudios han demostrado que estas técnicas llamadas REP-PCR son un método altamente sensible para la caracterización de una amplia gama de especies bacterianas de diversos géneros. (Georghiu y col., 1994; Masco y col., 2003).

REP-PCR es un conjunto de metodologías que son llamadas huellas dactilares genotípicas. Este grupo de métodos moleculares está conformado por como REP-PCR, ERIC-PCR, ERIC2-PCR, BOX-PCR y (GTG) 5-PCR y se utilizan para encontrar similitudes o diferencias entre cepas bacterianas, sin conocer exactamente su secuencia de ADN (Versalovic y col., 1994)

(GTG)⁵

Los microsatélites son regiones cortas de ADN aproximadamente de 1 a 10 pares de bases que se repiten dentro del genoma hasta 100 veces, usando estas regiones como cebadores y amplificando la distancia que hay entre cada región repetida, es como se utilizan para conocer el ADN polimórfico. Uno de los cebadores más utilizados es el (GTG)⁵ (Longato y col., 1997; Sampaio y col., 2003; Van-der-Werf, 2000).

Se ha comprobado que el (GTG)⁵ es el método más adecuado para conocer la diversidad genética debido a que evidencia más las huellas dactilares del genoma de las bacterias estudiadas mostrando un alto número de bandas en comparación con las otras técnicas (Mohapatra, 2008).

Sensibilidad Antimicrobiana

Después de desarrollarse la mastitis, la probabilidad de una recuperación exitosa depende del sistema inmune de la vaca, características de virulencia del patógeno y la eficacia del tratamiento debido a que el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos en los patógenos de la mastitis es un factor que reduce la probabilidad de curación (Makovec y Ruegg, 2003).

Aunque existan estos factores que provocan que varíe mucho la sensibilidad antimicrobiana al momento de analizar el tratamiento para atacar la mastitis, es de suma importancia la realización de este estudio, que es una herramienta muy importante para aplicar el tratamiento y permite dar seguimiento a la resistencia antimicrobiana de los patógenos causantes de la mastitis (Hoe y Ruegg, 2005; Apparao y col., 2009, Pol y Ruegg, 2007).

Por otra parte, la administración de agentes antimicrobianos en animales productores de alimentos como método de prevención, es un riesgo potencial para la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos (Schwarz y Chaslus-Dancla 2001). Esto puede ocurrir debido a que en los consumidores, las bacterias resistentes a los antibióticos presentes en el alimento, en este caso la leche, pueden pasar al intestino e intercambiar genes de resistencia a través de la conjugación con otras bacterias de la flora intestinal humana.

De igual modo, las bacterias que ya mostraron resistencia antimicrobiana pueden causar infecciones en individuos inmunosuprimidos, ocasionando un alto riesgo en la salud del paciente (Neu, 1992). Además de esto, se ha demostrado la transmisión de resistencia a antibióticos de *E. coli* a *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Trieu-Cout y col., 1993). Estos son algunos de los problemas que se pueden desarrollar por la aparición de resistencia antimicrobiana y uno de los motivos a grandes rasgos podría ser el hecho de administrar antibióticos como método de prevención de enfermedades en los animales que son utilizados para producir alimentos, las bacterias causantes de estas patologías, en este caso de la mastitis, al momento de infectar al animal y desarrollar la resistencia al medicamento sin ser detectadas y atacadas, pueden seguir presentes en la leche y al pasar por el intestino del consumidor utilizar sus propias herramientas para intercambiar información genética de resistencia a otros microorganismos presentes en los individuos y ocasionar la reducción de eficacia en los tratamientos habitualmente conocidos para tratar dichas enfermedades. (Winokur y col., 2001;. Ferber 2002; Helms y col., 2002; Desenclos y Guillemot, 2004).

Pérdidas Económicas en México a causa de la Mastitis Bovina

A principios de 1900 se inició la importación de bovinos lecheros a México, entre las principales razas fueron Jersey y Holstein-Friesian la que se consolidó aproximadamente en 1940. Entre los

años de 1950 a 1970 se integró la industria lechera con la producción de las pasteurizadoras e industrializadoras de productos lácteos como quesos, yogurt, mantequilla, entre otros (Wolter y col., 2004).

Como ya se ha mencionado en este trabajo, la mastitis es una enfermedad que afecta al ganado bovino y por consecuencia, a la producción de la leche. Ataca fundamentalmente al ganado bovino de explotación intensiva así como al de ordeño mecánico y manual debido a las deficientes condiciones de manejo e higiene (Ruiz, 1996).

Cerca de dos millones y medio de pesos se estiman en pérdidas en México por mastitis bovina al año correspondiendo el 30% a la mastitis clínica y un 70% a la mastitis subclínica (Romero, 2004). La mastitis bovina es la principal enfermedad que causa grandes pérdidas en la industria lechera, el promedio por vaca es de 1,700 a 2,000 pesos al año (Wolter y col., 2004). Estas pérdidas se deben una baja producción de la leche, leche desechada y costo en medicamentos (Medina, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de tesis forma parte de un Proyecto de Investigación, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), donde inicialmente se seleccionaron cinco hatos lecheros del municipio de Cobachi Sonora (Figura 1). Se trabajó con los animales (vacas) que estaban en periodo de ordeña realizando primeramente las pruebas de campo: Prueba de California y

conductividad eléctrica (MAS-D-TEC) para detectar animales con mastitis bovina. Después se hace otra recolección de la muestra de leche de las vacas que dieron al análisis positivo para las pruebas de campo y de igual manera se tomó el mismo número de vacas como controles negativos.

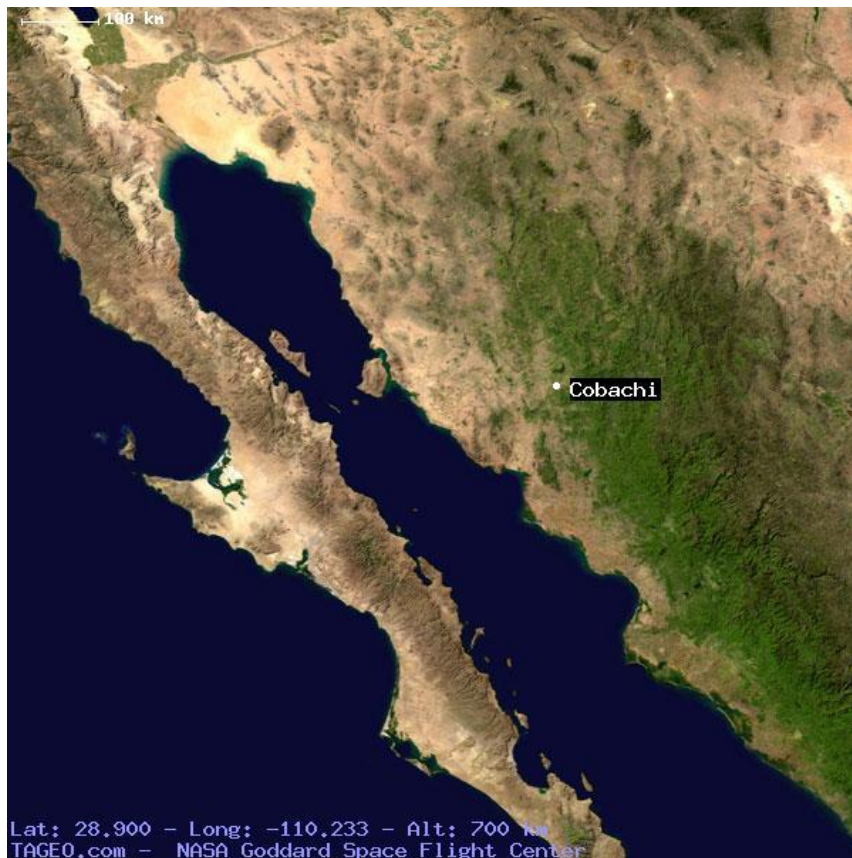


Figura 1. Mapa de la localización de Cobachi en el estado de Sonora.

Preparación de la Ubre para la Realización de las Pruebas de Campo

Primeramente se procedió a un lavado de manos para la toma de muestra. Los primeros chorros de leche fueron descartados (despunte) con el propósito de la eliminación de la flora bacteriana normal del canal y del orificio del pezón para minimizar la contaminación de la leche. La ubre y el pezón fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.1% y se secaron cada cuarto con una

toalla de papel individual. La limpieza y el muestreo de los pezones se realizaron en el sitio de ordeño.

Pruebas de Campo para la Detección de Mastitis Bovina (Comparación de los Tres Métodos)

Prueba de California

La Prueba de California consiste en tomar una paleta con cuatro depósitos para analizar cada cuarto (pezón) por separado. Se agregaron dos chorros de leche (aproximadamente 50 ml) cuidando la ubicación de cada depósito de la paleta para no interferir en el resultado, enseguida se agredo el reactivo de California (arilalquilsulfonato de sodio) en igual proporción, moviendo la paleta en forma de círculos para mezclar ambos componentes. La prueba positiva se da por la formación de un conglomerado gelatinoso visible a simple vista (figura 2). La paleta se lavó con agua y jabón para analizar a la vaca siguiente.

Prueba con el MAS-D-TEC.

Posterior a la Prueba de California se realizó la prueba con el dispositivo MAS-D-TEC (Wescor, Inc) que mide la conductividad eléctrica de la leche, la cual consiste en dejar pasar un chorro de leche de cada cuarto a través de un orificio que se encuentra en el centro del dispositivo. Este tiene una escala de números del 1 al 9. En el intervalo de 1 al 4, la muestra de leche no presenta infección y del número 4 al 9, hay presencia de mastitis subclínica (Figura 3)



Figura 2. Procedimiento para realizar la Prueba de California. A. Despunte. B. Recolección de leche en cada depósito de la paleta. C. Reactivo de California en misma proporción que la leche. D. Interpretación de resultados.



Figura 3. Utilización del dispositivo MAS-D-TEC.

Pruebas de Laboratorio

Análisis Microbiológico

Para el análisis microbiológico, se tomó una muestra de leche de cada cuarto (pezón) de las ubres que resultaron positivas en las técnicas anteriores, ya sea MAS-D-TEC o Prueba de California. Se obtuvo directamente de la ubre de los animales aproximadamente 100 ml de leche en bolsas whirl pak estériles (NASCO). Las muestras se transportaron en hielo a una temperatura 4-10 °C.

Posteriormente, se tomaron 10 μ de leche, para inocular placas de agar sangre (Difco) al 5% y placas de agar Baird-Parker (Difco), se sembró por estría mediante el uso de palillos de madera estériles. Las placas inoculadas se incubaron a 37° C por 24 h, en una estufa (Riossa mod). Las colonias que se desarrollaron en los medios de cultivo, producto del crecimiento bacteriano, fueron resembradas en agar nutritivo (Difco), para su aislamiento y obtención de cultivo puro, a las condiciones anteriormente descritas. A cada colonia obtenida se le realizó las pruebas de oxidasa, catalasa y tinción Gram (Forbes, 2009). Las colonias puras, fueron llevadas a congelación para su preservación, utilizando para ello glicerol al 80% y 1 ml de caldo BHI (Difco) para su conservación y posterior análisis por técnicas moleculares.

Técnicas de Biología Molecular

Extracción de ADN

Se procedió a la reactivación de cepas, mediante la inoculación en caldo de BHI (Difco) y su incubación a 37°C/24 h. Después se realizó la extracción del ADN, mediante la técnica de Marmur modificada (Marmur, 1961). Para comenzar la extracción, los tubos con las cepas se centrifugaron a 3500 rpm en una centrífuga (Termofisher Scientific), durante 10 minutos. Los sedimentos se resuspendieron con 1 ml de NaCl 0.9%, se mezclaron en vórtex (VWR mod. 12620-838) y se centrifugaron a 4000 rpm. Este paso se repitió una vez más. Enseguida se hicieron dos lavados con 1 ml de solución NaCl-EDTA pH 8.0.

El sobrenadante se descartó y se resuspendieron las células nuevamente en 1 ml de agua estéril y se centrifugaron en una microcentrífuga (Eppendorf), por 10 minutos a 4000 rpm. Nuevamente se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 600 μ l de solución NaCl-EDTA pH 8.0. Se añadieron 5 U de mutanolisina (Sigma) y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Posteriormente, se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 8000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron con 600 µl de tris 20 mM pH 8.0 y se agregaron 60 µl de SDS al 10% en Tris (50 mM y EDTA 20 mM). Se agregó proteinasa K (Sigma) (20 mg/ml en Tris-HCL 10 mM, pH8; EDTA 1mM abreviado como TE). Se incubaron por 24 horas a 50 °C.

Finalizado el tiempo de incubación, la enzima se inactivó a 65°C por 20 minutos. Se enfriaron las muestras a temperatura ambiente aproximadamente a 25°C y centrifugaron por 5 minutos a 8000 rpm; se recogió la fase acuosa y se depositó en otro microtubo con el cual se realizaron los siguientes lavados. Se añadieron 500 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 10000 rpm.

La fase acuosa se transfirió a otro microtubo de 1.5 ml. Se repitió una vez más este paso. Después de obtener una fase acuosa clara, se agregaron 0.1 volúmenes de NaCl 5M. Se añadieron 500 µl de isopropanol frío (Sigma) y se congelaron las muestras a -20°C por 24 horas. Después de descongelar las muestras a temperatura ambiente se centrifugaron 20 minutos a 13,000 rpm y se descartó el líquido sobrenadante. Se preparó una solución de TE con RNAsa A (Sigma), a una concentración final de 1 ug/ml y se agregaron 50 µl a cada tubo. Se re suspendió el ADN en 50 µl de TE/RNAsa y se incubaron a 37°C por 1 hora (Marmur, 1961).

PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)

Para la reacción de PCR se utilizaron 5 µl del ADN extraído anteriormente y se amplificó un fragmento. Lo iniciadores utilizados fueron: GTGGTGGTGGTGGTG (GTG⁵), la temperatura de anillado o hibridación fue de 48°C, con 30 ciclos de reacción. La temperatura de fusión fue de 94°C y la temperatura de polimerización de 72 °C.

Electroforesis

Para visualizar los productos de reacción de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 1.2%, teñido con Syber Safe (Invitrogen) concentración final de 1,000X (3 µL de SYBR Safe 10,000X a 30 mL de Agarosa en Buffer TBE 1X), las condiciones de corrida que se efectuaron fueron a 80 Volts durante 4 horas, y se visualizaron en un fotodocumentador bajo luz UV (Bio-Rad). Se captaron fotografías de los geles para su posterior análisis.

Para poder establecer la similitud genómica entre las cepas obtenidas y analizadas con PCR GTG, se analizaron los perfiles electroforéticos, haciendo uso del Software Bionumerics versión 3.5 software (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium) con el método de

Matriz de Distancias “UPGMA” (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) y el Coeficiente de Dice, con una tolerancia de 1%, para la obtención de los grupos del dendograma.

Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana

Técnica de disco-difusión en agar

Se realizó un antibiograma a cada una de las cepas (previa selección con el análisis de perfil electroforético), utilizando como cepa control a *E. coli* ATCC 25922, teniendo como resultado los patrones de resistencia a antimicrobianos, mediante la Técnica de Kirby-Bauer propuesta por el NCCLS (2002).

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, las cepas seleccionadas fueron transferidas a agar nutritivo (Difco) e incubaron a 37°C 7 24 h.

Se preparó el inóculo bacteriano estándar utilizando las colonias completamente aisladas del previo cultivo en agar nutritivo. La preparación del inóculo se hizo en 5 mL de solución salina al 0.85 %, el cual se igualó a la turbidez del estándar Núm. 0.5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 cel/mL), (CLSI/NCCLS, 2006).

Esta técnica se realizó usando agar Mueller Hinton (Difco). El inóculo estandarizado se sembró masivamente utilizando hisopos de algodón estériles para esparcir por toda la placa la misma carga bacteriana. Se colocaron los discos de antibióticos, máximo 4 discos por cada placa. Se incubó a 37 °C de 18-20 horas. El tiempo desde la estandarización del inóculo hasta la colocación de los discos no excedió de 15 Minutos. Los discos de antibióticos y concentración empleados se muestran en la Tabla 3 (CLSI/NCCLS, 2006).

Posterior a la incubación se procedió a medir los halos (diámetro) de inhibición en mm, con el fin de obtener la relación de sensibilidad antibacteriana para cada antibiótico. Las lecturas se compararon con las tablas preestablecidas (CLSI/NCCLS, 2006).

Tabla 3. Antibióticos utilizados

Antibiótico	Cantidad/disco(μg)
Fosfomicina (BD)	50
Cefalotina (BD)	30
Penicilina (BD)	10 U
Amoxicilina/ A. Clavulánico (BD)	20/10
Ampicilina (BD)	10
Cefazolina (BD)	30
Ceftriaxona (BD)	30
Sulfametoxazol/trimetoprim (BD)	23.75/1.25
Tetraciclina (BD)	30
Eritromicina (BD)	15
Gentamicina (BD)	10

Diseño y

Análisis

Estadístico.

De acuerdo al censo de ganado lechero proporcionado por los productores de la región, se cuidó que el número de animales seleccionados fuera un número significativo para determinar la incidencia de la mastitis. Para las diferentes pruebas cada cuarto se analizó de manera independiente.

La incidencia de mastitis se calculó con el porcentaje de vacas infectadas de acuerdo al total de vacas analizadas; el análisis se hizo eligiendo el número más alto de vacas que resultaron infectadas en cualquiera de las 3 pruebas utilizadas.

A los resultados obtenidos de los tres métodos evaluados se les realizó un análisis de X^2 para la detección de la mastitis con el fin de ver si había diferencias entre ellos.

Las mediciones de los halos de inhibición (mm) de los antibióticos fueron llevados a un análisis de Varianza (ANOVA) de 1 vía, a un nivel de significancia de 0.05, además de realizar una comparación de medias mediante el sistema de Tukey Kramer, todo lo anterior utilizando el paquete estadístico NCSS versión 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Incidencia de Mastitis Bovina

Se analizaron 126 vacas que pertenecen a los 5 productores seleccionados. A las cuales se les aplicaron las dos pruebas de campo para detectar mastitis bovina y realizar el análisis microbiológico. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

El análisis de 126 vacas del municipio de Cobachi, Sonora, que comprendía a los cinco productores seleccionados previamente, mostró que 83 vacas presentaron mastitis bovina detectada por el análisis microbiológico que era nuestra prueba de referencia. La incidencia de mastitis subclínica en la región fue del 65.80%, ésto refleja la necesidad de implementar métodos diagnósticos así como un monitoreo constante de esta enfermedad, ya que comúnmente no se realizan.

Ruiz y col. en 2011 en su estudio realizado en Pernambuco, Brasil, donde se emplearon tres métodos de detección: conteo de células somáticas, Prueba de California y análisis microbiológico encontraron una incidencia de mastitis bovina del 63.3%; un resultado similar al que se encontró en el presente trabajo. Se eligió este estudio como punto de referencia ya que en México hay muy pocos donde se evalúen tres metodologías y que se incluya el análisis bacteriológico. Además también se comparo la ordeña mecánica y manual, obteniendo una incidencia de 63.3% y 57.2% respectivamente, encontrando que en la ordeña mecánica hay una mayor propagación de la enfermedad y que esto podría deberse porque no hay un buen aseo de la máquina de ordeño, sin embargo, en este estudio la ordeña fué manual, la incidencia puede ser alta debido a que esta enfermedad no se monitoreaba antes de realizar esta investigación en esta región.

Gerlach y col. en 2009 en Santa Ana, Sonora reportaron una incidencia del 18.30% para mastitis subclínica y 5.35% para mastitis clínica, un porcentaje menor que el encontrado en este estudio (65.80%). Ésta marcada diferencia entre las incidencias a pesar de ser en el mismo estado donde se comparten casi el mismo clima y vegetación, se debe a que el estudio en Santa Ana, Sonora, solo se utilizó la Prueba de California, que es una prueba de campo confiable pero cuando la enfermedad está en etapas tempranas aun no hay suficientes células somáticas y por lo tanto, arroja un resultado negativo. En cambio, el análisis microbiológico es más específico y sensible desde etapas tempranas de la enfermedad, como se vio reflejado en estos resultados.

Tabla 4. Número de vacas detectadas con mastitis bovina por cada método.

	MAS-D-TEC	Prueba de California	Análisis microbiológico
No. de Vacas Positivas	53	64	83
% de Vacas Positivas	42.06%	50.70%	65.80%

Comparación de Tres Métodos de Detección de Mastitis Bovina

El diagnóstico precoz de la mastitis y la prevención de mastitis subclínica debe ser una prioridad para cada productor de lácteos, para lograr la obtención de leche de buena calidad y la prevención de pérdidas económicas. En este estudio se analizó la relación entre tres metodologías empleadas para la detección de mastitis bovina, buscando así comparar dos pruebas de campo con el cultivo, para conocer cuál de las pruebas tiene más relación con el método que se considera es el más efectivo. Se obtuvo un 10.6% para MAS-D-TEC, un 12.7% para la Prueba de California y el análisis microbiológico resultó tener un porcentaje de 28.5% de muestras positivas, lo cual significa que es el análisis más efectivo para la detección de Mastitis Bovina (Figura 4).

La comparación de las otras dos metodologías, difiere muy poco entre sí, es decir, la Prueba de California y la Medición de Conductividad Eléctrica (MAS-D-TEC) no muestran diferencias. De acuerdo con los resultados de otras investigaciones la Medición de la Conductividad Eléctrica exhibe una alta correlación con la prueba de California y el conteo de células somáticas. La fiabilidad de la medición de conductividad eléctrica se puede aumentar aún más utilizándose simultáneamente con otro método de detección de mastitis bovina. (Güven y col., 2012).

La Prueba de California muestra una mayor relación con el análisis microbiológico que la conductividad eléctrica, por lo que podría ser la mejor opción como prueba rápida para los productores. La detección de mastitis con la Prueba de California ha sido extensamente evaluada obteniendo resultados variables. En otros estudios, se ha comparado con el recuento de células somáticas y se determinó una sensibilidad del 66,7% para detectar patógenos mayores y 49,5 para patógenos menores, siendo una prueba apropiada para programas de monitoreo de mastitis en vacas infectadas con patógenos mayores. La Prueba de California proporciona una predicción confiable debido a su similitud con las demás metodologías, y advierte sobre nuevos casos de

mastitis subclínica y la aplicación de medidas correctivas antes de que la enfermedad progrese a mastitis clínica (Sargeant, 2001).

Cómo ya se mencionó anteriormente, para este trabajo, el mejor método fue el microbiológico, debido a que es considerado el estándar por su especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de la mastitis bovina, que ayuda a identificar el agente causal de esta enfermedad. Para obtener un resultado válido y correcto es necesario que desde la obtención de la muestra de leche hasta su procesamiento en el laboratorio se emplee un manejo apropiado para evitar la contaminación para disminuir las variables que influyen en el resultado obtenido (Hernández y Valero, 1999).

Análisis Microbiológico

Partiendo de 502 cuartos (pezones) analizados, 143 cuartos presentaron crecimiento microbiológico y de estos se obtuvieron 199 aislamientos.

En este trabajo sólo se aislaron los microorganismos presentes en las muestras con mastitis sin conocer a que especie pertenecían, sin embargo, en otros estudios realizados en Latinoamérica informan que el género *Corynebacterium sp*, que es bacilo Gram positivo, es el de mayor prevalencia, seguido por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sp.*, también con porcentaje considerable *E. coli* (Ruiz y col., 2011), en el resultado de este estudio se aprecia que el 92.5% de los aislamientos fueron cocos Gram positivos en racimos, catalasa positiva, y oxidasa negativo, lo que hace suponer que pertenecen al género *Staphylococcus sp.*, siendo muy pocos los cocos Gram positivos en cadena con un 4.5% y un 3% de bacilos Gram positivos. No se cultivaron bacilos Gram negativo confirmando así, que la mastitis bovina en las vacas analizadas no es por contaminación de heces en el establo ni por la manipulación de muestras y sólo por agentes comunes de la mastitis bovina.

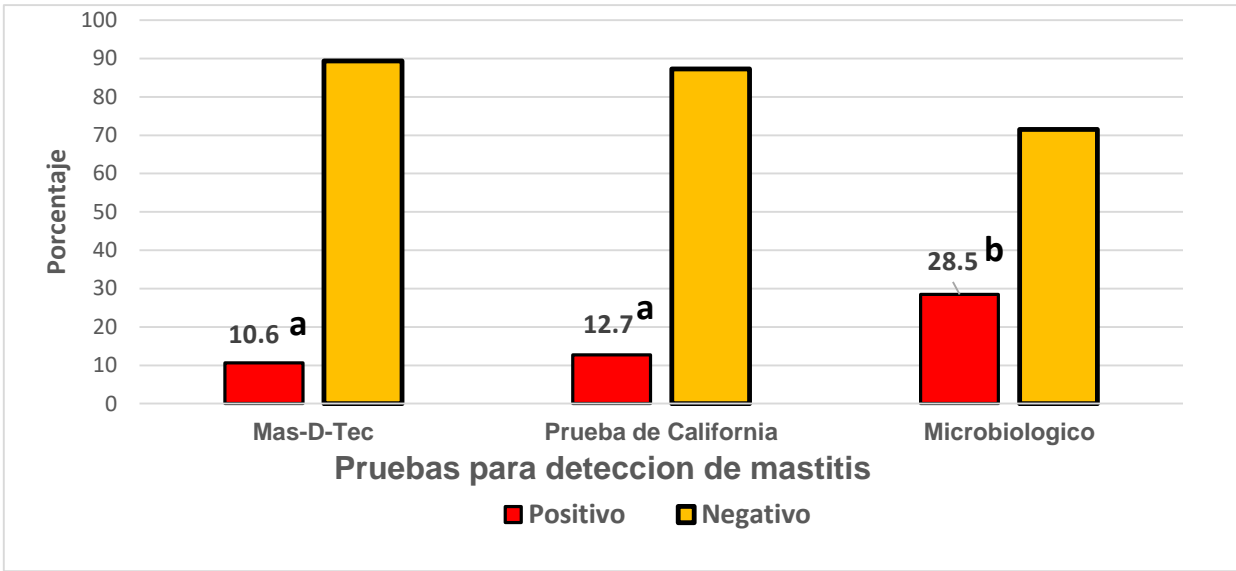


Figura 4. Comparación de los tres métodos de detección de Mastitis Bovina. NOTA: Subíndices iguales, no hay diferencias ($p \geq 0.05$), subíndices diferentes denotan diferencias entre los métodos ($p \geq 0.05$).

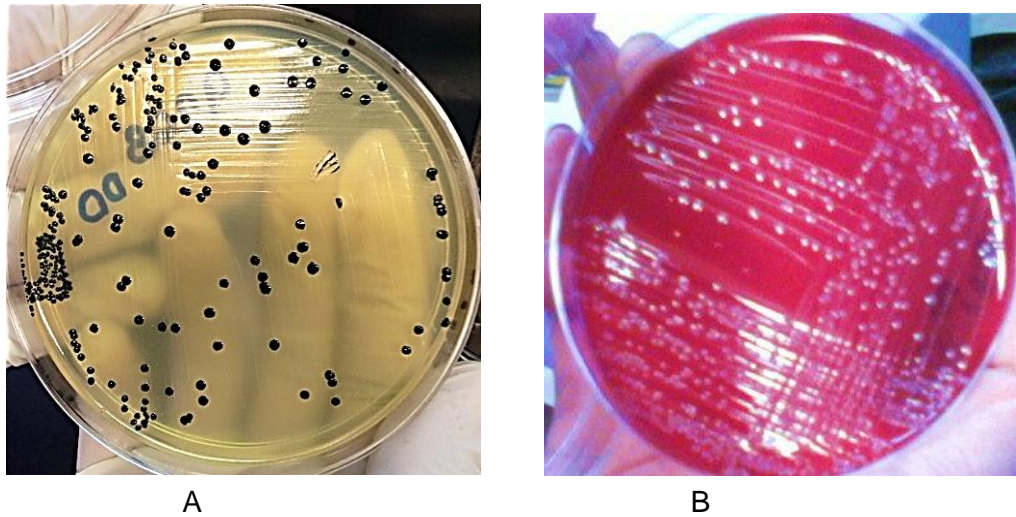


Figura 5. Crecimiento de bacterias obtenidas de las muestras de leche recolectadas en Cobachi, Sonora. A. Agar Baird-Parker; B. Agar Sangre

PCR (GTG)⁵ y Dendograma

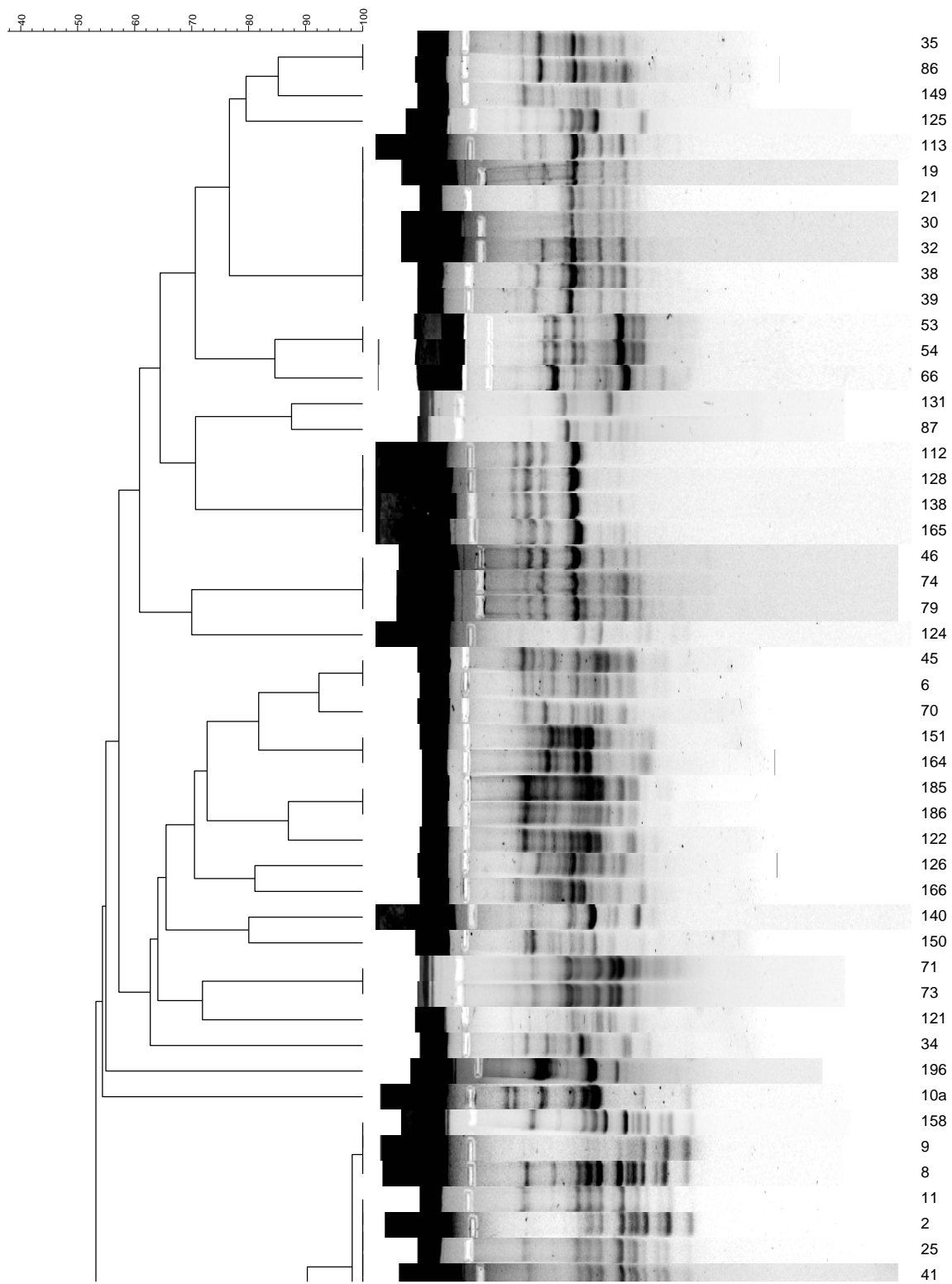
En la figura 6 se observa el dendograma obtenido de los perfiles electroforéticos de los productos de PCR con el primer GTG⁵. Se encontró mucha variabilidad genómica entre las cepas analizadas a pesar que todas provienen de Mastitis Bovina subclínica de la misma región.

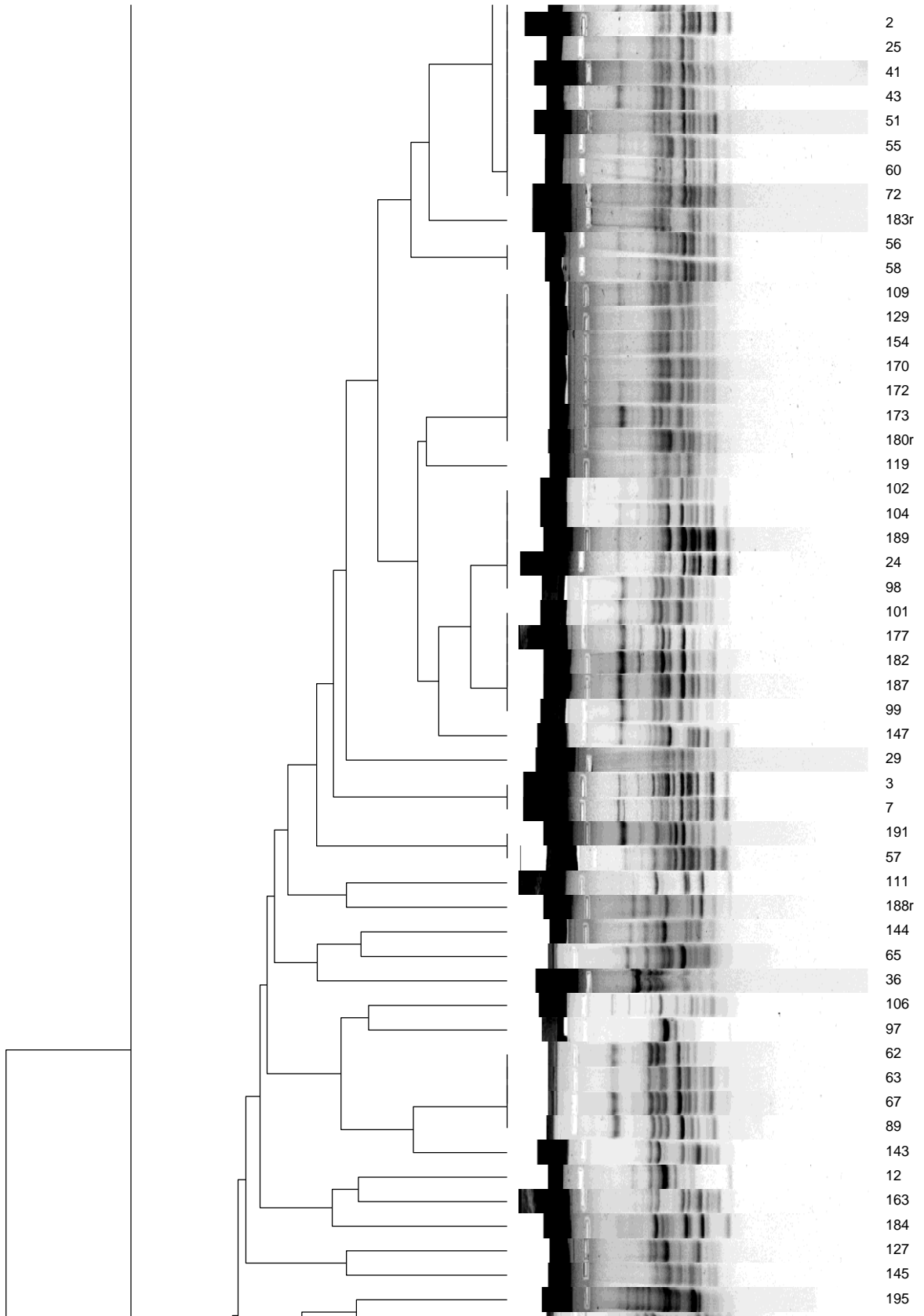
Las cepas se separaron en 91 grupos, la mayoría formadas por cepas solas excepto las cepas 113, 19, 21, 30, 32, 38 y 39 en un grupo, 11, 2, 25, 41, 43, 51, 55, 60, 72 en otro grupo. También 109, 129, 154, 170, 172, 173, 180 tuvieron mucha similitud entre sí, y otro gran grupo lo conforman las cepas 102, 104, 189, 24, 98, 101, 177, 182, 187, 99. Esta falta de poder discriminatorio entre las cepas, posiblemente se deba a que se utilizó la PCR-(GTG)⁵ para realizar este análisis, pudiéndose haber utilizado otros métodos con enzimas de restricción para hacer los perfiles electroforéticos y así poder tener un grado de discriminación más amplio, pero, como se menciona en la metodología, este análisis fue realizado con el objetivo principal de hacer una preselección, para elegir las cepas a las cuales se les realizaría el antibiograma, sin embargo podemos observar claramente que aun así existe una amplia variabilidad de cepas

Sensibilidad Antimicrobiana

En la tabla 5, se muestran los resultados de la sensibilidad antimicrobiana que se realizó a las cepas aisladas, de la cual se puede decir que varios antibióticos muestran el mismo comportamiento ante la variabilidad de las cepas analizadas. La ceftriaxona es el antibiótico al que se observa la mayor resistencia comparado con los demás.

Estos resultados muestran que los antibióticos fosfomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalotina, cefalozina muestran una mejor acción contra los microorganismos causales de la Mastitis Bovina en la región de Cobachi, Sonora, seguidos por los antibióticos tetraciclina, eritromicina, gentamicina y sulfametoxazol/trimetoprim. Como anteriormente fue mencionado, el de menor eficiencia es la ceftriaxona al que se observó una mayor resistencia. El éxito de un tratamiento antibacteriano contra la Mastitis Bovina, está determinado por una elección adecuada del antibiótico. Se recomiendan: β -lactámicos, aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos, tetraciclina, trimetropim-sulfonamidas combinadas, y fluoroquinolonas (Zschöck 1996).





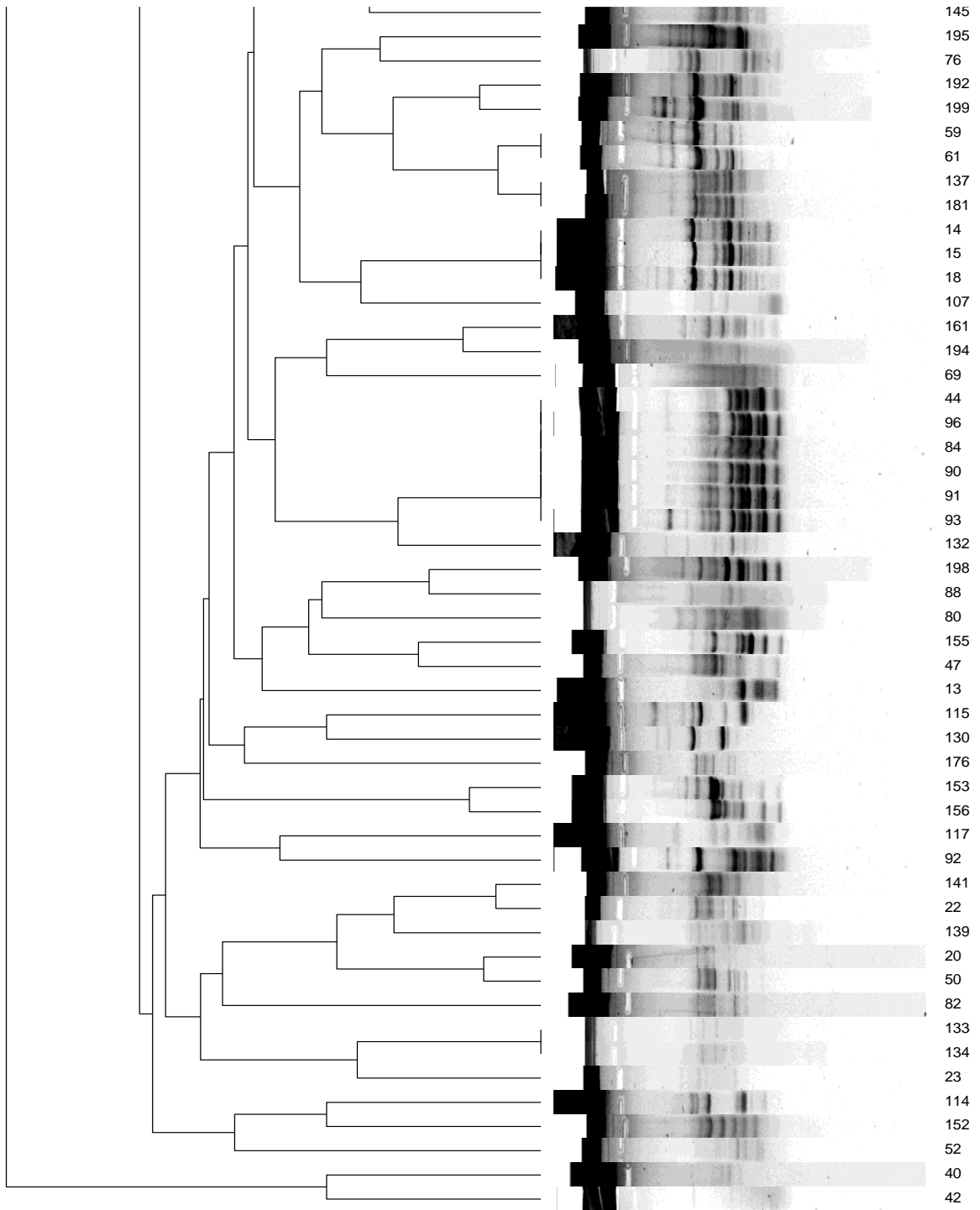


Figura 6. Dendrograma que muestra la variabilidad genómica del ADN de cepas causantes de Mastitis Bovina, amplificado con el primer (GTG)⁵ y separado mediante electroforesis convencional.

Tabla 5. Media de halos de inhibición para cada de uno de los antibióticos analizados. Superíndices iguales, no presentan diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Antibiótico	Media de Halo de inhibición (mm)	Sensibilidad/ Resistencia
Fosfomicina	40 ^a	S
Penicilina	39 ^a	S
Ampicilina	38 ^a	S
Amoxicilina/ A. clavulánico	37 ^a	S
Cefalotina	37 ^a	S
Cefazolina	35 ^a	S
Tetraciclina	28 ^c	S
Eritromicina	28 ^c	S
Gentamicina	27 ^c	S
Sulfametoxazol/trimetoprim	26 ^c	S
Ceftriaxona	21 ^b	R

En este estudio se incluyeron la mayoría de las familias de los antibióticos para evaluar la sensibilidad con las cepas obtenidas. No se sabe con certeza el nombre de las cepas analizadas pero como se explicó anteriormente la mayoría presentan características del género *Staphylococcus sp*; hay estudios en Latinoamérica que demuestran una alta resistencia antimicrobiana de este género, por ejemplo Brita en el año 2001, en Brasil, indica que hay una resistencia de este género contra oxacilina que pertenece a grupo de los betalactámicos, así como la Penicilina, Amoxicilina, Ampicilina que se analizaron en este trabajo, sin embargo, no se reflejó esa resistencia encontrada en otras regiones, esto puede deberse a que no se trata de *Staphylococcus sp.*, ó que las cepas no tienen esa multiresistencia y que la situación se encuentra en buen momento para evitar esa característica. Otro estudio donde se utilizan otros antibióticos, por ejemplo la asociación de Neomicina, Bacitracina y Tetraciclina se observó que este género era inhibido por estos antibióticos, seguido por el Florfenicol. En este trabajo se encontró una gran diversidad genética en las cepas aisladas y como consecuencia, la resistencia y susceptibilidad a los diferentes antibióticos.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran una alarma a la cual se le debe tomar importancia, esto es porque la incidencia de mastitis bovina fue del 65.80% lo cual hace notar que existe un problema de mastitis bovina en Cobachi, Sonora.

Es de suma importancia emplear un sistema de control para el monitoreo continuo en el animal (vaca) recurriendo a las pruebas de campo comparadas en este estudio, la Prueba de California y el MAS-D-TEC que pueden ser utilizadas indistintamente por el productor ya que no muestran diferencias entre sí ($p \geq 0.05$) y de esta manera, tener un seguimiento de esta enfermedad en el ganado bovino.

La gran cantidad de cepas obtenidas nos muestran la variabilidad genética de los patógenos que provocan la mastitis bovina en esta región; esto nos hace ver la necesidad de implementar buenas prácticas de higiene a la hora de ordeño así como en el manejo del establo en general.

Además de aplicar el tratamiento adecuado utilizando los antibióticos que mostraron un mejor efecto como fosfomicina, penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavilónico, cefalotina, cefalozina contra de los microorganismos aislados. Por otro lado, la ceftriaxona es el antibiótico que resultó menos efectivo, por lo tanto, lo convierte en la opción menos recomendada a emplearse.

RECOMENDACIONES

El Mas-D-Tec así como la Prueba de California son dos pruebas de campo eficaces y de bajo costo para el monitoreo de la mastitis bovina; éstas son ideales para que los productores de esta región las empleen en el control de la enfermedad, incluso la recomendación va a gran escala, y se invita a todos los productores de todo el estado que implementen este tipo de metodologías y así, reduzcan los índices de mastitis a nivel estado.

La aplicación de este monitoreo y control de la enfermedad, repercutirá directamente en la producción y calidad de la leche así como en la salud del consumidor, por lo tanto, es importante que el productor las emplee de manera constante.

La gran variedad de bacterias aisladas muestran que la contaminación se presenta durante la manipulación de la leche para la elaboración de queso artesanal, por lo que es de suma importancia implementar las buenas prácticas de higiene, desde el área de ordeño hasta la realización del queso artesanal.

El ADN obtenido de todas las cepas aisladas dan pie a seguir con la investigación y conocer que bacterias son las causales de mastitis bovina en esta región de Cobachi, Son. Se pueden realizar estudios moleculares para la caracterización de tales bacterias con el ADN extraído, se les puede realizar una PCR 16s ribosomal con la cual se prosigue conocer la secuencia nucleotida de cada bacteria y saber exactamente el patógeno causal de mastitis bovina en esta región.

Una de las investigaciones de nuestros días, es buscar una opción alternativa para tratar las infecciones bacterianas, debido a la gran cantidad de cepas resistentes a los antibióticos; por lo tanto, una manera de aplicar un tratamiento tal vez igual de eficaz que un antibiótico común es el uso de extractos naturales, lo cual podría arrojar resultados muy buenos y tratar la mastitis bovina a un costo mucho más bajo. La utilización de extractos naturales ayudaría como modo de prevención, puesto que se les puede aplicar a los animales de forma cotidiana para restringir el crecimiento de microorganismos. Los extractos naturales actualmente se consideran una gran alternativa para la ciencia, debido a lo ya antes mencionado, la resistencia antimicrobiana que por el mal manejo de la población se ha convertido en un problema actual a nivel mundial, y en el uso veterinario ocurre de la misma manera.

Los datos obtenidos sobre antimicrobianos y los de diversidad genética deben ser considerados como parte de una estrategia integral para el manejo de los hatos lecheros, esto con el fin de tener un control exitoso de la mastitis bovina.

BILBIOGRAFÍA

- Akuzawa R, Miura T, Kawakami H. 2009. Bioactive Components in Caseins, Caseinates, and Cheeses, in *Bioactive Components en Milk and Dairy Products*, editorial JW Park, Wiley-Blackwell, Ames, pp. 217-225.
- Alais C. 1985. Química, bioquímica y física de la leche, en *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*, Reverté, Madrid, pp. 31-253.
- Allen MS. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 83:1598–162.
- Álvarez PE. 1998. Situación de la Brucelosis en América. Panorama General. *Memorias Del Tercer Foro Nacional de Brucelosis*. Acapulco, Guerrero, México; pp 23-31.
- Anon R. 2011. Veterinary investigation surveillance report. London: Veterinary Laboratories Agency. 223 p
- Apparao D, Oliveira L, Ruegg PL. 2009. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 234:1437–1446.
- Aranceta J, Serra L. 2004. Leche y Lácteos: valor nutricional. *Leche, lácteos y salud*, Médica Panamericana, Madrid, pp. 19-30.
- Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F. 2002. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. *Journal of Dairy Science*. 85:1370-1375.
- Ávila TS, Gutiérrez CJ, Sánchez G, Canizal JE, Torres SV. 2004. Mastitis y glándulas improductivas en hatos pequeños. *Memorias XXVIII Congreso Nacional Buiatría*. Morelia, Michoacán, México. Pp 52-64.

- Ávila TS, Gutiérrez CJ. 2001. Epidemiología de las mastitis en hatos pequeños. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la leche. Julio 21-23, León, Gto. México. Pp. 61-67.
- Báez GJ. 2002. Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Téjaro, Michoacán. Tesis de licenciatura. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacan. pag. 120
- Baştan A, Kaymaz M, Findik M, Erünal N. 1997. The use of electrical conductivity, somatic cell count and California mastitis test in diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Ank. Univ. Vet. Fak. Derg.* 44: 1-6.
- Barker RM, Yang TJ. 1998. Chemotactic Activities in Nonmastitic and Mastitic Mammary Secretions: Presence of Interleukin-8 in Mastitic but Not Nonmastitic Secretions. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 5:82-8.
- Bedolla CC. 2004. Mastitis Bovina. *Cuatro Vientos.* No 41. Febrero-Marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 24-26.
- Bernal ML, Rojas GM, Vázquez FC, Espinoza OA, Estrada FJ, Castelán OO. 2007. Determinación de la calidad físico-química de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regiones del estado de México. *Vet Méx*;38 (4):395-407.
- Bertino E, Coppa G, Giuliani F, Coscia A, Gabrielli O, Sabatino G, Sgarrella M, Testa T, Zampini L, Fabris C. 2007. Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *International Journal of immunopathology and pharmacology* 21(2): 381-385.
- Blowey RW, Edmonson P. 1999. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Zaragoza: Acribia, pp. 224.
- Boulanger D, Bureau F, Mélotte D, Mainil J, Lekeux P. 2003. Increased Nuclear Factor κ B Activity in Milk Cells of Mastitis-Affected Cows. *Journal of Dairy Science* 86:1259-1267.

- Brito MAVP. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. Journal Arq Bras Med Vet Zootec. 53(5):531-7.
- Caballero TA, Carrera VA, Legomin FE. 1998. Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. Rev Cubana Aliment Nutr;12:7-10.
- Capurro A, Artursson K, Waller KP, Bengtsson B, Ericsson-Unnerstad H, Aspán A. 2009. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. Journal of Veterinary Microbiology. Mar 2;134(3-4):327-33.
- Castañeda H, Kloppert B, Zschock M, Wolter W. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Mastitis Bovina. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16, 62-72.
- Chiang YC, Lu HC, Li SC, Chang HY, Chen HY, Lin CW, Tsen HY. 2012. Development of PCR primers and a DNA microarray for the simultaneous detection of major *Staphylococcus* species using *groESL* gene. Foodborne Pathog. Dis. 9:249–257.
- CLSI/NCCLS. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S16. Ninth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS.
- Corbel MJ. 2006. Brucellosis in Humans and Animals. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Correa MGP, Marin JM. 2002. O-serogroups, *eae* gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brasil. Journal of Veterinary Microbiology. 85:125-132.

- Costa EO, Ribeiro AR, Watanabe ET, Melvilla PA. 1998. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *J Vet Med B*;45: 65–71.
- Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni P, Morandi S, Luzzana M. 2006. Technical note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J Dairy Sci* 89, 163–169.
- Cunha RPL, Molina LR, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira PM, Gentilini MB. 2008. Subclinical mastitis and relationship between somatic cell count with number of lactations, production and chemical composition of milk. *Arq Bras Med Vet Zoo*, 60:19–24.
- Delgado R, Cristóbal L, Torres D, Maurtua J. 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp.* *Revista Panamericana Salud Publica* [online] 14:3. 158-164. ISSN 1020-4989. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892003000800002>
- Devriese LA, Vancanney M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E. 2005. *Staphylococcus pseudointermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 55: 1569-1573.
- Djabri B, Barielle N, Beaudeau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Journal of Veterinary Research*.33:335-357.
- Dogan B, Klaessig S, Rishniw M, Almeida RA, Oliver SP. 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Journal of Veterinary Microbiology*. 116: 270-282.
- Dohoo IR, Smith J, Andersen S, Kelton DF, Godden S. 2011. Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. *Journal of Dairy Science* 94(1):250–61.
- Eck A, Gillis JC. 2000. *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance*, Lavoisier Publishing, 3^a ed, Paris, Francia.

- Färber JM, Peterkin PY. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Foodborne Pathog. Microbiology Reviews; 55(3): 476-511.
- Fetherston C. 2001. Mastitis in lactating women: physiology or pathology?. Breastfeed Rev.;9(1):5–12.
- Filteau SM, Rice AL, Ball JJ, Chakraborty J, Stoltzfus R. 1999. Breast milk immune factors in Bangladeshi women supplemented postpartum with retinol or beta-carotene. American Journal of Clinical Nutrition. 69 (5):953–8.
- François S, Meregalli S, Sutich E. 1999. Mastitis bovina: tipificación de cocos Gram positivos y determinación de su sensibilidad a quimioterápicos [en línea]. Universidad Nacional de Rosario Disponible en: <http://www.unr.edu.ar/u-acad/fveter/divulg-cientif/17.htm>
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 2009. Diagnostico Microbiológico. 12ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Galeana T, Cisneros JJ, Solís EI, Ortega VM, González VE, Mejía AR, Rentería SI y Bedolla CC. 2008. Etiología de la mastitis bovina en el municipio de Pátzcuaro Michoacán. Memorias del V Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. Centro de Investigaciones en Óptica. León, Guanajuato. México. pp. 1-4.
- Gerlach BFA, Ayala Álvarez F, Denogean B, Moreno MS, Gerlach B. 2009. Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora (parte A). Revista Mexicana de Agronegocios. XIII(24): 789-792.
- Ghebremedhin, B, Layer F, König W, König B. 2008. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA and tuf gene sequences. Journal of Clinical Microbiology. 46, 1019–1025.
- Giammarinaro P, Leroy S, Chacornac JP, Delmas J, Talon R. 2005. Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. Journal of Clinical Microbiology. 43:3673–3680.

- Gilson W, 1995. Interpreting and using mastitis screening test [en línea]. University of Georgia. College of Agricultural & Environmental Sciences. Bulletin 913. Disponible en: <http://www.ces.uga.edu/pubcd/b913-w.htm>
- Güven K, ÇETİN Ö, BİNGÖL E, GÜNDÜZ MC. 2012. Relations between electrical conductivity, somatic cell count, California mastitis test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. Turkish Journal of Veterinary & Animal Science. 36:1, p49.
- Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rösler U, Neubauer H, Tomaso H. 2010. Brucellosis—Regionally emerging zoonotic disease? Croatian Medical Journal. 51:289–295.
- Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. Journal of Vet. Q. 29:18–31.
- Hassan ASF, Hassanein R, Abdelazeem M, Elsayh KI, Malek AM. 2010. Occurrence of *Listeria* species in meat, chicken product and human stools in Assiut city, Egypt with PCR use for rapid identification of *Listeria monocytogenes*. Journal of Veterinary World. 3(8):353-359.
- Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane, J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. Livestock Production Science. 64:95-106.
- Hernández L, Valero G. 1999. Diagnóstico bacteriológico y recomendaciones para el control de la mastitis. INIFAP, CENID Microbiología Animal. México, D.F. p. 18-21.
- Hoe FGH, Ruegg PL. 2005. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. Journal of American Veterinary Medicine Association. 227:1461–1468.
- Hogan JS, Galton DM, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW. 1990. Protocols for evaluating efficacy of post milking teat dips. Journal of Dairy Science. 72:2580.

- Hogeveen H, Huijps K, Lam TJ. 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *New Zealand Veterinary Journal*. 59:16–23.
- Jain NC. 1979. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *Journal of Dairy Science*. 62:128–134.
- Jaramillo GM, Echeverria ZJ, Restrepo BLF. 2010. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*, 7(1), 49-57.
- Juárez M. 2002. Quesos mexicanos: toda una tradición. Reportajes FMVZ (serial online). Available from: URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/reportajes/quesos/quesos.htm>
- Kaclikova E, Kuchta T, Kay H, Gray D. 2001. Separation of *Listeria* from cheese and enrichment media using antibody-coated microbeads and centrifugation. *Journal of Microbiological Methods*. 46 63–67.
- Kathariou S. 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*. 65, 1811-29.
- Kemper N, Gerjets I. 2009. Bacteria in milk from anterior and posterior mammary glands in sows affected and unaffected by postpartum dysgalactia syndrome (PPDS). *Acta Veterinaria Scandinavica*. 51(1):26.
- Kitchen BJ. 1981. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*. 48:167–188.
- Kowalski JJ. 1977. Microbial agents and bovine mastitis. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 170:175.
- Lafi SQ. 2006. Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. *Journal of Small Ruminant Research*. 62: 83-86.

- Lee KH, Lee LW, Wang SW, Liu LY, Lee MF, Chuang ST, Shy YM, Chang CL, Wu MC, Chi CH. 2008. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 20:463–471.
- Lucy MC. 2001. Reproduction loss in high-producing dairy cattle: Where will it end?. *Journal of Dairy Science*. 84:1277–1293.
- Makovec JA, Ruegg PL. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994–2001). *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 222:1582–1589.
- Malik GM. 1997. A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 56:375–377.
- Manjarrez LAM, Velázquez OV, Alonso MU, Díaz ZS, Lagunas BS, Valladares CB, Saltijeral OJ. 2008. Niveles de infección producidos por *Staphylococcus aureus* en hatos lecheros del Estado de México. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Yucatán, México.
- Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganism. *Journal of Molecular Biology*. 3: 208-218.
- Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 2001. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:2541–2547.
- McLaughlin J. 1997. Animal and human listeriosis: a shared problema. *Journal of Veterinary*. 153, 3-5.
- Medina CM, Montaldo VH. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo.
- Medina RJJ. 2002. Prevalencia e identificación de agentes etiológicos causantes de mastitis en el Municipio de Vista Hermosa, Michoacán. (Tesis de licenciatura).

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México 39-41 y 83.

Mehrotra MG, Wang W, Johnson M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:1032–1035.

Morin DE. 2004. Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. 23rd World Buiatrics Congress. Québec, Canada. July 11-16.

Morin DE, Hurley WL. 1994. Mastitis. Lesson B. [en línea]. *Lactation Biology*. ANSCI 308. University of Illinois (Urbana-Champaign). Disponible en: <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/mastitisb.html>

Morot-Bizot, SC, Talon R, Leroy S. 2004. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *Journal of Applied Microbiology*. 97:1087–1094.

Morresey PR. 1999. Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editors. *Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice*. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co, 563-568.

Nash DL. 2000. Heritability of clinical mastitis incidence and relationships with sire transmitting abilities for somatic cell score. *Journal of Dairy Science*. 83:50-60.

National Mastitis Council. 1995. *Mastitis Control in Dairy Herds*. Cap. 9:229-277.

Noquera A. 1999. *La mejor manera de controlar la mastitis bovina*. Ed. El guayabo Maracaibo.

Norger E, Hogeveen H, Korsgaard IR, Friggens NC, Sloth KH, Løvendahl P. 2004. Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *Journal of Dairy Science*. 87:1099–1107.

Osteras O. 2006. Mastitis epidemiology practical approaches and applications. XXIV World Buiatrics Congress. Nice, France. 14pp.

- Pérez CG, Bedolla CC, Castañeda VH. 2005. Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. *Sustentabilidad*. Vol III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. pp. 86-94.
- Philpot WN. 1998. Today's Challenge to Meet Tomorrow's Needs. Proc. Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality. Mérida, México. 12-21.
- Philpot WN. 2001. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Junio de 2001. León, Gto. México. 26 pp.
- Philpot WN, Nickerson SC. 1993. Mastitis: El contraataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Publicado por Babson Bros. Co.
- Philpot WN. 1978. Mastitis Management, Clinical Subclinical. Bobson Bros. Co., Oak Brook Illinois
- Pol M, Ruegg PL. 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. 90:262–273.
- Ponce P, Armenteros M. 2000. Producción y calidad de la leche: Temas de actualización para técnicas de la lechería. EDICENSA. La Habana. Cuba.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2000. *Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 9th ed. London, GB: WB Saunders Co.
- Reza GLC. 2000. Mastitis bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antimastíticos a base de cefapirinas. *Mastitis bovina su reconocimiento clínico*. México D. F.: 1-13.
- Roberts AJ, Wiedmann M. 2003. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cellular and Molecular Life of Science*. 60, 904-18.

- Romero AT. 2004. Situación actual de la mastitis en México. Dpto. Producción Animal, FMVZ-UNAM. México D. F. pp.122-134.
- Romero CR. 2007. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial Panamericana, Tercera edición. Pp 699-706.
- Ruegg PL. 2003. Investigation of mastitis problems on farms. Journal of Veterinary Clinical American Food and Animal Practice. 19:47–73
- Ruiz AK, Ponce P, Gomes G, Mota RA, Sampaio E, Lucena ER, Benone S. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico. Revista de Salud Animal, Vol. 33 No. 1, 57-64.
- Sampimon OC, Van den Borne BH, Santman-Berends I, Barkema HW, Lam TGJM. 2010. Effect of coagulase-negative staphylococci on somatic cell count in Dutch dairy herds. Journal of Dairy Research. 77:318–324
- Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirota S, Hiramatsu, K. 2010. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. Journal of Clinical Microbiology.48(3), 765–769. doi:10.1128/JCM.01232-09.
- Schalm OW. 1942. Streptococcus agalactiae in the udder of heifers at parturition traced to sucking among calves. Cornell University College of Veterinary Medicine. 32:39–60.
- Shen Y, Liu Y, Zhang Y, Cripe J, Conway W, Meng J, Hall G, Bhagwat AA. 2006. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods in Florida. Journal of Applied Environ Microbiology. 72, 5073-6.
- Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tinofsky L, Gonzales RN. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Journal of Veterinary Research. 34:579–596.
- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. SAGARPA. 2011. Mejora continua de la calidad higiénico-sanitaria de la leche de vaca. Gobierno de la República. ISBN: 978-607-425-560-7.

- Seegers H, Fourichon C, y Beaudeau F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Journal of Veterinary Research*. 34:475–491
- Saran A, Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Buenos Aires: Inter-Médica. 194 p.
- Sargeant JM, Leslie KE, Shirley JE, Pulkrabek BJ, Lim GH. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis: Test for identifying intramammary infection in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 84: 2018–2024
- Schalm OW, Carrol NJ, Jain NC. 1987. Bovine mastitis. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*. 18(1-2):1-10.
- Schlech WF. 2000. Foodborne listeriosis. *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals*. 31:770-5.
- Schrack FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *Journal of Dairy Science*. 84:1407-1412.
- Shome BR, Das Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R., Isloor S, Barbuddhe SB, Rahman H. 2011. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 111:1349–1356.
- Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4, 169-83.
- Skrzypek R, Wojtowski J, Fahr RD. 2004: Factors affecting somatic cell count in cow bulk tank milk a case study from Poland. *Jornal of Veterinary Medicine. Series A*; 51: 127-131.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:4089–4094.

Swinkels JM, Hogeveen H, Zadoks RN. 2005. A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*. 88: 4273-4287.

Tollersrud T, Kenny K, Reitz AJ, Lee JC. 2000. Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2998-3003.

Tristan AL, Ying M, Bes J, Etienne, F, Vandenesch, and G. Lina. 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:4465–4467.

Wagner M, Lehner A, Klein D, Buber A. 2000. Single-strand conformation polymorphisms in the *hly* gene and polymerase chain reaction analysis of a repeat region in the *iap* gene to identify and type *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 63, 332–336.

Watts JL. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Journal of Veterinary Microbiology*. 16: 41-66.

Zadoks RN, Watts JL. 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Journal of Veterinary Microbiology*. 134, 20–28.

Zschöck M, Wolter W, Kloppert B. 1996. Susceptibility of various Streptococcal Isolates from Bovine Clinical and Subclinical Mastitis against Penicillin G. Symposium on Milk Synthesis, Secretion and Removal in Ruminants Berne, Switzerland.