

**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES SED Y SEI DE *Staphylococcus aureus*
PARA EL DIAGNÓSTICO DE MASTITIS BOVINA.**

Por:

DIANA PAMELA BONILLA SESSLER

Tesis propuesta al Colegio de Profesores del Posgrado

de la

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

de la

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

CIENCIA ANIMAL

FEBRERO 2011

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RECONOCIMIENTOS.....	v
ÍNDICE.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo incondicional. A pesar de la distancia siempre estuvieron para darme palabras de aliento para seguir adelante en esta difícil pero no imposible meta.

A mis tutores, Dra Patricia Cervantes Acosta y el Doctor Hugo Castañeda Vazquez por su apoyo, dedicación, paciencia y su tiempo. Gracias por creer en mí.

A mi familia mexicana su apoyo, amistad, cariño y alegría siempre fueron un gran motor para seguir adelante. Gracias por permitirme estar con ustedes y sentirme parte de su familia.

A la Química Laurita gracias porque sin su apoyo, paciencia y guía, no hubiera podido lograr la primera parte de mi trabajo.

A la Doctora Martha, al Doctor Guadalupe, a la Doctora Isabel muchas gracias por hacer mi estancia en Guadalajara una experiencia inolvidable.

Al MVZ Mario Antonio Espinoza por su apoyo tanto en la fase de muestreo, como en ser siempre él que me daba ánimos para seguir adelante.

A mis compañeros, tanto los de la maestría así como los del grupo de CC- VIP. Sin esos momentos tan alegres, chistosos, inolvidables, esta experiencia hubiera sido mucho más difícil. Gracias a todos los que contribuyeron con la ciencia.

RECONOCIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, por ser la institución que siempre me brindo el apoyo para mi superación profesional.

Al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, por abrirme sus puertas para realizar una estancia académica en sus instalaciones.

Al Laboratorio de Microbiología de lácteos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Veracruzana a cargo de la Dra Patricia Cervantes Acosta, en el cual se pudo realizar toda la fase de análisis microbiológico de las muestras.

A la Q.C. Laura Quintero Servin, gracias porque sin su apoyo, paciencia y guía, no hubiera podido lograr la primera parte de mi trabajo.

Al Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Mastitis, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara a cargo del Dr. Hugo Castañeda Vázquez, A la Dra. Martha, al Dr. Guadalupe, a la Dra. Isabel muchas gracias por hacer mi estancia en Guadalajara, una de las experiencias más agradables de mi vida.

A la Dra. Violeta T. Pardío Sedas, el Dr. Belisario Domínguez Mancera, la Dra. Martha Isabel Torres Morán, la Mc Laura Quintero Servín por ser mi jurado y guiarme con la revisión de este trabajo y con sus observaciones mejorar mi trabajo.

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en dos etapas, la primera se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular ubicado en la Unidad de Diagnóstico "Augusto Mancisidor Ahuja" de la Posta Zootécnica Torreón del Molino y en el Laboratorio de Microbiología de Lácteos, ambos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. La segunda etapa fue realizada en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Mastitis, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Directora de tesis:

Dra. Patricia Cervantes Acosta

Co-Director:

Dr. Hugo Castañeda Vázquez

La autora de esta tesis recibió durante el periodo septiembre 2008 a julio 2010, el beneficio de la beca **224274** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT).

ÍNDICE

Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.2. Mastitis.....	3
2.3. Situación de la mastitis en México.....	4
2.3.1. Repercusiones económicas de la mastitis.....	4
2.3.2. Problemática de la producción de la leche en México.....	5
2.3.3. Normatividad de la leche en México.....	5
2.4. Factores que originan la mastitis.....	6
2.5. Microorganismos que producen la mastitis.....	7
2.5.1. Microorganismos contagiosos.....	7
2.5.2. Microorganismos ambientales.....	8
2.5.3. Microorganismos oportunistas.....	9
2.6. Métodos de diagnóstico de la mastitis.....	9
2.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.7.1. Reseña histórica y características generales (clasificación taxonómica).....	12
2.7.2. Factores de virulencia.....	13
2.7.2.1. Estructuras.....	14
2.7.2.1.1. Cápsula.....	15
2.7.2.1.2. Proteína A.....	15
2.7.2.1.3. Pared celular.....	15
2.7.2.2. Enzimas.....	16
2.7.2.3. Toxinas, intoxicación alimentaria por enterotoxinas.....	16
Hipótesis.....	21
Objetivo.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivo específicos.....	21
3. Material y métodos.....	22
3.1. Obtención y manejo de muestras.....	22
3.2. Prueba de california.....	23
3.3. Conteo de células somáticas.....	23
3.4. Obtención de colonias. <i>S. aureus</i>	24
3.4.1. Frotis directos teñidos con Gram.....	24
3.4.2. Prueba de catalasa.....	25

3.4.3. Prueba de coagulasa en tubo.....	26
3.5. Diagnóstico molecular de <i>S. aureus</i>	27
3.5.1. Extracción de ADN bacteriano a partir de colonias de <i>S. aureus</i> aislados.....	27
3.5.2. Extracción de ADN bacteriano a partir de leche mastítica bovina.....	28
3.5.3. Amplificación del ADN por PCR.....	29
3.5.4. Análisis de los productores de amplificación.....	30
3.6. Análisis estadístico.....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Conteo de células somáticas.....	31
4.2. Aislamiento microbiológico e identificación fenotípica de <i>S. aureus</i>	35
4.3. Extracción de ADN para ensayos basados en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR).....	35
4.4. Concordancia.....	38
5. Discusión.....	40
6. Conclusión.....	44
7. Bibliografía.....	45

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1	Fuente de microorganismos causantes de mastitis.....	8
CUADRO 2	Pruebas de diagnóstico de mastitis basadas en los cambios producidos por la inflamación.....	10
CUADRO 3	Etapas en la tinción de Gram.....	25
CUADRO 4	Reacción de PCR.....	29
CUADRO 5	Protocolo de amplificación para el gen 23S rADN, SED y SEI.....	29
CUADRO 6	Escala de valoración de índice kappa.....	30
CUADRO 7	Presencia de <i>S. aureus</i> en leche mastítica bovina.....	33
CUADRO 8	No. de muestras de leche con <i>S. aureus</i> obtenidos por ordeño mecánico y manual como factor de riesgo	34
CUADRO 9	Presencia de <i>S. aureus</i> en tipos de ordeño.....	34
CUADRO 10	Concordancia de pruebas.....	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	β -hemólisis de <i>S. aureus</i> en Agar sangre.....	13
FIGURA 2	Esquema de estructuras <i>S. aureus</i>	14
FIGURA 3	Diagrama de las toxinas Ses.....	17
FIGURA 4	Zona de Muestreo. Municipios aledaños a Veracruz.....	22
FIGURA 5	Prueba de California.....	23
FIGURA 6	Tinción de cocos Gram positivos <i>S.aures</i>	24
FIGURA 7	Reacción del peróxido de hidrógeno con <i>S. aureus</i>	25
FIGURA 8	Prueba de coagulasa en tubo.....	26
FIGURA 9	Conteo de células somáticas y presencia de <i>S. aureus</i> en mastitis.....	32
FIGURA 10	Electroforesis de producto de PCR del gen 23S rADN en agarosa al 1.5% (Bromuro de Etidio [0.5mg/ml]).....	36
FIGURA 11	Electroforesis de producto de PCR del gen SED en agarosa al 1.5% (Bromuro de Etidio [0.5mg/ml]).....	36
FIGURA 12	Electroforesis de producto de PCR del gen SEI, en agarosa al 1.5% (Bromuro de Etidio [0.5mg/ml]).....	37
FIGURA 13	Electroforesis de producto de PCR del gen 23S rADN, en agarosa al 1.5% (Bromuro de Etidio [0.5mg/ml]). De ADN bacteriano en leche mastítica	38

Resumen

Bonilla Sessler, Diana Pamela. M en C. Universidad Veracruzana. **Identificación de los genes *SED* y *SEI* de *Staphylococcus aureus* para el diagnóstico de mastitis bovina.** Dra. Patricia Cervantes Acosta, Dr. Hugo Castañeda Vázquez

La leche y los derivados lácteos frecuentemente se contaminan con toxinas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), patógeno relacionado tanto con mastitis como con intoxicaciones alimentarias. El objetivo de este trabajo fue identificar por PCR en ADN microbiano de leche mastítica de vaca y de aislamientos de cultivos de *S. aureus*, los genes 23S rADN (específico de *S. aureus*), SEI y SED (codificadores de enterotoxinas) y correlacionar los resultados positivos de los cultivos con los de PCR. Se realizó Prueba de California a muestras de leche de 1396 cuartos mamarios de vaca. 493 muestras resultaron con CCS >200,000/ml y cada una se cultivó para aislar *S. aureus*. Se obtuvieron 38 aislamientos positivos a *S. aureus* (7.7%). Se extrajo ADN por el método de precipitación salina y proteinasa K tanto de 38 aislamientos como de 50 muestras de leche mastítica negativa a *S. aureus* en bacteriología. Por PCR se amplificaron los genes el 23S rADN, SEI y SED. El gen 23S rADN se amplificó en el 100% de las muestras de ADN tanto de los 38 aislamientos de *S. aureus*, como de 9 de las leches mastíticas negativas en las pruebas bacteriológicas, lo que permite concluir que un 18% de los resultados por microbiología convencional fueron falsos negativos. Las pruebas de concordancia entre microbiología y PCR arrojaron un grado de acuerdo bueno ($\kappa=0.45$), que indican que PCR es más sensible que el análisis por microbiología. Del análisis de los genes SEI y SED, diecinueve (50%) de las cepas aisladas de *S. aureus*, fueron portadoras del gen SEI y ninguna presentó el gen SED. Se concluye que *S. aureus* no es el principal agente etiológico de mastitis bovina en los hatos analizados en la zona centro de Veracruz; que el gen 23S rADN es un marcador con alta sensibilidad y especificidad para identificar *S. aureus*, tanto en ADN de cultivos bacterianos como en ADN extraído de leche mastítica y que la PCR es específica y sensible tanto en aislamientos bacterianos como en leche mastítica sin cultivo previo y en menor tiempo. Por lo expuesto se considera que las técnicas moleculares para el diagnóstico preventivo de mastitis permitirían establecer estrategias para tratamiento temprano y control de esta enfermedad en los hatos lecheros.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, 23S rADN, SED, SEI, mastitis, leche.

ABSTRACT

Bonilla Sessler, Diana Pamela. MCA. University Veracruzana. **Identification of gen SED and SEI of *Staphylococcus aureus* for the diagnosis of bovine mastitis.**
Dra. Patricia Cervantes Acosta, Dr. Hugo Castañeda Vázquez.

Milk and dairy products are often contaminated with toxins from *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) pathogen related both as mastitic and food poisoning. The aim of this study was to identify microbial DNA by PCR in mastitic cow's milk as in crop isolates of *S. aureus*, the 23S rDNA genes (specific to *S. aureus*), SEI and SED (encoding enterotoxin) and to correlate the positive results of the cultures with those of PCR. Test of California was determined in 1396 samples of milk of mammary quarters of cow. In every sample count of somatic cells (CCS) and microbiology were conducted. 493 samples resulted with CCS >200,000/ml and each one was cultured to isolate *S. aureus*. 38 positive isolates for *S. aureus* (7.7%) were obtained. DNA was extracted by the method of saline and proteinase K from 38 asylum and of 50 mastitic milk samples negative to *S. aureus* by bacteriology. The genes 23S rDNA, SED and SEI were amplified. The 23S rDNA gene was amplified in 100% of the DNA samples of the 38 isolates of *S. aureus*, and from 9 of the negative mastitic milk bacteriological test, leading to the conclusion that 18% of microbiology results were false negatives. The agreement between microbiological tests and PCR showed a good degree of agreement ($\kappa=0.45$), indicating that PCR is more sensitive than microbiological analysis. The analysis of the SED and SEI genes indicated that nineteen (50%) strains isolated from *S. aureus* were carriers of the gene present at the SEI and SED gene. It can be concluded that *S. aureus* was not the main etiologic agent in bovine mastitis in the herds analyzed in the zone center of Veracruz; the 23S rDNA gene is a marker with high sensitivity and specificity for identifying *S. aureus*, both in DNA of bacterial cultures and in DNA extracted from mastitic milk, and that the PCR is specific and sensitive test in bacterial isolations and in mastitic milk as well without previous culture and in shorter time. It is considered that molecular techniques for the preventive diagnosis of mastitis would allow early treatment and control this disease in the dairy herds.

Key words: *Staphylococcus aureus*, 23S rADN, SED, SEI, mastitis, milk.

INTRODUCCIÓN

La mastitis, una enfermedad infecciosa que afecta a un tercio de las vacas lecheras en el mundo. Como consecuencia ocasiona pérdidas económicas por un bajo rendimiento en la producción de la leche y por producir cambios en las características organolépticas en la leche (Castañeda, 2010).

Aunque existen diversos grupos de microorganismos asociados con mastitis, la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es uno de los patógenos contagiosos prevalentes y responsables de las infecciones subclínicas y clínicas en la glándula mamaria de vacas lactantes. Esta bacteria puede causar un daño permanente en el tejido glandular al afectar la síntesis y la capacidad secretora de la glándula mamaria (Wolter *et al.*, 2004). La mastitis por *S. aureus* ocasiona un incremento considerable en la proporción de leucocitos y células somáticas en la leche (Casell, 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha confeccionado una lista en la que se señalan los agentes patógenos que, transmitidos por la leche, pueden originar enfermedades en el hombre. Los más importantes son *Staphylococcus aureus*, ya que producen toxinas resistentes al calor (Magariños, 2000).

Entre los factores que hace a esta bacteria tan virulenta, está la producción de enterotoxinas denominadas SEs. Varias especies tienen el potencial para producir la enterotoxina que provoca gastroenteritis; siendo *S. aureus* la bacteria atribuida a casi todos los casos de intoxicación alimentaria estafilocócica (SPF). Esta forma de daño se considera una intoxicación ya que no requiere el crecimiento del organismo en el hospedador (Doyle *et al.*, 2001).

Existen pruebas para el diagnóstico de *S. aureus*, pero se deben de realizar diversas pruebas bioquímicas para llegar a un diagnóstico preciso de este agente. En el presente trabajo se propone el uso de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), ya que es una herramienta que provee información de las características de este agente causante de mastitis, como lo menciona Katsuhiko *et al.* (2002), ya que esta prueba facilita el diagnóstico rápido y sensible de infecciones intramamarias y la prevención de intoxicación por consumo de leche con enterotoxinas.

Debido a la escasa información en la región central de Veracruz de los microorganismos, que producen toxinas y son responsables de mastitis bovina, se requiere su identificación para un diagnóstico rápido y específico de los agentes patógenos.

La caracterización genotípica de *S. aureus*, provee información de sus características patogénicas y de los genes que regulan la producción de toxinas causantes de mastitis e intoxicaciones alimentarias.

2. ANTECEDENTES

2.2. Mastitis

La mastitis es una reacción inflamatoria en los tejidos secretores o conductores de la leche en la glándula mamaria, como respuesta a una lesión traumática o infección bacteriana. El término deriva del griego "mastos", ubre e "itis", inflamación (Jäger, 2006). El propósito del proceso inflamatorio es eliminar o neutralizar a los microorganismos invasores y asistir en la reparación de tejidos dañados y de esta forma restablecer la función normal de la glándula (Saran y Chaffer, 2000).

La presentación de la mastitis y la sintomatología depende del grado de reacción de los tejidos de la glándula mamaria a la infección o lesión traumática y a la condición general de salud del animal afectado. Esta enfermedad se presenta en dos formas: la forma *clínica* de la enfermedad que se reconoce fácilmente a través de las anomalías que se presentan en la ubre y/o en la leche; sin embargo, la forma *subclínica* no se puede detectar a través de observaciones visuales de la vaca ni de la leche, por lo que es necesario identificarla mediante pruebas para detectar los microorganismos infecciosos, o bien, métodos indirectos para detectar los procesos de la inflamación que resultan de la infección de la glándula, como es la detección de la células somáticas que aparecen en la leche de vacas infectadas (Amiot, 1991; Wolter *et al.*, 2004; Barkema *et al.*, 2006; Gerlach *et al.*, 2009).

Esta enfermedad es considerada como una enfermedad compleja y producto de la interacción de varios factores: el sistema inmunitario de la vaca, el medio ambiente en que se encuentren los animales y la patogenicidad-virulencia del agente causal que esté interviniendo en la infección de la glándula (Castañeda, 2010).

Es la principal enfermedad de la ganadería lechera a nivel mundial debido a sus efectos adversos sobre la producción y calidad de la leche, costos de tratamientos, alteraciones en los procesos industriales de la materia prima y daños a la salud del consumidor (Saltijeral *et al.*, 2010).

La información estadística de varios países señala que la mastitis no ha disminuido en los últimos 40 años y que el 50% del ganado lechero se encuentra afectado por esta enfermedad, como promedio, en dos de sus cuartos. Estas cifras impresionantes pueden deberse a muchos factores como son las exigencias a que son sometidas las

vacas lecheras para producir mayores volúmenes de leche en lactancias más largas y al mayor empleo del ordeño mecánico, en los casos en que su uso no es el correcto (Magariño, 2000).

2.3. Situación en México

La leche de bovino se produce en todo el país. Se identifican tres grandes sistemas de producción, el intensivo ubicado en las grandes cuencas lecheras del altiplano y en el norte, el de la lechería familiar en los estados del centro, regiones montañosas y el de doble propósito localizado principalmente, en las costas del Golfo y el Pacífico (Vera *et al.*, 2009).

2.3.1. Repercusiones económicas de la mastitis

Por lo menos un 70% de las pérdidas económicas relacionadas con la mastitis se expresan en mermas en la producción de leche y eliminación de la leche procedente de animales enfermos (Balderas *et al.*, 2006; Barkema *et al.*, 2009). Otros elementos de costo comprende, la eliminación de leche que contenga residuos de antibióticos empleados en el tratamiento de los animales enfermos, pérdida de valor genético por eliminación temprana de vacas y, por ende encarecimiento del reemplazo, honorarios veterinarios, gastos de medicamentos entre otros (Castro *et al.*, 2006).

La severidad de la lesión glandular está directamente relacionada con la disminución productiva y con el recuento de células somáticas en la leche. La depresión en la producción láctea fluctúa en relación al grado de severidad de la infección entre 15.2% y 83.3% (Castro *et al.*, 2006; Rodríguez, 2006).

La leche también sufre importantes alteraciones en su composición en presencia de esta enfermedad. No sólo se afecta la leche, sino que los productos derivado de ella también suelen estar afectados debido a los cambios físicos-químicos de la leche, lo que se expresa en una menor estabilidad y valor nutricional de la leche, mayor facilidad para enranciarse, dificultad para la elaboración de productos fermentados, merma en los rendimientos, palatabilidad y, por ende, en los costos de elaboración de queso (Saran y Chaffer, 2000; Castro, 2003).

El Consejo Nacional de la Mastitis estima una pérdida promedio de \$225 dólares anuales por vaca en un hato con problemas de mastitis (López *et al.*, 2006).

En la zona Centro de Yucatán, Pech *et al.* (2007) realizaron un estudio para determinar las pérdidas económicas que provoca la mastitis en esa zona, demostrando una merma de \$129,600 Mx por concepto de la disminución en la producción, \$11 250 por concepto de desecho de animales, biológicos \$750 y \$313 por concepto de mano de obra extra; las pérdidas causadas por la mastitis repercuten en la economía de los productores. Otro estudio realizado en Sonora, México, pudieron concluir que el costo total de la mastitis representa una tercera parte de la producción anual obtenida un el establo (Gerlach *et al.*, 2009).

2.3.2. Problemática de la producción de leche en México

México es deficitario en la producción de leche y sus derivados por lo que se tiene que importar alrededor del 20% del consumo nacional aparente. Respecto a la producción de leche en México, ésta se lleva a cabo en diferentes regiones ecológicas y sistemas de producción (Martínez, 2010). El sistema de doble propósito se localiza principalmente en las áreas tropicales. Entre sus características destacan los tamaños pequeños o medianos de las explotaciones, el pastoreo principalmente de praderas de Gramíneas tropicales introducidas con ganado de cruza de Cebú con Holstein o Pardo Suizo, para la producción de leche y becerros. Se tiene un uso limitado o nulo de suplementos, se práctica la monta directa y muy poco la inseminación artificial. La producción de leche es alrededor de 700 kg/vaca/año (Román *et al.*, 2009; Vera *et al.*, 2009).

2.3.3. Normativa de la leche en México

En México ha sido lento el desarrollo de las normas y reglamentos, el primer reglamento que hace referencia a derivados de la leche se publicó el 9 de julio de 1948. En los siguientes nueve años se publicaron dos reglamentos, uno para sustitutos de leche natural y otro para productos derivados de la leche y sustitutos de ella. En septiembre de 1976 se publicó un reglamento para el control sanitario de la leche.

Anteriormente, hasta los años sesenta existían políticas y una legislación deficientes de la comercialización y el control de calidad de la leche y productos lácteos. Con la entrada de México al Acuerdo General de Aranceles y Comercio (GATT) y posteriormente al Tratado de Libre Comercio con Norteamérica (TLC), se inició una

apertura a productos lácteos y agropecuarios de Estados Unidos y Canadá. Por consiguiente, se cambió la normativa de la leche. A partir de 1994 mejoró en forma considerable, pero se considera que el proceso de desarrollo de métodos de pruebas es poco dinámico. Sin embargo, ya se manifiesta un interés por parte de la sociedad respecto de la calidad de la leche y de exigir que los productos cumplan cuando menos con los requisitos mínimos de calidad (González *et al.*, 2005).

2.4. Factores que originan la mastitis

La mastitis es una enfermedad multifactorial en la que se interrelacionan varios factores, se mencionan: los mecanismos de defensa de la vaca, el medio ambiente en que está el animal y la patogenicidad y virulencia del agente causal (Castro *et al.*, 2006).

Entre los mecanismos de defensa de la vaca está el factor de alimentación, puesto que están estrechamente correlacionadas la alimentación y la salud. Una mala nutrición, deficiente en energía y proteína, debilita los mecanismos de defensa de la ubre, lo que causa que una gran cantidad de agentes patógenos que habitan en el ambiente infecten la glándula mamaria (Lam *et al.*, 2008).

El manejo de la vaca tiene una influencia decisiva en el bienestar del animal y con ello en sus mecanismos corporales de defensa. El manejo higiénico es importante para determinar la presencia de agentes patógenos (Pol y Ruegg, 2007).

Para la salud de la ubre de la vaca es indispensable tener en cuenta varios factores, tales como que, para evitar lesiones en las ubres no debe haber un sobrecupo en los corrales o en el establo, las vacas deben poder echarse y levantarse libremente, sin obstáculos; tener un buen clima en el establo para evitar un alto índice de humedad, camas o echaderos secos, especialmente en el área de la ubre, limpieza diaria de los cajones o cajas de cama, también se debe de dar un alimento, del agrado de las vacas, después de la ordeña para que permanezca parada un mínimo de 1 a 2 horas, hasta que el canal lácteo haya cerrado de nuevo (Wolter *et al.*, 2004).

La mastitis es ocasionada por microorganismos que penetran la ubre a través del canal de los pezones. La penetración puede ocurrir por multiplicación, movimiento mecánico, propulsión durante el ordeño o por una combinación de los diferentes

factores; estos microorganismos deben superar las defensas locales inmunes humoral y celular (Philpot *et al.*, 2001; Zecconi *et al.*, 2006).

Varios patógenos causantes de mastitis contagiosa son endémicos en la mayoría de los países con una industria láctea, pero no necesariamente dentro de cada establo. Los más notables son *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma spp* (Barkema *et al.*, 2009). La introducción de patógenos en una ganadería puede evitarse mediante medidas de bioseguridad. Recientemente surgieron cepas de patógenos causantes de mastitis y capaces de causar rebrotes de mastitis, incluso cuando la transmisión de otras cepas de la especie bacteriana se controlan adecuadamente con las medidas de gestión existentes (Smith *et al.*, 1998; Zadoks *et al.*, 2003).

2.5. Microorganismos que producen la mastitis

Los agentes causantes de mastitis bovina son microorganismos que habitan en la ubre de la vaca y sus alrededores (Saran y Chaffer, 2000). Se han aislado al menos 137 microorganismos diferentes de la glándula mamaria de bovinos afectados de mastitis, los cuales se clasifican en contagiosos, ambientales u oportunistas de acuerdo con su epidemiología (Castañeda, 2010). En la literatura internacional se les conoce y define como patógenos mayores y menores, respectivamente (major and minor pathogens) (Wolter *et al.*, 2004).

2.5.1. Microorganismos contagiosos.

La fuente de los microorganismos contagiosos es la ubre de la vaca afectada, diseminándose a partir de ésta hacia otras vacas. El lugar donde se produce el contagio es la sala de ordeño (Saran y Chaffer, 2000). El cuarto infectado de la ubre es el principal reservorio de los agentes contagiosos de mastitis. Sólo dentro del cuarto infectado esos agentes patógenos pueden reproducirse y sobrevivir largo tiempo (Wolter *et al.*, 2004). Este grupo incluye bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma sp* y *Corynebacterium bovis*. Una característica común a los microorganismos contagiosos es la de colonizar y crecer en la piel de la ubre y dentro del canal del pezón (Saran y Chaffer, 2000). Las infecciones por estos microorganismos generalmente son más fuertes y presentan elevado conteos de células somáticas (CCS) y pueden ser transmitidos en la ordeña mediante los plásticos de las pezoneras, las manos del

ordeñador y también cuando se utiliza la misma toalla para limpiar un cuarto y otro o una vaca y otra (Wolter *et al.*, 2004).

2.5.2. Microorganismos ambientales

Los microorganismos ambientales, por otra parte, viven en los alrededores de las vacas y acceden a la ubre en los intervalos entre los ordeños. Pertenecen a este grupo bacterias tales como *Streptococcus no agalactiae* y Gram negativas, sobre todo coliformes. La infección por estos microorganismos es de corta duración si se compara con aquella causada por los contagiosos, provocando principalmente mastitis de tipo clínico. La fuente de estos microorganismos (Cuadro 1) es el entorno, por ejemplo, cama, estiércol, agua estancada, restos de comida y también las agujas y cánulas contaminadas de uso intramamario (Saran y Chaffer, 2000). Las infecciones por estos microorganismos suelen causar leves reacciones del tejido glandular (Wolter *et al.*, 2004).

CUADRO 1. Fuente de microorganismos causantes de mastitis.

Fuente	Microorganismos
Máquina de ordeña	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>
Ubre infectada	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>
Cama y piso	<i>Streptococcus uberis</i> Enterobacterias <i>Bacillus cereus</i>
Piel de pezones y ubre	<i>Staphylococci</i> coagulasa negativos <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
Moscas	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
Leche para becerros	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Agua contaminada	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Prototheca</i> sp
Alimentos contaminados	<i>Prototheca</i> sp

Fuente: Saran y Chaffe (2000)

2.5.3. Microorganismos oportunistas.

Los microorganismos oportunistas se encuentran en la piel de la ubre y pezones. Pertenecen a este grupo los *Staphylococci coagulasa negativos*, que adquirieron importancia a raíz del descenso en la prevalencia de microorganismos tales como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, es decir, son el resultado del buen trabajo realizado en cuanto a control de microorganismos contagiosos se refiere (Saran y Chaffer, 2000).

2.6. Métodos de diagnóstico de la mastitis

Los métodos de detección de mastitis son una herramienta que permite identificar el tipo de infección clínica o subclínica que puede presentarse dentro de un hato lechero, por lo que el método que se elija para determinar las pruebas será esencial para tener un diagnóstico más preciso (Bedolla *et al.*, 2007). Los diferentes métodos consisten en pruebas físicas, químicas y microbiológicas aplicadas a cada glándula o a la leche. El diagnóstico observacional se basa en las diferentes señales clínicas, como son inflamación, dolor al tacto, fiebre depresión y reducción de la producción láctea (Castro *et al.*, 2006).

Existen diferentes métodos para el diagnóstico de la mastitis basadas en los cambios producidos por la inflamación (Cuadro 2). Dentro de los métodos que se usan con mayor frecuencia a nivel de campo para diagnosticar mastitis clínicas, se encuentran el método de observación y palpación de la ubre y las pruebas físicas, como la prueba de escudilla de ordeño, prueba del paño negro y taza probadora. Las pruebas químicas, como la prueba de conductividad eléctrica de la leche, papel indicador de mastitis y prueba de whiteside (precipitación con NaOH 4%), que sirven también para diagnosticar mastitis clínicas y subclínicas. Las pruebas biológicas, como son la prueba de California para mastitis (CMT, por sus siglas en inglés), la prueba de Wisconsin, el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, pruebas bioquímicas e identificación y el conteo de células somáticas por microscopía directa o contadores automáticos (Wolter *et al.*, 2004).

CUADRO 2. Pruebas de diagnóstico de mastitis basadas en los cambios producidos por la inflamación

Detección	Pruebas
Aumento en el recuento celular somático	Microscopio óptico Fossomatic Coulter Counter California Mastitis Test
Presencia de proteínas plasmáticas	Detección de albúminas séricas
Cambios en la composición iónica de la leche	Medición de la conductividad eléctrica de la leche
Presencia de componentes intracelulares en la leche debido a daño celular	Medición de actividad de enzimas: NAGasa
Disminución de la capacidad de síntesis del epitelio mamario	Lactosa Caseína

Fuente: Wolter *et al.* (2004)

La prueba de California (CMT) fue desarrollada en la década de los '50 por Noorlander y Schalm en California; este método de detección de mastitis aún tiene vigencia y puede ser de gran utilidad en la realización de un plan de control de la mastitis (Saran y Chaffer, 2000).

El conteo de células somáticas (CCS) es un indicador del estatus de salud en cada glándula de la ubre (Heeschen, 2005). Las células somáticas están compuestas principalmente por leucocitos; cuando existe algún proceso inflamatorio en la ubre, aproximadamente el 99 % de todas las células presentes en la leche del cuarto infectado son leucocitos, mientras que el 1 % restante son células secretadas en la leche, provenientes del tejido mamario (Philpot *et al.*, 2001).

El conteo directo o indirecto de las células somáticas es la herramienta más común que se utiliza para el diagnóstico temprano de la mastitis subclínica. La prueba de California estima el recuento de células somáticas de la leche y se realiza al pie de la vaca (Ruegg, 2008).

El diagnóstico con contadores automáticos, permite hacer pruebas de conteo rápido de células somáticas (CCS) que se pueden realizar también al pie de la vaca y se han desarrollado para la detección de la mastitis subclínica, tales como el contador

electrónico el infrarrojo DCC de DeLaval[®], o el método de reflectancia del equipo Portacheck[®]. Estos equipos guardan alta correlación con los resultados convencionales de laboratorio (Barratt *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2004).

De los contadores automáticos electrónicos, los más utilizados actualmente por su rapidez y efectividad son el Fossomatic y el Counter Coulter, porque tienen una aplicación universal sobre todo en laboratorios de control lechero o los dedicados al diagnóstico e investigación de la mastitis (Ovidio *et al.*, 2006).

2.7. *Staphylococcus aureus*

2.7.1. Reseña histórica y características generales (Clasificación taxonómica)

El término *Staphylococcus* viene del griego staphyle=racimo y kokkos=granos, denominación inicialmente otorgada por Ogston hacia 1880 aunque tanto Koch como Pasteur lo había también observado. Ya en 1884 se relacionó su presencia con infecciones en heridas y osteomielitis, y desde entonces hasta nuestros días, se considera de suma importancia en el mundo de la microbiología sanitaria debido a su potencial para provocar un amplio espectro de cuadros infecciosos y toxigénicos (Fueyo, 2005).

Los estafilococos son bacterias esféricas Gram positivas, generalmente dispuestas en racimos irregulares parecidos a racimos de uvas, sus células tienen un diámetro que varían, aproximadamente desde 0.5 hasta 1.5µm. Son organismos organótrofos catalasa-positivo con un contenido de G + C en la composición del ADN de 30 a 40mol%. Los estafilococos poseen una pared celular gram-positiva típica que contiene peptidoglucano y ácidos teicoicos (Doyle *et al.*, 2001); crecen con rapidéz sobre muchos tipos de medios y son metabólicamente activos, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el color amarillo intenso (Ingraham e Ingraham, 1998). El *S. aureus* tiene todas las características típicas del género: anaerobios facultativos, mesófilos, requiere aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, es capaz de fermentar la glucosa (y también el manitol) con producción de ácido y tolera condiciones ambientales muy variables. Así, pues crece a cualquier temperatura entre 6 y 46°C, con el óptimo en 30-37°C (Figura 1). En cuanto al pH, se desarrolla entre valores de 4.0 y 9.8 con el óptimo en torno a la neutralidad. Es igualmente tolerante con respecto a la sal, resistiendo concentraciones hasta un 20% de NaCl (Murray *et al.*, 1997).

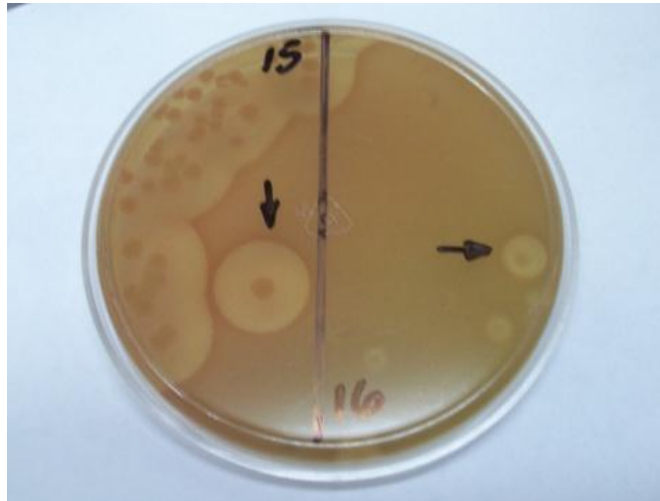


FIGURA 1. β -hemólisis de *S. aureus* en Agar sangre.

S. aureus es el agente de mayor importancia clínica y epidemiológica en la colonización y el desarrollo de infección bacteriana de la glándula mamaria en los hatos lecheros a causa de la cronicidad de la infección y la persistencia de la inflamación determinadas por los mecanismos de resistencia celular de la vaca y la virulencia del agente (Pol y Ruegg, 2007).

2.7.2. Factores de virulencia

Las enfermedades causadas por *S. aureus* se dividen en las infecciones y las enfermedades causadas por las toxinas que ésta produce (Novick *et al.*, 2001). Las infecciones pueden ser localizadas como espinillas, forúnculos, o generalizadas como en los procesos de infecciones post-quirúrgica como osteomielitis, neumonías, endocarditis o hasta meningitis, o como bacteriemia y septicemia de difusión. Por otro lado, las enfermedades pueden ser causadas por toxinas y provocar una intoxicación alimentaria, el síndrome de shock tóxico y el síndrome de piel escaldada (Jäger, 2006).

S. aureus posee varias propiedades que incrementan su capacidad de producir enfermedad. Sin embargo, estos factores de virulencia no se encuentran en todas las cepas de *S. aureus* y este microorganismo sigue siendo fuente de sorpresas constantes a medida que se descubren propiedades patogénicas nuevas y diferentes (Konema *et al.*, 1999).

Los factores de virulencia de esta bacteria se pueden clasificar en tres grupos:

1. Sus estructuras
2. Las enzimas que produce
3. Las toxinas que origina para su defensa natural.

2.7.2.1. Estructuras

En la figura 2 se presentan las estructuras características de *S. aureus*.

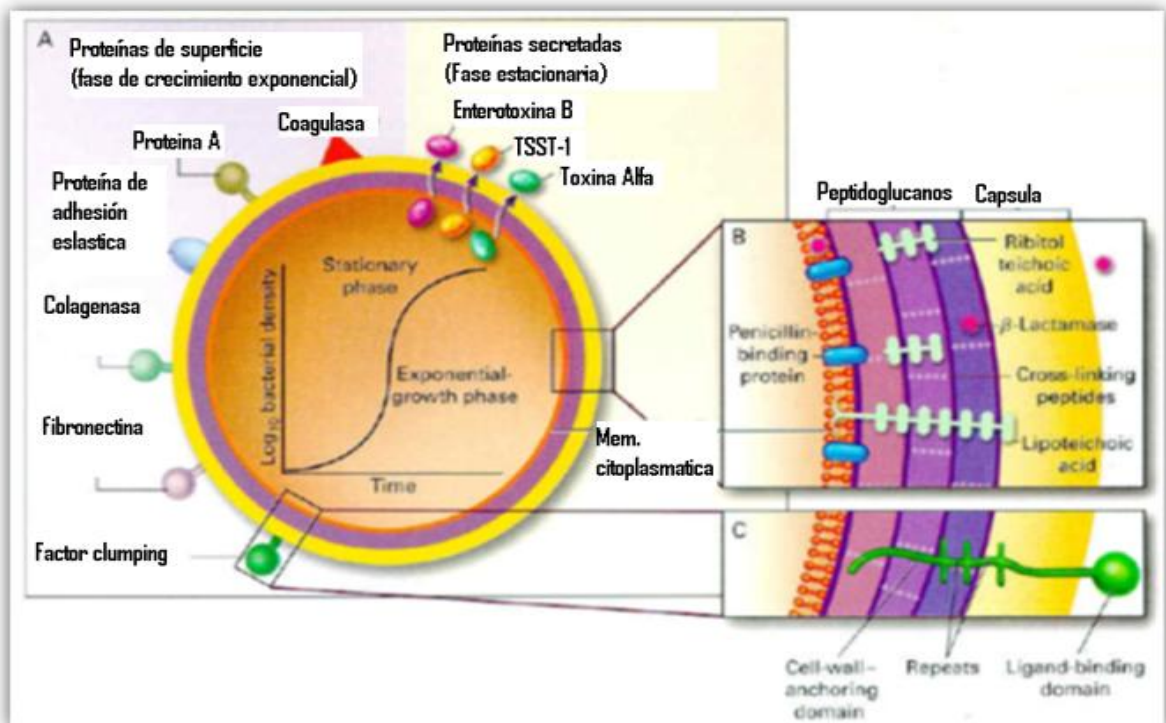


FIGURA 2. Esquema de Estructuras *S. aureus* (Fueyo, 2005).

2.7.2.1.1. Cápsula

Algunas cepas de *S. aureus* producen un exopolisacárido que puede evitar la fagocitosis del microorganismo por parte de los leucocitos polimorfonucleares. Este material puede facilitar la adherencia de los microorganismos a las células del huésped (Koneman *et al.*, 1999).

2.7.2.1.2. Proteína A

La pared celular de *S. aureus* contiene una peculiar proteína que tiene la capacidad de unirse a la región Fc de la molécula de inmunoglobulina G (IgG) (Koneman *et al.*, 1999). La proteína A está embebida en la capa externa del peptidoglicano, en distintas cepas se presenta en cantidades variables (Fueyo, 2005).

2.7.2.1.3. Pared celular

Esta bacteria cuenta con diferentes componentes en la pared celular. El principal componente que confiere la forma y estabilidad al microorganismo y representa el 50% de la pared es el peptidoglicano. Este es un polímero polisacárido compuesto por subunidades alternante de N-acetilmurámico (con una cadena de cuatro aminoácidos: L-alanina-D-glutámico-L-lisina-D-alanina) y N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces β -(1-4). Las cadenas peptídicas laterales unidas al residuo de ácido murámico están ligadas en forma cruzada por un puente de pentaglicina adherido a la L-lisina de una cadena y a la D-alanina de la otra cadena. Entre sus propiedades biológicas destacan su capacidad para inducir la producción de interleucina-1 (IL-1) por monocitos y una reacción local capaz de atraer a leucocitos polimorfonucleares (PMN), activar el complemento y estimular la producción de anticuerpos opsonicos (Fueyo, 2005).

Otros componentes incluyen los ácidos teicoicos que contribuyen con alrededor del 40% al peso de la pared celular. Son polisacáridos complejos que contienen fosfatos unidos a la capa de peptidoglicano y la membrana citoplásmica. Estos polisacáridos son específicos de especie, por ejemplo para el caso de *S. aureus* se encuentra N-acetilglucosamina (polisacárido A). La adherencia de los estafilococos a las superficies

está mediada por los ácidos teicoicos de la pared celular, a través de su unión específica con la fibronectina. Aunque los ácidos teicoicos son malos inmunógenos, estimulan una respuesta de anticuerpos específicos cuando se unen al peptidoglicano (Murray *et al.*, 1997).

2.7.2.2. Enzimas

S. aureus produce varias enzimas que pueden contribuir a su virulencia. La producción de catalasa por parte de estos microorganismos puede actuar para inactivar el peróxido de hidrógeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema mieloperoxidasa dentro de las células fagocíticas después de la ingestión de estos microorganismos. Tanto la coagulasa libre como la unida (también denominada factor de agregación) pueden recubrir las células bacteriana con fibrina y tornarlas resistentes a la opsonización y la fagocitosis. Las fibrinolisinias pueden degradar coágulos de fibrina y permitir la diseminación de la infección a los tejidos contiguos. En forma similar, la hialuronidasa hidroliza la matriz intercelular de mucopolisacáridos en los tejidos y, por lo tanto, puede actuar diseminando los microorganismos a zonas adyacentes (Koneman *et al.*, 1999).

2.7.2.3. Toxinas, intoxicación y las enterotoxinas

Aunque el mecanismo de patogenicidad de *S. aureus* aún no conocen con exactitud, se sabe que sus exotoxinas son superantígenos como las enterotoxinas (SE) (Figura 3) y la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1). Son considerados como superantígenos que estimulan una respuesta no específica policlonal de linfocitos T y aumentando la liberación de citoquinas, que causan toxicidad sistémica y la supresión de la respuesta inmune adaptativa (Da Silva, 2008)

Los agentes etiológicos de las intoxicación alimentaria estafilocócica (SPF), son representates del género *Staphylococcus*, en su mayor parte *Staphylococcus aureus*. Esta forma de intoxicación alimentaria se considera una intoxicación ya que no requiere el crecimiento del organismo en el hospedador. La intoxicación alimentaria estafilocócica se clasifica como una de las causas más frecuentes de gastroenteritis en todo el mundo. Resulta de la ingestión de una o mas enterotoxinas estafilocócicas (SEs) preformadas en los alimentos que contiene estafilococos (Doyle *et al.*, 2001).

Las toxinas de origen microbiano se pueden dividir en dos grupos: las endotoxinas y las exotoxinas. De principal importancia son las exotoxinas producidas fundamentalmente por bacterias Gram positivas, aunque algunas Gram negativas también son capaces de elaborarlas. Las exotoxinas son, en general, de naturaleza proteica y termolábil. La actividad de estas toxinas no es destruida totalmente por el calentamiento ni siquiera durante 30 minutos a 100°C (Koneman *et al.*, 1999; Books *et al.*, 2005).

En muchos países, los SEs constituyen los segundos o terceros agentes causales más comunes que provocan intoxicación alimentaria (Akineden *et al.*, 2001). La intoxicación de los alimentos con la presencia de *S. aureus* en los diferentes tipos de alimentos, tales como pescados y mariscos, productos lácteos, carne y productos cárnicos se han reportado principalmente en las Américas, Europa y Asia Oriental (Dinges *et al.*, 2000).

La higiene en la obtención de la materia prima (leche), en los procesamientos de estos alimentos y el personal responsable de ese proceso, deben ser de la mejor calidad para obtener alimentos inocuos y aptos para el consumo humano. (FAO, 2006).

S. aureus se considera en el mundo como la tercera causante más importante de enfermedades transmitidas por los alimentos (Morandi *et al.*, 2007; Normanno *et al.*,

2007). Un estudio realizado en el Laboratorio Nacional de Salud Pública de México, entre 1980 y 1989, confirmaron que el 45% de los brotes de intoxicación alimentaria fueron provocados por enterotoxinas producidas por *S. aureus* (Mota y Fernández, 2007).

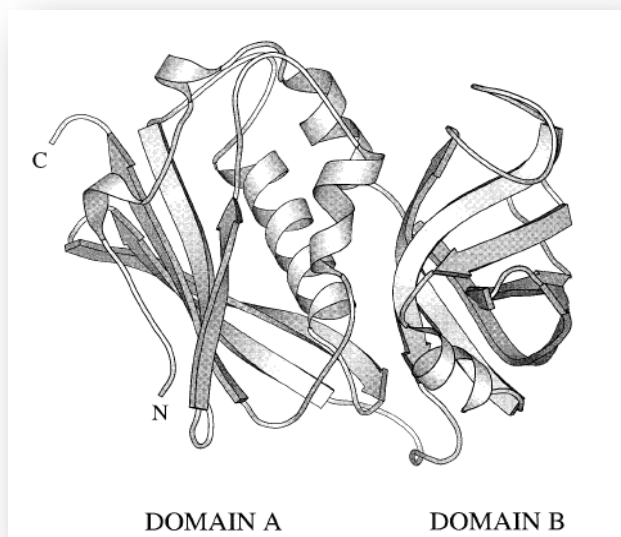


FIGURA 3. Diagrama de de las toxinas Ses (Dinges *et al.*, 2000)

Una causa importante de intoxicación por alimentos es que la producción de enterotoxinas cuando se desarrolla *S. aureus* en alimentos que contiene carbohidratos y proteínas. De las diversas enterotoxinas, el 95% de las toxinas estafilocócicas son sintetizadas por los genes SEs. En 1962, se reunió una comisión para crear la actual nomenclatura alfabética. En conformidad con esta nomenclatura, a las SEs les fueron asignadas de modo consecuencial una letra del alfabeto en el orden de su descubrimiento. Antes de 1971, la SEa era la toxina predominantes identificada en casos de SPF seguida en frecuencia la SED y la SEc (Doyle *et al.*, 2001). Existen otro tipo de toxinas como la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1). Estas enterotoxinas son superantígenos, son termoestables y resistentes a la acción de las enzimas del intestino (Omoe *et al.*, 2002). La cantidad de enterotoxina para causar una intoxicación alimentaria es mínima ($0.2 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Fueyo, 2005). La ingestión de estas toxinas provoca vómito y diarrea. El efecto emético de la enterotoxina tal vez se deba a la estimulación del sistema nervioso central (centro del vómito) luego de que la toxina actúa sobre los receptores nerviosos en el intestino (Books *et al.*, 2005).

Las gastroenteritis provocadas por Staphylococcus se dan por la ingestión de alimentos que contengan una o más enterotoxinas. Se estima que $1000 \mu\text{g}$ (1 mg) son suficientes para producir la enfermedad en individuos susceptibles. Para que ocurra la producción mínima de enterotoxinas estafilocócicas en los alimentos es necesario que haya condiciones adecuadas de temperatura, pH y la presencia o ausencia de oxígeno, la sal, el azúcar, la acidez y la microflora son otros factores importantes para el crecimiento de bacterias en el tracto gastrointestinal (Jay *et al.*, 2005).

El diagnóstico de envenenamiento alimenticio por estafilococo es generalmente confirmada por al menos uno de los siguientes factores: la recuperación de más de 10^5 *S. aureus* / g de alimentos, la detección de la SE en los alimentos o el aislamiento de *S. aureus* fagotipo en los mismos pacientes y los alimentos. El diagnóstico definitivo se basa principalmente en la demostración de la SE en los alimentos (Fueyo, 2005).

La aparición de los síntomas, sin embargo, depende del grado de susceptibilidad y peso individual, la concentración de enterotoxina en el alimento y la cantidad de alimentos consumidos, siendo más severa en niños, ancianos y personas que sufren

de inmunosupresión crónica (Jay *et al.*, 2005). La intoxicación alimentaria estafilocócica rara vez es registrada y, por lo tanto, hay limitada información sobre su incidencia y prevalencia. La notificación no se considera obligatoria en México y otros países sin saber la incidencia real debido a la sintomatología general, leves y de corta duración, ya que sólo las grandes brotes llaman la atención de las autoridades sanitarias (Mota y Fernández, 2007).

Al estudiar la genética y la evolución de las SEs, también se deben tener en cuenta otras toxinas estafilocócicas, más algunas toxinas producidas por otros organismos, especialmente por los estreptococos del grupo A. Las SEs forman parte de una gran familia de toxinas emparentadas producidas por *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Esta familia de toxinas ha sido denominada la familia de las toxinas pirógenas (PT); los representantes de esta familia son agrupados juntos en base a sus propiedades biológicas y bioquímicas que comparten. La única característica común a todas las PTs, que incluyen las SEs, es su capacidad sin igual para comportarse como superantígenos (Doyle *et al.*, 2001).

Los superantígenos son moléculas que, por su capacidad de unirse a determinadas regiones variables del receptor antigénico de linfocitos T (TCR), pueden hacer que se dividan linfocitos T específicos. El mecanismo por el cual sucede esto lo diferencia de los mitógenos (cualquier sustancia que estimula la división celular y de los antígenos convencionales (Tizard, 2000). Con respecto a la estimulación de células T, los superantígenos son moléculas bifuncionales que al principio interaccionan con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II en las células presentadoras de antígenos. A diferencia de lo que sucede en los antígenos convencionales, esta interacción no requiere preparación y se produce fuera del surco fijador del péptido del MHC. Una vez formado el complejo de MHC-superantígeno interacciona con el receptor de la célula T (TCR). La interacción con el TCR también es no convencional y relativamente inespecífica; se produce en un lugar variable en la cadena β del TCR. Sin importar como los superantígenos se fijen fuera de la zona en el TCR usado para el reconocimiento del antígeno, activan un porcentaje de células T mucho mayor que el que puede activarse por los antígenos convencionales (Doyle *et al.*, 2001).

Los PTs estafilocócicas y estreptocócicas son superantígenos microbianos prototipos que ejercen una diversidad de efectos inmunomodulares que conducen al shock, a la

inmunosupresión y a otras anomalías sistémicas asociadas con el TSS. Si bien las SEs están incluidas en las PTs, están dotadas de la diferencia sin igual de poseer una capacidad complementaria para inducir una respuesta emética por ingestión oral y por tanto son únicamente responsables de las SPF (Dinges *et al.*, 2000, Doyle *et al.*, 2001).

HIPÓTESIS

Los marcadores moleculares permiten el diagnóstico de mastitis bovina causada por *S. aureus* con mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas microbiológicas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar con marcadores moleculares los genes 23S rADN, *SED* y *SEI* de *S. aureus* en ADN de leche mastítica bovina y en aislamientos de *S. aureus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar al agente *S. aureus* en cultivos de leche con mastitis bovina.
- Obtener ADN de la bacteria *S. aureus* en leche mastítica bovina.
- Identificar por PCR el gen 23S rADN en ADN bacteriano de *S. aureus* en leche mastítica para corroborar los resultados negativos en microbiología.
- Amplificar los genes *SED* y *SEI* para identificar *S. aureus* enterotoxigénico tipo D e I.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención y manejo de muestras

Las muestras de leche para el desarrollo de este trabajo se llevaron a cabo en 9 ranchos en los municipios aledaños a Veracruz señalados en la figura 4. 4 ranchos tenían un manejo de ordeña mecánica y los 5 restantes usaban ordeño manual. El periodo de muestreo fue entre Mayo-Septiembre y 2009.

En campo se realizó la prueba de California y las muestras que resultaban con trazas o más se tomaron como positivas. Se tomó la muestra asépticamente según la NOM-109-SSA1-1994, se colectaron 1396 muestras de leche mastítica bovina. La leche se transportó y conservó en refrigeración hasta su análisis microbiológico.

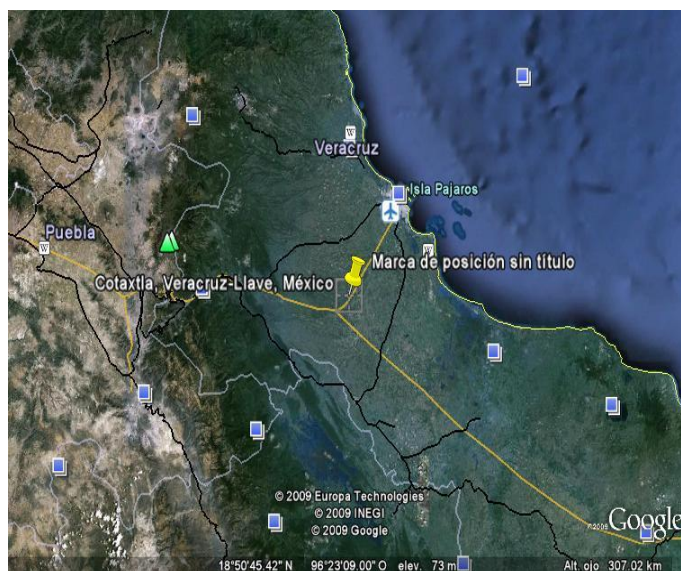


FIGURA 4. Zona de Muestreo. Municipios aledaños a Veracruz.

3.2. Prueba de California



FIGURA 5. Prueba de California.

El manejo de cada una de las vacas previo a la toma de muestras incluyó la limpieza y desinfección de la glándula mamaria. Después del después se tomó muestra de cada cuarto para prueba de CMT (Wolter *et al.*, 2004). La prueba consiste en la adición de un detergente a la leche, el aquil-aril sulfonato de sodio, causando la liberación de ADN de las células presentes y que convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en un gel. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por

lo tanto, mayor será la formación del gel, traduciéndose en una lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Además la prueba posee un indicador (púrpura de bromo-cresol) que muestra los cambios de pH ocurridos en la leche a causa de la inflamación (Saran y Chaffer, 2000). El criterio para clasificar a los positivos fue a partir de trazas. Cada cuarto con valor mayor a trazas, se consideró positivo y se continuó con la toma aséptica de cada muestra, de acuerdo con los procedimientos de la norma NOM-109-SSA1-1994, que se refiere a los procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

2.3. Conteo de células somáticas

Se realizó el Conteo de células somáticas en 1396 muestras mediante el contador electrónico automático infrarrojo DCC de DeLaval®, el cual permite hacer pruebas de conteo rápido de células somáticas (CCS), por citometría de escaneo laser (480 nm), con ADN celular marcado con el fluorocromo Yoduro de propidio. Las muestras con más de 200,000 células somáticas (n=493) se consideraron como positivas y se prosiguió a realizarles las pruebas microbiológicas para la detección y aislamiento de *S. aureus* como lo dicta la NOM-155-SSA1-1994, la cual determina los métodos para el diagnóstico determinación de *S. aureus* en alimentos.

3.4. Obtención de colonias *Staphylococcus aureus*

Las alícuotas de 0.2 ml de leche se sembraron en agar sangre y se incubaron a 37°C por 48 horas. A las 24 horas se realizó la primera lectura y a las 48 horas se cumplió el tiempo de crecimiento de esta bacteria para poder hacer su reconocimiento por morfología en agar. Las colonias identificadas como sospechosas a *Staphylococcus* spp. se analizaron por pruebas bioquímicas para determinar la especie *Staphylococcus aureus*.

3.4.1. Frotis directos teñidos con Gram

Las tinciones en las células bacterianas únicamente tienen como fin diferenciar y hacer más visibles algunas estructuras celulares de las bacterias involucradas. Esto sucede porque los colorantes se combinan químicamente con la pared celular bacteriana y permite observar las características estructurales de las bacterias, para separarlas en dos grupos: Gram positivos y Gram negativos (Álvarez y Mendoza, 2005).

Una asada de las colonias sospechosas se extendieron en un porta objetos previamente teniendo un gota de solución salina fisiológica. Se dejó secar a

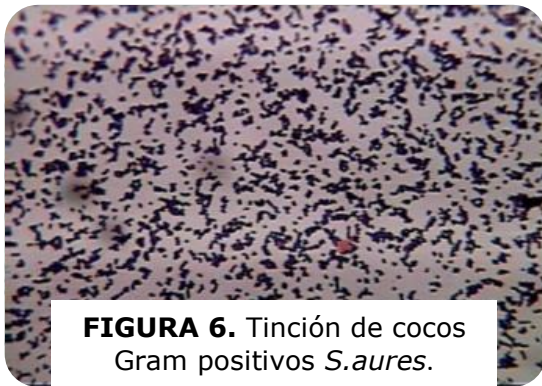


FIGURA 6. Tinción de cocos Gram positivos *S.aures*.

temperatura ambiente y se fijó al cristal por calor. Posteriormente se prosiguió con la tinción con el colorante y tiempo mostrado en el cuadro 3.

En los frotis directos teñidos con Gram, los estafilococos se observan como cocos Gram positivos de un tamaño que varía de 0.5 μm a más de 1 μm de diámetro (Figura 6). Los microorganismos pueden aparecer aislados, en pares o en grupos (racimo de uva), tanto dentro como fuera de

leucocitos polimorfonucleares. Estos microorganismos Gram positivos se tiñen de azul o purpura (Koneman *et al.*, 1999). Para el procedimiento de esta técnica se debe tener un cultivo no mayor de 18 a 24 horas, esto debido a que los cultivos envejecidos liberan enzimas por autólisis y atacan la pared celular modificando sus

propiedades estructurales que pueden confundirse con resultados falsos (Álvarez y Mendoza, 2005).

CUADRO 3. Etapas en la tinción de Gram

Paso	Método	Tiempo
Tinción inicial	Cristal violeta	30 segundos
Mordiente	Lugol	30 segundos
Decoloración	Gotas de solución de alcohol y acetona	3 a 4 segundos
Contraste	Safranina	30 segundos

Fuente: Álvarez y Mendoza (2005)

3.4.2. Prueba de catalasa

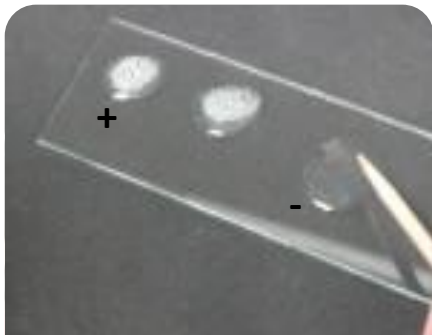


FIGURA 7.
Reacción del peróxido de hidrogeno con *S. aureus*.

Los microorganismos de la familia *Micrococcaceae* se diferencian de los de la familia *Streptococcaceae* por la prueba de la catalasa. Esta prueba detecta la presencia de citocromo oxidasa en las *Micrococcaceae* (Koneman *et al.*, 1999).

Una asada es extendida en un porta objeto, posteriormente se le agrega peróxido de hidrogeno. Si se presenta una reacción como se observa en la figura 7, la colonia es catalasa positiva (Álvarez y Mendoza, 2005)

3.4.3. Prueba de Coagulasa en tubo

En 0.5ml de plasmas obtenido de sangre de borrego se inocula una asada de la colonia sospechosa y se incuba a 37°C se hacen varias lecturas, a las 2 horas, 6 horas, 12 horas y a las 24 horas. La colonia sospechosa que forma un coagulo se da como coagulasa positiva, siendo esta una característica principal del *S. aureus* coagulasa positivo (Álvarez y Mendoza, 2005).

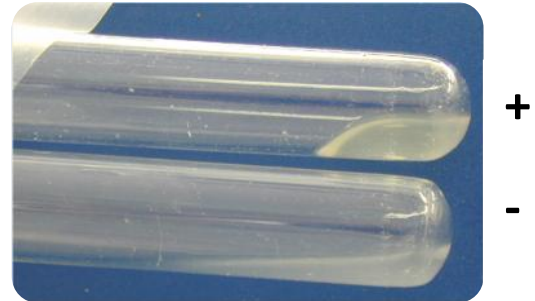


FIGURA 8.

Prueba de coagulasa en tubo.

La coagulasa detectada por este método se secreta en forma extracelular y reacciona con una sustancia presente en el plasma denominada "factor de reacción con la coagulasa (CRF)" para formar un complejo que, a su vez reacciona con el fibrinógeno para formar fibrina (Koneman *et al.*, 1999).

3.5. Diagnóstico molecular de *S. aureus*

3.5.1. Extracción de ADN bacteriano a partir de colonias de *S. aureus* aislado

La extracción de ADN se llevó a cabo con modificaciones al protocolo propuesto por Mata (2004). Se realizó una resiembra de las colonias en agar sangre, 24 horas antes de la extracción debido a que se necesitan bacterias jóvenes ya que con el tiempo la pared celular se torna más gruesa y es más difícil la extracción de ADN.

De cada resiembra se tomaron de 2 a 3 asadas de las colonias seleccionadas y se suspendieron por separado en 200 µl de amortiguador TE 1X (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8). Posteriormente se inactivaron las bacterias en baño maría a 100°C por 10min. Se dejó enfriar y agregó 10µl de proteinasa K (10mg/ml) y se incubó a 65°C / 3 hrs para activar la proteinasa K. La desactivación de esta enzima fue realizada por baño maría a 100°C por 10 min. Se le adicionó 200µl NaCl 2M y se centrifugó a 12,000 rpm / 10 min/4°C. Posteriormente se agregó 200µl de NaCl 2M y fue refrigerado a -20°C por 10 min y se centrifugó a 12,000 rpm por 10min/4°C; recuperando el sobrenadante en tubos cónicos nuevos y estériles. Al sobrenadante se le agregó 200µl isopropanol frío y fue dejado por 1 hora a -20°C. Se centrifugó a 12,000 rpm / 15 min / 4°C y se retiró el isopropanol. Se le agregó 200µl de etanol al 70% frío y se centrifugó a 12,000 rpm /10 min/4°C dejándolo enfriar -20°C por 5 min. Se retiró el etanol y se dejó a temperatura ambiente por 24 horas.

Cada muestra de ADN se hidrató con 100 µl de amortiguador TE y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Todo el material utilizado en la manipulación de las colonias fue previamente esterilizado para evitar contaminaciones entre muestras y contaminaciones ajenas al aislamiento. La manipulación de las colonias se llevó a cabo en una campana de flujo laminar.

3.5.2. Extracción de ADN bacteriano a partir de leche mastítica bovina

Para la extracción de ADN bacteriano a partir de leche, fue utilizado el protocolo propuesto por Leal- Klevezas (1999).

Al igual que para la extracción de ADN bacteriano a partir de colonias, todo el material utilizado en la manipulación de la leche se esterilizó previamente para evitar contaminaciones entre muestras y contaminaciones ajenas al aislamiento. La manipulación de las leche se llevó a cabo en una campana de flujo laminar.

La alícuota de 0.2 ml de leche mastítica se le agregó 400µl de solución de lisis y 10µl de proteinasa K. Fue incubado a 55°C, por 30 min. Posteriormente se les agregó 400 µl de fenol equilibrado con HCl, fue mezclado por inversión y se centrifuga a 8000 rpm por 5 min. La capa acuosa fue transferido a un tubo limpio y se le agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), fue mezclado y centrifugado a 8000 rpm por 5 min. Posteriormente se le agregó 200 µl de acetato de amonio al 7.5 M y se dejó reposar por 10 min. Fue agregado 2 volúmenes de etanol al 95% y se mantuvo a -20°C por una hora. Se centrifugó a 8000 rpm por 10 min y fue desechado el sobrenadante (con pipeta). Se lavó la pastilla con 1ml de etanol al 70% y fue centrifugado a 8,000 rpm por 10 min y fue refrigerado a -20°C por 5 minutos. Fue retirado el alcohol (con pipeta) y se dejó secar la pastilla por toda la noche a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones. Cada muestra de ADN fue hidratado con 100 µl de amortiguador TE y se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Para validar la calidad y pureza del ADN bacteriano obtenido, tanto a partir de la de ADN de colonias bacterianas aisladas, como a partir de ADN bacteriano extraído de leche mastítica bovina, se sometió cada una de las muestras a la lectura por espectrofotometría con dos lecturas, una a 260nm y otra a 280nm. Al mismo tiempo se realizó geles de calidad, fue sometido cada muestra a separación por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, con un marcador de ADN de 1Kb (Invitrogen), en TAE (40mM Tris-Acetato, pH 8.0, 1 mM EDTA) 0.5µg de Bromuro de Etidio, durante 45 min a 96 voltios. Para visualizar el ADN, el gel se examinó en un Documentador de geles con Transiluminador de Luz Ultravioleta.

3.5.3. Amplificación del ADN por PCR

Para la amplificación del ADN se trabajó bajo el protocolo señalado por el fabricante de la tag Amplicasa®.

CUADRO 4. Protocolo para la amplificación de ADN bacteriano. Amplicasa®.

Reactivo	Volumen µl
Dd H ₂ O	13.5
Buffer de PCR	2.0
MgCl ₂	1.0
Tag ADN Polimerasa (Amplicasa®)	0.5
dNTPs	1.0
Muestra de ADN genómico	1.0
Oligonucléotidos	1.0
VOLUMEN TOTAL	20.0

Fue utilizado dos protocolos de amplificación, uno para el gen 23S rADN y otro para los genes SED y SEI. En el cuadro 5 se muestran los tiempos y temperaturas para las fases de desnaturalización, apareamiento y extensión. Se incluyó una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos y una extensión final de 72°C por 5 minutos

CUADRO 5. Protocolo de amplificación para el gen 23S rADN, SED y SEI

	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
Gen 23S rADN 37 ciclos	Desnaturalización	94	40
	Apareamiento	58	60
	Extensión	72	75
Gen SED y SEI 35 ciclos	Desnaturalización	94	60
	Apareamiento	55	60
	Extensión	72	60

Fuente: El-Sayed *et al.* (2006)

3.5.4. Análisis de los productos de amplificación

El análisis de los productos de amplificación se llevaron a cabo por electroforesis en Agarosa al 1.2% en TAE pH 8.0, para ello fue utilizado un control positivo de la cepa ATTC1-990-005 y un marcador de 1kb (Invitrogen) para el gen 23S rADN y para los genes SED y SEI un marcador de 200pb (Promega®).

Se esperaba una banda de amplificación para el gen 23S rADN con un tamaño de 1251pb, para el SED 318pb y para el SEI 576pb.

3.6. Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas bacteriológicas y de PCR fueron evaluados mediante el uso del cálculo estadístico por índice kappa de Cohen (K). Se utilizó el programa WinEpiscop 2.0 para calcular kappa.

Para la interpretación de los resultados se utilizó la escala de valoración del índice kappa de Cohen (Cuadro 6) donde en primer lugar, K depende de la prevalencia del carácter observado: cuando más cerca esté de 0 ó 1, menor es el índice K para igual proporción de acuerdos observados. En segundo lugar, depende de la simetría de los totales marginales: en igualdad de acuerdos observados, cuando menor sea la diferencia entre las prevalencias observadas, menor es el índice K (Portilla, 2007).

CUADRO 6. Escala de valoración del índice kappa.

Kappa	Grado de acuerdo
<0,00	Ninguno
0.00-0.20	Mínimo
0.21-0.40	Regular
0.41-0.60	Bueno
0.61-0.80	Excelente
0.81-1.00	Casi perfecto

Fuente: Portilla (2007)

4. Resultados

4.1. Conteo de células somáticas

En esta investigación fueron realizados 10 muestreos con un total de 421 animales en diferentes explotaciones con diversas características como: tipo de ordeño, control de higiene tanto en el corral como en las máquinas y manos de los ordeñadores. Se obtuvieron 1396 muestras de cada cuarto, no de todos los cuartos se obtuvieron muestras, ya que se restaron los cuartos ciegos. A cada cuarto posteriormente de haberles realizado la asepsia correspondiente, se les realizó la prueba de california a cada cuarto viable, obteniendo 493 cuartos mayores en el nivel de trazas. De cada cuarto identificado como afectado se le tomó una muestra asépticamente en frascos estériles, identificándolos por vaca y cuarto afectado, respectivamente. Estas muestras fueron llevadas en refrigeración al laboratorio de Microbiología de la leche de la Universidad Veracruzana para posteriormente realizarles el CCS.

De las 493 muestras de leche mastítica, se aislaron bacterias en agar sangre con las características morfológicas específicas de *S. aureu*, 38 colonias. Estos aislamientos se confirmaron con las pruebas bioquímicas específicas para este patógeno. El 34.9% de las muestras presentaron un conteo de células somáticas entre 0-200,000 CCS lo cual se clasifica como negativo, pero a pesar de tener una cuenta de células bajas, en estas muestras se localizaron 3 muestras contaminadas con *S. aureus*, de las cuales 2 de esas muestras presentaron el gen SEI, gen presente en 19 de 38 cepas de *S. aureus* aislados, lo que representa un 10.52% de las muestras positivas a *S. aureus* y al gen SEI productor de toxinas. El 68.9% de los aislamientos de este patógeno se encontró en la leche con grado de mastitis 1 y 2. El 16.8% de las muestras, a pesar de ser clasificadas como trazas (conteo de CCS de 200,000 a 400,000) estaban contaminadas con el patógeno. La leche analizada y clasificada en grado negativo y trazas, es considerada apta para el consumo humano (Saran y Chaffer, 2000), en este trabajo se observó la presencia de este patógeno, por lo que se consideró que debido a la contaminación con toxinas que provocan intoxicación alimentaria, representan un riesgo para el consumidor final.

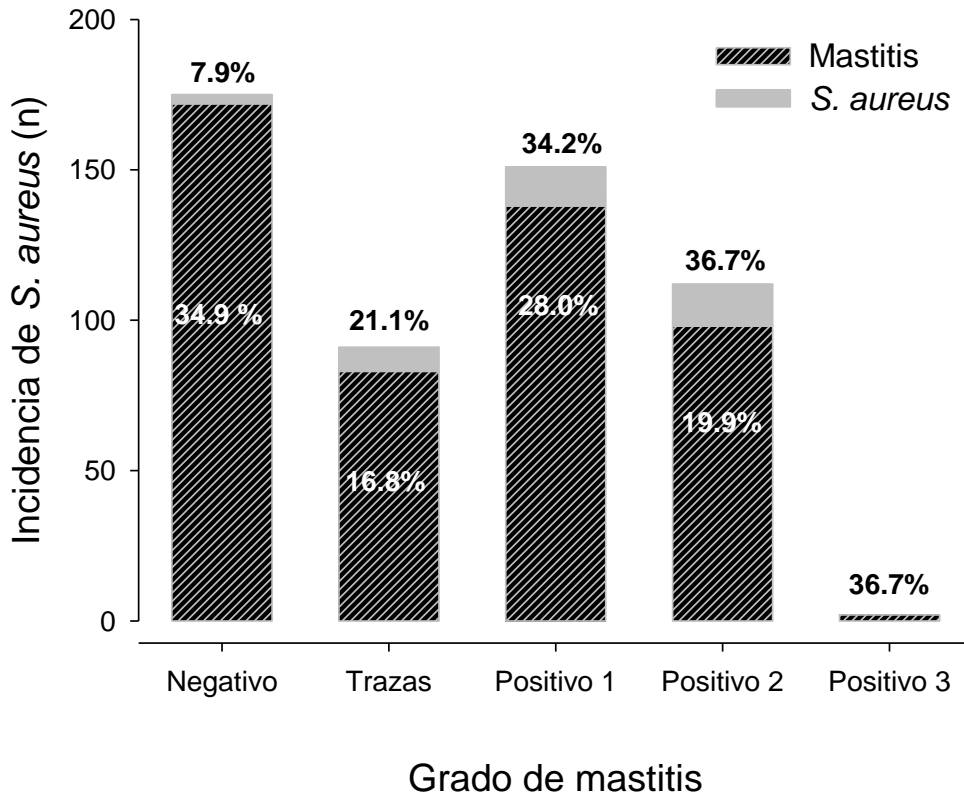


FIGURA 9. Conteo de células somáticas y presencia de *S. aureus* en mastitis.

En el límite entre una mastitis subclínica y clínica (400,000-5,000,000 CCS) fue posible aislar la mayor cantidad de casos de *S. aureus* (27 de los 38) (Cuadro 7), este límite es el más difícil de diagnosticar y controlar por no presentar los signos clásicos de mastitis, pero aún cuando la enfermedad no sea visible, ya están presente patógenos afectando a la ubre y como consecuencia, contaminando la leche. El mayor porcentaje de casos de mastitis por *S. aureus* se encontró en la clasificación de 1 y 2 con conteos que van de 400,000-5,000,000 CCS.

CUADRO 7. Presencia de *S. aureus* en leche mastítica bovina.

Clasificación	CCS (ml)	Muestras de leche positivas (n)	No. De muestras positivas a <i>S. aureus</i>	
Negativo	0-200,000	172	3	Cuarto Sano
Trazas	200,000-400,000	83	8	Mastitis subclínica
1	400,000-1,200,000	138	13	Mastitis subclínica
2	1,200,000-5,000,000	98	14	Mastitis clínica
3	Más de 5,000,000	2	0	Mastitis clínica

Fuente: Saran y Chaffer (2000).

Aún cuando no fue un objetivo de este trabajo, se observó que el tipo de ordeña influye en la presencia de infecciones mamarias. Como se presenta en el cuadro 8, los resultados obtenidos en el muestreo y procesamiento de las muestras dejan a la vista que las explotaciones con manejo de ordeña mecánica presentaron el 29% de los casos de mastitis por *S. aureus*. Por lo que se consideró al ordeño mecánico como factor de riesgo (OR=4.108 IC 95%=1.90-8.88); sin embargo, esto no significa que el uso de la ordeña mecánica sea dañino, sino que la contaminación de *S. aureus* ocurre debido al mal manejo en los aspectos de higiene y mantenimiento que se le debe de dar a la maquinaria, tales como el sistema de tuberías, mangueras y pezoneras.

CUADRO 8. No. de muestras de leche con *S. aureus* obtenidos por ordeño mecánico y manual como factor de riesgo.

	<i>S. aureus</i>		
	+	-	
Mecánico +	29	200	229
Manual -	9	255	264
	38	455	493

OR=4.108
IC 95%=1.90-8.88

El 41.38% de los aislamientos de *S. aureus* provocados por el ordeño mecánico presentaron mastitis grado 2 (cuadro 9), este se considera el grado en que las mastitis pasa de ser una mastitis subclínica a mastitis clínica.

CUADRO 9. Presencia de *S. aureus* en leche producida mediante ordeño mecánico y manual.

Clasificación (Saran y Chaffer, 2000)	Ordeño Mecánico n (%)	S. <i>aureus</i>	Ordeño Manual (n)	<i>S. aureus</i>
Negativo	77 (33.62)	3	95	0
Traza	36 (15.72)	7	47	1
1	54 (23.58)	7	84	6
2	60 (26.20)	12	38	2
3	2 (0.87)	0	0	0
Total	229	29	264	9

4.2. Aislamiento microbiológico e identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus*

De las 493 muestras de leche mastítica que contaban con más de 200,000 CCS se realizó la siembra directa en agar sangre; de éstas, 38 muestras estaban representativamente contaminadas con el patógeno *S. aureus*. Para poder confirmación, se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para esta bacteria. Se encontró que el 100% de los patógenos aislados eran positivos a todas las pruebas sometidas, con lo que se concluyó que el patógeno que provocó la enfermedad y contaminó la leche, fue *S. aureus*.

4.3. Extracción de ADN para ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A las 38 cepas aisladas de *S. aureus* se les realizó la extracción de ADN para localizar al gen 23S rADN, gen específico para la detección de *S. aureu*; el resultado fue del 100% de positivos a este gen (Figura 10), confirmando que las bacterias aisladas eran *S. aureus* de género y especie.

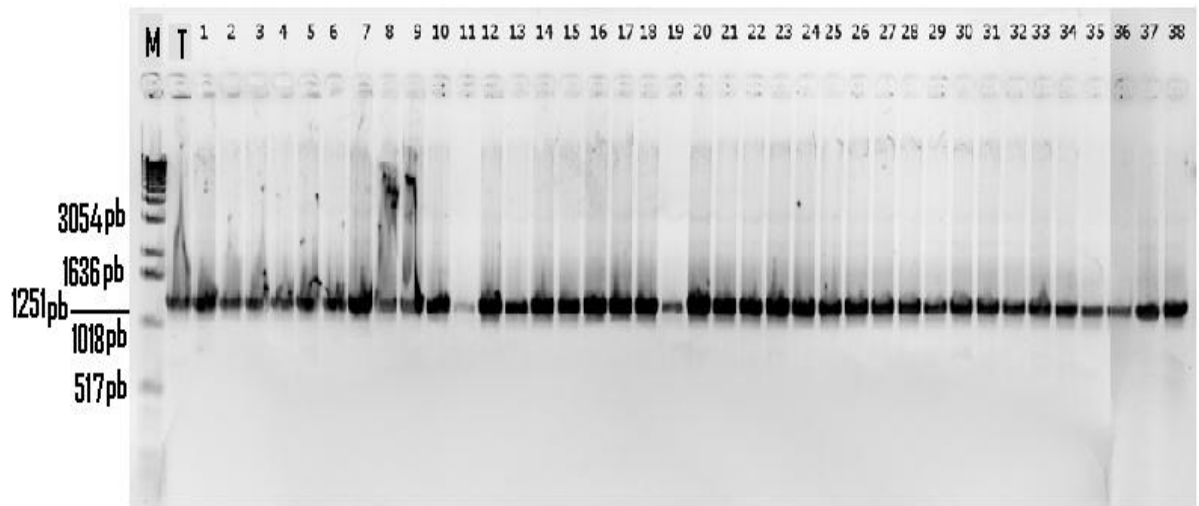


FIGURA 10. Electroforesis de producto de PCR del gen 23S rADN en agarosa al 1.5% teñido con bromuro de Etidio al 0.5µl/ml.

Una vez que se comprobó que las cepas aisladas eran cepas puras de *S. aureus*, se identificó en cada una de las cepas la presencia de los genes enterotóxicos. En el análisis del gen SED, las 38 cepas de *S. aureus* fueron negativas a su presencia (Figura 11).

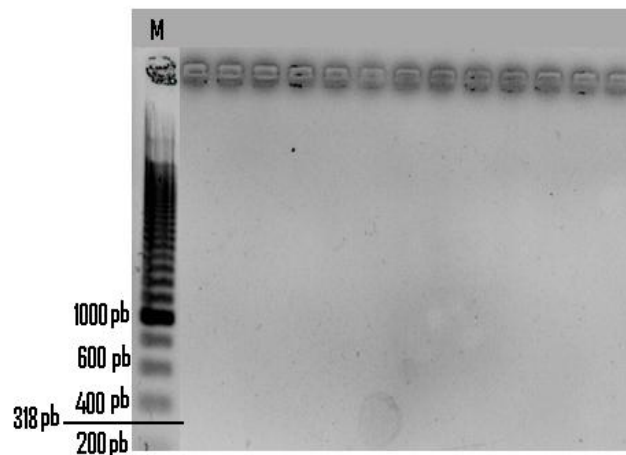


FIGURA 11. Electroforesis de producto de PCR del gen SED en agarosa al 1.5% (Bromuro de etidio [0.5mg/ml])

Del resultado del análisis de amplificación del gen SEI, éste se identificó en 19 cepas (50%) de las 38 muestras analizadas (Figura 12).

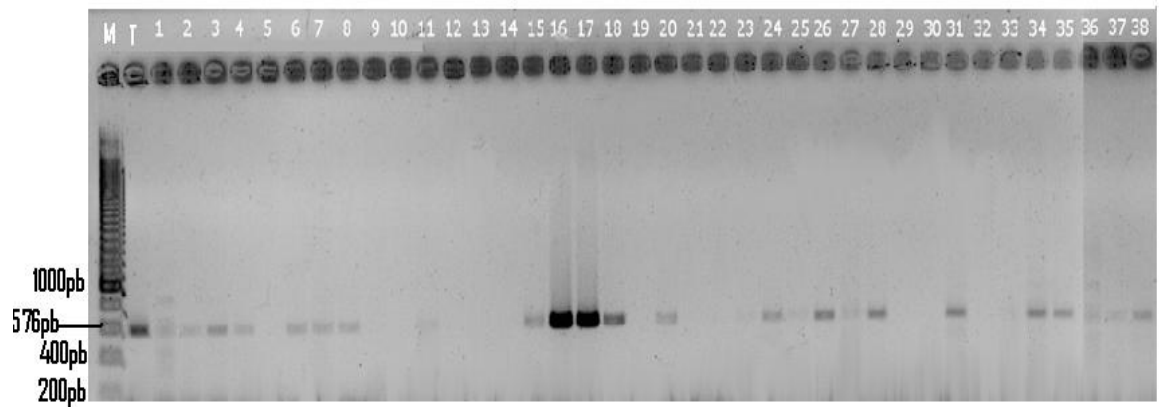


FIGURA 12. Electroforesis de producto de PCR del gen SEI, en agarosa al 1.5% (Bromuro de etidio [0.5 mg/ml]).

Simultáneamente a la confirmación de *S. aureus* en los aislamientos, en muestras de 50 leches a azar, se realizó extracción de ADN bacteriano. Las muestras de leche correspondieron a las mismas que previamente se les había realizado pruebas microbiológicas con resultados negativos a este patógeno. En los ADN's de estas muestras, se detectó el 18% como muestras falsas negativas con respecto a los resultados de bacteriología.

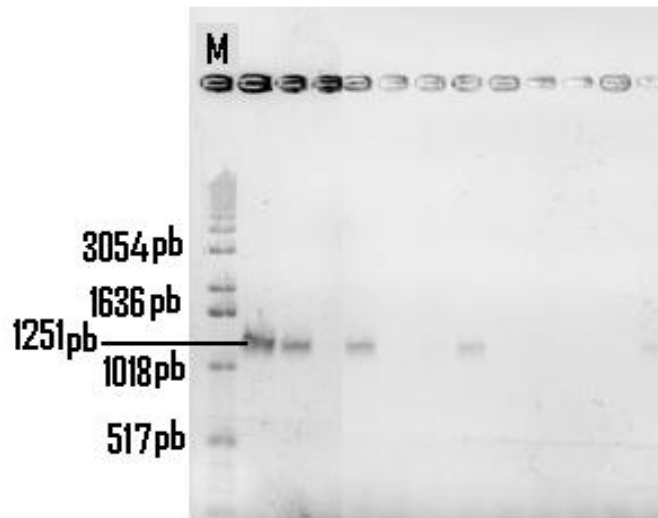


FIGURA 13. Electroforesis de producto de PCR del gen 23S rADN, en agarosa al 1.5% (Bromuro de Etidio [0.5mg/ml]). De ADN bacteriano en leche mastítica

4.4. Concordancia

En el cuadro 10 muestra la concordancia entre las pruebas de biología molecular y microbiología, arrojando como resultados una concordancia de kappa= 0.45, que de acuerdo a la tabla de tabulación del índice kappa (Cuadro 6), cae en el rango de bueno. El rango de valor bueno puede representar una alta proporción de muestras de falsos negativos a la prueba de microbiología cuando son comparados con las de biología molecular.

Cuadro 10. Proporción de concordancia observada entre las pruebas de biología molecular y microbiología.

		Microbiología		
		+	-	
Biología molecular	+	3	6	9
	-	0	41	41
		3	47	50

Kappa: 0.451

Grado de acuerdo: BUENO

Debido a que el grupo de genes de enterotoxinas de *S. aureus* (SE) son más estables que la propia bacteria, es posible que en pruebas bacteriológicas este microorganismo no se desarrolle; sin embargo la probable presencia del patógeno puede identificarse a través de pruebas de ADN que permitan localizar sus genes, tales como, Sea, seb, sec, SED, see, sef, seg, seh, SEI, sej (Bendahou *et al.*, 2008).

5. Discusión

López *et al.* (2006), utilizó la metodología que marca la NOM -109-SSA1-1994 y reportó resultados del aislamiento de *Staphylococcus* spp en 20 muestras de leche de vaca lactante con mastitis. Con la misma metodología, de acuerdo con las características fenotípicas y bioquímicas de las 1396 muestras de leche mastítica, en este trabajo fue posible identificar este agente en 178 muestras con *Staphylococcus* spp (12.75%) y confirmar *S. aureus* en 38 muestras (2.7%), por lo que las pruebas estándar y pruebas de oro (bioquímicas) fueron eficientes para esta fase de investigación. Osteras *et al.* (2006), encontraron en vacas lecheras en Noruega una prevalencia de 8.2 % de *S. aureus* en leche con mastitis al momento del parto, mientras que mastitis por *S. agalactiae* sucedió en vacas durante la lactancia, Por otro lado, Reksen *et al.* (2007) asociaron la caída en la producción de leche en vacas de alta producción a partir del tercer parto, a infecciones mamarias causadas por *S. aureus* y *Streptococcus* spp. y concluyeron que el hallazgo de estos patógenos se debe considerar para el potencial productivo de estos animales. En este trabajo se pudo demostrar que *S. aureus* no es el principal agente causal de mastitis en esta zona, dando pie a futuras investigaciones para identificar a los patógenos que ocasionan la mastitis bovina en esta región y así crear estrategias para el diagnóstico y control de esta enfermedad. Da Silva (2008) reportó en un estudio hecho en Brasil, en leche y queso de vaca un 100 % de *S. aureus* en 94 aislamientos, estos resultados correspondieron a diversos municipios y sugieren por sus hallazgos, variaciones geográficas en la presencia de este patógeno; esta diferencia en los hallazgos puede atribuirse a diferencias en el manejo de las explotaciones; de lo observado en este trabajo, la presencia de *S. aureus* fue mayor en los hatos donde la ordeña se asocia con prácticas de higiene inadecuadas. Recientemente en estudios hechos en hatos estadounidenses, se publicó que aproximadamente el 3% de los animales están infectados con *S. aureus* (Schukken *et al.* 2009); sin embargo, Tenhagen *et al.* (2009), mencionaron que este patógeno puede representar del 10 al 12% de las infecciones clínicas de mastitis y destaca que las vacas infectadas con *S. aureus* no necesariamente presentaron cuentas elevadas de células somáticas. Esto concuerda con los resultados que se presentan en esta investigación, donde 3 de las cepas aisladas (7.8%) se localizaron en leches con cuentas de células somáticas menores a 200,000. Boscan *et al.* (2009), encontraron en ganado de doble propósito

que las bacterias mayormente aisladas fueron *Corynebacterium bovis* (46.73%), *Staphylococcus epidermidis* (20.56%), *Staphylococcus aureus* (12.15%) y *Arcanobacterium pyogenes* (7.48%). Gutiérrez y Agudelo (2010), en una investigación realizada en Colombia en vacas lecheras con mastitis, encontraron que *S. aureus* y *Escherichia coli* fueron los agentes principales en esta infección. Los resultados de estos autores coinciden con los hallazgos en esta investigación, por lo que la baja presencia de *S. aureus* en los animales estudiados, permite considerar que este no es el agente causal más importante de mastitis bovina en la zona de estudio y se puede atribuir a las necesidades ambientales y de tipo de transmisión que requiere para diseminarse y contagiar a los hatos que, en el caso de los estudiados por ser en su mayoría de ordeña manual, no contribuyen a su diseminación. Cabe señalar que, aunque la concentración de este patógeno no es la más importante para la producción de mastitis, sino por la posibilidad de que se distribuya en los hatos a causa de prácticas de ordeña inadecuadas y que se presente en la leche, es altamente posible que ocurran intoxicaciones alimentarias. En ello, radica la importancia de su diagnóstico y la mejora de prácticas higiénicas para la salud de la ubre.

Por otro lado, no existe una vacuna eficiente para la prevención de la mastitis que se de por resultado de la interacción de varios factores tales como: manejo e higiene de los animales durante la ordeña, susceptibilidad de las vacas, características ambientales, y la presencia de microorganismos (Riffon *et al.*, 2001; Ovidio *et al.*, 2006). Esta enfermedad se puede erradicar por medio de buenos y eficientes métodos de manejo, tanto de los animales en ordeño, como la maquinaria que se utiliza para realizar este proceso. Aunado a las buenas prácticas de manejo se debe contar métodos rápidos, sensibles y específicos para la detección de los patógenos causantes de mastitis que eviten pérdidas económicas que se dan por esta enfermedad en la ganadería.

Phuektes *et al.* (2001) utilizaron el gen 23S rADN en 117 muestras de leche mastítica bovina y demostraron que es un buen fragmento para la identificación de *S. aureus* en leche. Akineden *et al.* (2001) y Cremonesi *et al.* (2006) utilizaron también este gen para la identificación de *S. aureus* por especie. Con este trabajo se demostró que el gen 23 S rADN es el adecuado para la identificación *S. aureus* tanto en aislamientos bacteriológicos, como de leche mastítica y su utilidad e importancia radican en la posibilidad para la detección de este patógeno directo desde la leche, sin

realizar aislamientos por cultivo, ya que en estas pruebas pueden dar falsos negativos por la cantidad de colonias que son necesarias para su detección en agar, mientras que la detección de *S. aureus* en leche por PCR puede lograrse la presencia de ADN en muestras con menos de 100 UFC en cada muestra. En un estudio realizado por Riffon *et al.* (2001) con diferentes pruebas de PCR y diferentes cantidades de UFC de *S. aureus* en leche, demostraron que con PCR y con pocas o muchas UFC, en cuestión de horas se obtienen resultados con alta sensibilidad (99%) y especificidad (100%), sin los cultivos engorrosos y largos de bacteriología. Por lo que se concluye que el PCR es altamente confiable para la detección directa de bacterias más frecuentes causantes de mastitis bovina en leche.

Los genes SED y SEI se han utilizado para demostrar que aunque *S. aureus* es un agente causal de mastitis, también puede provocar intoxicaciones alimentarias por la presencia de esos genes que regulan la producción de toxinas enterotoxinas. Cremonesi *et al.* (2006) obtuvieron en leche mastítica 95 aislamientos de *S. aureus* de los cuales, 39 fueron positivos a SED (41%) mientras que del gen SEI encontraron 19 positivos (5.3%). En este trabajo, de los 38 aislamientos de *S. aureus* para el gen SED se reportaron 0 positivos y 19 fueron positivos para el gen SEI (50%). Zschöck *et al.* (2005), obtuvieron las toxinas de *S. aureus* de los tipos SEA- SEE, y reportan que siempre fueron las únicas y principales toxinas de este patógeno productor de mastitis bovina. Aparte de estas toxinas identificaron las de tipo SEG- SEJ, sin embargo la toxina SEH no se identificó. De los genes estudiados en este trabajo (SED y SEI), en las muestras positivas a mastitis por *S. aureus* en cultivo, ninguna fue portadora del gen SED, mientras que el gen SEI se localizó en 7.7 % de las muestras analizadas. El-Sayed *et al.* (2006), reportaron que en no obstante el aislamiento de cepas de *S. aureus* portadoras del gen SED, no se reportan caso de mastitis clínica ó subclínica, por lo que se atribuye a que las toxinas que regula este gen no se asocian a daño tisular. En consideración a los resultados del gen SED, se aporta el conocimiento de que las cepas positivas a *S. aureus* en la zona de estudio no son portadoras de este gen; mientras que las cepas de *S. aureus* positivas al gen SEI, aportan información acerca de su presencia y llevan a considerar la posibilidad de que leche contaminada con esta cepa provoque intoxicaciones alimentarias además de su asociación a infecciones mamarias. Estos resultados sirven de base para futuras investigaciones para caracterizar en *S. aureus* los genes más importantes que se asocian a sus factores de virulencia, tales como la estructura bacteriana, la síntesis de enterotoxinas y de enzimas, propiedades ya mencionadas, que contribuyen su

capacidad de producir enfermedad y que, tal como mencionan Konema *et al.* (1999), estos factores de virulencia no son constantes en todas las cepas de *S. aureus* y los resultados de esta investigación coinciden con estos autores, debido a ello también se coincide en la opinión de que este patógeno debe ser estudiado en cada hábitat donde se localice, a fin de descubrir las propiedades patogénicas de esa bacteria en los diferentes hábitats.

La leche categorizada como apta para consumo humano debe tener cuentas de células somáticas menores a 200,000. Sin embargo, el hallazgo de dos muestras de las 19 positivas al gen SEI, provenían de muestras con conteos menores las 200,000 células somáticas, y en consecuencia estas cepas son capaces de producir toxinas de tipo I que provocan intoxicación alimentaria, por lo que se demuestra entonces que los marcadores para identificar a este tipo de genes en los diferentes patógenos, cobran importancia por su alta sensibilidad y especificidad para prevenir enfermedades de origen alimentario.

Los resultados de este trabajo confirman lo expresado por Méndez y Pérez (2004) y Kubota *et al.* (2007), que indican que la introducción de métodos de biología molecular en los laboratorios de microbiología clínica es importante para obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor tiempo posible. Sin embargo, el grado de concordancia en los resultados de esta investigación (kappa 0.45), que aún cuando se consideró bueno, indican que se requiere un mayor número de pruebas de PCR que mejoren la confianza en el uso de marcadores moleculares.

6. Conclusión

Se demostró que *Staphylococcus aureus* no es el principal agente causal de la mastitis bovina en los hatos estudiados en la zona centro del estado de Veracruz.

El diagnóstico molecular es posible con alta sensibilidad (99%) y especificidad (100%) a partir de ADN bacteriano extraído de colonias aisladas así como de leche mastítica bovina para el diagnóstico de esta enfermedad, con menor tiempo que las pruebas microbiológicas, lo que permite establecer estrategias para un tratamiento temprano y lograr así su control en los hatos lecheros.

El uso del marcador 23S rADN fue apropiado para la identificación específica de *S. aureus* tanto en cepas aisladas en cultivo, como en ADN bacteriano obtenido de muestras de leche mastítica.

Se identificaron a los genes SED y SEI, y se observó que las cepas de *S. aureus* aisladas en este trabajo no son portadoras del gen SED y que el gen SEI tiene una baja incidencia, por lo que se requiere el uso de otros marcadores de los factores de virulencia de este patógeno para poder determinar cuales son los factores que estos poseen para poder así realizar una adecuada caracterización en la zona de estudio.

7. Bibliografía

Akineden Ö., Annemüller C., Hassan A.A., Lämmler C., Wolter W., Zschöck M. 2001. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. *J. Clin. Microbiol.* **8 (5)**: 959-964.

Álvarez C. y Mendoza E. 2005. Manual básico de bacteriología. Editorial Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 127-147.

Amaral T. y Ruegg P. 2004. Association between Results of Porta SCC, the CMT and Isolation of mastitis Pathogens. University of Wincosin Madison, WI.

Amiot Jean. 1991. Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp 1-55.

Balderas R., Espinosa M. S., Gómez L. D., Miros A. G., Ortíz Castellanos J., Ortuño H. L. 2006. Establecimiento de prácticas de higiene durante el ordeño, para propiciar la disminución de la presencia de mastitis en siete ranchos de GGAVATT La Laguna, Municipio de Medellín de Bravo, Ver. Memoria del PAMVET.

Barkema H. W., Schukken Y. H. y Zadokst. 2006. Invited Review. The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J. Dairy Sci.* **89**:1877-1895.

Barkema H.W., Green M.J., Bradley A. J., y Zadoks R. N. 2009. The role of contagious disease in udder health. *J. Dairy Sci.* **92 (10)**: 4717-4729.

Barratt K.J., Leslie K.E., Bashiri A. 2004. An evaluation of the PORTASCC™ test as an estimate of milk somatic cell count. Memories. 23rd World Buiatrics Congress, Quebec City, Canada, July 11-16.

Bedolla, Castañeda H, Wolter. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. *REDVET.* **VIII (9)**: 23-28.

Bendahou A., Lebbadi M., Ennanei L., Essadqui F., Abid M. 2008. Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (Iben and jben) in Nord Morocco. *J Infect Developing Contries* **2(3)**:218-225.

Benito M.J., Rodríguez M.M., Cordoba M.G., Aranda E., Cordoba J.J. 2000. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* from staphylococcal species by arbitrarily primed-polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology* **31:143-152**.

Books F.G., Butel S.J., Morse A.S. 2005. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual Moderno 10ª Edición. México.

Boscán O. J., Villarroel N. R., Oviedo B. A., Sánchez V. A., Pino R. D., García B. D.; Hernández G. L., Pérez B. M. 2009. Bacterias patógenas potenciales al inicio del período seco de vacas doble propósito con mastitis subclínicas. *Revista Científica*, **XIX: 256-263**.

Cassell BG. 1997. Using somatic cell score evaluations for management decisions. *J Dai Si*. **77 (7): 2130-2136**.

Castañeda Hugo. 2010. La Prevención de la Mastitis. Memoria del 6º Seminario Internacional en reproducción Animal y Producción de la leche y la carne. Mazatlán, Sinaloa, México.

Castro L.C. 2003. Perspectivas de la red leche de bovino en México. FIRA, México.

Cremonesi P. Vimercati C., Pisoni G., Castiglioni B., Luzzana M., Ruffo G., Moroni P. 2006. Identification of Enterotoxin Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Caprine Milk. *Veterinary Research Communicatons*, **30 (1): 241-243**.

Cuteri V., Mezzasoma P., Valente C. 2003. Application of Biomolecular Methods of *Staphylococcus aureus* Strains from Dairy Cows. *Veterinary Research Communications*. **27 (1):335-338**.

Da Silva L.I. 2008. Toxinas em *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco RECIFE. Tesis de Maestría.

Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*. **13 (1):16-34**.

Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T. J. 2001. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

El-Sayed A., Alber J., Lämmler C., Jäger S., Wolter W., Castañeda H. 2006. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus*

aislados en casos de mastitis clínica y subclínica en México. *Vet. Méx.* **37 (2): 165-179.**

FAO. Control de riesgos alimentarios. 2006. [En línea] <http://fao.org/docrep/W6419S/w6419s08.htm>.

Fueyo J.M. 2005. Frecuencia y tipo de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéticos. Tesis Doctoral. Universidad Oviedo.

Gerlach F., Álvarez F., Moreno S., Gerlach L. 2009. Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios. Cuarta Época.* **24 (XIII): 356- 376.**

González M.T., Rojas R.A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México.* **47 (5): 388-390.**

Gutiérrez L.A. y Agudelo D.A. 2010. Contro de crecimiento In Vitro sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis. *Revista lasallista de investigación* **6 (1): 76-82.**

Heeschen H.W. Somatic Cells as an Indicator of Milk Hygien. 2005. Scientific Basic and The EU Approach. In NMC 44th Annual Meeting Proceedings. USA. 52-72.

Hernández R.J., Bedolla C.J. 2008. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET.* **IX (9):25-28.**

Hoblet K., Schnitkey G., Arbaugh D., Hogan J., Smith K. 1991. Costs associated with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J Am Vet MecAssoc* **119 (2):190-196.**

Ingraham L.J., Ingraham A.C. 1998. Introducción a la Microbiología. Editorial Reverente, S.A. España. 567-646.

Jäger Sybille Petra. 2006."Untersuchungen zur Eutergesundheit in Milchviehbeständen des Bundesstaates Jalisco, Mexiko". Tesis de Doctorado. Universidad de Leipzig, Alemania.

Jay J.M., Loessner J.M., Golden A.D. 2005. Modern food microbiology. Springer Science+ Business Media, Inc. New York, USA. 545- 561.

Katsuhiko O., Machiko I., Yu S., Dong-Liang H., Shigeko U., Kunihiro S. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh* or *sei* Genes. *JCM* **40 (3): 857-862**.

Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P. 1999. Diagnóstico Microbiológico texto y atlas color. Editorial Panamericana. Quinta Edición. Argentina.

Kubota M., Hayashi T., Iwasaki H., Kohiruimaki M., Kawamura S., Sakaguchi K., Abe R. 2007. Rapid and Effective Method for Separation of *Staphylococcus aureus* from Somatic Cells in Mastitis Milk. *J. Dairy Sci.* **90:4100-4107**.

Lam T., Ruegg L.P., McDougall S. 2008. Good Veterinary Practice of improve bovine udder health: do's, don'ts, and opportunities. XXV. Jubilee World Buiatrics Congress. Budapest, Hungary.

Leal-Klevezas D., Barbabosa A., Flores M., López A., Martínez J. 1999. Epidemiología molecular de un foco primario de brucelosis en el Estado de México. *Biología Aplicada*; **16 (3):149-153**.

López J. E., Higuerra J. E., Ochoa A., Chassin O., Valdez J., Bravo P., Baizabal V. M. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. Asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Rev. MexCienc: Pecu* **44(1):91-106**.

López, J., Ramos J., Zarzosa A., Chassin O., Valdez J., Bravo A., Baizabal V. 2005. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán, México. *Téc. PecuMéx* **44(1):91-106**.

Magariño H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. Editorial 2001. Producción y Servicios Incorporados S.A. Guatemala, Centroamérica. 11-52.

Martínez Cabrera Félix. 2010. XXVI Conferencia Internacional sobre Ganado lechero. Guadalajara, México.

Martínez V. C., Carvajal M., y Montes R. 2007. Impacto económico de la mastitis subclínica en hatos bovinos de doble propósito de la Zona Centro del Estado de Yucatán. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Universidad Autónoma de Yucatán. **7 (002): 27-131**.

Mata V. L. 2004. Detección de *Staphylococcus aureus* a partir de colonias aisladas de muestras de carne. *INIFAP. Folleto Técnico* **5: 104-107.**

Morandi S., Brasca M., Lodi R., Cremonesi P., Castiglioni B. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol.* **124: 66-72.**

Mota L.G. y Fernández E. P. 2007. Intoxicación estafilocócica por alimentos. *Énfasis Alimentación Online.* 17:14.

Murray P., Kobayask G., Pfaller M., Rosenthal K. 1997. Microbiología médica. Segunda Edición. HarcourtBrace, España. 166-179.

NOM -109-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-155-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Métodos para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos: Establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *Staphylococcus aureus* presentes en alimentos nacionales e importados.

Normanno G., Corrente M., La Salandra G., Cambrosio A., Quaglia N.C., Parisi A., Greco G., Bellacicco A.L., Virgilio S., Celano G.V. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *J. FoodMicrobiol.* **117:219-222.**

Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A., Descastelli L., Mioni R., Scuota S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Salinetti A.P., La Salandra G., Bartoli., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia N.C., Celano G.V. 2005. Coagulasa-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *J. FoodMicrobiol.* **982:73-79.**

Normanno G., La Salandra G., Dambrosio A., Quaglia N.C., Corrente M., Parisi A., Santagada G., Firinu A., Crisetti E., Celano G.V. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *J. FoodMicrobiol.* **115: 290-296.**

Novick R.P, Schlievert P., Ruzin A. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microb. Infect.* **3**, 585-594.

Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D.L., Ueda S. & Shinagawa K. 2002. Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh or sei genes. *J. Clin. Microbiol.* **40**:857-862.

Osterås O., Sølverød L., Reksen O. 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey. *J. Dairy Sci.* **89**:1010-1023.

Ovidio F. C., Rojas P., Rodríguez L. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. *Agro-Ciencia.* **22(1)**: 49-58.

Pech V.C., Carvajal M., Montes R. 2007. Impacto económico de la mastitis subclínica en hatos bovinos de doble propósito de la zona centro del estado de Yucatán. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* **7**:127-131.

Philpot. N.W. y Nickerson S.C. 1991. Mastitis: Counter attack. Babson Bros. Co. II., USA.

Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. 2001. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci.* **84**:1140-1148.

Pilar M. 2002. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colombia Médica* **33 (4)**: 36-40.

Pol M., Ruegg L. Pamela. 2007. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-positive Mastitis Pathogens. *J. Dairy Sci.* **90**: 262-273.

Portilla M. 2007. Uso de la secuencia de inserción RvD1 para la identificación de *Mycobacterium bovis*. Tesis de Maestría en Ciencia Animal, de la Universidad Veracruzana.

Reksen O., Solverød L., Ostera O. 2007. Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **90**:4670-4678.

Riffon R., Sayasith K., Khalil H., Dubreuil P., Drolet M., Lagacé J. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol* **39 (7): 1276-1281.**

Rodríguez G. 2006. Behavior of bovine mastitis and its economic impact in some farms of Bogota's Savannah, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria* **12: 15-19.**

Román P.H., Ortega R.L., Hernández A.L., Díaz A.E., Espinosa G.J., Núñez H.G., Vera A.H., Medina C.M., Ruiz L.F. 2009. Producción de leche de bovino en el sistema de doble propósito. *INIFAP. CIRGOC. Libro Técnico. Veracruz, México.* **22:355-356.**

Rosengren A., Fabricius A., Guss B., Sylven S., Lindqvist R. 2010. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *Int. J. Food Microbiol.* **144. 263-269.**

Ruegg P.L. 2008. Implementación de programas exitosos de calidad de leche en la finca. Memorias 10º Congreso Panamericano de la Leche, San José, Costa Rica.

Saltijeral J., Cordova A. 2010. Tendencia en la calidad de la leche. Memoria del 6º Seminario Internacional en Reproducción Animal y Producción de Leche y Carne. Mazatlán, Sinaloa, México.

Saran Arthur y Chaffer Marcelo 2000. Mastitis y Calidad de la leche. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, República de Argentina.

Schukken Y. H., Gonzalez R. N., Tikofsky L. L., Schulte H. F., Santisteban C. G., Welcome F. L., Bennett G. J., Zurakowski M. J., Zadoks R. N. 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? *Veterinary Microbiology* **134(1-2): 9-14.**

Smith Th., Fox L., Middleton J. 1998. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **212:553-56.**

Tenhagen, B. A., I. Hansen, A. Reinecke, and W. Heuwieser. 2009. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *Journal of Dairy Research* **76(2): 179-87.**

Tizard I.R. 2000. Inmunología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana. México.

Vera A.H., Hernández A.L., Espinosa G.J., Ortega R.L., Díaz A.E., Román P.H., Núñez H.G., Medina C.M., y Ruiz L.F. 2009. Producción de leche bovina en el sistema familiar. INIFAP.CIRGOC. Libro Técnico. Veracruz, México. **24: 384-386.**

Wolter W., Castañeda H., Kloppert B., Zschöck M., 2004. Mastitis bovina, prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria, Guadalajara, Jalisco, México. 11-130.

Zadoks R., Gillespie B., Barkema H., Sampimon O., Oliver S., Schukken Y. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* **130:335-349.**

Zecconi A., Cesaris L., Liandris E., Dapra V., Piccinini R. 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *MicrobPathog.* **40:177-183.**

Zschöck M., Kloppert B., Wolter W., Hamann H.P., Lämmle Ch. 2005. Pattern of enterotoxin genes seg, seh, sei and sej positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* **108: 243-249.**