

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS



POSGRADO EN CIENCIAS PECUARIAS

TEMA:

Identificación y tipificación genética de cepas de Staphylococcus aureus de vacas con mastitis en la Región centro de Jalisco

TESIS QUE PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA:

MVZ VALDIVIA VÁZQUEZ OSCAR

DIRECTOR: Dr. CASTAÑEDA VÁZQUEZ HUGO

EVALUADORES: RAMÍREZ ÁLVAREZ AGUSTÍN
VALDIVIA FLORES ARTURO

ASESORES: Dr. ALANIZ DE LA O RICARDO
Dr. VILLAGOMEZ ZAVALA DANIEL A. F.
Dr. WOLTER WILFRIED

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN JAL. MEX. MARZO DE 2006



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló el pasante de la Maestría Interinstitucional en Ciencias Pecuarias, **MVZ. Oscar Valdivia Vázquez**, cuyo título es:

Identificación y tipificación genética de cepas de *Staphylococcus aureus* de vacas con mastitis de la Región centro de Jalisco.

Trabajo dirigido por: Dr. Hugo Castañeda Vázquez

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 15 Diciembre del 2005

REVISOR

Dr. Arturo Valdivia Flores

REVISOR

Dr. Agustín Ramírez Álvarez

REVISOR

Dr. Hugo Castañeda Vázquez

c.c.p. Archivo

DEDICATORIA

A mi esposa: Blanca A. López Rojas

A mis padres: Roberto Valdivia Nieves

Cleotilde Vázquez Mercado

A mis hermanos: Roberto, Carlos, Efraín , Martín, José, Imelda y Jaime.

Que siempre me apoyaron en todo momento en especial en aquellos donde los escollos a los que me enfrente parecían infranqueables lo cual me dio deseo y fortaleza de continuar hasta finalizar el posgrado, ah ellos todo mi agradecimiento.

A mis hijos. Cristofer y Oscar, por cambiarles disfrutar los momentos de regocijo a su lado, por días y noches de desvelo hacia el rumbo de la superación, ha ellos los que cada vez que contemplaba sus caritas inocentes me proporcionaron la tranquilidad necesaria para reconocer que las dificultades con las que me encontré tenían solución, a ellos todo mi cariño.

Al Divino Maestro. por retroalimentar mi espíritu cada vez que las cosas parecían inalcanzables y desalentadoras.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor de tesis: Dr. Hugo Castañeda Vázquez

Por la ayuda y colaboración sin condiciones que me otorgó e hicieron posible la culminación de esta tesis, pero principalmente por su amistad y consejos siempre oportunos a los:

Dr. Alaniz de la O Ricardo
Dr. Albarran Rodríguez Esther
M. en C. de la Torre Covarrubias José Luis
Dra. Luis Juan Morales Angélica
Dr. Martín del Campo Moreno Castulo I.
Dr. Moreno Martínez Juan Manuel
M. en C. Pacheco Gallardo Carlos
Dr. Roa J. Juan
Dr. Villagomez Zavala Daniel A. F.

Mis amigos los cuales sin su ayuda, este trabajo de investigación no habría sido posible de realizar

A todos los que intervinieron e hicieron posible la culminación de este trabajo de investigación

A la Universidad de Guadalajara y a la Secretaría de Educación Pública Jalisco.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes

A la Universidad de Colima.

Identificación y tipificación genética de cepas de Staphylococcus aureus de vacas con mastitis en la Región centro de Jalisco

INDICE:

LISTA DE ABREVIATURAS -----		iii
1.0. RESUMEN -----		iv
2.0. INTRODUCCIÓN-----		1
2.1.	Producción de leche a nivel mundial -----	1
2.2.	Producción de leche en América Latina -----	3
2.3.	Producción de leche por entidad federativa -----	4
2.4.	Producción de leche por región en Jalisco -----	5
2.5.	Producción de leche en la zona centro de Jalisco -----	5
2.6.	Jalisco -----	7
2.7.	Situación geográfica región centro de Jalisco -----	
2.7.1.	Zapotlanejo-----	7
2.8.	Descripción geográfica -----	7
2.8.1.	La Mastitis (Definición) -----	9
2.9.	Factores predisponentes -----	11
2.9.1	Anatomía y Fisiología de la glándula mamaria --	12
2.10.	Alteraciones de la leche -----	13
2.10.1	Causas bacterianas de la mastitis -----	15
2.10.2	Patógenos contagiosos de la mastitis -----	16
	Fuentes de microorganismos causantes de mastitis -----	19
2.10.3	Tipos de mastitis -----	19
2.10.4	Métodos de detección de mastitis -----	20
2.10.5	Diagnostico de la mastitis -----	24
2.10.6	Prueba de California -----	26
2.10.7	Pruebas bacteriológicas -----	30
2.11	Importancia de S. aureus en la salud Pública ---	33
2.11.1	Enfermedades transmisibles al Hombre por	
2.11.2	leche -----	34
2.11.3	Intoxicación Alimentaria -----	35
2.11.4	Etiología -----	35

	Período de incubación -----	36
2.11.5	Resistencia de los agentes etiológicos -----	36
2.11.6	Características principales del S. aureus -----	36
2.11.7	Genero de S. aureus -----	37
2.11.8	Hábitat -----	38
2.11.9	Productos extracelulares -----	38
2.11.10	Clasificación -----	39
2.11.11	Epidemiología -----	39
2.11.12	Toxinas y enzimas de S. aureus -----	39
2.11.13	Enterotoxinas A-E-----	40
2.11.14	Patogenicidad -----	40
2.11.15	Hemolisinas -----	40
2.11.16	Inmunología -----	41
2.12	Higiene de la leche -----	42
2.12.1	La Salud del Hato lechero -----	43
2.12.2	Identificación de mastitis clínica y subclínica ---	45
2.12.3	Industrialización de la leche -----	46
2.12.4	Bajas en la producción -----	47
2.12.5	Diagnostico y control -----	47
2.13	La utilización de la PCR -----	51
2.13.1	Los Oligonucleótidos -----	53
2.13.2	Productos de la Reacción -----	53
3.0	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	56
4.0	JUSTIFICACIÓN -----	57
5.0	HIPÓTESIS -----	59
6.0	OBJETIVOS -----	60
6.1	General -----	60
6.2	Particulares -----	60
7.0	MATERIAL Y MÉTODOS -----	61
7.1	Colecta aséptica de muestras -----	61
7.2	Toma de muestras -----	61
7.3	Presencia de lesiones -----	61

7.4	Preparación de los pezones -----	62
7.5	Transporte de muestras -----	62
7.6	Procesado de las muestras -----	62
7.7	Identificación de mastitis -----	63
7.8	Identificación morfológica y bioquímica -----	63
7.9	Cultivos bacteriológicos -----	63
7.10	Medios de cultivo -----	63
7.11	Aislamiento de S. aureus -----	63
7.12	Diseño Experimental -----	64
7.13	Identificación de S. aureus por PCR -----	64
7.14	Taq polimerasa -----	64
7.15	Ciclos de PCR -----	64
7.16	Extracción de ADN -----	65
7.17	Pureza del ADN -----	65
7.18	PCR -----	66
7.19	Secuencia de los cebadores -----	66
7.20	Azarosa -----	66
7.21	Electroforesis -----	66
7.22	Determinación del gen Spa y Coa -----	66
8.0	RESULTADOS -----	67
8.1	Prueba de California -----	67
8.2	Época del año -----	67
8.3	Porcentajes positivos y negativos -----	68
8.4	Porcentajes por época del año -----	68
8.5	Porcentajes totales -----	68
8.6	Análisis Estadístico -----	70
8.7	Polimorfismo del gen Spa -----	81
8.8	Polimorfismo del gen Coa -----	83
9.0	DISCUSIÓN -----	86
10.0	CONCLUSIÓN -----	89
11.0	BIBLIOGRAFÍA -----	90
12.0	ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ATCC	Colección Americana de Tipos de Cultivos
AP-PCR	Arbitrarios Primers
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ASTEL	Agar de Soya de Trypticase
bp	Pares de bases
BAM	Manual de Bacteriología Analítica
Cel	Célula
CDNA	secuencia de Ácido Desoxiribonucleico
CCS	Conteo de Células Somáticas
CMT	Prueba de California para Mastitis
Coa	Gen coagulasa
CST	Caldo soya tripticase
dNTPs	deoxinucleotido trifosfatos
dsDNA	hélice doble de Ácido Desoxiribonucleico
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
EUA	Estados Unidos de Norteamérica
EDTA	Etilen Diamino Tetra Acético.
FDA	Alimentos y Drogas Administración
g	Gramos
H	Horas
Kb	Kilobases
kPa	Kilo Pascáles
Log	Logaritmos

mg	Miligramos
μ l	Microlitros
ml	Mililitro
mm	milímetros
μ M	microMoles
mM	miliMoles
min	Minutos
M	Molar
N	Normal
N\$	Nuevos pesos
Na(OH)	Hidróxido de Sodio
NASBA	Secuenciación de ácidos nucleicos
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Probabilidad
pH	Potencial de Hidrógeno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pol	Polimerasa
ppm	partes por millón
RFLP	Polimorfismo de extensión de fragmentos por restricción
RT-PCR	Reversa Transcripción
Spa	Gen Staphylococcus proteína a
Seg	Segundo
snm	sobre nivel del mar
STH	Hormona Somatotropa

SSA	Secretaría de Salubridad y Asistencia
Taq	Thermus aquaticus
Taq-pol	Thermus aquaticus polimerasa
ufc	unidades formadoras de colonias
VP	Vaciado en Placa

RESUMEN

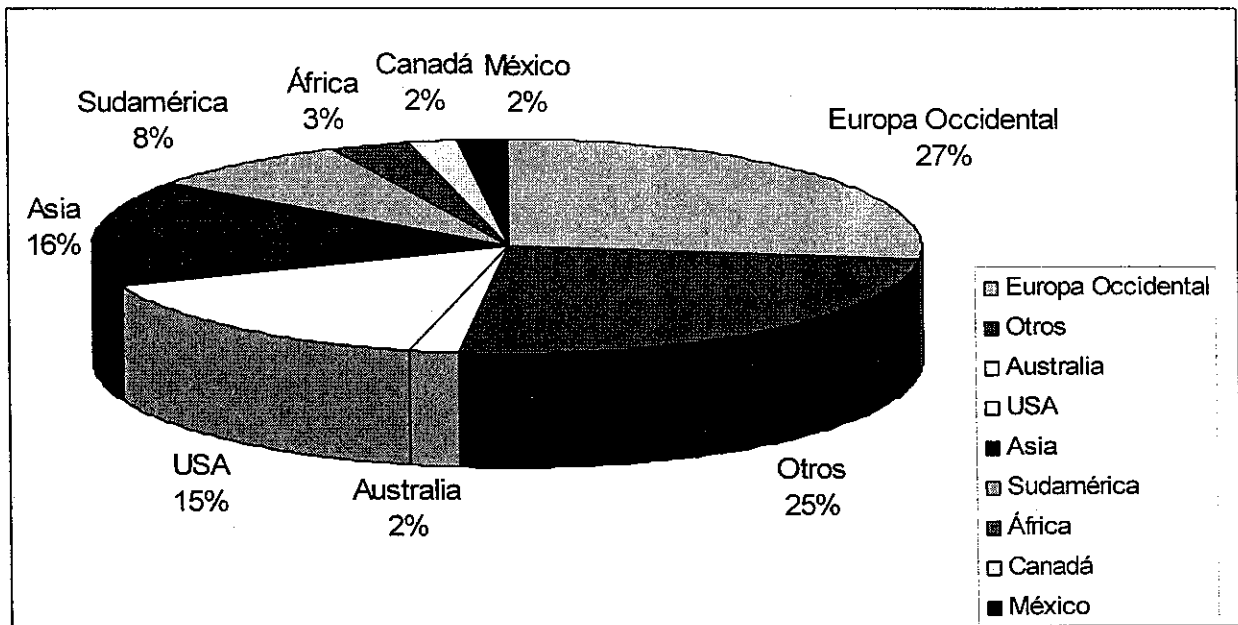
La mastitis es uno de los principales problemas que afecta a nivel mundial la industria lechera, y en particular a los productores de leche. A pesar de los importantes avances de la ciencia en medicina veterinaria, la mastitis bovina constituye uno de los factores negativos para la obtención de leche de buena calidad, y para la eficiencia en la producción de leche en la mayoría de los establos de México y el mundo. Entre los diferentes microorganismos causantes de mastitis el *Staphylococcus aureus*, se considera como uno de los principales agentes patógenos que causan la enfermedad. El objetivo de la presente investigación fue identificar y tipificar *S.aureus* como agente causal de mastitis bovina, mediante pruebas bioquímicas y genéticas. Se muestrearon 300 vacas de las cuales fueron aisladas 70 cepas de *S. aureus* de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica de cuatro establos de Pueblo Viejo, municipio de Zapotlanejo región centro de Jalisco. Se determino el perfil y polimorfismo genético mediante PCR, con primers de los genes Spa. y Coa. Se usaron dos cebadores diferentes, mediante la técnica de PCR. Los resultados fueron uniformemente positivos para los segmentos del gen que codifica una parte específica del *S.aureus*, Específicamente codifican para la coagulasa (coa) y la proteína A (Spa). Todas las cepas investigadas fueron positivas al polimorfismo, y fueron detectadas en un número variable de aislamientos. Pudieron ser observadas diferencias significativas entre cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica, en la distribución del tamaño del amplicon para el gen Coa y para el segmento codificador de la región X del gen spa respectivamente.

2.0. INTRODUCCIÓN

2.1. Producción de leche a nivel mundial .

Existen países con una clara tendencia a incrementar los volúmenes de producción y no solo abastecerse, sino también proveer de este producto a otras naciones. Las principales esferas mundiales productoras de leche se localizan en Europa Occidental con una participación del 27%, seguido por América del Norte con el 19%, Asia con el 16%, Sudamérica con el 8%, África con el 3%, Australia con el 2% y el resto de países con el 25%. (Gráfica 1), (FAO 2004).

Gráfica1: Estructura Porcentual de la Producción Mundial de Leche.

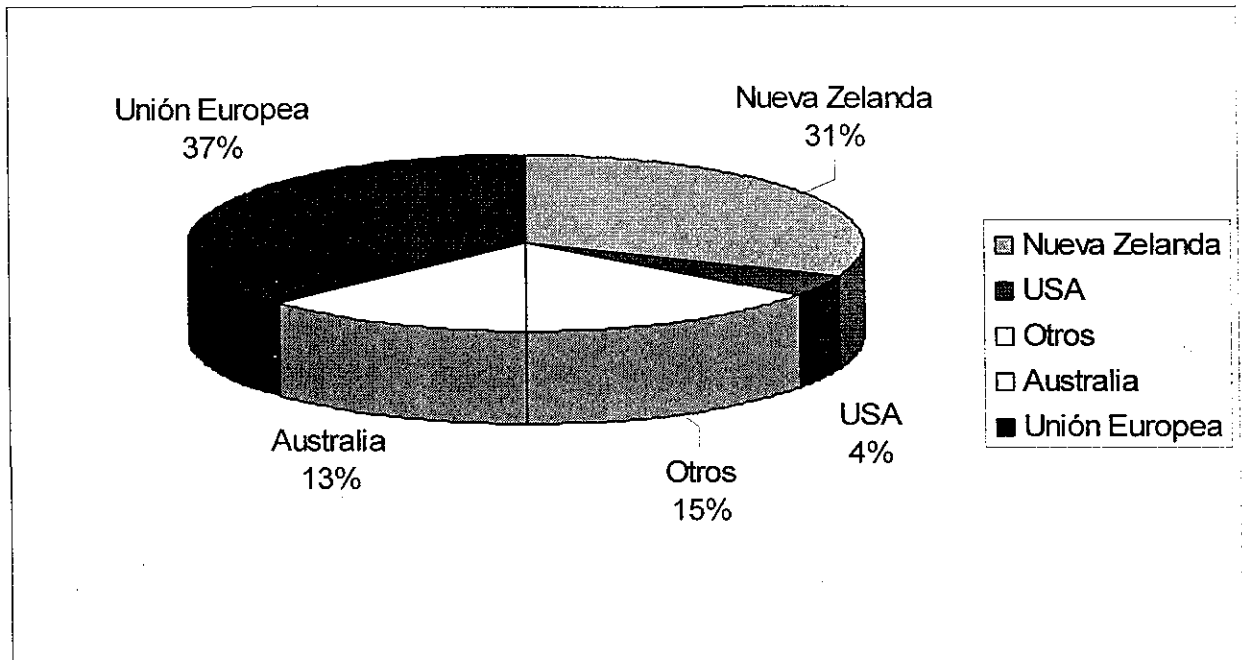


Otros(25%). Australia(2%). México(2%). Canadá(2%). África(3%). Sudamérica(8%). Asia(16%). USA(15%). Europa Occ.(27%).

De estas zonas lecheras, muchos países se dedican no solamente al autoabastecimiento, sino también a la venta del excedente producido en sus respectivos países, y que se encuentran ya consolidados en el mercado internacional, los altos aranceles protegen su producción e impiden el ingreso del mismo producto por parte de otros países.

Es por ello que sólo el 6% de la oferta mundial de leche es accesible al mercado mundial y los principales países que intervienen en el comercio internacional son Australia, Nueva Zelanda, Unión Europea y Estados Unidos (Gráfica 2), (FAO 2004).

Grafica 2. Participación del mercado del comercio mundial de Leche.



Unión Europea (37%), Nueva Zelanda(31%), Otros(15%), Australia(13%) ,. USA(4%).

Dinamarca, Alemania y Austria son los países líderes en Europa en la producción de leche. Dinamarca es el país con 20.5%. Seguido de Alemania con el (12%) y Austria con el 9% (Schelhaas et al., 2000).

De los ingresos totales de ventas en la unión europea, la leche tiene una proporción del 26% (15.6 billones de Euros). Los daños ocasionados por la mastitis se han calculado entre 150 y 200 Euros por vaca por año. Esto representa para los ganaderos alemanes una pérdida anual de 740 a 2,000 millones de euros (Wolter et al., 1999).

En Estados Unidos las pérdidas económicas por mastitis son de

\$225 dólares por vaca al año. Representando pérdida anual del 64%, Francia tiene el porcentaje mas alto con un 70.3%, Israel estima una pérdida de 130 dólares por vaca por año con un 20% de descarte de vacas por disminución en la producción (Seddek et al., 2001).

En Latinoamérica las pérdidas económicas por mastitis son de 1.700 a 2000 pesos promedio por vaca anuales. Representando 7.400 a 10.000 millones de pesos (FAO 2004).

En el caso del estado de Hesse en Alemania, Holanda y los Estados Unidos los problemas de mastitis es la segunda causa mas común en la eliminación del 19.4% de las vacas lecheras (Wolter et al., 1999). En Latinoamérica el 26.5% (Castañeda et al.,2004).

2.2. Producción de leche en América Latina.

Podemos decir que el principal productor de leche es Colombia con más de 5,300.000 toneladas por año. Venezuela y Ecuador con un poco más de 1,300.000. El Perú con 1,100.000. toneladas y finalmente Bolivia con 230.000 toneladas anuales(FAO 2004).

Estas investigaciones aplicadas a la ganadería en México representan altos costos económicos por causa de mastitis clínica y subclínica. Con un costo de 1,150 a 2.500 pesos por vaca anual (FAO 2004).

Actualmente la producción de leche bovina es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico y socioeconómico. Se clasifican cuatro tipos de sistemas de producción: el especializado, que contribuye con el 50%, el semi-especializado con el 21%, el de doble propósito con el 29%, y el familiar o de traspatio, con el 9% (Kloppert et al;2004. Castañeda et al., 2004).

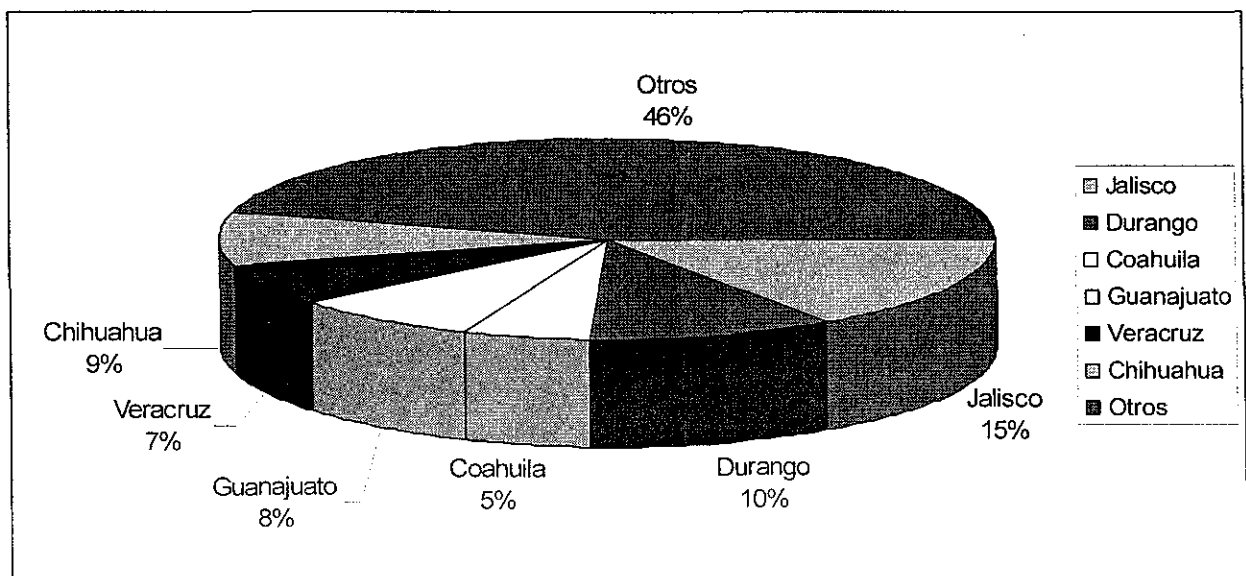
2.3. Producción de leche por entidad federativa.

El sistema especializado aportó el 51% de esta producción, la cual en su mayor parte es bajo sistemas semi-intensivos que han llevado al uso de sustancias químicas, hormonas y antibióticos que han aumentado la producción a un elevado costo para la salud y el ambiente (INEGI,2004. NMC.2004).

Dentro de la República Mexicana, la producción de leche por entidad federativa se concentra en el estado de Jalisco, que aporta el 14.9% del total nacional; le siguen el estado de Durango con 9.96%, Coahuila con 9.47%, Chihuahua con 8.38%, Guanajuato con 7.68% y Veracruz con

(6.36%) del total nacional; en conjunto contribuyeron con 3,530.6 millones de litros que representa el 56.7% de la producción total del país,(Gráfica 4), (FAO, 2004).

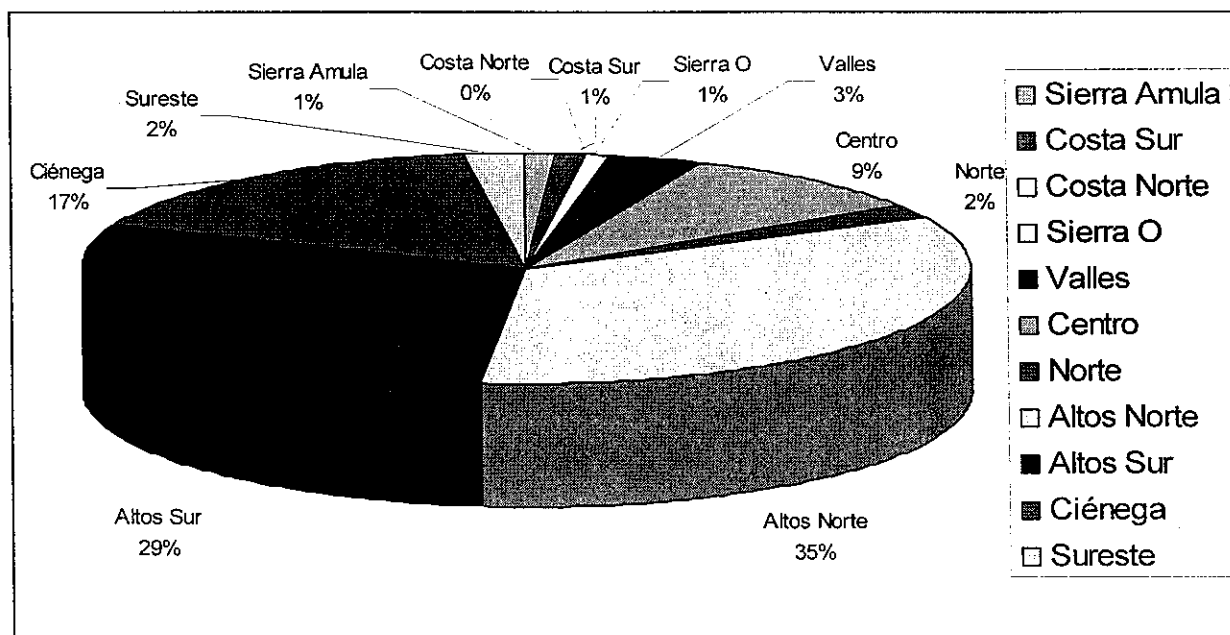
Gráfica 4. Producción de leche por entidad federativa.



2.4. Producción de leche por región en Jalisco.

La producción de leche en Jalisco, en el 2004 fue de 1,712.547 litros,. Región I. Norte 28.480 Litros que corresponde a el (2%). Región II. Altos Norte 557.437. Litros el (32%). Región III. Altos Sur 479.423 Litros el (28%). Región IV. Ciénega 266.111 Litros el (16%). Región V. Sureste 35.938 Litros el (2%). Región VI. Sur 93.906 Litros el (5%). Región VII. Sierra Amula 19.375 Litros el (1%). Región VIII. Costa Sur 9.411 Litros el (1%). Región IX. Costa Norte 8.349 Litros el (0%). Región X. Sierra Occidente 14.987 Litros el (1%). Región XI. Valles 42.874 Litros el (3%). Región XII Centro 156.256 Litros el (9%). (Gráfica 5), (INEGI. 2004).

Gráfica 5. Producción de leche en Jalisco por región. (INEGI. 2004).



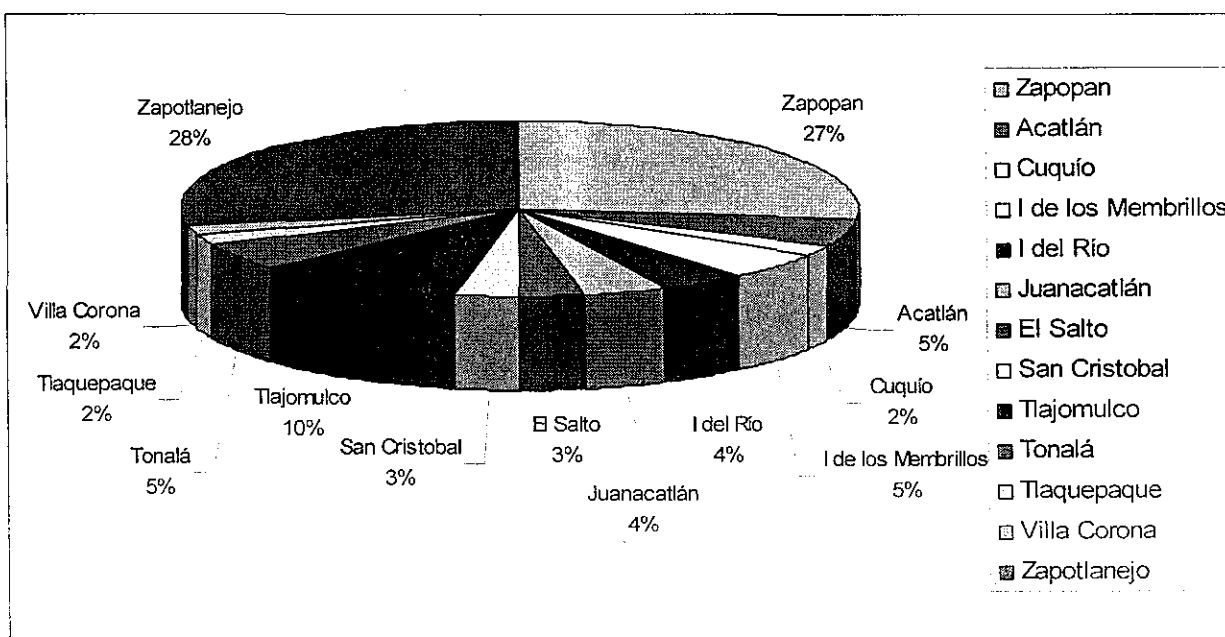
2.5. Producción de leche de la zona centro de Jalisco

La ganadería en la producción de leche es la principal actividad del sector agropecuario de la región centro y una de las mas importantes

del país. De las 995.438 vacas lecheras inventariadas en el estado de Jalisco durante el año 2004 aproximadamente el 16% se explota en la región centro con 162.994 vacas que aportan el 9% de la leche que se produce en el estado (SAGARPA,2004. INEGI.2004).

La producción de leche en la región centro, en el 2003 fue de 156.256 litros, de los cuales Acatlán de Juárez aporta 7.488 litros que corresponde a el (5%). Cuquío con 3.423 litros a el (2%), Ixtlahuacán de los Membrillos con 8.034 litros a el (5%), Ixtlahuacán del Río con 6.368 litros a el (4%), Juanacatlán con 5.904 litros a el (4%), El Salto con 4.519 litros a el (3%), San Cristóbal con 4.347 litros a el (3%), Tlajomulco de Zúñiga con 14.871 litros a el (10%), Tlaquepaque con 3.668 litros a el (2%), Tonalá con 7.991 litros a el , (5%), Villa Corona con 2.693 litros a el (2%), Zapopan con 41.915 litros a el (27%), Zapotlanejo con 45.036 litros a el (28%). (Gráfica 6), (INEGI.2004).

Gráfica 6. Producción de leche en la región centro de Jalisco (INEGI.2004).



2.6. Situación geográfica de la región centro de Jalisco

La región centro se localiza en la altiplanicie jalisciense y de acuerdo a su orografía se puede situar en la porción media central y de los altos. Formando parte de la comarca central del valle de Tepatitlán. Entre los 20°25'02'' de latitud norte y los 103°05'24'' y de longitud oeste,

2.7. Zapotlanejo.

Su nombre significa "lugar de zapotes" antes de la llegada de los españoles estuvo habitada por tribus tecuexes, que se establecieron alrededor del año 1218. en 1530 fue conquistada por Cristóbal de Oñate, y en 1824 designada capital del departamento de Tonalá (Jalisco).

2.7.1. Descripción Geográfica

Se localiza al oriente del estado, en las coordenadas 20°27'32'' a los 20°47'40'' de latitud norte y de los 102°52'20'' a los 103°17'05'' de longitud oeste, a una altura de 1.596 metros sobre el nivel del mar a 5 kilómetros de la izquierda del río Calderón.

Delimitación

Limita al norte con los municipios de Ixtlahuacan del Río y Cuquío; al sur con Juanacatlán y Zapotlán del Rey; al oriente con Tototlán, Tepatitlan y Acatic y al poniente con Juanacatlán, Tonalá y parte de Guadalajara.

Su extensión territorial es de 643.02 Km²

Datos Físicos

Geología.- los terrenos del municipio pertenecen al periodo Cuaternario.

Topografía.- este municipio está formado básicamente por derivaciones de la Sierra Madre Occidental. Su porción central es un amplio corredor con alturas entre 1.500 y 1.700 metros sobre el nivel del

mar. Las alturas inferiores a 1.500 metros sobre el nivel del mar se encuentran formando las barrancas por donde corren los ríos Verde y Santiago. Las alturas superiores a 1.700 metros se ubican de la siguiente manera: los cerros Colorado y la Verdolaga (1.870 y 1.750 metros, snm, al noreste del municipio; en la zona centro-este, se encuentran algunas elevaciones con alturas ligeramente superiores a los 2.000 metros; y la zona sur, en donde se ubica el cerro Grande con 2.700 metros sobre el nivel del mar.

Clima

El clima del municipio es semiseco con invierno y primavera secos y semicálido, sin estación invernal definida. La temperatura media anual es de 19.8°C y tiene una precipitación media anual de 945.3 milímetros, con régimen de lluvias en los meses de junio, julio y agosto. Los vientos dominantes son en dirección sureste. El promedio de días con heladas al año es de 3 (INEGI JAL.2004).

Hidrografía

Existen los ríos Calderón, Santiago y Verde; los arroyos Zapotlanejo, La Laja, Paso del Lobo, Agua Caliente, San Agustín, Pila Colorada, Chilares y Robaderas, entre otros. Cuenta además con las presas "La Joya", "Elías González Chávez", "Partidas" y numerosos bordos secundarios.

Suelos

Este municipio está clasificado como agrícola, ganadero, avícola y apícola; en sus alrededores se cultiva caña de azúcar, cacahuate, legumbres y tabaco. Sus principales actividades productivas se concentran en la pesca, minería y en la cantera, Su artesanía se basa en la confección de prendas de vestir deshiladas.

Recursos Naturales

La riqueza natural con que cuenta el municipio está representada por 4,700 hectáreas de bosque, donde predominan especies de encino,

pino y madroño, principalmente. Sus recursos minerales son yacimientos de mármol, cantera, grava, arena, arcilla y piedras de construcción.

Uso del suelo

La mayor parte del suelo tiene un uso pecuario. La tenencia de la tierra en su mayoría corresponde a la propiedad privada (INEGI.2004. SNIM.2004).

2.8. Definición de la Mastitis.

El termino mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria sea cual sea su causa. Este termino deriva del griego "mastos" mama e "itis", inflamación, la enfermedad puede ocurrir en cualquier mamífero, de mayor frecuencia e importancia en la vaca lechera, ya que produce cambios importantes en la composición de la leche y disminuye la producción láctea (Bedolla et al.,2004).

La mastitis es una respuesta a una inflamación inespecífica en la ubre de la vaca, es común a causas de tipo bacteriana, cambiante con el tiempo, de distinta variedad, duración de acuerdo al tipo y concentración de desafío bacteriano. La inflamación e infección son eventos relacionados, pero no necesariamente presentes en forma simultanea y cada uno con su dinámica propia de evolución (Álvarez et al.,2001. Castellanos et al., 2001).

La mastitis bovina, es por definición patológica, la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria a una agresión externa o interna que desencadene el complejo mecanismo de base humoral y celular que la constituye (Álvarez et al.,2002).

La mastitis bovina a menudo es crónica, es importante que se identifiquen rápidamente los nuevos casos clínicos para que se controle la infección en el hato lechero (Field et al.,2003).

Este concepto no debe de perderse, ya que las diferencias y similitudes que implica la colonización bacteriana del canal del pezón, infección establecida y la respuesta inflamatoria como mecanismo de defensa de las estructuras en ambos casos pertenece al 70-80% de los casos de mastitis son de naturaleza bacteriana, las que provocan mayores pérdidas en la ganadería lechera (Romero et al.,2004.).

Sin embargo, el 20-30% restante, es no infecciosa; lesiones traumáticas, disturbios secretorios de base metabólico-nutricional, situaciones de estrés, cambios fisiológicos asociados con una región temprana del epitelio secretor de la ubre; o el número de bacterias infectantes eliminadas en la leche es tan baja que no pueden ser detectadas al cultivo bacteriano o el cuarto a eliminado rápidamente el estado de infección, permaneciendo por días o semanas en estado de reacción, inflamatoria, con el número de células somáticas de la leche (Wolter et al.,1999).

Esto, unido al hecho de las causas múltiples bacterianas, con los diferentes mecanismos de infección, la epidemiología, grado y duración de la reacción inflamatoria de acuerdo a la bacteria actuante, la colonización transitoria del canal del pezón considerada como una infección latente o en estado subclínico y como una infección activa (Bedolla et al.,2004).

Con ello se promueve una acción inflamatoria local de baja intensidad pero suficiente para elevar el conteo de células somáticas en la muestra de leche, en los últimos años ha quedado demostrado el carácter dinámico de las colonizaciones del canal del pezón, de las infecciones intramamarias. Por trabajo de muestreo continuo, midiendo tanto parámetros de reacción inflamatoria como aislando e identificando las bacterias actuantes, las colonizaciones del canal del pezón, las infecciones subclínicas de corta duración, que probablemente sólo implican la colonización de los tejidos del canal y/o la cisterna del pezón (Castellanos et al., 2001).

La transmisión de esta enfermedad es de un animal enfermo a un sano por medio del ordeñador. Las pezoneras de la maquina ordeñadora, moscas, estiércol de los corrales (Rosas et al.,1992).

2.8.1. Factores predisponentes.

Facilitan la entrada del microorganismo o disminuye la resistencia del animal al crecimiento bacteriano desencadenando el proceso inflamatorio:

- Golpes, pisadas, heridas, cuarteaduras, mordiscos de la cría al mamar (Edgen et al.,1985).

- Ordeño inadecuado por alteraciones excesivas en el vacío, por sobre ordeño o por ordeño incompleto (Ensminger et al.,1991).

- Deficiente higiene de los implementos de ordeño, especialmente pezoneras (Wyest et al.,1982).

- Condiciones de clima y alojamiento inapropiados (Holstein. 1989).

- Alimentación mal balanceada y trastornos metabólicos (Wyest. 1982).

- Factores genéticos relacionados con el tamaño y la forma de los pezones y ligamentos superiores de la ubre (Reaves et al.,1985).

Clásicamente, los patógenos de la mastitis han sido divididos en organismos contagiosos y ambientales (Cuadro 3); en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su productividad de causas la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente (Bradley et al., 2001., Riffon et al;2001., Rossitto et al; 2002,).

Según (Riffon et al.2001), las bacterias responsables de la mastitis bovina, también pueden ser clasificadas como contagiosas y ambientales, dependiendo de su reservorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria infectada (Figura 1).

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp, y *Mycoplasma* spp. (Riffon et al;2001., Rossitto et al; 2002, Djabry et al.,2002). Son organismos transmitidos de vaca a vaca donde el reservorio primario que alberga los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre (Rossitto et al; 2002, Zadoks et al 2001), y la exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso de la ordeña (Bradley et al., 2001., Zadoks et al 2001 ., Zadoks et al 2002).

2.9. Anatomía de la Glándula mamaria, fisiología de la lactación y el reflejo de eyección de la leche.

La ubre es un cuerpo glandular, el cual sirve para la nutrición del becerro y consta de cuatro cuartos, cada cuarto presenta una unidad. Ello da como resultado que la enfermedad mastitis puede estar confinada a un cuarto, cada cuarto de la ubre consta del cuerpo glandular y el pezón, la cisterna de la glándula, los canales lácteos y los alvéolos con un espesor de 0.1 mm en promedio en donde se produce la leche (Sisson et al.,1986).

La lactación se mantiene a través de la regulación hormonal. La hormona somatotropa (STH) es la hormona galactopoyetica más importante en la vaca. Mediante la inyección de esta hormona puede ser aumentado claramente el rendimiento lácteo de la vaca. Otras hormonas que también son importantes para la secreción de la leche son las hormonas esteroides, estrógenos, progesterona, prolactina, glucoesteroides y la oxitocina (Frandsen et al.,1994).

Con él termino eyección de la leche se entiende la salida activa, la conducción de la leche alveolar de la porción alveolar a la cisterna de la ubre. Esta se inicia mediante la contracción del mioepitelio que rodea al alveolo.

La eyección de la leche es un proceso de expulsión, que se puede también denominar "disparo" de la leche. La eyección de la leche es el resultado de un reflejo involuntario neurohormonal que abarca los siguientes procesos:

1.- Estimulación de los receptores a la pared del pezón mediante; succión, masaje o estímulo de la ordeña y la transformación del estímulo en un impulso excitatorio.

2.- Transmisión de la excitación de las vías aferentes nerviosas y al hipotálamo.

3.- Liberación de la hormona oxitocina, la cual se forma en el núcleo paraventricular y supraóptico y por transporte axonal se almacena en la hipófisis posterior y de ahí se libera en la sangre.

4.- Transporte de la oxitocina de la sangre al mioepitelio de los alvéolos.

5.- Contracción de las células mioepiteliales por efecto de la oxitocina con los receptores oxitocínicos.

6.- La leche alveolar con esto es presionada de la parte alveolar a la porción cisternal alcanzando una presión intra mamaria de 1-4kPa (Castañeda et al., 2004).

2.9.1. Alteraciones más importantes de la leche.

La mayor parte de los consumidores aprecian la calidad de la leche de cualquier producto por su sabor; la leche no es una excepción. Los sabores que se encuentran más a menudo en la leche son:

Sabores de alimentos y melazas. Altas concentraciones en la dieta.

Sabor de óxido. Se ha descrito como sabor a cartón. Algunas de las causas de este fenómeno son: la contaminación metálica.

Sabor rancio. Es causado por una descomposición de la grasa, que libera ácidos de fuerte sabor, por la enzima lipasa.

Sabor a establo. Los establos sucios, una mala ventilación, la falta de higiene en el ordeño.

Sabor salado. Un gusto salado, que prácticamente anula su sabor algo dulce. Proveniente principalmente de vacas con mastitis.

Sabor a malta. Se debe principalmente al alto número de bacterias.

Sabor ácido o agrio. Es producido por una cantidad elevada de bacterias por la pérdida del enfriamiento.

Sabores extraños. Proceden de agentes medicinales y desinfectantes (Ensminger et al., 1977).

Cambios de color, Presencia de coágulos, Incremento de las proteínas de la sangre y leucocitos en el tejido mamario (Holstein. 2004., Castañeda et al., 2004).

Cuadro 1. Cambios en la composición de la leche ocasionados por la mastitis.

Parámetro	Cambio	Causa
Lactosa	Disminución	Disminuye la síntesis Pasan de la sangre
Caseína	Disminución	
Proteínas del suero	Aumento	
Cloruro	Aumento	
Sodio	Aumento	
pH	Aumento	Paso de las sustancias alcalinas a la sangre

2.10. Causas bacterianas de la mastitis.

Dentro de estas, muchas son consecuencia directa del mal manejo e higiene de la ordeña. En realidad no son las bacterias sino sus toxinas, las que producen la respuesta inflamatoria. La inflamación persistente ocasiona daños en los tejidos y el reemplazamiento de células secretoras de la ubre con tejido conectivo no productivo (o de cicatrización), ésta pérdida de tejido reduce la producción de leche (Castañeda et al. 2004).

Bacterias involucradas en mastitis (Cuadro 2)

	<i>uberis.</i>
	<i>agalactiae.</i>
	<i>dysgalactiae.</i>
<i>Streptococcus:</i>	<i>zooepidemicus</i>
	<i>fecalis</i>
	<i>pneumoniae</i>
	<i>pyogenes.</i>
	<i>aureus</i>
	<i>epidermidis</i>
	<i>citreus</i>
<i>Staphylococcus:</i>	<i>albus</i>
	<i>intermedius</i>
	<i>saprofiticus</i>
	<i>pyógenes</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Proteus mirábilis</i>
<i>Enterobacterias:</i>	<i>Salmonella parathyphi "a"</i>
	<i>Enterobacter aglomerans</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

pyógenes
Corynebacterium: hemoliticum
pseudotuberculosis

bovigenitalium
Mycoplasma: agalactiae var. bovis

fortuitum
Mycobacterium: tuberculosis

Pseudomona aureoginosa.

Sphaerophorus necróphorus.

Pasteurelis multocida.

Brucella abortus.

Nocardia sp.

Cryptococcus neofermans
Levaduras: *Candida albicans*
Trichosporum sp.

2.10.1 Los patógenos contagiosos de la mastitis.

El *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* son infecciosos a nivel individual y a nivel de población (Nash et al.,2002), Han sido reportados bajo control en los hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de las tetas después de la ordeña, terapia de la vaca seca, desecho, mantenimiento del equipo de ordeño, y terapia antibiótica de las infecciones intramamarias (Zadoks et al 2002).

A pesar de que la mastitis por organismos contagiosos (especialmente *Streptococcus agalactiae*) ha sido disminuido por mejoramiento en el manejo, las perdidas económicas debido a la enfermedad pueden continuar porque los organismos causales no pueden ser erradicados del medio ambiente de las vacas lecheras (Field et al., 2003. Nash et al., 2002).

Los patógenos ambientales a diferencia de los contagiosos son transmitidos entre las ordeñas con el ambiente que sirve como la fuente primaria de estos organismos. Los patógenos principales es este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, etc.), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* , y *Enterococcus* spp. (Oliveiro, 2002. Rossitto et al; 2002).

La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis (Calvinho et al., 1998. Phuektes et al., 2001).

Debido a que en la actualidad estos patógenos no han sido bien controlados por los métodos arriba mencionados, ahora están surgiendo como la causa más frecuente de mastitis en muchos hatos, particularmente bien manejados, hatos con bajo conteo de células somáticas (<200,000/ml) . (Rossitto et al; 2002).

Cuadro 3. Principales agentes patógenos causantes de la mastitis bovina.

Tipo de microorganismos.				
Contagiosos	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Mycoplasma spp</i> <i>Corynebacterium bovis</i> <i>Corynebacterium spp.</i>			
Ambientales	<i>Streptococcus no-agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis.</i>			
	Enterobacterias <table style="display: inline-table; vertical-align: middle; margin-left: 20px;"> <tr> <td><i>Escherichia coli</i></td> </tr> <tr> <td><i>Klebsiella spp</i></td> </tr> <tr> <td><i>Enterococcus spp.</i></td> </tr> </table>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella spp</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Klebsiella spp</i>				
<i>Enterococcus spp.</i>				

Tradicionalmente, los agentes más comunes causantes de la mastitis también han sido clasificados como patógenos mayores y menores según el grado de inflamación que estos producen en la glándula mamaria . (Ariznabarreta et al.,2002).

Los patógenos mayores son definidos como los patógenos responsables, la mayoría de las veces, de las mastitis clínicas o de fuertes respuestas inflamatorias (Ariznabarreta et al.,2002). Conteos elevados de células somáticas en la leche y comprenden al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus (uberis, agalactiae, dysgalactiae)*, (*Arcanobacterium pyogenes* y coliformes (White et al.,2002. Djabri et al., 2002. Boulanger et al., 2003).

Los patógenos menores son definidos como los patógenos que infectan la glándula mamaria, causando conteos moderados de células somáticas, pero en lo general no causan signos clínicos. Estas infecciones, son especialmente frecuentes, debidas sobre todo a otros *Staphylococcus* (principalmente *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, y *S. xylosus*) o por *Corynebacterium bovis* y *Micrococcaceae* coagulasa-negativos (White et al.,2002. White et al.,2002. Djabri et al., 2002).

2.10.2 Fuentes de microorganismos causantes de la mastitis bovina

Máquina de ordeño

Staphylococcus aureus
Streptococcus agalactiae

Ubre infectada

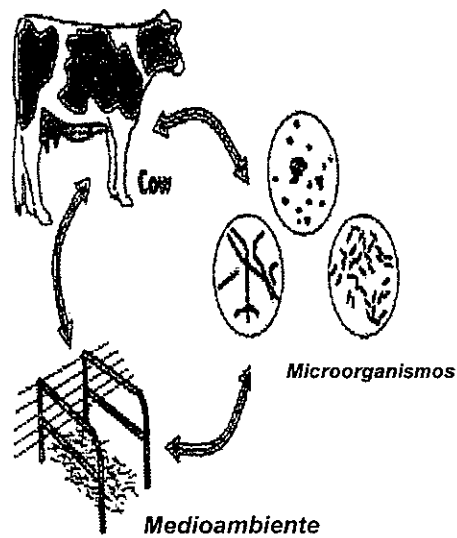
Staphylococcus aureus
Streptococcus agalactiae

Cama y piso del establo

Streptococcus uberis
Enterobacterias
Bacillus cereus

Piel de pezones y ubre

Staphylococci coagulasa negativos
Staphylococcus aureus
Streptococcus dysgalactiae



Moscas

Arcanobacterium pyogenes

Leche para terneras

Streptococcus agalactiae

Agua contaminada

Pseudomonas aeruginosa
Prototheca sp

Alimentos contaminados

Prototheca sp

Figura 1. Fuentes de microorganismos causantes de la mastitis bovina (Bedolla et al., 2004).

2.10.3. Tipos de mastitis.

La mastitis bovina normalmente se presenta como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica es decir, puede ser acompañada o no de signos clínicos (Bedolla. et al.,2003. Castañeda et al.,2003).

1.- Mastitis Clínica leve (mild clinical mastitis).

Anormalidades observables en la leche, por lo común copos o grumos sin signos aparentes o graves de hinchazón de la glándula mamaria o de reacciones sistémicas (Burvenich et al.,1995).

2.- Mastitis clínica recurrente (recurrent clinical mastitis).

Existen episodios múltiples de mastitis clínica en el mismo cuarto mamario, causados por el mismo patógeno y donde no ha ocurrido una curación bacteriológica entre los episodios clínicos (Castillo.1998).

3.- Mastitis contagiosa (contagious mastitis).

Transmisible causada por organismos patógenos contagiosos como *S. aureus* y *S. agalactiae* la transmisión pasa de una ubre infectada a una sana, principalmente durante el transcurso del ordeño. El reservorio de la enfermedad se encuentra en la ubre infectada (Chaffer et al.,1999).

4.- Mastitis crónica (chronic mastitis).

Una inflamación continuada de la ubre durante un período prolongado. Que puede ser clínica o subclínica (Leitner et al.,1993). Se presenta una infección de la ubre de larga duración con leche de apariencia normal o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre, infección resistente de la ubre que existe continuamente. A veces se desarrollan en la forma clínica. Después de esas apariciones bruscas, se produce un regreso a la forma subclínica (Schrick et al., 2001).

5.- Mastitis "de Verano" (summer mastitis).

Una forma de mastitis de vacas en periodo seco, estabuladas, que se caracteriza por un olor fétido y secreción de pus. Puede manifestarse como un proceso gangrenoso en el cual el pus encuentra salida mediante una fístula, esta causada por *Arcanobacterium pyogenes*, *peptococcus indolicus*, *Streptococcus dysgalatae*. La incidencia se forma en verano en países nórdicos y se relaciona con la posibilidad de moscas que actúan como vectores (Miller et al., 1993).

6.- Mastitis exacerbativa (exacerbative mastitis;"flare up").

Un proceso de mastitis clínica leve o subclínica que agrava su manifestación clínica. Se la denomina también "destello o fogonazo" de mastitis (Nickerson et al., 1998).

7.- Mastitis gangrenosa (gangrenous mastitis).

Proceso mediante el pus no encuentra salida. La glándula se manifiesta de color morado y después muerte subita (Saran et al., 1998).

8.- Mastitis no bacteriana (nonbacterial mastitis).

Una forma de inflamación de la glándula mamaria de la cual no pueden aislarse microorganismos patógenos para la ubre en muestras de leche, lo que no confirman necesariamente que el causante no haya sido un microorganismo. Se denomina a veces mastitis inespecífica (Sordillo et al., 1997).

9.- Mastitis aguda (acute mastitis).

Inflamación de la ubre caracterizada por su repentina aparición (Leitner et al., 1993). Inflamación grave con intensa sintomatología local y sistémica (Sordillo et al., 1997. de Mol et al., 2000).

10.- Mastitis clínica (clinical mastitis).

Inflamación de la ubre caracterizada por visibles anomalías en la leche y/o en la ubre. La gravedad de los casos clínicos debe

graduarse como leve, moderada (intermedia) o severa (Nickerson et al.,1998. Tollersrud et al., 2000).

Tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento, la leche presenta una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente (Heringstad et al., 2000; Barkema et al.,1999).

En algunos casos la inflamación de los cuartos mamarios es acompañada de signos clínicos (signos pronunciados de inflamación mamaria y de enfermedad sistémica), por lo que es diagnosticada entonces como mastitis clínica, La cual puede presentarse de manera aguda o crónica (Djabrí et al., 2002).

11.- Mastitis clínica aguda (acute clinical mastitis).

Inflamación de la ubre caracterizada por una aparición repentina, con signos visibles de anormalidad en la leche (Nickerson et al.,1998. Sordillo et al.,1997.de Mol et al.,2000).

Por su condición de aparición turbia, la leche es de apariencia anormal, hay enrojecimiento, tumefacción, y dolor en la ubre, con o sin síntomas sistémicos. Inflamación repentina del cuarto que puede sentirse caliente, duro y sensible al tacto. Puede hacerse sistémico con signos de fiebre, pulso rápido, depresión, debilidad y pérdida del apetito (Schrack et al., 2001).

12.- Mastitis clínica hiperaguda (peracute clinical mastitis).

Inflamación grave de la ubre caracterizada por su aparición repentina con intensa sintomatología local y sistémica (Nickerson et al.,1998).

Durante la primera lactación, este tipo de mastitis, resulta en obvias pérdidas como son disminución en la producción de leche y alteraciones en la composición de la misma (Barker et al., 1998).

13.- Mastitis subclínica (subclinical mastitis).

Inflamación de la glándula mamaria que no se manifiesta visiblemente y requiere pruebas de diagnóstico para su detección, siendo la más utilizada el recuento de células somáticas en la leche. Es la forma más prevalente de mastitis en ganaderías de vacuno lechero (Burvenich et al., 1995).

Ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas debido al reducido rendimiento de leche, y multas a causa de los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche una inflamación de la ubre sin síntomas externos reconocibles, el contenido de las células somáticas está elevado cuando en dos de tres muestreos se observa la presencia de agentes patógenos de mastitis. Forma en la que no hay inflamación en la glándula o una gran anomalía en la leche a simple vista (Wellenberg et al., 2002).

En otros casos, los signos de la mastitis son imperceptibles por observación directa. Esta es entonces diagnosticada como mastitis subclínica (Djabri et al., 2002). Por lo que las técnicas de laboratorio como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico son necesarios para detectar inflamación e infección (Barker et al., 1998).

Con base a lo anterior, la mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo patógeno en combinación con un conteo elevado de células somáticas de la leche (Tollersrud et al., 2000).

Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche (Barkema et al., 1999), composición alterada de la leche y la presencia de

componentes inflamatorios y bacterias en la leche (Heringstad et al., 2000).

2.10.4 Métodos de detección de mastitis bovina.

1. Monitoreo del conteo de células somáticas, Con el nombre de células somáticas se designa a las células del propio organismo. Por tanto, las células somáticas son células corporales. Éstas pasan a la leche procedentes de la sangre y del tejido glandular. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en periodo lactante; debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (Wolter et al., 2000).

La leche de una ubre sana presenta pocas células somáticas. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes (neutrófilos polimorfonucleares, granulocitos, macrófagos, linfocitos). El porcentaje de los diferentes tipos de células somáticas en la leche de las glándulas mamarias sanas es: a) macrófagos (60%); b) linfocitos (25%); y c) neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares (15%),. (Castañeda et al., 2004. Philpot, 2001. Wolter et al., 2004).

De todas las células de la leche de un cuarto infectado, aproximadamente el 99% serán leucocitos, mientras que el resto 1% serán células secretoras que se originan de los tejidos de la ubre. Juntos esos dos tipos de células constituyen la cuenta de células somáticas (CCS) de la leche que comúnmente es expresada en mililitros (/ml)., (Philpot, 2001).

El conteo de células somáticas (CCS) es la medición más ampliamente utilizada para supervisar el estado inflamatorio de las glándulas mamarias, y puede ser realizada en la leche de: (1).- cuartos individuales; (2).- vacas individuales; (3).- el hato completo; (4).- un grupo del hato (Philpot et al., 2001).

La infección intramamaria es el principal factor causante de cambios en el CCS de leche. Cuando los microorganismos causantes de mastitis invaden un cuarto de la ubre y empiezan a multiplicarse o cuando el número de estos aumenta significativamente en un cuarto infectado, el organismo de la vaca tiende a reclutar leucocitos para combatir a dichos microorganismos causantes de la mastitis (Philpot et al., 2001).

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20,000 a 50,000/ml. en grandes poblaciones de vacas, 80% de los animales no infectados tendrán un CCS menor de 200,000/ml y 50% menor de 100,000/ml. una razón de las cuentas ligeramente elevadas en animales no infectados es que algunos cuartos tuvieron una infección previa de la cual no se han recuperado totalmente (Philpot et al., 2001).

Según Philpot, (2001) datos obtenidos de numerosos estudios, señalan que la mayoría de las vacas con cuentas mayores de 300,000/ml probablemente no están infectadas, mientras que aquellas con un CCS entre 200,000 y 300,000/ml son difíciles de interpretar.

En base a lo anteriormente expuesto, cabe señalar que el registro ordenado de los resultados de las pruebas de monitoreo mensual de vacas individuales proporciona información muy útil para el manejo del hato, para el ganadero, y veterinario. Aunque estas pruebas de monitoreo no diagnostican la causa o tipo de infección o si hay una lesión presente, si alertan al ganadero y al veterinario. De que un problema se esta desarrollando, por lo que se debe poner mucha atención al respecto (Fernández et al, 1997).

2.10.5. Diagnostico de la mastitis.

Pruebas :

1.- Prueba del paño negro. Consiste en extraer unos chorros de leche haciéndolos pasar a través del paño. Si hay presencia de grumos . indica positivo a mastitis (Foley et al., 1982).

2.- Prueba de cloruros. La leche se pone en contacto en una titulación con nitrato de plata en solución 0.1N., la transformación de la solución en cuanto a su color en un amarillo intenso, es indicativo de mastitis (Heidrich et al.,1969).

3.- Prueba de catalasa. La enzima esta presente en células epiteliales, seroproteínas, leucocitos y estafilococos, cierta cantidad de catalasa puede encontrarse libre en la leche como resultado de la desintegración de células epiteliales y leucocitos, por lo que, la leche que proviene de animales con mastitis conteniendo gran número de bacterias y células somáticas tiene un gran contenido alto de catalasa, la prueba se basa en la liberación de oxígeno de O_2 a partir de H_2O_2 por la catalasa (BAM.2001).

4.- Prueba de whiteside modificada. Consiste en la adición de dos gotas de NaOH al 4% a 5 gotas de leche bien mezcladas, (si la leche es refrigerada, solo 1 gota) se deposita sobre una placa de cristal negra; mezclando cuidadosamente y agitando durante 20 a 30 segundos con una varilla de vidrio. El resultado se designa: -, +, ++, +++, +++++, El resultado será negativo si el aspecto de la leche no varía, positivo si se observan coagulaciones terrosas, en filamentos o en témpanos: y grado máximo de positividad. Si la mezcla se transforma en una masa viscosa, espesa, que desprenda un líquido claro (Heidrich et al.,1969).

5.-Prueba de wisconsin para mastitis (WMT).

Fue diseñada para el uso en el laboratorio, y es utilizada para

estimar el contenido de células somáticas de muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento, así como para muestreo de vacas individuales. Se utiliza una solución similar a la que se emplea con la prueba de California (CMT), pero en contraste con esta última, los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la velocidad. No cualitativamente o de estimarla como en la CMT (Fernández et al., 1997. NMC, 1999).

La técnica consiste en utilizar un tubo graduado en milímetros en donde se depositan 2 ml de leche y una mezcla de 2 ml de reactivo para CMT con agua destilada (1:1) ambas a temperatura ambiente. Enseguida se agita durante 10 segundos, horizontalmente y de izquierda a derecha. Se deja reposar 10 segundos.

Una vez transcurrido el tiempo, se procede a realizar la lectura en el tubo por debajo de la espuma que se forma, los resultados se relacionan con la escala graduada en mililitros del tubo y su valor de células somáticas, empleando para su interpretación una tabla específica para la prueba (Fernández et al., 1997).

6.- Conductividad eléctrica de la leche.

La prueba de conductividad eléctrica (PCE) se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro y se ha desarrollado como un método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca, se le encuentra como parte de algunos equipos de ordeño computarizados dentro de las salas de ordeño así como también en forma de medidores portátiles, lo que permite el monitoreo individual por cuarto (Medina et al., 2003. Montaldo et al, 2003).

Este instrumento proporciona una lectura digital del resultado de la PCE y representa una alternativa a la PCM como prueba de monitoreo de la mastitis subclínica al lado de la vaca; aunque a veces da como resultado en gran número de falsos positivos o de falsos negativos, por

lo que no es muy confiable (Medina et al.,2003. Montaldo et al., 2003. Wolter et al., 2004).

7.- Conteo de células somáticas por microscopia directa.

El recuento microscópico directo de células somáticas de la leche denominado también, método óptico, si bien es de referencia, actualmente es de poca utilidad cuando se trata de un gran número de muestras y se debe trabajar con una metodología mas rápida. Sin embargo, aun mantiene su utilidad para los trabajos de investigación (Saran et al.,2000. Chaffer et al.,2000).

8.- Método de conteo electrónico celular.

Los métodos electrónicos tienen en la actualidad una aplicación universal, sobre todo en laboratorios de control lechero o dedicados al diagnostico o investigación de la mastitis, utilizándose aparatos de recuento celulares como el Fossomatic (Foss Electric. Dinamarca) y el Counter Coulter (Coulter, Inglaterra), (Saran et al., 2000. Chaffer et al.,2000).

Estos dos aparatos poseen alta correlación con la microscopia óptica, por lo que proporcionan una medida segura en el recuento de células somáticas. Sin embargo, se pueden presentar variaciones en el recuento en las mismas muestras cuando se realizan con los dos aparatos debido a la diferencia de operación de cada una de ellos (Saran et al., 2000. Chaffer et al.,2000).

El fossomatic basa su cálculo en la tinción fluorométrica del material nuclear, mientras que el Counter Coulter cuenta el número de impulsos eléctricos resultantes de las partículas que pasan entre dos electrodos (Djabri et al., 2002). Es decir, cuenta partículas de un diámetro determinado, que para el caso serían las células, entrarían otras partículas, aumentando ligeramente el valor en comparación con el Fossomatic (Saran et al., 2000. Chaffer et al., 2000).

El Fossomatic consiste en el filtrado de una solución de leche mezclada con detergente (Triton X-100 EDTA) a través de una membrana con poros finos. Un procedimiento colorimétrico basado en la reacción con el ADN de las células es entonces utilizado para determinar el contenido de ADN que esta relacionado directamente con número de células presentes en la muestra inicial (Djabri et al.,2002).

En síntesis, se puede decir que el Fossomatic es un contador específico de ADN nuclear, cada célula produce un pulso eléctrico que se amplifica y se registra (Djabri et al.,2002).

La automatización de este proceso significa que pueden analizarse un gran número de muestras por hora en los laboratorios de pruebas de leche. En la mayoría de los casos, el Fossomatic utiliza leche fresca o conservada. Aunque han sido muy pocos los estudios que se han llevado a cabo con leche congelada (Barkema et al.,1997), ésta puede ser útil en caso de una avería en el equipo de CCS, o en los protocolos biológicos para muestras de leche congelada (Martínez et al., 2003).

9.- Prueba de California:

(CMT),desarrollada en la década de los 50s por Noorlander y Schalm en California. A sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado lechero (Medina et al.,2003. Montaldo et al.,2003.) prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de el recuento cuando es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Blowey et al.,1995. Edmonson et al.,1995).

2.10.6. Prueba de California

Se realiza directamente en el establo o sala de ordeño. El material requerido consta de una paleta de plástico con 4 perforaciones que van en coordinación con los pezones del animal.

1.- Se desecha la leche del pre-ordeño de dos a tres chorros.

Después de eliminar los primeros chorros de cada cuarto se toman las muestras en la sección adecuada de la paleta. Enseguida se agrega el reactivo a cada sección en igual cantidad que la leche (Montaldo et al., 2003.).

2.- Se ordeña cada cuarto en cada una de las placas de la paleta, aproximadamente 2ml.

3.- Se agrega el reactivo aproximadamente 2 ml.

4.- Se inclina la paleta de modo que se agite suavemente para mezclar la leche con el reactivo con movimientos circulares. Esto produce la reacción entre el reactivo y las células somáticas.

5.- Se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación.

Se mide la cantidad de coagulación (viscosidad) para calcular el número de células blancas (leucocitos) y otras células somáticas presentes,

Cuando mayor sea la formación del gel. Tanto más alto será el conteo de células existentes en la leche, indicándonos el grado de inflamación en cada cuarto de ubre (Castañeda et al.,2004. Wolter et al.,2002).

Antes de continuar con la siguiente vaca se tiene que enjuagar las cuatro placas de la paleta.

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases: desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifican. Esto se determina en relación a la reacción de gelificación (Cuadro 4), (Blowey et al., 1995. Edmonson et al., 1995).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, El reactivo a utilizar es el alquil aril sulfonato de sodio al 3%, indicador purpura de bromocresol en una concentración de 1:10,000. causando la liberación del ADN. De los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina (Montaldo et al., 2003).

A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una placa con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Saran et al., 2000. Chaffer et al., 2000. Medina et al., 2003).

Cuadro 4. Clasificación e interpretación de la prueba de California para mastitis.

CLASIFICACION CMT	DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN	RANGO CCS EN LECHE.
Negativo -	No hay gel visible	< 200,000/ml
Trazas +	Se observa una cantidad Ligera de gel al la inclinar paleta	150.000-500.000/ml
Positivo ++	Gel más pesado que no va hacia el centro al darle vueltas a la paleta.	400.000-1.500.000/ml
Positivo +++	Gel espeso que se desplaza Con rapidez hacia el centro de la paleta Rápidamente.	800.000- 5.000.000/ml
Positivo ++++	Gel ml espeso que se adhiere al fondo de la paleta	> 5.000.000/ml

Fuente. (NMC. 1999. Saran et al., 2000. Chaffer et al.,2000. Medina et al.,2003. Montaldo et al., 2003.).

Los valores sólo se utilizan como referencia aproximada puesto que hay grandes variaciones individuales hasta el extremo de considerar normal los recuentos celulares hasta de 250.000 células / ml; e incluso superiores. Además hay diferencias fisiológicas entre distintos cuartos, de tal forma que puede ser sólo relativo el incremento del número de células en la leche total de una mama (Montaldo et al., 2003.).

Los factores que influyen en el número de células son:

- Fase de lactación en que se efectuó el recuento. El incremento en esta etapa es constante en la época calostrual y al final de la lactación.
- Edad del animal.

Las vacas de mayor edad tienen más células en su leche que las jóvenes.

-Si la operación se efectuó al principio, mitad o al final del ordeño.

Los líquidos inicial y final del ordeño tienen un contenido especialmente elevado de células.

-Los incrementos patológicos son bastante frecuentes en comparación con los fisiológicos (Montaldo et al., 2003.).

2.10.7. Pruebas bacteriológicas para estimar la calidad de la leche:

Conteo directo al microscopio de células bacterianas contenidas en la leche a analizar. Las células bacterianas están presentes en la leche en forma normal a niveles bajos entre (50.000-200.000/ml.) y cuando se alcanzan niveles altos, entre 200.000/800.000 células/ml (NCM 2001. BAM 2001).

2.11. Importancia de *S. aureus* en la salud pública.

La intoxicación estafilocócica se encuentra dentro de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) más importantes en el ámbito mundial (FAO,2004) de todos los brotes de intoxicación alimentaria que se presentan en promedio en un 20%, se debe a alimentos que se encuentran contaminados con enterotoxinas producidas por el género *Staphylococcus* principalmente la especie *aureus* (NOM 115-1 1994., Torres et al., 1999).

En Asia, África y América Latina se calcula que más de un billón de episodios de diarrea aguda se presentan anualmente en los niños de menos de cinco años de edad, dando por resultado cerca de cinco millones de muertes (Volk et al.,1996).

En estados Unidos en 1997 se calcularon 185,000 intoxicaciones por *Staphylococcus* (Tauxe et al., 2002).

2.11.1. Enfermedades transmisibles al hombre a través de la leche.

Cuadro 5. Enfermedades transmisibles al hombre a través de la leche (Böhm, Heeschen 1995).

Enfermedades causadas por	Fuentes de Infección		
	Humano	La vaca	El medio ambiente
Bacterias			
Neumonía	X	X	
Meningitis	X		
Ántrax	X	X	
Toxina del Botulismo		X	
Brucelosis	X		
Cólera	X		
E. coli patógena	X	X	
Infección por Clostridium perfringens		X	
Difteria	X		
Enteritis(no específica)*	X	X	
Leptospirosis*	X		
Listeriosis	X		
Paratifo	X	X	
Salmonelosis (no influye Tifoidea y paratifoidea)	X	X	
Shigelosis	X		
Gastroenteritis por enterotoxina de Staphylococcus	X	X	
Infección por Strepto	X	X	
Tuberculosis	X	X	
Tifoidea	X		
Síndrome (choque tóxico)	X		
Virus			
Adenovirus*	X		
Virus de la fiebre aftosa		X	
Virus de hepatitis infec.	X		
Virus de la encefalitis (garrapatas).		X	
Rickettsias			
Fiebre Q.		X	
Protozoos			
Amibas	X		
Toxoplasma	X		X

*La transmisión no siempre es detectable en leche, si bien existen evidencias epidemiológicas.

2.11.2. Intoxicación alimentaria.

Una propiedad característica que comparten las bacterias que causan intoxicación alimentaria (También denominada envenenamiento alimentario) Es su ocurrencia con características de ubicuidad. Como resultado, ciertos alimentos se deben considerar como contaminados, con bacterias productoras de toxinas y (NOM 115-1 1994) se debe dar un manejo adecuado para mantenerlas en condiciones de seguridad para el consumo (Volk et al., 1996).

2.11.3. Etiología.

La intoxicación alimentaria por *S. aureus* es el tipo más común. Está causada por un coco pequeño gram-positivo, esféricos que se presentan en tétradas o racimos, inmóviles, no forman esporas y son aerobios y anaerobios facultativos, el mismo estafilococo responsable de muchos problemas infecciosos. crecen con facilidad en medios nutrientes comunes y aunque muchas cepas requieren de varios aminoácidos y una o más vitaminas B, no se pueden considerar como bacterias altamente exigentes, crece óptimamente a la temperatura corporal de 37°C, también crecen, aunque con mayor lentitud, a temperaturas por debajo de 10°C. (Volk et al., 1996).

Mientras se multiplican los estafilococos, las cepas que causan intoxicación alimentaria liberan una toxina en los alimentos "enterotoxina", debido a la reacción severa que causa en el aparato gastrointestinal. La enterotoxina TSS-1, La dosis infectiva es elevada, se necesitan de 10^6 a 10^7 bacterias de *S. aureus* por mililitro para una producción efectiva de enterotoxinas. Hasta el 20% de los tipos de este agente causal pueden producir las intoxicaciones. De estas, la de tipo C es la más común, y el las intoxicaciones humanas son mas frecuentes las de tipo A y D (Castañeda et al., 2004).

Una vez formada, no se puede destruir incluso ni siquiera

calentando demasiado el alimento. Una vez ingerida la enterotoxina del *Staphylococcus*, la característica sobresaliente de la intoxicación alimentaria cursa con diarrea grave, vomito y dolor abdominal (Volk et al.,1996).

2.11.4. Período de incubación.

El diagnostico sobresaliente es el corto periodo de incubación el tiempo que transcurre entre la ingestión del alimento y la instalación de la enfermedad misma, no es raro que muchas personas enfermen súbita y violentamente. El periodo de incubación común va de dos a cuatro horas y la ingestión puede dar por resultado el ingreso a una sala de urgencias. la duración de los síntomas agudos por lo general es de menos de 24 horas, los individuos se sienten bastante debilitados por varios días. Por lo general se hospitalizan para recibir líquidos intravenosos con objeto de restituir la pérdida hídrica a través de la diarrea y el vomito (Volk et al.,1996).

2.11.5. Resistencia de los agentes etiológicos

La resistencia de los agentes etiológicos hacia los antibióticos cada día las cifras son mas. Situación de no aplicar antibióticos que no aporten beneficio en la mejora de reducción marcadas contra la infección, seguirán ocasionando mas perdidas económicas. En relación con la resistencia hacia los antibióticos aplicados causando resistencia, se exige investigar tipos de antibióticos que nos permitan reducir los parámetros de resistencia.

2.11.6. Características principales del *S. aureus*.

Los estafilococos son cocos gram-positivos que se presentan en pares, cadenas cortas, tétradas y racimos con mayor frecuencia, Son aerobios y anaerobios facultativos, positivos a catalasa, negativos a oxidasa. no móviles, no esporuladores y fermentadores (Carter et al.,1994).

2.11.7. Género de *Staphylococcus*.

Actualmente el género *Staphylococcus* contiene 31 especies 14 de las cuales han sido aisladas de la glándula mamaria de bovinos (Cuadro.7) (Watts et al.,1988). los *Staphylococcus* coagulasa positivos incluyen *S.aureus*, *S.intermedius* y algunas cepas de *S. hyicus* (Bergeys. 2000. Watts et al.,1988).

(Cuadro 7). Géneros de *Staphylococcus* aislados de glándulas mamarias bovinas (Watts et al.,1988).

S. aureus
S. capitis
S. cohnii
S. chromogenes
S. epidermidis
S. haemolitycus
S. hyicus
S. hominis
S. intermedius
S. saprophyticus
S. sciuri
S. simulans
S. warneri
S. xylosus

Cuadro 8. Diferenciación de algunas especies de *Staphylococcus* y pruebas bioquímicas (BAM 2001. Bergey's 2000).

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.intermedius</i>	<i>S.hyicus</i>	<i>Subs.hyicus</i>
Coagulasa	+	-	+	d	d
Temonu- cleasa	+	-	+	+	+
Manitol	+	-	(d)	-	+
Maltosa	+	+	(w)	-	-
Hemolis	+	-	(d)	-	-
Acetoina	+	+	-	-	-
Pigmento carotenoide	+w	-	-	-	-

Simbología de reacción. () = retardada, w = retardada débil, d = débil 11.89% cepas positivas

Las técnicas usadas para la caracterización de *Staphylococcus* han desarrollado nuevos métodos como PFGE la cual resulta de gran importancia en las investigaciones epidemiológicas (Wolter et al.,2004).

Los agentes patógenos de la mastitis, se localizan principalmente en piel, mucosas, vías digestivas y respiratorias, dependiendo del hábitat donde se encuentran las vacas. La leche contiene células somáticas, que en una glándula mamaria sana solo se presentan en cantidades pequeñas. La importancia biológica de las células somáticas estriba en la intervención de la defensa contra infecciones en la ubre. En este caso se trata de células epiteliales y granulocitos polimorfonucleares-neutrófilos, macrófagos y linfocitos (Wolter et al.,2004).

2.11.8. Hábitat.

Comensal de piel y mucosas, en especial de vías digestivas y respiratorias, de hombres y animales por lo común causa mastitis, abscesos e infecciones cutáneas, infecciones en vías urinarias y heridas (Carter et al.,1994).

2.11.9. Productos extracelulares.

Algunas de las sustancias que se consideran intervienen en la producción de infecciones estafilocócicas, no todos estos productos pueden clasificarse como tóxicos, algunas investigaciones indican que algunas de las enzimas son potenciadoras de la virulencia (Wolter et al.,2000).

Capaces de incrementar las características invasivas del microorganismo y quizá lo protegen de los mecanismos corporales de defensa. Sus efectos se han demostrado en gran parte con experimentos en conejos y ratones (Carter et al.,1994).

2.11.10. Clasificación.

El sistema común de clasificación separa a los estafilococos de los micrococos con base en una capacidad para fermentar la glucosa con la producción de ácidos. Así, los miembros del género *Micrococcus* (que son en su mayor parte morfológicamente idénticos a los estafilococos) son incapaces de fermentar la glucosa para producir ácido. sin embargo, los micrococos pueden oxidar la glucosa aeróbicamente, pero no da por resultado formación de ácido (Bergey's 2000).

La presencia de la enzima catalasa. degrada el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno. La burbujas de oxígeno son visibles, los estreptococos no forman catalasa y, por tanto, no producen oxígeno "burbujas" (Volk et al.,1996).

2.11.11. Epidemiología.

Esencialmente todos los padecimientos serios en los que intervienen los estafilococos están causados por *S. aureus*. La capacidad de este organismo para producir enfermedad depende de su capacidad para resistir la fagocitosis y del efecto de algunas de las toxinas y enzimas secretadas por la célula (Volk et al.,1996).

2.11.12 Toxinas y enzimas de *S. aureus*.

La coagulasa es una enzima que secreta la bacteria en el ambiente. Activa un factor de reacción de coagulasa (CRF, siglas en inglés) normalmente presente en el plasma, que hace que el plasma se coagule mediante la conversión de fibrinógeno en fibrina (Carter et al.,1996).

Todos los estafilococos productores de coagulasa son por definición *S.aureus*. El papel de la coagulasa en la producción del padecimiento no esta claro, se ha postulado que puede cubrir a los microorganismos con fibrina para inhibir su fagocitosis (Wolter et

al.,2000).

S. aureus también produce un enlace que hace que los organismos formen grumos cuando se mezclan con el plasma, los enlaces de coagulasa pueden convertir el fibrinógeno directamente a fibrina y no se requiere de la presencia de CRF para su actividad (Carter et al.,1996. Volk et al 1996).

2.11.13 Enterotoxinas A-E.

Estas toxinas son proteínas extracelulares compuestas de cadenas polipeptídicas simples de alrededor de 30 Kilobases. Hay cinco grupos serológicos, designados SEA, SEB, SEC, SED, y SEE. Un sexto grupo, SEF, se ha dado de baja como enterotoxina y rebautizado como toxina-1 del síndrome del choque tóxico, Basándose en diferencias antigénicas menores, SEC se ha subdividido en tres tipos, SEC1, SEC2 y SEC3 (Wolter et al.,2000).

Estas toxinas son muy resistentes al calor (100°C por 30 minutos). Se requiere un entorno favorable para su producción como flanes, leche cruda, crema, helado, salsas para carne, pescado, queso u otras (Carter et al.,1996).

2.11.14. Patogenicidad.

Los individuos más susceptibles a las infecciones por estafilococos incluyen a aquellos cuya capacidad para fagocitar y destruir a los estafilococos no está completamente desarrollada o está inhibida de manera significativa (Volk et al.,1996).

2.11.15. Hemolisinas (hemotoxinas, citolisinas).

Todas las hemolisinas producidas por *S. aureus* dan una hemólisis tipo beta. Sin embargo, debido a su efecto variado en muchos tipos de células, con mayor frecuencia se denominan toxinas, Hay cuatro toxinas: alfa (α), beta (β), gama (γ) y delta (δ). Éstas se pueden diferenciar

mediante distinciones antigénicas y por el tipo de eritrocitos que lisan preferentemente. Las cuatro toxinas poseen propiedades que dan por resultado diversos grados de toxicidad para los leucocitos y las células tisulares. Algunas (particularmente la toxina alfa) mata a las células cutáneas y son letales si se inyectan en ratones y en conejos (Bergey's .2000).

Todas tienen características antigénicas distintas. Los eritrocitos de varias especies difieren en susceptibilidad. Las toxinas alfa y beta son hemolisinas potentes.

La toxina alfa es la más activa contra eritrocitos de conejo y genera la zona clara interna de hemólisis. Esta toxina genera espasmos del músculo liso es dermonecrotizante y mortal.

La toxina beta es esfingomielinasa C y origina la zona parcial exterior de hemólisis y la más activa contra eritrocitos de carnero.

La toxina gamma tiene un espectro hemolítico estrecho y es inhibida por agar y colesterol.

La toxina delta tiene un espectro hemolítico amplio y los fosfolípidos la inhiben.

2.11.16 Inmunología.

S.aureus también secreta una serie de enterotoxinas, penicilinas (que destruye la penicilina), y hialuronidasa (factor de diseminación), lipasa y estafilocinasa que lisa los coágulos de fibrina de una manera análoga a la acción de la estreptocinasa, el *S. aureus* posee un componente de superficie, la proteína A, que inhibe su fagocitosis mediante la unión a la porción Fc de la IgG; la proteína A por tanto compite con los leucocitos por la porción Fc de las opsoninas específicas (Carter et al.,1996. Volk et al.,1996).

El *S.aureus* produce normalmente un pigmento dorado claro y posee ácido teicoico ribitol en su pared celular que antigénicamente es distinto al ácido teicoico glicerol de *S.epidermidis* (Volk et al.,1996).

El 50% de las cepas de *S. aureus* producen la enterotoxina y algunas de ellas elaboran más de una. No existen pruebas metabólicas que permitan reconocer la enterotoxigenicidad de las cepas. En alimentos se observan algunas propiedades básicas cocos gram (+), catalasa (+), coagulasa (+), termonucleasa (+), crecen a 35oC y dan la reacción a la yema de huevo (+). Excepcionalmente se han aislado cepas de estafilococos coagulasa (-) y productora de enterotoxinas.(Bergey's. 2000.,NOM 115-1 1994).

La termonucleasa (Tnasa) es una desoxirribonucleasa termoestable, es una característica muy constante de las cepas enterotoxigenicas, la reacción a la yema de huevo se debe a que las bacterias producen una fosfolipoproteína lipasa que utiliza como sustrato, la lipovitelina (NOM. 115-1 1994. AOAC 1995).

El porcentaje de cepas productoras de enterotoxina según el origen de las mismas:

El 7% de las cepas de *S. aureus* son productoras de enterotoxinas (NOM. 115-1 1995) y el 20% de las vacas con mastitis es provocado por el agente infeccioso *S. aureus*, en nuestro país el consumo de productos lácteos no pasteurizados es una practica común, esto nos da una idea de la problemática de *S aureus* en leche (Tauxe et al.,2002. Wolter et al 1999. Volk et al.,1996)

2.12. Higiene de la leche.

En la actualidad los cambios sociales y económicos por los que atraviesa el mundo y en especial aquellos que afectan a los países latinoamericanos, representan el surgimiento de problemáticas multifactoriales, entre las que se encuentran la provisión de alimentos

para lo cual se deben cumplir todas las condiciones y medidas necesarias que aseguren la inocuidad y la aptitud de los mismos en todas las fases de la cadena alimentaria principalmente la leche (FAO,1997. Silos,1993).

El consumo de leche y sus derivados aporta valiosos nutrientes pero conlleva el riesgo de algunas enfermedades. El primer caso extrarregional documentado de contagio debido al consumo de leche es el de una epidemia de tifo en la ciudad de Plön, Alemania, en 1857, desde entonces no se puede negar que la leche es un alimento que puede poner en peligro la salud, en el ámbito mundial se han descrito unas 269 epidemias de 1857 a 1908 causadas por el consumo de leche, principalmente de tifo, cólera y tuberculosis (Castañeda et, al. 2004).

Roberto Koch dictó (1822) su conferencia sobre la etiología de la tuberculosis, por primera vez se hablo de la identificación plena de un microorganismo patógeno relacionado con el consumo de leche (Castañeda et al., 2004).

2.12.1 La salud del hato.

La salud del hato lechero de la zona centro de Jalisco, esta condicionada de manera importante, porque la mastitis puede ser una enfermedad mortal para las vacas. Esta enfermedad es causada primordialmente por bacterias que se encuentran en el medio debido a la falta de higiene, este factor contribuye en la ocurrencia de la enfermedad (Castañeda et al.,2004).

Los agentes contagiosos de mastitis pueden, a la larga únicamente sobrevivir en la ubre, por ello, es la glándula mamaria el reservorio principal de los mismos, estos pueden salir al exterior con facilidad en la leche (Adams et al.,1998. Berri et al.,2000. Wolter et al 1999).

Los patógenos presentes en el medio ambiente que pueden ser los

responsables de la mastitis bovina son:

E.coli, o contagiosos como el *S. aureus*, (*Sc. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *parauberis*, *uberis*) que dependen de su reservorio primario medioambiental contra el cuarto de la glándula mamaria infectada (Whitehead et al.,2000).

Los agentes clásicos contagiosos asociados a las vacas, afectan toda la ubre o grandes áreas de ellas. Los principales problemas en la actualidad en el ganado bovino productor de leche, son causados por algunas bacterias mas comunes del genero *Staphylococcus* como lo son el *S.saprophyticus* *S.hyicus* *S.epidermidis*, *S.intermidis* *S.chromogenes*, *S.simulans*, *S.wameri* y el mas contagioso el *Staphylococcus aureus*, (*Bergey's2000*).

El *S.aureus* agente patógeno ha sido una de las bacterias más comunes en los años sesentas así como en la actualidad. La mastitis por estafilococos tenía una escasa importancia. Actualmente se ha aislado *S. aureus* hasta un 20% de las muestras positivas en cultivos bacteriológicos de cuartos afectados por la mastitis (IDF.1981).

El *S. aureus* no está bien adaptado al tejido de la ubre como por ejemplo *S. agalactiae*, este patógeno tiene una gran resistencia fuera de la ubre bovina, y por ello puede vivir mucho tiempo fuera de ésta. *S. aureus* posee diferentes factores de patogenicidad (Factores aglutinantes, coagulasa, hemolisina, etc.) los cuales causan la enfermedad en la glándula mamaria. A pesar de su alta capacidad de sobrevivir en el ambiente, los cuartos infectados de la ubre juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad (Carter and Chengappa, 1994).

En la actualidad se le conoce a la mastitis bovina como una enfermedad compleja, con diferentes causas, grados de intensidad, duración y efectos residuales, que determinan la salud de la ubre y el

estado sanitario de la leche. Las bacterias causantes de mastitis pueden salir del cuarto afectado en la leche, y por lo general la glándula mamaria infectada secreta bacterias, representando esto un riesgo de contagio para los cuartos sanos (William et al., 1975. Bedolla et al., 2004).

2.12.2. Identificación de Mastitis Clínica y Subclínica en las Vacas.

Cuadro 6. Agentes Causales de Mastitis Clínica y Subclínica (Watts et al., 1989. Wolter et al., 2002).

MASTITIS CONTAGIOSA	MASTITIS MEDIOAMBIENTAL
Causada por: <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Causada por : <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> .
Fuente primaria: Ubres de vacas infectadas	Fuente primaria : El medio ambiente de la vaca
Forma de diseminación: De cuartos infectados a otros cuartos y a vacas en periodo de lactancia	Indicador del problema: Alto rango de mastitis clínica, usualmente en lactación temprana o durante la época de calor. Conteo de células somáticas menor de 300.000.
Indicadores del problema : Conteo de células somáticas en tanque por arriba de 300.000 células/ml. Frecuente aparición de mastitis clínica en las mismas vacas Presencia de <i>S. agalactiae</i> y/o <i>S. aureus</i> en los cultivos bacteriológicos de vacas infectadas	Recomendaciones de control: Reducir el número de bacterias a las que este expuesta el final de la teta . Mejorar la limpieza de los alrededores de la vaca especialmente en el ultimo periodo seco y durante el parto. Mejorar los procedimientos para asegurar la limpieza y secar las tetas, que van a ser ordeñadas.
Recomendaciones de control : Desarrollar un programa para prevenir la diseminación de bacterias en el periodo de lactación. Eliminar las infecciones existentes por tratamiento de todas las vacas en periodo seco y extracción de las vacas con mastitis crónica	Metas: Reducir la mastitis clínica a menos del 3% de las vacas lecheras por mes
Metas: Erradicar <i>S. agalactiae</i> del hato . Reducir las infecciones por <i>S. aureus</i> a menos del 5% de las vacas en el hato.	

Dentro de la sanidad en explotaciones lecheras se considera prioritario, el control sobre la mastitis bovina, enfermedad más común e importante de la vaca lechera (Andrews et al.,1992. Blowey et al.,1992. Boyd, and Eddy. 1992).

La leche y sus derivados constituyen el grupo de alimentos de mayor consumo, en especial entre la población infantil de humanos y mamíferos (Castañeda et al., 2004).

La mastitis bovina afecta a la economía; por la disminución en la producción e inocuidad de la leche y de su industrialización; así como también impacta en la salud pública, tanto por las contaminaciones microbianas de *S.aureus*, como por sustancias quimioterapéuticas, derivadas del tratamiento con antimicrobianos que reciben las vacas, y que pueden dar origen a cepas resistentes y a la presencia de residuos antibióticos (Adams et al., 1988).

Las investigaciones en el ramo agropecuario deben estar orientadas hacia la resolución de problemas regionales que impacten principalmente la economía y la salud desde la producción hasta el consumidor. En relación a la leche las bacterias representan el problema más importante para la salud animal y humana por lo que la inocuidad microbiológica de este alimento se garantiza mediante la aplicación de buenas prácticas de higiene en el transcurso de cada una de dichas fases, pero indudablemente adquiere una particular importancia en el control que se efectúe en el punto de origen (NOM.086-1. 1994).

2.12.3 Industrialización de la leche

La Industrialización de la leche y los productos lácteos tiene que ser con leche de calidad dentro de su proceso, para que no ocasione mas perdidas económicas desde el primer eslabón de la industria de la lechería que es el productor hasta el consumidor que exige leche y subproductos de calidad (NOM.036-1.1993).

2.12.4 Bajas en la producción

Las bajas en la producción, son tan cuantiosas las pérdidas que se busca un apoyo científico y tecnológico que nos brinde la confiabilidad de erradicar las infecciones de mastitis.

Considerando que el *S. aureus* es uno de los patógenos con mas frecuencia en mastitis 20% (IDF.1981. Castañeda et al.,2004. Bedolla et al.,2004. Wolter et al.,1999) y que ocasiona grandes pérdidas económicas.

Constituye la mastitis bovina, una enfermedad de gran importancia económica por sus efectos negativos, la predicción y el estudio de los problemas microbiológicos asociados a los sistemas tecnológicos de la producción lechera intensiva, constituyen dentro del contexto general, una necesidad impostergable para la expansión de la lechería mexicana (Adams et al., 1988. Andrews et al.,1983.Andrews et al.,1992 Bentley et al.,1995. Berri et al., 2000).

2.12.5. Diagnostico y control.

La conveniencia de aplicar un método para el diagnóstico rutinario dependerá de la especificidad, la sensibilidad, costo, tiempo, y de la pertinencia del mismo en relación a la cantidad de las muestras a analizar (NOM 115-1 1994) en el caso de infecciones crónicas potenciales se utiliza como prueba de campo la cuenta celular somática él método automatizado de escrutinio para el diagnóstico se llevará a cabo en el laboratorio (Andrews et al.,1992).

Actualmente, el método para la identificación de patógenos presentes en la glándula mamaria es por el cultivo *in vitro*, lo cual requiere más tiempo y dedicación, pueden presentarse problemas en el crecimiento y aislamiento para la identificación del patógeno y en ocasiones los ensayos bioquímicos no son concluyentes (Mendoza et al.,1998).

Se ha demostrado estacionalmente que los procedimientos de detección, refuerzan las propiedades de la cura y reducen el tiempo que exige supervisar y controlar la proporción de la infección a nivel de establo (Wellenberg et al.,2002).

Durante los últimos años se han desarrollado muchas pruebas para el diagnóstico de Mastitis, sin embargo la prueba específica para cada especie bacteriana no se ha logrado al cien por ciento. Existen muchas pruebas para los patógenos que afectan a los humanos, algunas de las cuales se han aplicado para el patógeno que produce la mastitis en bovinos, como el Minitek y la tinción de Gram para estreptococos (Tauxe et al.,2002) pero tales pruebas han resultado sin éxito, debido a la falta de información en el banco de datos referente a los patógenos animales (Smith et al.,1996).

Anteriormente no existían métodos moleculares rápidos como herramientas de diagnóstico para la detección de microorganismos a partir de muestras; entre los métodos rápidos y altamente selectivos se encuentra la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para determinar la presencia de los genes de la proteína A y de la Coagulasa de *S. aureus*.

Los métodos de ensayo existentes de Unión Enzimática inmunoabsorbentes para la detección del *S. aureus*, en casos de mastitis bovina no tiene correlación entre el anticuerpo y la cantidad de infección bacteriana (Bourry et al.,1996. Bramley et al.,1996).

La mayoría de los métodos de PCR usados para la detección de microorganismos en la leche o en otras muestras orgánicas necesitan de la multiplicación de bacterias en los medios de cultivo y son por lo consiguiente un gasto infructuoso, los métodos de identificación rápida (Andrews et al.,1992 Reale et al.,1992).

En particular las pruebas ácido-básicas nucleicas, tienen el

potencial para ser sumamente específicas y también pueden diferenciar entre los organismos estrechamente relacionados, como el *S. parauberis* y *S. uberis*, se ha demostrado previamente que las muestras de leche pudieran servir como el substrato para la amplificación de sucesiones específicas de ADN usando secuencias de PCR; (Bentley et al.,1995). Por todas estas razones, selecciono la técnica de PCR como un método para identificar el patógeno de *S. aureus* como uno de los causantes de mastitis, debido a su precisión, alto grado de detección y rapidez (Bourry et al.,1996).

El *Staphylococcus* de origen bovino puede ser clasificado en varias subespecies (Cuadro 7) por la biotipificación, el fago diferenciado se ha demostrado útil en el análisis de mastitis y el perfil plasmidico ha sido valioso en los estudios epidemiológicos del *S. aureus* en bovinos. Durante los últimos años el estudio del genoma de *S. aureus* se volvió una herramienta poderosa para la investigación epidemiológica (Wolter et al.,1999).

Un cuarto de la ubre sana es aquel que no presenta alteración patológica externa o interna; la leche no contiene microorganismos patógenos teniendo un nivel de células somáticas <100,000/ml. El contenido de células somáticas en la leche, nos permite tener un criterio sobre el estado funcional y de salud de la glándula mamaria en estado latente; debido a la estrecha relación con la composición de la leche, este es un criterio de inocuidad muy importante (Castañeda et al.,2004).

Las bacterias pertenecen a la microbiota normal del ambiente de la vaca y casi siempre se encuentran en cada corral. Como principales representantes de ese grupo tenemos a estreptococos *esculina* positivos (Frecuentemente *S. uberis*, ocasionalmente enterococos), estafilococos coagulasa-negativos diferentes tipos de estafilococos como el *S. aureus* y coliformes como *Escherichia coli*. (Wolter et al.,2001).

El crecimiento de *S. aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias (NOM. 115-1.1994)

Las enzimas que intervienen en la producción de infecciones estafilocócicas son capaces de incrementar las características invasivas de microorganismos, como la Coagulasa, que convierte la protrombina en trombina que a su vez transforma fibrinógeno en fibrina (Carter et al.,1994).

Así como la Proteína A que es un componente de superficie en cepas de *S.aureus*, que tiene la propiedad única de unirse a la región Fc de IgG que colabora en la patogenia. El procedimiento serológico útil, coaglutinante, depende de la Proteína A (Carter et al.,1994).

S.aureus tiene capacidad para invadir tejidos, producir abscesos, pústulas en la piel, osteomielitis, endocarditis, neumonía, meningitis, bacteremia y septicemia (Berri et al.,2000. Bes et al.,2000. Bourry et al.,1997).

La respuesta inflamatoria a la infección moviliza los neutrófilos al sitio de invasión, lo cual desencadena la respuesta piógena. Se forma un absceso seguido por rotura de la piel y drenaje de pus a la superficie. Los productos extracelulares de *S.aureus* intervienen en el desarrollo de la infección albergando niveles de 10^2 a 10^4 ufc/ml (de Santos et al.,1981. Carter et al.,1994).

Las cepas de *S.aureus* poseen antígenos capsulares y algunos de superficie son los mas inmunogénicos. Sin embargo, se considera que su valor es dudoso en la prevención de mastitis (Bes et al.,2000. Carter et al.,1994).

El *S. aureus* produce cuando menos tres leucocidinas que actúan

en macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, destruyendo su membrana y favoreciendo a la pérdida de sus gránulos que actúan dentro del fagocito destruyéndolo (Wolter et al.,2004. Berri et al.,2000. Bes et al.,2000).

2.13. La Utilización de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

En el diagnóstico de patógenos en alimentos. En los últimos años. El extraordinario auge experimentado por la biología molecular ha conducido al desarrollo de técnicas genéticas que permiten la identificación rápida de microorganismos específicos en cultivos puros. Eliminando algunas de las limitaciones de los métodos convencionales. La PCR es actualmente una herramienta imprescindible en los en los laboratorios de investigación en todo el mundo y se emplea rutinariamente para la identificación de microorganismos patógenos.

La PCR fue desarrollada por Kary Mullis en 1983 quién ideó un procedimiento para la amplificación de las secuencias de ADN específicas basada en el mecanismo de la replicación del ADN celular. Sin embargo, el primer trabajo experimental utilizando esta técnica fue realizado por Saiki y col.,1985; esta técnica conocida universalmente como PCR, ha revolucionado los campos más diversos de la ciencia (Mullis,1990).

Actualmente, además de la técnica de PCR clásica, existen entre otras modalidades de PCR como son: RT-PCR (Reverse Transcriptase), PCR múltiple, PCR anidada, Touch-down-PCR, PCR inverso, AP-PCR (arbitrary primers), RACE (Rapid Amplificación of cDNA Ends), asociaciones de PCR con otras técnicas como: RFLP's (Restricción Fragments Length "Polimorphisms Análisis", RADP's (Random Amplified Polymorfhic DNA) y técnicas de amplificación distintas de la PCR (PCR,32S), (Walker y Gingold, 1997, McPherson y Moller, 2000)

Las aplicaciones de la PCR son demasiado numerosas. Debido a su alta sensibilidad y especificidad, esta técnica es una de la mas utilizada para la confirmación del diagnóstico. La introducción de la PCR a la industria de los alimentos, ha permitido de forma espectacular incrementar la sensibilidad de los métodos de detección de microorganismos patógenos y alternantes. Sin embargo, su aplicación al análisis de alimentos se encuentra todavía en sus fases iniciales. A pesar de los obstáculos que pueda encontrar en medios tan complejos como los alimentos. La técnica de PCR tiene un futuro prometedor como técnica rutinaria de identificación de microorganismos en muchos sustratos.

La PCR se ha aplicado en la identificación de bacterias patógenas principalmente: *Listeria monocytogenes*, (Niederhauser y col., 1992), *Campylobacter jejuni* (Wegmuller y col., 1993), *Staphylococcus aureus* (Backer y col., 1998), *Escherinchia coli*, (Franch y col., 1998), *Salmonella spp.* (Aabo y col., 1995, trkov y col., 1999., Soument y col., 1997), cepas enterotoxigénicas de *E. Coli* (bej y col., 1990), en algunos alimentos como leche, huevo, pollo, pescado, alimentos marinos entre otros.

Consiste en la síntesis enzimática in vitro de millones de copias de un segmento específico de ADN, esta ingeniosa y novedosa metodología está causando una nueva revolución en el análisis y manipulación del material genético (Karp.1996).

La reacción en cadena de la polimerasa se aplica a el proceso bioquímico in vitro, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30 ciclos) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso en general, los componentes requeridos para una RCP son, ADN iniciadores

(oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's), solución amortiguadora de reacción, y ADN polimerasa (Cold et al., 1989)

En la microbiología la PCR se ha utilizado en el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias particularmente aquellas difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y cultivo (Cold et al., 1989).

2.13.1. Los oligonucleótidos

Estos oligonucleótidos tienen las sucesiones diferentes, son complementarios de la plantilla ADN, o elige el segmento ADN que será amplificado, la plantilla de ADN se desnaturaliza primero calentando en el presente por un exceso molar grande de cada uno de los oligonucleótidos y los cuatro dNTPs, la mezcla de la reacción se refresca entonces a una temperatura que permite al oligonucleótido cebador templar su blanco de sucesiones, después de que los cebadores templados son la pieza extendida del ADN de polimerasa, el ciclo de naturación, el recocido, y la síntesis de ADN se repiten muchas veces, los productos de secuencia de amplificación, así como las plantillas para el producto de ADN deseado (Giovannoni et al., 1988).

2.13.2. Producto de la reacción

El producto mayor de esta reacción exponencial es un segmento de ADN doble-dejado cuyos términos son definidos por la distancia entre los cebadores del oligonucleótido y de quien la longitud es definida por la distancia de los cebadores, además se genera una molécula de ADN más larga durante la reacción, por ejemplo, los productos de un exitoso cebador redondo de amplificación, que se clasifican según el tamaño de molécula de ADN cuyos largos pueden exceder la distancia entre los sitios obligatorios de los dos cebadores, en la segunda ronda, estas moléculas generan ADNs de longitud definida

que aumentara en una moda exponencial en las rondas más tarde de amplificación y productos de forma testimonial de la reacción. Aunque las moléculas más largas continúan siendo producidas de la plantilla original ADNs en cada ronda, ellos sólo aumentan a una proporción (Lorenz et al., 1998).

Secuencia del gen Spa, que codifica para la proteína A de *S. aureus*.

A continuación se muestra la secuencia del gen Spa y la localización de los cebadores seleccionados (sombreado) en la que se puede observar que el fragmento a amplificar es de (270 pb).

1 tgaagctcaa caaaatgctt tttatcaagt gttaaataatg cctaacttaa
acgctgatca

61 acgtaatggt tttatccaaa gccttaaaga tgatccaagc caaagtgcta
acgttttagg

121 tgaagctcaa aaacttaatg actctcaagc tccaaaagct gatgcgcaac
aaaataactt

181 caacaaagat caacaaagcg ccttctatga aatcttgaac atgcctaact
taaacgaagc

241 gcaacgcaat ggtttcattc aaagtcttaa agcgatcca agccaaagca
ctaacgttt

301 aggtgaagct aaaaaattaa atgaatctca agcaccgaaa
gctgacaaca attcaacaa

361 agaacaacaa aatgctttct atgaaatctt gaacatgcct aacttgaagc
aagaacaacg

421 caatggtttc atccaaagct taaaagatcaa cccaagtcaa agtgctaacc
tttagcaga

481 agctaaaaag ttaaataaat ctcaagcacc gaaagctgac aacaatttca
acaagaaca

541 acaaaatgct ttctatgaaa tcttacattt acctaactta aacgaagaac
aacgcaatgg

601 tttcatccaa agcttaaaag atgacccttc agtgagcaaa gaaattttag
cagaagctaa

661 aaagctaaat gatgcacaag caccaaaagc tgacaacaaa
ttcaacaaag aacaacaaaa

721 tgctttctat gaaattttac attacctaa cttaactgaa gaacaacgta
acggcttcat

781 ccaaagcctt aaagacgatc cttcagtgag caaagaaatt ttagcagaag
ctaaaaagct

841 aaacgatgct **caagcaccaa** **aagaggaaga** caataacaag
cctggcaaag aagacggtaa

901 caagcctggt aaagaagacg gcaacaaacc tggcaaagaa
gatgcaaag aagacggcaa

961 agaagacggc.

3.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México el diagnóstico de la mastitis bovina se basa en la prueba de California, lo cual es aplicada por su eficiencia ya que presenta reacciones positivas, otro método utilizado es la identificación de las lesiones macroscópicas a partir de la inspección en los pezones o la ubre, actividad que se ve limitada porque sólo se podrá detectar las lesiones de la mastitis visibles mas no internas, y por ultimo el aislamiento bacteriológico del *S. aureus*, el cual requiere de personal capacitado para la toma de las muestras asépticas y realizar un aislamiento bacteriológico que llevará de 24 a 48 horas para llevar el primer crecimiento de las colonias bacterianas, se tiene que realizar las pruebas bioquímicas y de escrutinio para identificación y realizar una identificación morfológica de las colonias para después realizar un cepario de puro *S. aureus* después con un diagnostico molecular determinar la presencia de los genes *Coa* y *Spa* para la caracterización de un polimorfismo genético del *S. aureus* mediante PCR, ya que el diagnostico molecular es importante por su especificidad para cada secuencia nucleotidica de los genes del *S. aureus*, permitiéndonos una identificación mas precisa del patógeno.

El presente trabajo aporta a la ganadería lechera datos sobre las relaciones filogenéticas y epidemiológicas de las diferentes cepas de *S. aureus* que sean aisladas de vacas que presentan mastitis en la zona lechera de Zapotlanejo Jal.

4.0. JUSTIFICACIÓN:

Para controlar esta enfermedad "mastitis" no sólo debe ser económica, sino también de salud y para tener éxito debe ser un proceso continuo en todos los hatos y no debe estar limitado a situaciones de crisis porque se pierde todo lo ganado.

No controlar la mastitis en un hato lechero es igual a tirar la leche, porque las vacas infectadas representan índices altos de la mastitis y producen menos leche que las no infectadas.

Respecto a la calidad de la leche que se proporciona a bebés, niños, ancianos y demás población, El público espera tener estándares de calidad más altos que para otros alimentos que dependen de la calidad de la leche que sale de la granja.

Los cambios en la composición de la leche de vacas con mastitis (reducción de calcio, fósforo, proteínas y grasa e incremento en sodio y cloro) reducen su calidad. Además hay que considerar los antibióticos que se usan para tratar la mastitis que preocupa en la industria y a la salud pública, que además interfieren en el proceso de elaboración de quesos y otros productos fermentados; y también pueden causar reacciones anafilácticas y resistencia de los microorganismos a los antibióticos.

Es importante subrayar que debe haber programas de educación continua para el control de mastitis, calidad de la leche, producción Láctea que permitan a los ganaderos aumentar su eficiencia, competitividad y ganancias.

La industria agropecuaria, los productores y los campesinos son el motor que impulsa el desarrollo económico de las naciones, aquellos países incapaces de producir su propia alimentación no podrán competir

en la economía global que cada vez avanza más.

El éxito de un programa de Control de mastitis y Calidad de la leche requiere de aumentar la producción Láctea para autofinanciarse y la coordinación de esfuerzos en donde todos los involucrados deben hacer las mismas recomendaciones para no crear confusiones, que permitirán implementar las decisiones tomadas. Para poder realizar este tipo de programas son necesarias investigaciones como la presente, ya que no únicamente plantea el estudio de bacterias tan importantes como el *S. aureus* sino que también utiliza nuevas técnicas de diagnóstico molecular para un mejor estudio de los microorganismos.

5.0. HIPÓTESIS

Si se estudian las cepas aisladas de *S. aureus* con técnicas de biología molecular, se puede obtener la tipificación precisa del microorganismo, lo cual servirá como una herramienta auxiliar para el control y prevención de la mastitis en bovinos productores de leche en el estado de Jalisco.

6.0. OBJETIVO GENERAL

Identificar y tipificar *S. aureus* como agente causal de mastitis bovina, en el municipio de Zapotlanejo en el Estado de Jalisco ,

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- 6.1.1. Aislar e identificar las cepas de *S. aureus* relacionadas con mastitis, mediante pruebas bioquímicas y PCR.
- 6.1.2. Determinar la incidencia de *S. aureus* en bovinos productores de leche en la zona de Pueblo Viejo, municipio de Zapotlanejo Jalisco.
- 6.1.3. Determinar la presencia de los genes *Coa* y *Spa* y polimorfismo genético (de los genes de la proteína A y de la Coagulasa) del *S. aureus*; mediante PCR.

7.0. MATERIAL Y METODOS

7.1. Colecta aséptica de muestras de leche

Una técnica aséptica en la colecta de muestras es esencial para evitar la contaminación por microorganismos provenientes del exterior de la glándula mamaria y también fue necesario un manejo posterior apropiado, de las muestras de leche.

7.2. Toma de muestras

La toma de las muestras para un examen bacteriológico fue totalmente aséptica, así como su traslado al laboratorio. Antes de tomar las muestras, las tetas de las vacas fueron desinfectadas con etanol al 70%, posteriormente se realizó el lavado de los pezones para retirar suciedad, se evitó un escurrimiento de agua que pudiera contaminar el conducto del pezón o el tubo de ensayo, se procedió al secado.

Colecta de muestras.

Se eligieron 4 establos de Pueblo Viejo en la región de Zapotlanejo Jalisco. El procesamiento de las muestras se efectuó en el Laboratorio de Mastitis y diagnóstico molecular del Depto. de Medicina Veterinaria del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Se tomaron dos muestras de leche de 300 vacas por época del año; que corresponde a la época de secas de marzo-mayo, y lluvias de junio-octubre, Al iniciar con el proceso, la asepsia de las manos fue por inmersión en el desinfectante de yodo al 75%; antes de manipular la ubre, se abrió el vial de muestreo, manteniendo el tapón boca abajo en la misma mano que el vial, el cual se mantuvo tan cerrado como fue posible para minimizar la entrada de polvo.

7.3. Presencia de lesiones

La presencia de lesiones cercanas al ápice del pezón se registraron, ya que éstas pueden contribuir a la presencia de patógenos en la muestra, ante la ausencia de infecciones intramamarias.

7.4. Preparación de los pezones.

Se desinfecto el final del pezón antes de hacer la colección de muestras. Únicamente si los pezones visiblemente presentaban suciedad se lavaron usando una solución desinfectante de 60 ppm de yodo disponible, secando por completo con una toalla de papel desechable.

Se desecharon los primeros 10 a 15 ml de leche, enseguida se limpio el final del pezón y el orificio durante 10 a 20 seg. con toallas de papel desechables en alcohol al 70%. Se elimino el exceso de alcohol y se seco el pezón sin tocar el orificio.

Al colectar la muestra de leche se presiono ligeramente el pezón y de preferencia con un solo apretón. El final del pezón no toco el borde del vial, el cual no se lleno a más de dos tercios de su capacidad. Se evito tocar el final del pezón entre la limpieza y la colecta.

7.5. Transporte de muestras

Los tubos con las muestras se transportaron hacia el laboratorio en un tiempo no mayor de dos horas, en una hielera con una gradilla en su interior agregando hielo o un refrigerante para evitar que el exceso de calor y que se alterara la muestra.

7.6. Procesado de las muestras

El procesado de las muestras se realizo inmediatamente después de la llegada de las mismas al laboratorio, evitando un almacenamiento mayor de 24hrs. y manteniéndolas a una temperatura entre 4 a 5°C.

7.7. Identificación de mastitis.

La Prueba de California se utilizó en la detección de mastitis, registrando los resultados obtenidos para cada una de las muestras,

7.8. Identificación morfológica y bioquímica

Las muestras fueron adecuadamente homogenizadas, debido a que las bacterias se concentran en la capa de grasa de la leche. En caso de que algunas muestras hayan sido refrigeradas, antes de mezclarlas se sometieron a una temperatura de 17°C (+-1°C).

7.9. Cultivos bacteriológicos

Se realizaron siembras de las muestras con 0.05 ml por extensión en superficie de toda la placa de agar sangre para distinguir fácilmente entre los espacios las colonias de estafilococos. La temperatura de incubación fue de 36°C (+-1°C) y los crecimientos se examinaron después de 24-48 hrs.

7.10. Medios de cultivo

Se hicieron los cultivos en agar con 5% de sangre de ovino, después de la incubación las cajas fueron examinadas morfológicamente, diámetro y producción de hemólisis. (BAM.2000. NOM.115-1 1995) se identificaron las colonias sospechosas por la prueba de catalasa, tinción de Gram, coagulasa, termonucleasa, producción de acetoina, fermentación anaerobia de manitol, y maltosa. (BAM.2000. Bergey's.2000) comparando las pruebas con una cepa de referencia *S.aureus*. ATCC 25923 1-Lote 3202024.

7.11. Aislamiento de *S. aureus*

Coco gram positivo que se desarrolla en medios de cultivo selectivo y diferencial, que dio positiva la prueba de coagulasa, termonucleasa, y produjo en agar sangre colonias cremosas, color gris-blanco y ocasionalmente amarillo oro, de 3 a 5 mm de diámetro con zonas típicas de hemólisis (produjo una zona clara de completa lisis de

los glóbulos rojos, generalmente de 2 mm) o (produjo una zona de oscurecimiento de los glóbulos rojos), estas cepas fueron comúnmente coagulasa positivas. Algunas cepas fueron no hemolíticas, o bien, produjeron zonas estrechas (1mm o menos) bien definidas de completa hemólisis debido a la β -toxina, generalmente fueron coagulasa positivas (NOM. 115-1 1995.Watts et al., 1989).

7.12. Diseño Experimental.

La clasificación e interpretación de la prueba de California para los porcentajes de mastitis se realizo mediante la aplicación del método propuesto por (Saran et al., 2000. Chaffer et al.,2000. Medina et al.,2003. Montaldo et al., 2003. Gutiérrez et al.,2003). Se realizó el análisis estadístico por un Diseño Factorial prueba de Medias (LSD).

7.13. Identificación de *S. aureus* mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

7.14. Taq Polimerasa

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizo una enzima llamada Taq. Polimerasa, Para multiplicar rápidamente un pequeño fragmento de ADN, cada ciclo de PCR consto de tres fases: (Straub and Hammes 1999)

7.15. Ciclos de PCR

1°- Desnaturalización: se caliento el ADN a 90-95°C durante 30seg, esto provoco la separación de las cadenas que lo forman.

2°-Templado: se redujo la temperatura de la mezcla hasta 55°C durante 20seg. Para que los cebadores nucleótidicos o fragmentos indicadores se enlazaran con las cadenas de ADN.

3°-Polimerización: la temperatura de la mezcla se elevo de nuevo hasta 75°C para que la enzima polimerasa copiara rápidamente el ADN de la molécula presente en la reacción.

7.16. La extracción del ADN para *S. aureus*.

La extracción del ADN se realizó de la siguiente forma:

Se utilizaron de un cultivo (caldo) de medio BHI se tomaron 400 μ l de cultivo que equivale aproximadamente 10 a la 8 bacterias. Se centrifugaron durante treinta seg. a 16.000g (11.500 rpm) una vez centrifugado se decanta el medio y el botón de bacterias se resuspendió en 200 μ l de lisosima (10.0 μ g/ml H₂O). ya resuspendidas las células se incubaron por 10 minutos a 37°C. posteriormente se le agregó 8 μ l de proteinasa K (10mg/ml) y 600 μ l de Buffer (0.1M Tris pH=7.5); las células en suspensión se incubaron a 37°C por 10 min. y finalmente se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. (Cold et al., 1989, Naresh et al., 2000).

7.17. Espectrofotometría de ADN de las cepas *S. aureus*.

IDENTIFICACIÓN	L 260.0		L 280.0	
	Factor	33.00	Factor	1.000
1;1000.	Abs	Result. Mg/ml	Abs	Result. Mg/ml.
SPA	0.0474	1.5642	0.0200	0.0200
SPA	0.0713	2.3516	0.0433	0.0433
SPA	0.0637	2.1026	0.0375	0.0375
SPA	0.0369	1.2162	0.0220	0.0220
SPA	0.0348	1.1476	0.0185	0.0185
COA	0.0407	1.3228	0.0207	0.0207
COA	0.0229	0.7566	0.0043	0.0043
COA	0.0300	0.9916	0.0149	0.0149
COA	0.0389	1.2822	0.0189	0.0189
COA	0.0293	0.9662	0.0095	0.0095
COA	0.0653	2.1545	0.0435	0.0435
COA	0.0682	2.2497	0.0462	0.0462.

7.18. PCR.

10 microlitros de lisado celular (DNA) se adiciono a una mezcla de PCR la cual contenía lo siguiente: Buffer de PCR 1X (50mM KCL, mM Tris HCL), MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 0.2mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), iniciadores sentido y antisentido a 1mM y la Taq DNA polimerasa 1.U/Rx (Reacción) a un volumen de 50 microlitros .

7.19. Secuencia de los Cebadores.

Una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos los cuales c/uno de ellos consto de 30 segundos a 95°C , 2 minutos a 55°C y 4 minutos a 75°C.

7.20. Agarosa.

Al 2%. Se pesaron 0.6g, se disolvieron en 30 ml de Buffer TBE ya disuelto se le añadió 1.2µl de bromuro de etidio y se vació a la cámara de electroforesis esperando su solidificación

7.21. Electroforesis

Se hizo una electroforesis de agarosa al 2% para poder visualizar los productos de PCR y se tiño el gel con bromuro de etidio, se utilizo un marcador de peso molecular el QX174RF para distinguir los fragmentos de interés.

7.22. Determinación del gen Spa y Coa

Para determinar el gen *Spa*, que codifica para la proteína A fue determinado por el método de (Frenay et al.1995). Se aplico el ADN usando los siguientes cebadores 5'CAAGCACCAAAGAGGAA-3, y 5'CACCAGGTTTAACGACAT-3 y para amplificar el gen de Coagulasa se utilizo como cebador 5'-AAAGAAAACCACTCACATCA-3'.y 5'-AAAGAAAACCACTCACATCA-3'. El producto del PCR (10ml) fueron digeridos con 10 unidades de la enzima endonucleasa *AfuI* (Gen de la Coagulasa) de restricción. Enseguida los productos de PCR Y los fragmentos digeridos de restricción se detectaron por electroforesis en gel de agarosa (40 g/l) en presencia de bromuro de etidio. (Cold. 1989, Jayarao te al., 1991. Wolter et al.,1999).

8.0. RESULTADOS

8.1. Prueba de California.

En el cuadro No. (9) se presenta los resultados de la prueba de California; Para detección de mastitis, se muestrearon en total 4 establos con una población total de vacas de 140, 140, 50 y 50 respectivamente.

El muestreo se realizó únicamente en las vacas en producción, por lo que el total de animales muestreados es de 97, 120, 39 y 44 de acuerdo al orden de los establos el total de animales muestreados es de 300.

8.2. Época del año.

En relación a la época del año que se realizaron los muestreos, se consideraron dos periodos uno de lluvias y otro de secas, en el cuadro se puede apreciar el número de animales positivos y negativos para cada uno de los periodos resultando 91 positivos y 6 negativos para el establo número 1; 107 positivos y 13 negativos para el establo número 2; 39 positivos y 0 negativos en el establo número 3; 31 positivos y 13 negativos en el establo número 4; en época de lluvias; en tanto que en el periodo de secas los resultados fueron de 73 positivos y 24 negativos para el establo 1; 111 positivos y 9 negativos para el establo 2; 29 positivos y 10 negativos para el establo 3, y finalmente 14 positivos y 30 negativos respectivamente para el establo número 4.

Cuadro 9. Resultados de la prueba de California.

ESTABLO	POBLACION TOTAL VACAS	VACAS EN PROD	ANIMALES MUESTRADOS				PORCENTAJE			
			LLUVIAS		SECAS		LLUVIAS		SECAS	
			+	-	+	-	+	-	+	-
1	140	97	91	6	73	24	97.81	6.19	75.26	24.74
2	140	120	107	13	111	9	89.17	10.83	92.5	7.5
3	50	39	39	0	29	10	100	0	74.36	25.64
4	50	44	31	13	14	30	70.45	29.55	91.82	68.18
TOTAL										
4	380	300	268	227	227	73	89.35	10.67	75.55	24.33

8.3. Porcentajes positivos y negativos

Los porcentajes relativos de negativos y positivos son del establo 1, con 93.81% positivos y 6.19% de negativos, del establo 2, se obtuvo un porcentaje de positivos del 89.17%, y de negativos 10.83%, en el establo 3 se encontró un 100% de positivos. por ultimo en el establo 4 se aprecio un porcentaje de 70.45% positivos y el 29.55% de negativos durante la época de lluvias.

8.4. Porcentajes por época del año

En la época de secas los porcentajes fueron 75.26%(+) y 24.74%(-); 92.5% (+) y 7.5%(-); 74.36%(+) y 25.64%(-); 31.82%(+) y 68.18%(-) respectivamente.

8.5. Porcentajes totales

El total de los porcentajes fueron de 89.35% positivos y 10.67% negativos en la época de lluvias en tanto que los porcentajes totales para la época de secas fueron de positivos 68.48%; y negativos 31.51%. en la (tabla 9) se resumen los resultados anteriormente descritos.

Cuadro 10. Detección de cuartos afectados mediante la prueba de California.

ESTABLO	CUARTOS	C.A.I.				C.A.D.				C.P.I.				C.P.D.			
		LLUV.		SEC		LLUV		SEC		LLUV		SEC		LLUV		SEC	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	388	85	12	47	50	85	12	38	59	80	17	43	54	77	20	43	54
2	480	103	17	74	46	101	19	68	52	98	22	67	53	102	18	70	50
3	200	32	7	13	26	34	5	18	21	29	10	20	19	30	9	17	12
4	200	13	31	3	41	22	22	8	36	19	25	6	38	28	16	9	35

(CAI) Cuarto Anterior Izquierdo. (CAD) Cuarto Anterior Derecho. (CPI) Cuarto Posterior Izquierdo. (CPD) Cuarto Posterior Derecho. (LLUV) Lluvias. (SEC) Secas.

Cuadro 11. Porcentajes totales de Cuartos positivos y negativos según época del año por establo.

	C.A.I.				C.A.D.			
	LLUV.		SEC.		LLUV.		SEC.	
	+	-	+	-	+	-	+	-
E 1	21.91	3.10	12.11	12.89	21.91	3.09	9.8	15.3
E 2	21.46	3.55	15.42	9.58	21.1	3.96	14.17	10.84
E 3	16	3.5	13.5	13	17	2.5	9	10.5
E 4	6.5	15.5	1.5	20.5	11	11	4	18

	C.P.I.				C.P.D.			
	LLUV.		SEC.		LLUV.		SEC.	
	+	-	+	-	+	-	+	-
E1	20.62	4.38	11.1	13.92	19.85	5.15	11.1	13.92
E2	20.42	4.58	13.96	11.04	21.25	3.75	14.59	10.42
E3	14.5	5	10	9.5	15	4.5	8.5	6
E4	9.5	12.5	3	19	14	8	4.5	17.5

(CAI) Cuarto Anterior Izquierdo. (CAD) Cuarto Anterior Derecho. (CPI) Cuarto Posterior Izquierdo. (CPD) Cuarto Posterior Derecho. (E1) Establo 1. (E2) Establo 2. (E3) Establo 3. (E4) Establo 4. (LLUV) Lluvias. (SEC) Secas.

8.6. Análisis estadístico

Tabla 1. el porcentaje de mastitis en cada combinación Establo
1.2.3.4.* Época A. B.* Pezón 1.2.3.4.,.

E.	E. del A.	P.	%
1	A	1	87.6
1	A	2	87.6
1	A	3	82.5
1	A	4	79.4
1	B	1	48.5
1	B	2	39.2
1	B	3	44.4
1	B	4	44.4
2	A	1	85.8
2	A	2	84.0
2	A	3	81.7
2	A	4	85.0
2	B	1	61.7
2	B	2	56.7
2	B	3	55.8
2	B	4	58.4
3	A	1	82.1
3	A	2	87.2
3	A	3	74.4
3	A	4	76.9
3	B	1	69.2
3	B	2	46.2
3	B	3	51.3
3	B	4	43.6
4	A	1	29.5
4	A	2	50.0
4	A	3	43.2
4	A	4	63.6
4	B	1	6.8
4	B	2	18.2
4	B	3	13.6
4	B	4	20.5

B = SECAS

A = LLUVIAS

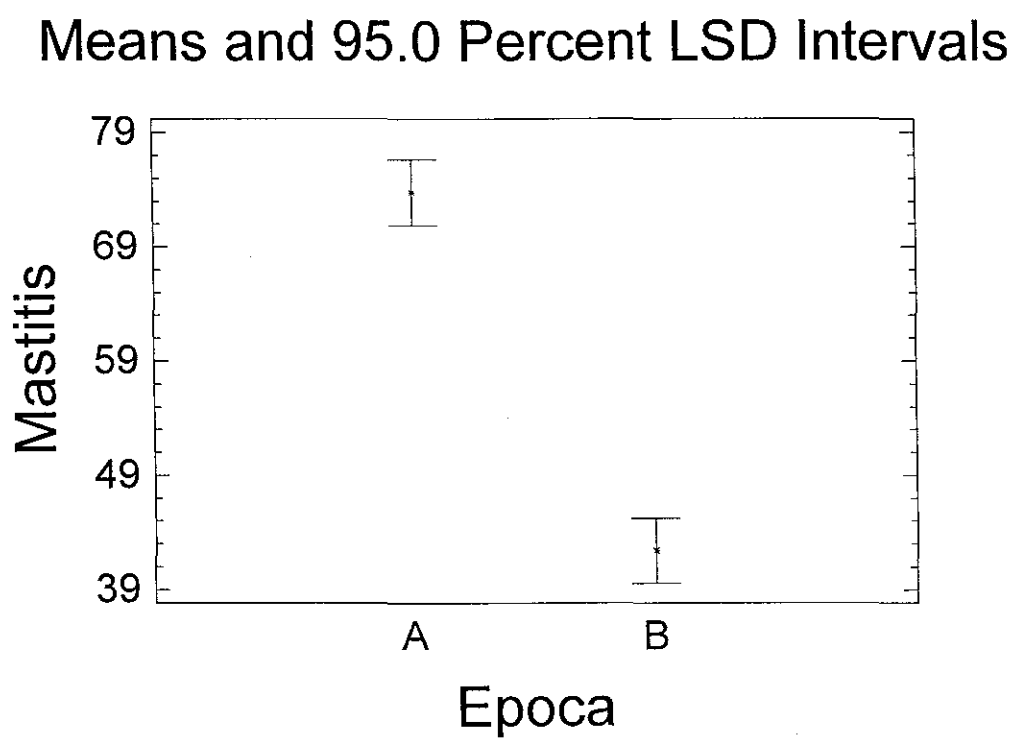
Tabla 2. Se aprecia el factor establo, como época del año fueron significativos, siendo mas importante este ultimo.

Análisis de Variación para Mastitis - Tipo III Total de Cuartos

Origen	Suma de Cuartos	Df	Media Cuartos	F-Proporción	P-Valor
EFFECTO PRINCIPAL					
A: Establo	8220.69	3	2740.23	44.99	0.0000
B: Época	7875.12	1	7875.12	129.29	0.0000
C: Pezón	53.6062	3	17.8687	0.29	0.8297
INTERACCION					
AB	241.562	3	80.5208	1.32	0.2938
RESIDUAL	1279.08	21	60.9085		
TOTAL (CORRECTED)					
	17670.1	31			

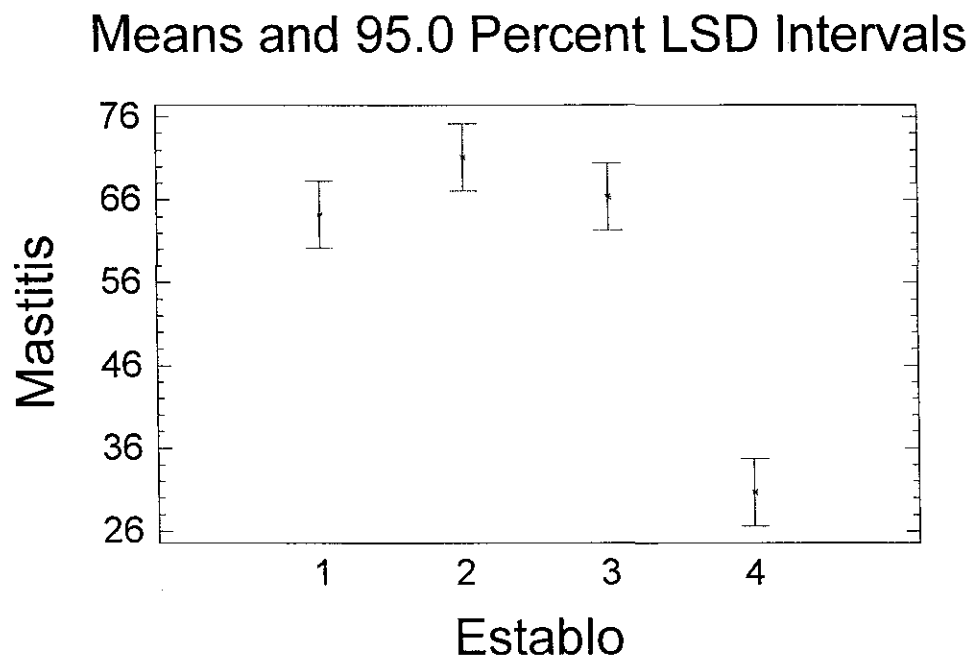
Todos F- Proporción está basada en el residual media cuadrados error.

Gràfica 7. Se muestra la prueba de medias para época del año donde se aprecia que la época A (lluvias) el nivel de infección por pezón es significativamente más alto,



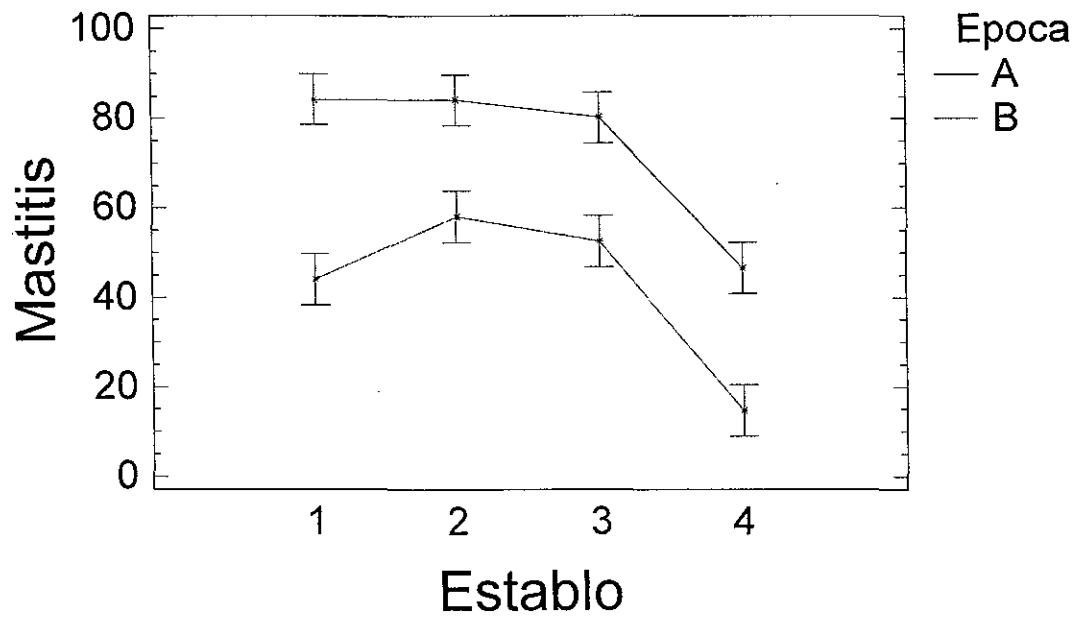
B = SECAS
A = LLUVIAS

Gráfica 8 Diferencia de medias entre establos de donde se aprecia que los establos 1,2 y 3 tienen un nivel de mastitis significativamente más alto y el establo 4 el nivel más bajo,



Gráfica 9: Se muestra la interacción entre época del año y establo. A hi se aprecia que en la época de lluvias en todos los establos se tubo un mayor porcentaje de mastitis

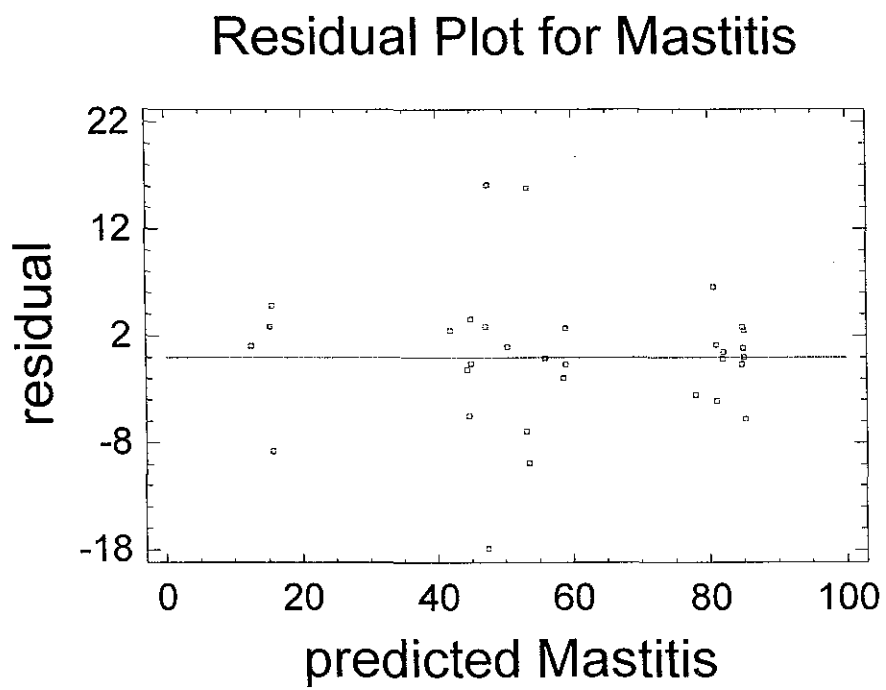
Interactions and 95.0 Percent LSD Intervals



A = LLUVIAS

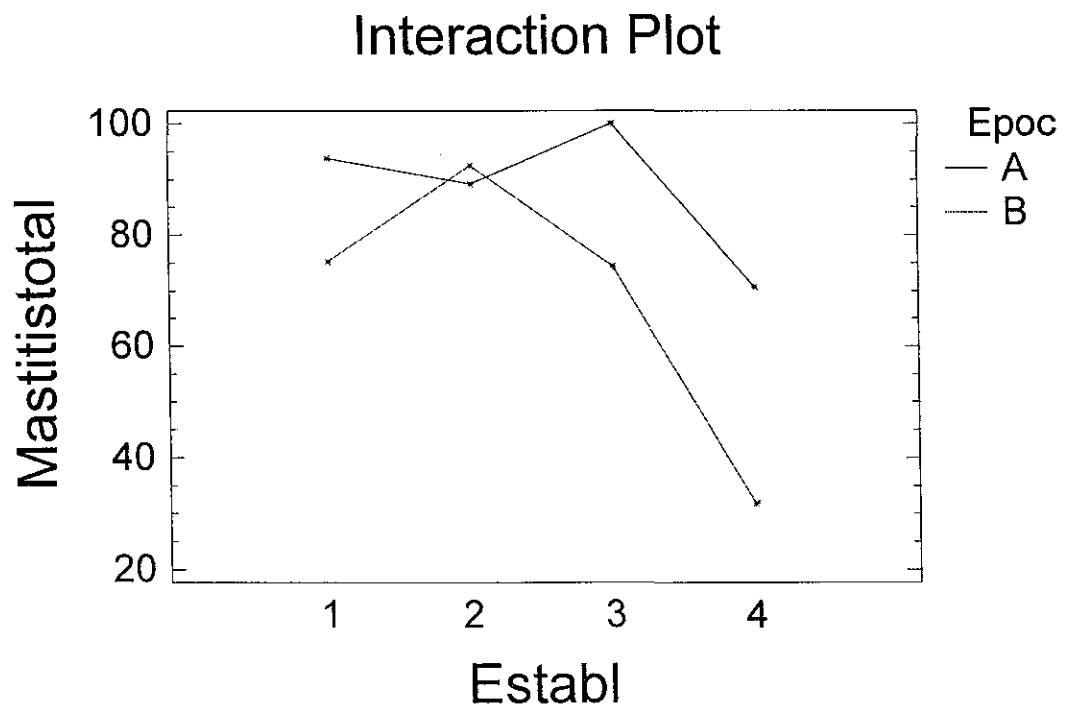
B = SECAS.

Gráfica 10: Se muestra la gráfica de residuales contra predichos. Esta grafica permite verificar el supuesto de varianza constante entre los tratamientos



Gráfica 11 Se muestra el análisis del porcentaje de mastitis por establo según época del año.

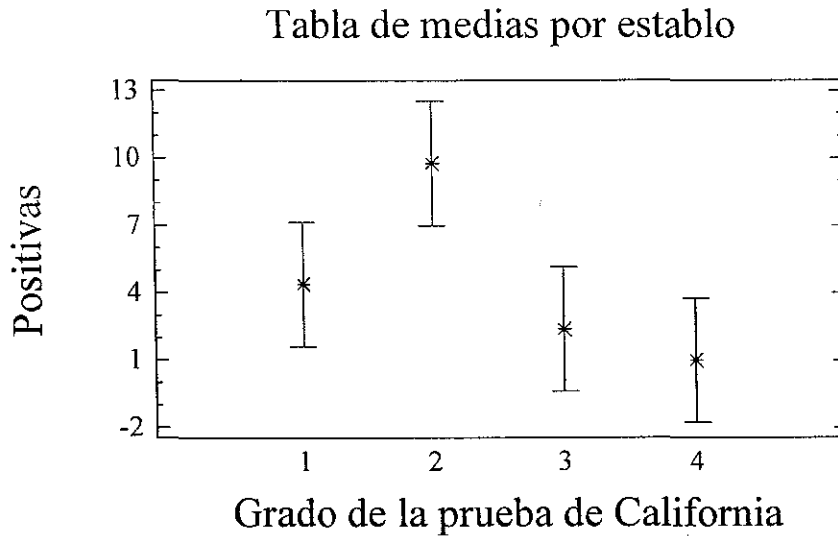
1	A	93.81
1	B	75.26
2	A	89.17
2	B	92.5
3	A	100
3	B	74.36
4	A	70.45
4	B	31.82



A = LLUVIAS

B = SECAS

Gráfica 12. Se muestra el análisis del grado a la prueba de California por establo de mastitis.



Se utilizó un diseño Factorial con dos factores (4 niveles) y época del año (con dos niveles) y el pezón de la vaca se utilizó como factor de bloqueo " 4 niveles ", (Gutiérrez et al ., 2003) lo cual se generaron 4 repeticiones por cada tratamiento y, se incrementó la precisión del estudio al considerar la posible diferencia en el porcentaje de mastitis entre los cuatro pezones. La variable de respuesta fue el porcentaje de mastitis en cada combinación Establo* Época * Pezón*.. Como se muestra en la tabla (1). El análisis de varianza para verificar la significancia de los factores estudiados se hizo con el Software Statgraphics Plus Versión 5.1 tal análisis de varianza para el diseño indicado antes se muestra en la tabla (2) a partir de la cual se aprecia tanto el factor establo como época del año fueron significativos siendo más importante este último. El factor de bloqueo pezón no fue significativo. Esto quiere decir que el porcentaje de mastitis entre los diferentes pezones en una misma vaca se puede considerar similar estadísticamente ablando.

En la gráfica (7) se muestra la prueba de medias (LSD) (Gutiérrez et al., 2003) para época del año donde se aprecia claramente. Que la época A (lluvias) el nivel de infección por pezón es significativamente más alto, en la gráfica (8) se muestra esta misma prueba del (LSD) para la diferencia de medias entre establos de donde se aprecia que los establos 1, 2 y 3 tienen un nivel de mastitis significativamente más alto y el establo 4 el nivel más bajo,. En la gráfica (9) se muestra la interacción entre época del año y establo. A hi se aprecia que en la época de lluvias en todos los establos se tubo un mayor porcentaje de mastitis, se destaca ligeramente el establo 1 que tiene un porcentaje de mastitis menor que el del establo 2 en la época de secas.

La diferencia entre épocas del año era algo esperado ya que la lluvia propicia el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos por medio del estancamiento de agua con suciedad que facilita las infecciones, pero las diferencias entre establos seria contrario a lo esperado ya que se esperaría que los establos rústicos estarían mas infectados por la falta de higiene en los establos o echaderos de las vacas, pezones menos higiénicos y manos del ordeñador sucias y la facilidad con que se pueda transmitir la infección de un pezón a otro. Sin embargo el establo 4 que era el rústico o manual resulto ser con el menor nivel de mastitis.

En la gráfica (10) se muestra la gráfica de residuales contra predichos. Esta grafica (Gutiérrez et al., 2003) permite verificar el supuesto de varianza constante entre los tratamientos. Como se aprecia en la gráfica los puntos se distribuyen en forma más o menos aleatoria a lo ancho y largo de la gráfica lo que indica que tal supuesto si se cumple y en ese sentido las conclusiones obtenidas con el análisis de varianza son consistentes y validas.

En la gráfica (11) se muestra el análisis del porcentaje de mastitis por vaca, considerando que una vaca tiene problemas de mastitis si por

lo menos uno de sus pezones esta infectado. Aquí no es posible hacer un análisis de varianza puesto que no hay grados de libertad para el error. De la gráfica se aprecia tendencias similares a las comentadas previamente para el análisis por pezón excepto en el establo 2 donde el porcentaje de mastitis por vaca resultó similar en ambas épocas del año.

Tipificación de *S. aureus* por PCR

Una vez que se obtuvo crecimiento bacteriológico en los cultivos

Anteriormente citados. Se les practico la prueba de PCR para identificar una secuencia blanco en el ADN del *S. aureus*, el citado procedimiento diagnóstico comprendió en su primera etapa a la obtención del ADN de las 70 cepas puras del *S. aureus* aisladas, seguida de la amplificación por PCR, y finalmente se observó el producto de 270 pb por medio de la electroforesis, las muestras se consideraron filogenéticamente positivas al coincidir la banda en el espacio 2 o 3 de la banda testigo, de acuerdo con el procedimiento usado por Wolter y Col.2001 (Figura 2).

Obtención del ADN genómico del *S. aureus*

Se obtuvo el ADN para la realización de la PCR de las siguientes muestras:

ADN de 70 cultivos puros de *S. aureus*.

ADN de un cultivo de referencia ATCC 25923 de *S. aureus*.

Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de cultivos puros de *S. aureus* para probar la eficiencia de los cebadores.

La elección de los cebadores se tomo de Wolter et al., 2001, De la información bibliográfica, citada se eligió el gen Spa y coa, que codifican para una proteína A, (región X) Spa-5`CAA GCA CCA AAA GAG

GAA 3'. Spa- 3' CAC CAG GTT TAA CGA CAT 5'. y el gen Coa que codifica para la región Fc de IgG Coa-5' ATA GAG ATG CTG GTA CAG G 3' y Coa-3' GCT TCC GAT TGT TCG ATG C5'. secuencias específicas que reconocen únicamente los serotipos de *S. aureus*.

Se logró optimizar las condiciones para la reacción a partir del ADN extraído de la especie de *S. aureus*, esto demuestra que los procesos de búsqueda bibliográfica y el control de las condiciones experimentales fueron las correctas. En la fase preliminar se comprobó la eficiencia y especificidad de los cebadores al realizar PCR a la especie aureus y las bacterias de referencia. *S. aureus*. La figura (2) muestra los resultados de la prueba de la especificidad de los cebadores para el género *S. aureus* ya que muestra amplificación de un fragmento de 920 pb del gen extraído (carril 3.4.5 y 7) lo que confirma la especificidad de los cebadores únicamente la especie del género aureus.

8.7. Polimorfismo del gen Spa.

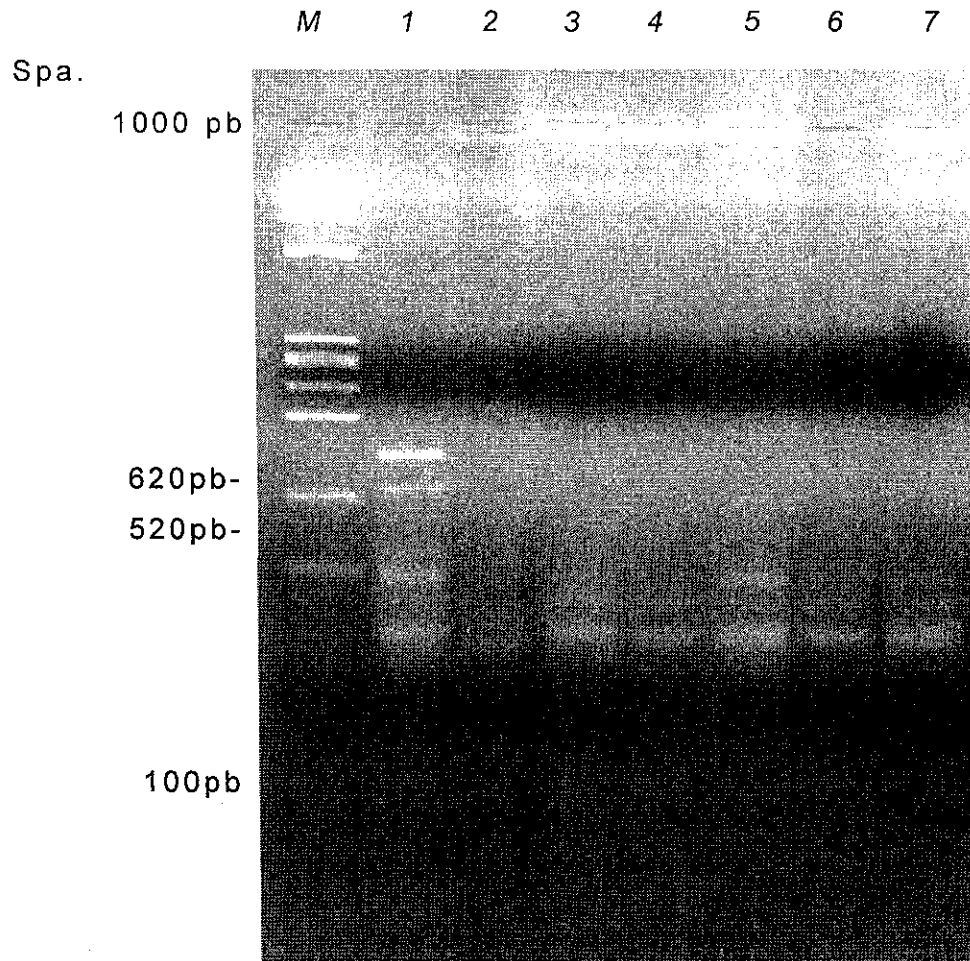


Figura 2. Polimorfismo que codifica el gen Spa. I de *Staphylococcus aureus* Carril 1, 920bp marcador de peso molecular X174RF. carril 2, referencia. 620bp. Carril 3,4,5,6,7, 520bp.

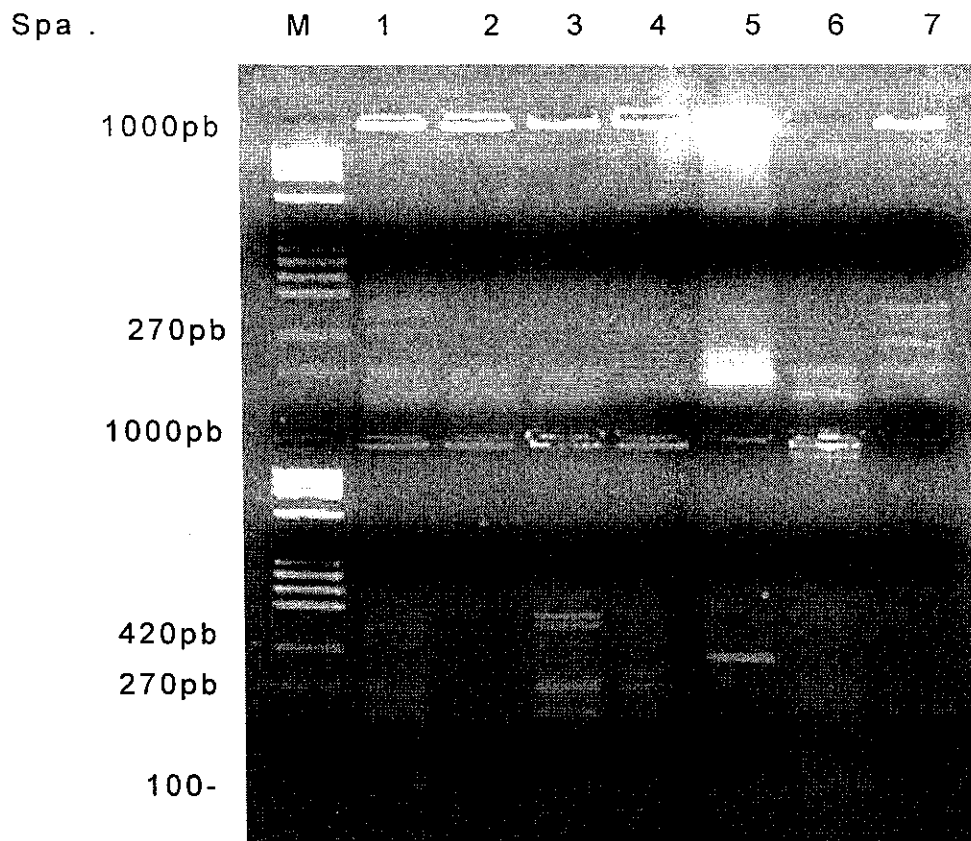


Figura 3. Amplificación del gen que codifica la región X de la proteína A. carril 1,5. 420pb. Carril 2,7. 270pb, 3,6. 460pb y 4. 300pb.

8.8. Polimorfismo del gen Coa

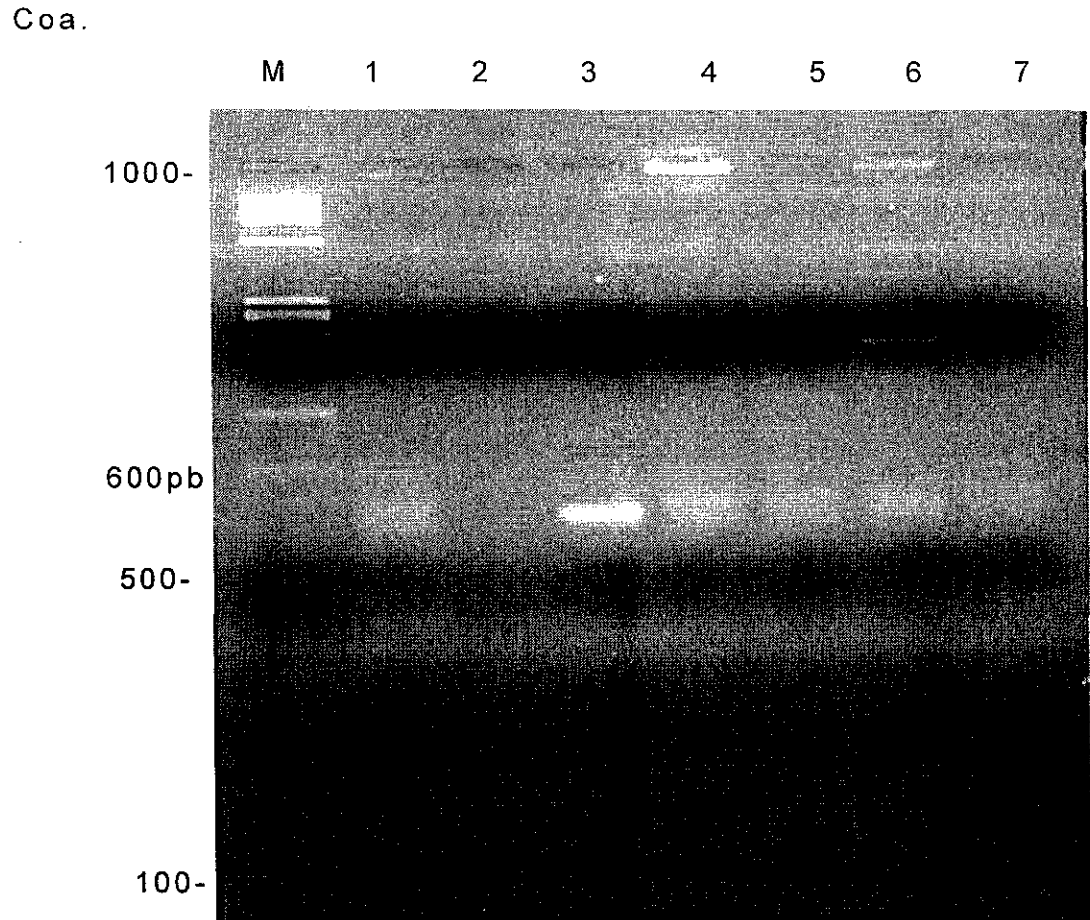


Figura 4. Polimorfismo del gen Coa que codifica a *Staphylococcus aureus* carril 1, 600 pb, carril 3, 580 pb. Carril 4,5,6, 620 pb, carril 7, 680pb.

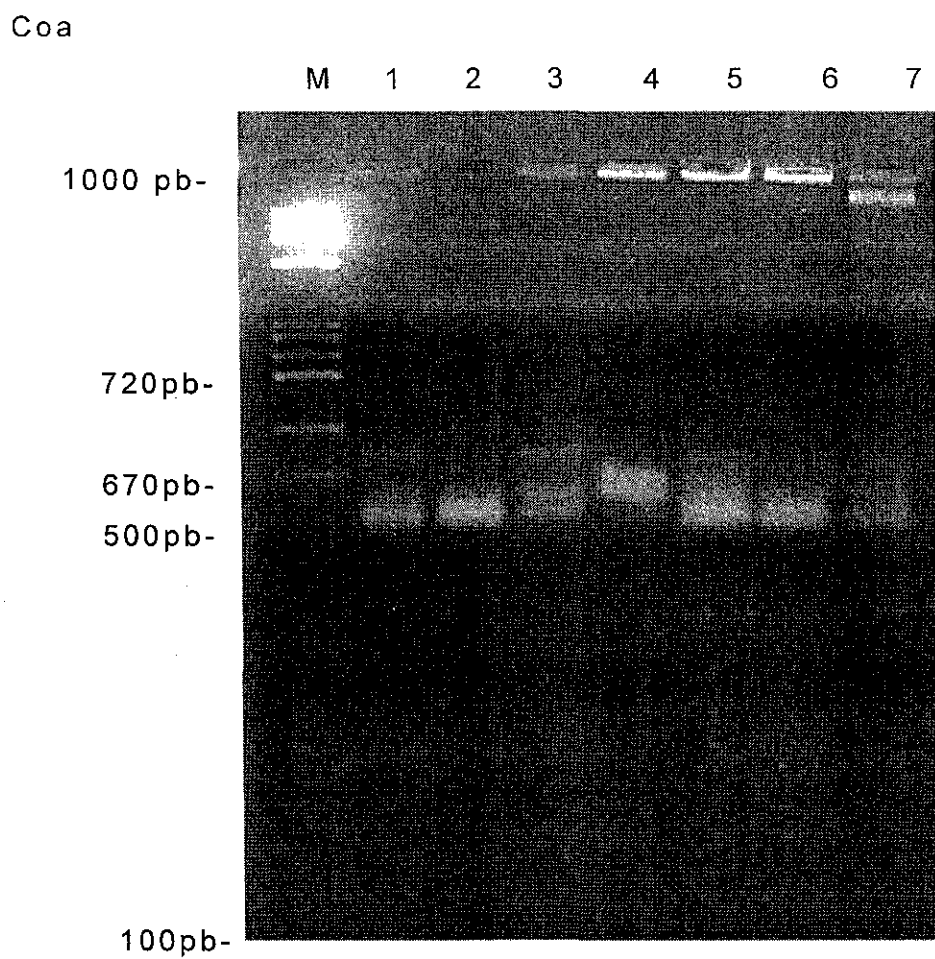


Figura 5. Polimorfismo del gen Coa que codifica a *Staphylococcus aureus* carril 1,2, 5,6 y 7 670 pb. Carril 3, 690pb y el carril 4, 720pb.

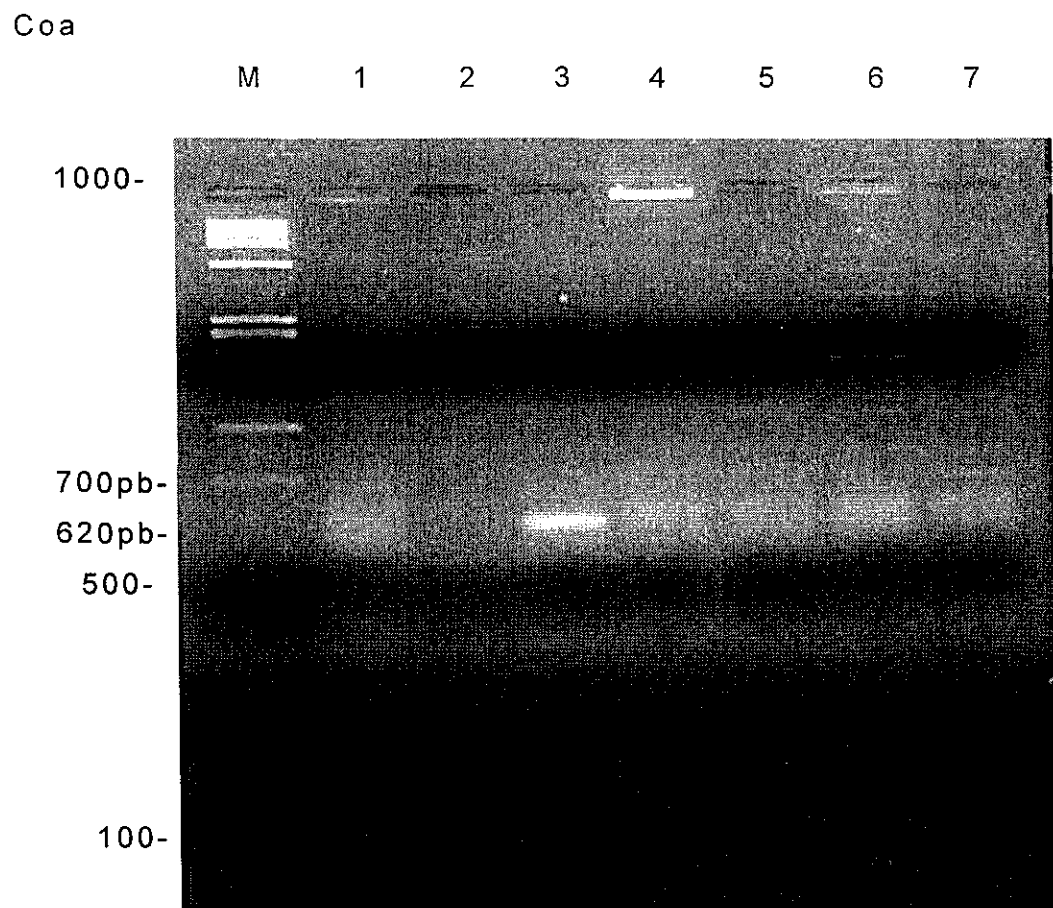


Figura 6. Polimorfismo del gen Coa que codifica a *Staphylococcus aureus* carril 1, 620pb. Carril 3, 680pb. Carril 4,5,6,7, 700pb.

9. DISCUSIÓN

Según Wolter 1999. y Romero. 2004, la variación en los porcentajes de mastitis en los hatos lecheros es del 70-80%, comparando los porcentajes obtenidos del presente estudio, estos mostraron porcentaje de mastitis superior a la establecida en otros estudios, los resultados anteriores determinan una alerta sobre los riesgos potenciales en la salud pública veterinaria

El *S. aureus* es un patógeno bacteriano bien estudiado en infecciones de humanos y animales. Ha sido realizada la caracterización fenotípica de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en varios países (Centorbi et al.1992). Sin embargo, actualmente no se dispone de información sobre las características genotípicas de *S. aureus* aislado de mastitis bovina en México. En el presente estudio 70 cepas de *S. aureus*, aisladas de vacas con mastitis clínica y subclínica del estado de Jalisco, México. Las infecciones de las ubres de las vacas lecheras, en este estado, causan graves pérdidas económicas.

De acuerdo con las propiedades fenotípicas de todos los 70 aislamientos en el presente estudio, pudieron ser identificados como *S. aureus*. Pudo ser realizada una identificación molecular mediante la amplificación de los genes por PCR, que fueron, el segmento del gen que codifica para una parte específica del 23S rARN de *S. aureus*, los genes que codifican para la coagulasa (coa) y el gen spa en el segmento que codifica la región repetitiva-Xr y la región de enlace de la IgG para la proteína A. Una identificación similar basada en el PCR con caracterización de *S. aureus* de origen bovino, ha sido ya realizada por numerosos autores (Annemuller et al.1999). De acuerdo con los resultados del presente estudio, todos los aislamientos de bovinos investigados, fueron positivos para Spa y Coa, revelaron un tamaño de 900pb puede generalmente ser encontrado entre las cepas de *S. aureus*. Aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica, el tamaño del

amplicon del gen Coa y del gen Spa en el segmento codificador de la región Xr de la proteína A. Sin embargo, actualmente, aun no esta clara la importancia de los tamaños de los polimorfismos de los genes Coa y Spa (región Xr) respecto a la situación de la mastitis en los respectivos animales. La presencia de la hemolisina alfa y beta parece tener un patrón típico en el *S. aureus* aislado de la mastitis bovina. Esta sugiere que tal perfil de la hemolisina es necesario para la inducción de la mastitis en las vacas (Lange et al. 1999). La ausencia del gen Spa para cepas de *S.aureus* aisladas de casos de mastitis subclínica puede afectar su capacidad para inducir la mastitis clínica, debido al papel que juega este gen para la penetración en el tejido, la multiplicación y la inducción de la enfermedad (Diges et al. 2000). La capacidad que tiene *S. aureus* para adherirse a matrices extracelulares de proteínas, se piensa que es esencial para la colonización y el establecimiento de las infecciones,. El *S. aureus* posee varios genes de adhesión tales como *clfA*, *fnbA*, *fnbB*, *ebpS*, *cna*, *fib*, *fbpA*, y *map* (Smeltzer et al. 1997).

La mayoría de las cepas del presente estudio (82.5%) fueron Spa, y las cepas restantes (17.5%) fueron positivas a Coa. Estos resultados concuerdan con los de (Hensen et al.2000) ambos tipos fueron observados en la presente investigación en los aislamientos de mastitis clínica y subclínica sin ser estadísticamente significativos.

La investigación presente de *S. aureus* para los genes que codifican Spa y Coa mostraron que las cepas aisladas de mastitis clínica fueron positivas en general para Spa, mientras que las cepas de mastitis subclínica fueron principalmente positivas para Coa. Sin embargo, aun no esta clara la relación de esas diferencias en la regulación genética para la situación respectiva de la mastitis

.(Williams et al. 2000).

Las enterotoxinas producidas por *S. aureus* son proteínas de cadena única de 23- a 29 kD con propiedades inmunomoduladoras potentes. Estas están situadas en su mayoría en elementos genéticos

móviles los cuales los capacitan para una transferencia horizontal entre las poblaciones bacterianas (Novick et al. 2003). La presencia de genes que codifican para enterotoxinas y TSST en los aislamientos de *S. aureus* de leche con mastitis varia (Puig et al. 1992). Siendo muy alto en Japón (Takeuchi et al. 1998) y rara en Dinamarca (Larsen et al. 2000). De los aislamientos bovinos de *S. aureus* en Alemania y Suiza predominaron los genes de Spa principalmente y Coa en segundo termino (Stephan et al. 2001).

Las enterotoxinas se encuentran principalmente relacionadas con intoxicación alimenticia en humanos. La ETA es uno de los principales factores de virulencia de *S. aureus* relacionado en el síndrome estafilococcico de piel escaldada en niños (Haveman et al. 2003). De acuerdo con las publicaciones anteriores, los genes Spa y Coa si pudieron ser detectados en cepas involucradas en la presente investigación.

Los resultados de la genotipificación del presente estudio dan una información acerca de las propiedades genotípicas y de la distribución de los genes de virulencia entre la población de *S. aureus* en el Estado de Jalisco. Esto puede ayudar al entendimiento de la situación de la mastitis bovina en México y puede ser la base de estrategias preventivas para erradicar cepas de *S. aureus* con un fuerte potencial patógeno. Las diferencias de los patrones génicos de los alimentos de *S. aureus* de mastitis clínica y subclínica en el presente estudio y la importancia de esas diferencias para la situación respectiva de la mastitis deberá ser investigada con un numero mayor de cepas.

10. CONCLUSIONES

1.-La investigación de muestras de leche en cuartos de vacas en establos de Zapotlanejo Jalisco del patógeno contagioso *S. aureus* coagulasa positiva, esta presente con frecuencia en hatos lecheros.

2.-Los cebadores seleccionados, permitieron aplicar la técnica de PCR con sensibilidad y especificidad para la detección de las especies del genero *Staphylococcus*. El método de detección aplicado en este trabajo, permitió la amplificación de un fragmento específico de 270 pb, a partir del ADN extraído de *S. aureus* aislado en agar sangre e incubado en caldo BHI.

3.-La técnica de PCR , es altamente especifica capaz de detectar el polimorfismo del gen Spa y Coa de *S. aureus* aislado de leche produciendo resultados favorables de cultivos tradicionales. De mastitis clínica fueron positivas en general para Spa, mientras que las cepas de mastitis subclínica fueron principalmente positivas para Coa. cepas del (82.5%) fueron Spa, (17.5%) Coa. aislamientos de mastitis clínica y subclínica sin ser estadísticamente significativos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aabo, S., Andersen, J.K., Olsen, J.E. (1995). Research note: detection of *Salmonella* in minced meat by polymerase chain reaction method. *Letters in Applied Microbiology*. 21:180-182.
- Adams, D.J.S. McDonald, D. Hancock, and T.C. McGUIRE. (1988). *Staphylococcus aureus* antigens reactive with milk immunoglobulin G of naturally infected dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 26:1175-1180.
- Andrews, A. H., R.W. Blowey, H. Boyd, and R.G. Eddy. (1992). *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*, p. 289-300. Blackwell Publishing Co. London, United Kingdom.
- Andrews, A.T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50:45-55.
- Annemuller C, Lammler C, Zschock M. (1999). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol*; 69:217-224.
- AOAC International. (1995). official Methods of Analysis, 16th ed., sec.975.09.AOAC INTERNATIONAL, Arlington,VA.
- Ariznabarreta A, Gonzalo C, San Primitivo F. (2000). Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to *Staphylococci*. *J. Dairy Sci.*85:1370-1375.
- BAM. Bacteriological Analytical Manual.(2001). Online.January, Chapter ,2. pag.12.03-12.05
- Barkema, HW, Der Schans JV, Schukken YH, De Gee ALW, Lam TJGM, y Benedictus G.(1997). Effect of freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter. *J. Dairy Sci.*80:422-426.
- Barkema H.W, Schukken Y.H, Lam TJGM, Beiboer ML, Benedictus G, Brand A. (1999). Management Practices Associated with the incidence Rate of Clinical Mastitis. *J.Dairy Sci.* 82:1643-1654.
- Barker A.R, Schrick F.N, Lewis M.J, Dowlen H.H, Oliver S.P. (1998). Influence of Clinical Mastitis During Early Lactation on Reproductive Performance of Jersey Cows. *J. Dairy Sci.* 81:1285-1290.
- Becker, K., Roth, R., y Peters, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* use of two multiplex PCR enzyme inmunoenssays for amplification and hybridizationof

- Becker, K., Roth, R., y Peters, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus* use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of two multiplex PCR enzyme of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology* 34:1293-1304
- Bedolla C. C. (2004). Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. N° 41. Febrero-Marzo. UMSNH. pp.24-26.
- Bedolla C. C, Castañeda V. H. (2003). Agentes Patógenos de la Mastitis Bovina. Departamento de Ciencias Agropecuarias Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón Coahuila. Marzo. Vol.1.p.1-4.
- Bej A. K., Esteffan Dicesare., (1990). Detection of coliform bacterial in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiology*. 26:437-444.
- Bentley, R. W., AND j. a. Leigh. (1995). Determination of 16S ribosomal RNA gene copy number in *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. disgalactiae* and *S. parauberis*. *FEMS Immunol. Med Microbiol.* 12:1-7.
- Bentley, R.w., and J. A. Leigh. (1995). Development of PCR-based hybridization protocol for identification of streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.* 33:1296-1301.
- Berri, M., K. Laroucau, and A. Rodolakis. (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from Bovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 72:285-293.
- Bes, M., V. Guerin-Fauble, H. Meugnier, J. Etienne, and J. Freney. (2000). Improvement of the identification of *Staphylococci* isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet. Microbiol.* 71:287-294.
- Blowey R. Y Edmonson P. (1995). Control de la Mastitis en granjas de vacuno de leche. Acribia, Zaragoza. 208 pp.
- Boulanger D, Bureau F, Mélotte D, Mainil J, Lekeux P. (2003). Increased Nuclear Factor κ B Activity in Milk Cells of Mastitis-Affected Cows. *J. Dairy Sci.* 86:1259-1267.
- Bourry, A., T. Cochard, and B. Poutrel. (1997). Serological diagnosis of bovine, caprine, and ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 35:2189-2195.

Bourry, A., and B. Poutrel. (1996). Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* : Kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. *J. Dairy Sci.* 79:2189-2195.

Bradley AJ, Green MJ. (2001) Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *Journal of Clinical Microbiology*; 39(5):1845-1849.

Bramley, A., J. (1996). Current concepts of bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, Wis.

Calvinho LF, Almeida RA, Oliver SP.(1998). potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol*, 61;93-110.

Carter y Chengappa, (1994). Ed. Manual Moderno "Bacteriología y Micología Veterinarias", Segunda edición pág. 197-204)

Castañeda VH, Wolter W, Kloppert B, y Zschock M. (2004). Mastitis Bovina. Prevención. Diagnóstico y Tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. pp.146-153.

Ceron-Muñoz M, Tonhati H, Duarte J, Oliveira J, Muñoz-Berrocal M, Jurado-Gámez H. (2002). Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85:2885-2889.

Cold Spring Harbor Laboratory press(1989) "In Vitro Amplification of DNA by the Polimerase Chain Reaction". Medical Center Second Edition TOMO II (2) Cap. 14. pág.14.2-14.33

Correa M. G. P, y Martín J.M. (2002). O-serogroups, ease gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of Bovine Mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology*. 85:125-132.

De Mol R.M. (2000). "A framework for automated dairy cow status monitoring ".automated detection of oestrus and mastitis in dairy cows. Chapter1. PhD thesis. Wageningen University, Netherlads.1-13.

De Olivera A.P, Watts J.L, Salmon S.A, Aarestrup F.M,. (2000). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States.

Diges. MM, Orwin PM, Schlievert PM: (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol*; 13:16-34.

Djabri B, Barielle N, Beaudeau F, Seegers H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows, a meta analysis. *Vet, Res.* 33:335-357.

Dos Santos Nacimiento J, Dos Santos K.R, Gentilini E, Sordelli D, (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Departamento de Microbiología*

Ensminger M.E. (1997). *Producción Bovina para Leche*. Animal Agriculture Series published by THE INTERSTATE PRINTERS, AND PUBLISHERS, INC., Danville, Illinois, U.S.A. p.4-28.

FAO. (1997). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Gestión de Riesgos e Inocuidad de los Alimentos, Estudio Alimentación y Nutrición* 65.

Fernández del Río J. A. (2002). Mastitis Tema V., en : *Calidad y Eficiencia en la producción de leche*. Manual de procedimientos para la ordeña. Virbac. Departamento técnico. pp.13-18.

Field TR, Ward PN, Pedersen LH, (2003). The Hyaluronic Acid Capsule of *Streptococcus uberis* Is Not Required for the Development of Infection and Clinical Mastitis. *Infection and Immunity*. 71(1):132-139.

Foley, A.C, Bath DL, (1982). *El ganado lechero, principios prácticos, problemas y beneficios*. Editorial interamericana pag. 358-360.

Forsman, P., A. Tilsala-Timisjarvi, and T. Alatossava. (1997). Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S RNA spacer regions. *Microbiology* 143: 3491-3500 Abstract.

Franch, S. M., Bosworth, B. T., Moon H. W., (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing and Shiga-Like toxin-producing *E. coli* strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:1795-1796.

Frandsen, R. D., (1994). *Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos, Fisiología de la Lactancia* McGraw-Hill Interamericana 5ª Ed. Pag.461-469.

Oliveira G.A. (2002). Instituto General de Microbiología, Ciudad Universitaria Rio de Janeiro Brazil. *Mar.* Vol.85. No.2, p.133-144.

Giovannoni, S.J., DeLong, E. F. Olsen, G. J. and Pace, N. R.,

(1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170: 720-726

Gray, M. W., D. Sankoff, and R. J. Cedergren. (1984). On the evolutionary descent of organisms and organelles : a global phylogeny based on a highly conserved structural core in a small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 12: 5837-5852

Gutiérrez P. H., de la Vara Z.R. (2003). *Análisis y Diseño de Experimentos McGraw Hill* cap.5-6 pag. 246-276.

Haveman LM, Fleer A, (2003). Staphylococcal scalded skin syndrome in two very low birth weight infants, *J. Perinat Met;* 31:515-519.

Heidrich JH, Renk W, (1969). enfermedades de las glándulas mamarias en los animales domésticos. Editorial Labor, S.A. pag. 167-231.

Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, (2000). Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expresión of capsular polysaccharide types in situ *J. Dairy;* 83:1996-1975.

Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J, (1999). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science* 200;64:95-106.

Hiringstad B, Klemetsdal G, Ruane J, (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science.* 203 64:95-106.

Hockett ME, Hopkins FM, Lewis MJ, Saxton AM, Dowlen HH, Oliver SP, (2000). Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Anim Reprod Sci,* 58:241-251.

Hulgren J, (2002). Foot leg and udder health in relation to housing changes in Swedish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 53:167-189.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), (2003). *Anuario Estadístico. Por Entidad Federativa. Producción de Leche 2002-2001. Cuadro 11.10 1ª Parte.*

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), (2003). *Anuario Estadístico. Producción de Leche. Por Región y Municipio. Jalisco Tomo II. Cuadro11.5.*

- International Dairy Federation (1981). Laboratory methods for use in mastitis Work. Belletin document 132.. pag. 5-21.
- Jayarao, BM, JJ. Dore, Jr GA. Baumbach, KR. Matthews, and SP. Oliver, (1991). Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. J. Clin. Microbiol 29: 2774-2778.
- Journal of Dairy Research/Dairyng Lactation Food, (2000). Cambridge University Press. Vol. 67, Number 3 August.
- Kakoma I, Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, (2002). Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk, Department of Veterinary Pathbiology University of Illinois, U.S.A. Jan. Vol.84. No.1 p.74-83
- Karp G, (1996). Biología celular y molecular. Ed. McGrauw-Hill interamericana Cap.17 pag.742-746
- Kerr DE, Plaut K, Bramley AJ, Williamson CM, Lax AJ, Moore K, (2001) .Lysostaphin expresion in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nature Biotechnology. 19:66-70.
- Large C, Cardoso M, Senczek D, Schwar, (1999). Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. Vet. Microbiol; 67:127-141.
- Larsen HD, Huda A,(2000). Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. Vet. Microbial; 76.153-162.
- Lorenz H, C. Jager, H. Willems, and G. Baljer, (1998). PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. Appl. Environ. Microbiol. 64:4234-4237 Abstract/Full Text.
- Martínez JR, Gonzalo C. Carriedo JA, y San Primitivo F, (2003). Effect of Freezing on Fossomatic Cell Counting in Ewe Milk. J. Dairy Sci. 86:2583-2587.
- Medina CM, y Montaldo VH, (2003) . el uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México 29-31 de Mayo.
- Mendoza M, H. Meugnier, M. Bes, J. Etienne, and J. Freney, (1998). Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. 1049-1055.

Menzies PI, y Ramonoon SZ, (2001). Mastitis of sheep and goats. *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice*. 17(2):333-358.

Mullis KB, (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am* (April). 262:56-65.

Naresh K. Sharma, Catherine ED, Rees, and Christine ER. Dodd, (2000). Development of a Single-Reaction Multiplex PCR Toxin Typing Assay for *Staphylococcus aureus* Strains Applied Environmental Microbiology. American Society for Microbiology Apr. Vol. 66.No.4 p. 1347-1353

Nash DL, Rogers GW, Cooper JB, Hargrove GL, Keown JF, (2002) Relationships among severity and duration of clinical mastitis and sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and clinical mastitis and sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *J. Dairy Sci.*;85:1273-1284.

Nash DL, Rogers GW, Cooper JB, Hargrove GL, Keoun JF, (2003). Heritability of Intramammary Infections at First Parturition and

National Mastitis Council, (1999). Laboratory handbook on bovine mastitis. 222 pp.

Nierderhauser, C., Candrian, U., Hofelein, CM, Buhler. HP. y Luthy, J. (1992). use for polimerase Caín reaction for detection of *Lysteria monocytogenes* in food. *Applied and Enviromental Microbiology*. 58:1564-1568.

Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA 1-1993. Bienes y Servicios. Especificaciones sanitarias. establece las medidas sanitarias tanto químicas como microbiológicas. Muestreo, métodos de prueba, etiquetado, envase y embalaje, y venta al público.

Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA 1-1994. Leche de vaca y leche pasteurizada con sabor. Incluye métodos de muestreo, métodos de prueba, etiquetado, envase y embalaje.

Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA 1-1994, Bienes y Servicios. Método para la Determinación de *Staphylococcus aureus* en Alimentos.

Novick RP, (2003). Mobile genetic elements and bacterial toxinoses.

The superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. 49: 93-105.

Oluoch AO, I. Kakoma, (2001), Optimization of the PCR for Detection of *Staphylococcus aureus* nuc Gene in Bovine Milk, Department of Veterinary Biosciences American Dairy Science Association, 200, Vol.84 No.1 p. 74-83.

Philpot WN, (2001). Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Junio. León, Gto. México. 26 pp.

Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS, Browning GF, (2001). Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4):1460-1466.

Puig de Centorbi ON, M. de Cuadrado A, (1992). Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in dairies of the city of San Luis. *Rev. Argent Microbiol*; 24:72-80.

Queipo-Ortuno, MI, MA. Garcia-Ordoñez, JD. Colmenero, and P. Morata, (1999). Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *BioTechniques* 27:248-250.

Ramesh A, Padmapriya BP. Chashekar A, Varadaraj MC, (2002). Application of a convenient DNA extraction method PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. Department of Food Microbiology, Central Food Technological Research Institute, Mysore India. Aug. Vol. 16, No.4, p. 307-314.

Reale, S. L. Maxia, f. Vitale, NS. Glorioso, S. Caracappa, and G. Vesco, (1999). Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with Lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* 66:2931-2935 Abstract/Full Text.

Riffon Renée, Khampoune Sayasith , Pascal DJ, (2001). Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal Canada, *Journal of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, . Vol.39, No.7, p. 2584-2589.

Rosas RB, (1992). Boletín informativo. Síntesis de investigación clínica. mastitis y heridas del pezón. Vol 37, N° 8. Pag.15-23.

Rossitto PV, Ruiz L, Kikuchi Y, Luis K, Watts JL, Cullor JS, (2002). Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J. Dairy Sci.*;85:132-138.

Romero AT, (2004), Situación Actual de la Mastitis en México. Departamento de Producción Animal: Rumiantes. FMVZ-UNAM. Año 2. N°7. AGO-SEP pag,7.

Sabat, G. P. Rose, WJ. Hickey, and JM. Harkin, (2000). Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16Sr RNA genes in soil. Appl. Environ. Microbiol. Abstract/Full Text. 66:844-849.

Saran A, y Chaffer M, (2000). Mastitis y calidad de la Leche. Inter. Medica. Buenos Aires. 194 pp.18-21.

Stephan R, Annemuller C, (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. Vet. Microbiol; 78:373-382.

Saruta, K. T. Matsunaga, M. Kono, S. Hoshina, S. Ikawa, O. Sakai, and K. Machda, (1997). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. FEMS Microbiol. Lett. 146:271-278

Schukken YH, Barnm DA, Mallard BA, Lumsden JH, Dick PC, (1999). Experimental *Staphylococcus aureus* Intramammary Challenge in Late Lactation Dairy Cows: Quarter and cow Effects Determining the Probability of Infection . J. Dairy Sci. 82:2393-2401.

Seddek SR, (2001) Bovine Mastitis (Age, cause and control) in Assiut Governorate. Assiut Veterinary Medic Journal.36:149-159.

Smeltzer MS, Gillaspay AF, Pratt Jr FL, Thames MD, (1997). Prevalence and chromosomal location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes, Gene; 196:249-259.

Smith, BP, (1996). Large animal internal medicine, 2nd ed., Mosby, Boston, Mass. p. 1181-1193.

Smith GW, Constable PD, Morin DE, (2001). Ability of hematologic and serum biochemical variables to differentiate gram-negative and gram-positive mastitis. J.Vet. Inter. Med. 15:394-400.

Smith E, Burvenich C, Guidry AJ, Roets E, (1998). In Vitro Expression of adhesion reseptors and Diapedesis by Popymorphonuclear Neutrophils during Experimentally Induced *Streptococcus uberis* Mastitis. Infect Immun.66(6):2529-2534.

Schrack FN, Hocket ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver

- SP, (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.*84:1407-1412.
- Sisson S, Grossman JD, (1986). Anatomía de los animales domésticos Salvat 5ª Ed. Tomo I. pag. 1242-1261
- Soument C. Gwennola E, (1997). Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of Salmonella from chicken products by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology.* 18:294-298.
- Straub, JA, C. Hertel, and WP. Hammes, (1999). A. 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Prot.* 62:1150-115
- Takeuchi S, Ishiguro K, (1998). Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic milk and from bulk. *Vet.* 58:251-258.
- Tamarapu S, McKillip JL, Drake M, (2001). Development of polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. Department of Food Science and Technology, Southeast Dairy Foods Research Center, Mississippi State University, Mississippi. U.S.A. May. _Vol.64. No.5, p.664-668
- Tauxe, RV, (2002). Emerging food borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology.* 78, 31-41
- Talavera JC. De La Fuente EG, Berruecos JM, (1975). Pérdidas económicas por problemas en producción, reproducción, edad y causas por las que son desechadas en México las vacas lecheras estabuladas. *Rev. Técnica Pecuaria, México, S.A. G. Enero-Junio* No. 24.
- Thomas EJ, RK. King, J. Burchak, and VP. Gannon, (1991). Sensitive and specific detection of *Listeria . monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl. EnvironMicrobiol.* 57:2576-2580.
- Tollersrud T, (2001). *Staphylococcus aureus* mastitis. Bacterial characteristics and host immune responses. Thesis of Doctor Medicine Veterinariae. National Veterinary Institute. Oslo: 9.
- Tollersrud T, Kenny K, Caugant DA, Lund A, (2000). Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway, *APMIS.*108 :565-572.

- Torres-Vitela, MR, (1999). Agentes Patógenos Transmitidos por Alimentos. Vol. 1. Universidad de Guadalajara 123-157
- Trkov M, Majericova I, Jerasek B, (1999). Detection of Salmonella in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 16 :393-399.
- Volk AW, (1996). Microbiología Básica, Ed. Harla 7a. Edición, Cap.28 pag.642-648.
- Walker JM, y Gingold, EB, (1997). Biología Molecular y Biotecnología Segunda edición. Ed. Acribia. Zaragoza. España. pp. 53-65.
- Watts JL, (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*16:41-66
- Watts JL, (1989). Evaluation of the Minitex Gram-Positive Set for identification of streptococci isolated from bovine mammary glands., *J. Appl. Bacteriol.*121-126.
- Wegmuller B, Luty J, (1993). Direct polymerase chain reaction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Applied and environmental Microbiology*. 59:2161-2165.
- Wellenberg GJ, van der Poel WHM, Van Oirschot JT, (2002). Viral infections and bovine mastitis. A review. *Veterinary Microbiology*; submitted.
- White LJ, Schukken YH, Lam TJGM, Medley GF, Chappell MJ, (2002). A multispecies model for the transmission and control of mastitis in dairy cows. *Epidemiol. Infect.* 127:567-576.
- Wilkins S, y Baltimore M, (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Ed. Lippincott Williams. pag.544-550
- Whitehead TR, and MA. Cotta, (2000). Development of molecular methods *Microbiol. Lett.* 182: 237-240.
- William L. Crist, (1975). Extension Dairy Specialist, "Mastitis and its Control" Cooperativa Extension Service. University of Kentucky, College of Agriculture 1997. Publication ASC-140. pag. 3-13
- Williams RJ, Ward JM, Henderson B, Pooles S, (2000). Identification of a novel gene cluster encoding *Staphylococcus aureus* exotoxin-like proteins . characterization of the prototypic gene and its protein product, SET1. *Infect Immun* . 68:4407-4415.

Wolter W. Kloppert B. y M. Zschöck, (1999). Memoria: La mastitis en Bovinos. Curso México-Alemania, Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.. pag. 1-51

Wolter W. And Zschöck M. Lammler C, (2001), Toxin Genes and Other characteristics of Staphylococcus aureus Isolates from Milk of Cows with Mastitis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, American Society for Microbiology. Sep. Vol.8; No.5 p. 959-964

Yazdankhah SP. Sorum H, Larsen HJS, Gogstad G, (2001). Rapid Method for Detection of Gram-Positive and Negative bacteria in Milk from Cows with Moderate or Severe Clinical Mastitis Journal of Clinical Microbiology. 39(9):p. 3228-3233.

Zadoks RN, (2002). Molecular and mathematical epidemiology of Staphylococcus aureus, and Streptococcus uberis. Mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine.2-3,329.

Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, (2001). Analysis of an outbreak of Streptococcus uberis mastitis. J. Dairy Sci.;84(3):590-599.

Zadoks RN, (2002). Molecular and mathematical epidemiology of Staphylococcus and Streptococcus uberis mastitis in dairy herds. Thesis of PhD.:2-3.

Zschock M, Jurgen S. and Castañeda H, (1999). Relatedness of Staphylococcus isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd, Staatliches Medizinal-, Lebensmittel-und Veterinaruntersuchungsamt Mittelhessen, pag. 429-435

**ANEXO 1 Grado de afección a la prueba de California establo N° 1,
por cuarto y época del año de 97 vacas muestreadas.**

Época de Lluvias.				Época de Secas			
3	3	3	3	1	2	1	1
2	3	3	2	0	2	2	0
3	3	3	3	1	0	1	0
1	2	2	2	0	1	0	1
1	3	3	3	0	2	1	0
1	2	2	3	0	1	0	2
3	3	3	3	1	1	2	2
2	2	2	2	0	0	2	1
1	2	3	2	0	0	1	0
1	2	3	2	0	1	1	0
3	2	2	3	1	0	0	2
1	1	1	1	0	1	0	0
1	2	2	2	0	0	0	0
3	3	3	3	0	1	1	1
1	0	2	3	0	0	0	2
1	2	2	3	1	0	1	1
2	2	3	2	1	1	1	1
1	2	3	3	0	0	1	2
3	2	1	3	1	0	0	2
1	3	1	2	0	1	0	0
2	2	2	2	0	0	0	0
0	0	3	2	0	0	1	1
1	1	1	1	0	0	0	0
3	3	3	3	2	1	1	2
1	0	2	2	0	0	0	1
3	3	2	3	1	1	0	1
0	0	1	0	0	0	0	0
0	1	2	1	0	0	0	0
1	2	2	1	0	0	0	0
CLINICO	0	1	3	CLINICO	0	0	2
1	2	3	1	0	0	2	0
1	1	2	3	0	0	1	1
0	2	2	1	0	0	0	0
3	2	3	3	2	1	2	2
3	3	3	3	1	1	1	1
CALOSTROS				GESTACION			
0	0	0CLINICO		0	0	0CLINICO	
1	3	2	1	0	2	0	0
3	2	3	3	1	0	2	1
3	3	3	3	1	1	1	1
2	1	2	1	1	0	0	0
4	3	4	3	2	1	2	1
0	1	1	1	0	0	0	0
3	3	3	3	1	2	1	1
0	1	3	1	0	0	1	0
3	2	2	2	1	0	0	0

2	0	1	0	0	0	0	0
3	1	3	2	1	0	1	0
3	2	2	3	1	0	0	1
3	3		3	2	1	0	2
3	2	3	0	1	0	1	0
1	2	2	2	0	1	1	0
3	3	3	3	1	1	1	1
3	2	3	3	1	0	0	1
3	3	3	3	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	1	1	0	0	0	0
3	4	3	3	1	2	1	2
CLINICO	0	0	1	CLINICO	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	0	1	1	0	0	0
2	2	2	2	0	1	0	2
3	3	3	3	1	1	0	0
3	3	3	3	1	1	1	1
3	3	3	3	1	0	1	1
3	3	3	3	2	1	2	1
2	0	2	1	0	0	0	0
1	3	2	2	0	1	0	0
3	3	3	2	2	2	0	1
2	2	2	2	0	0	0	0
1	3	3	3	0	1	1	1
3	3	3	2	0	0	0	0
3	3	3	3	0	1	0	0
3	3	3	3	1	1	1	1
2	2	2	2	0	0	0	0
2	2	2	2	0	1	0	0
2	2	2	2	0	1	0	0
2	3	2	3	0	2	0	1
1	2	1	2	0	1	0	0
4	2	3CLINICO	2	2	1	3CLINICO	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	1	1	0	0	0
2	1	1	2	0	0	1	2
0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	3	2	3	1	0	0
2	3	2	2	0	0	1	1
3	3	3	3	1	1	1	1
3	3	3	3	1	2	1	1
2	2	3	3	0	0	0	2
3	3	3	3	2	2	2	3
0	0	0	2	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
4CLINICO		3CLINICO		2CLINICO		1CLINICO	
0	0	1	0	0	0	0	0
3	2	0	1	1	0	0	0

**ANEXO 2 Grado de afección a la prueba de California establo N° 2,
por cuarto y época del año de 120 vacas muestreadas.**

Época de Lluvias.				Época de Secas.			
3	3	3	3	2	2	2	3
3	3	3	3	2	2	1	3
2	2	2	2	0	1	0	1
2	2	2	2	2	1	2	2
2	2	2	3	0	1	1	3
2	2	2	2	0	0	1	0
3	2	3	2	1	0	2	0
2	1	2	1	0	0	0	0
CLINICO	CLINICO	2	3	3	3	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	1	0	0	1	0
1	2	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	1	0	1	1	1
2	1	1	2	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	3	2	0	0	1	0
2	3	2	2	0	2	0	0
3	3	3	3	1	0	1	1
3	3	3	3	1	1	2	2
2	2	3	3	1	1	2	2
3	3	3	3	2	1	1	1
2	2	3	3	2	2	2	2
0	0	0	2	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
4CLINICO		3CLINICO		2	2	2	2
0	0	1	0	0	0	0	0
3	2	0	1	1	0	0	0
3	2	0	1	2	2	0	0
3	2	3	0	2	0	1	0
1	2	2	2	0	1	1	1
3	3	3	3	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	1	1	0	0	0	0
3	4	3	3	2	2	2	2
1	0	0	1	0	0	0	0
2	2	2	2	0	0	1	1
3	3	3	3	1	1	0	1
3	3	3	3	1	0	1	2
3	3	3	3	3	1	2	3
3	3	3	4	3	3	3	3

2	0	2	1	1	0	1
1	2	3	2	1	1	1
3	3	3	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	1
1	3	3	3	1	2	3
3	3	3	2	2	2	3
3	3	2	3	1	2	1
3	3CLINICO	3	3	1	1CLINICO	2
1	0	2	2	1	0	0
3	3	3	3	2	2	2
1	1	1	1	0	0	0
0	0	3	2	0	0	1
2	2	2	2	2	2	1
0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	2	0	0	1
1	3	1	2	0	2	1
3	2	1	3	1	1	1
1	2	2	3	1	1	1
1	2	3	3	0	2	2
2	2	3	2	2	2	2
1	2	2	3	0	0	0
1	0	2	3	1	1	1
3	3	3	3	2	2	2
1	2	2	2	1	1	1
3	3	3	3	0	0	0
1	2	2	1	1	1	1
1	1	1	2	2	2	1
3	3	2	2	2	3	0
3	3	2	2	2	2	2
2	2	2	2	1	0	0
2	2	2	2	1	1	2
3	3	3	3	1	0	1
1	2	2	3	0	0	2
1	3	3	3	0	0	0
1	2	2	2	1	1	1
3	3	3	3	2	2	3
2	3	3	3	0	0	1
3	3	3	3	2	2	2
CLINICO	3	3	3	2	0	2
3	2	2	3	2	1	1
3	3	3	3	2	2	0
3	3	3	3	2	2	2
3	3	3	3	2	2	2
3	3	3	3	2	2	2
3	3	3	3	2	2	2
3	3	3	3	2	2	2
3	2	3	2	0	0	2
1	2	3	3	2	2	0
2	2	2	2	2	2	0
3	3	3	2	2	2	2
1	2	2	2	0	0	0
2	0	2	1	0	0	1
3	3	3	3	2	1	0

3	3	3	3	1	1	1	0
3	3	3	3	1	1	1	1
3	3	3	3	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	3	3	2	2	2	2
2	2	2	2	0	0	0	0
1	1	0	CLINICO	0	0	0	0
CLINICO	CLINICO	2	3	2	2	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0
3	4	3	3	2	2	1	1
1	2	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	3	3	3	2	0	0
3	3	3	3	2	2	0	0
3	2	3	3	2	2	1	1
1	2	2	2	1	1	1	1
3	2	3	0	2	2	2	0
3	3	3	3	1	1	1	1
3	3	3	3	0	0	0	0
3	3	3	3	1	0	1	0
CLINICO	3	3	3	2	2	2	2
CLINICO	CLINICO	3	3	2	2	2	2
0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	2	0	0	0	1

**ANEXO 3 Grado de afección a la prueba de California establo N° 3,
por cuarto y época del año de 39 vacas muestreadas.**

Época de Lluvias.				Época de Secas.			
3	2	3	3	2	2	1	2
3	3	3	2	2	2	2	2
3	2	2	3	1	1	1	0
3	3	3	3	1	2	2	2
2	2	2	1	0	0	0	1
3	3	2	3	2	2	1	2
2	2	2	1	1	1	1	1
CLINICO	CLINICO	3	3	1	2	2	1
3	2CLINICO	3	3	2	2	2	1
3	3	2	2	2	2	2	0
0	0CLINICO	3	3	0	0	3	0
0	0	0	1	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0	0	1
0	0	0CLINICO	1	1	0	0	0
2	2	2	1	1	1	1	1
1	2	2	2	1	1	0	0
1	3	2	1	0	0	0	0
3	3	3	3	2	0	2	0
1	1	1	1	0	0	0	0
0	0CLINICO	0	0	0	0	3	0
3	2	2	3	1	1	0	0
3	3	3CLINICO	3	0	0	0	3
3	3	2	2	0	0	0	0
3	2	3	3	0	1	1	0
3	2	2	3	0	1	0	0
3	2	2	3	0	1	2	1
0	0	2	0	0	0	0	0
2	1	0	0	1	0	0	0
2	2	1	1	0	1	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0
3	3	2	3	1	1	0	1
3	2	2	2	0	0	1	0
2	2	1	0	1	1	0	0
0	2	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	0	0
1	1	2	1	0	1	1	0
1	3	3	1	0	1	2	0
1	1	1	0	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	0

