



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**USO DE EXTRACTO DE SEMILLAS DE CÍTRICOS PARA EL CONTROL DE LA
MASTITIS BOVINA**

TESIS

Que presentan:

ANDRES GALLEGOS SORIA

JOSÉ NOÉ MONCADA CORTEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR: MC. José Luis Carlos Bedolla Cedeño

Coasesores: MC. Alejandra Minerva Aguilar Marín

Dr. José Herrera Camacho

Morelia Michoacán, Abril del 2011.





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

USO DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE CÍTRICOS PARA EL CONTROL DE LA
MASTITIS BOVINA

TESIS QUE PRESENTAN

ANDRES GALLEGOS SORIA

JOSÉ NOÉ MONCADA CORTEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Morelia Michoacán, Abril de 2011



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

USO DE EXTRACTOS DE SEMILLAS DE CÍTRICOS PARA EL CONTROL DE LA
MASTITIS BOVINA

TESIS QUE PRESENTAN

ANDRES GALLEGOS SORIA

JOSÉ NOÉ MONCADA CORTEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR: MC. José Luis Carlos Bedolla Cedeño

COASESORES

MC. Alejandra Minerva Aguilar Marín

Dr. José Herrera Camacho

Morelia Michoacán, Abril del 2011.

DEDICATORIA

A mis hermanos Rodrigo, Hermilo, Reyna, Rosvi y Rosy por apoyarme en lo que necesitaba y enseñarme a nunca dejar las cosas a la mitad.

Al profesor MC. José Luis Carlos Bedolla Cedeño por haberme dado la oportunidad de trabajar en su proyecto, apoyarme en la tesis como mi asesor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado licencia de cumplir mi sueño y concluir una etapa más de mi vida, gracias señor.

A mis Padres Roberto Gallegos y Enriqueta Soria por haberme dado la vida y las bendiciones para concluir mi sueño y apoyarme en mis decisiones.

A mis hermanos Gabriel, Roselvía, Rosaiselda, Rosario, Reina, Rodrigo, Hermilo, Enriqueta y Rosvelía por haberme apoyado en toda mi carrera incondicionalmente.

A Maricela Franco y Ramón Jácome por su grandioso apoyo y ser mis mejores padrinos.

A todos mis amigos de la sección 02, por ser mis mejores amigos y haberme apoyado y brindado su amistad incondicional.

A mis maestros que me formaron desde preescolar a los actuales por darme la enseñanza y formarme como un profesional.

A la Química Rosalva por su apoyo en el laboratorio.

A la profesora MC. Alejandra Minerva Aguilar Marín, por su apoyo en la parte de estadística y colaboradora con el proyecto.

Al MVZ. Fernando Cortez Ibarra por su grandioso apoyo durante la investigación del presente trabajo en el campo.

Se agradece a la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por el apoyo otorgado durante el 2010 al Proyecto de Investigación “Uso de extracto de semillas de cítricos para el control de la mastitis bovina” del cual forma parte el presente trabajo.

El presente trabajo forma parte del Proyecto de Investigación titulado “Uso de extracto de semillas de cítricos para el control de la mastitis bovina” financiado por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo durante el periodo de junio a diciembre del 2010.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres José Sidronio Moncada Mulato y María Eustolia Cortes Rangel, por haberme dado el Don más importante que es la vida, por haberme apoyado a lo largo de todos mis estudios, por sus consejos, por sus enseñanzas y por toda su comprensión a lo largo de mi carrera.

A Dios, por haberme dado licencia de terminar una etapa más en mi vida y en mi formación.

A mis hermanos y hermanas que estuvieron siempre conmigo apoyándome en cada etapa de mi vida.

A todas las personas y amigos que a lo largo de mi carrera estuvieron conmigo dándome consejos.

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Fisiología de la lactación.....	2
El desarrollo de la glándula mamaria.....	2
Mamogénesis.....	3
Lactogénesis y Galactopoyesis.....	3
Flujo sanguíneo mamario.....	4
MASTITIS.....	5
Tipos de mastitis.....	6
Mastitis clínica.....	6
Mastitis subclínica.....	8
CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA.....	9
Microorganismos causantes de la mastitis contagiosa.....	10
Microorganismos causantes de la mastitis ambiental.....	11
Genero <i>Staphylococcus</i>	13
Aislamiento e identificación.....	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	17
<i>Corynebacteriumbovis</i>	18
<i>Corynebacterianonlipophilic</i>	18
<i>Mycoplasma bovis</i>	19

<i>Mycoplasma agalactiae</i>	19
Género <i>Streptococcus</i>	19
Aislamiento e identificación.....	20
<i>Streptococcus agalactiae</i>	21
<i>Streptococcus uberis</i>	22
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	22
<i>Escherichia coli</i>	23
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	25
Hongos y levaduras.....	25
Algas.....	25
EXTRACTO DE SEMILLAS DE CÍTRICOS.....	26
Propiedades del extracto de semillas de cítricos.....	26
Su fruto es hespérido, característico del género.....	26
En Medicina.....	26
CitroBio 10.....	27
100 % orgánico bt agroindustrial.....	27
Características.....	27
Sugerencias de aplicación.....	27
Control microbiológico del CitroBio 10.....	28
Descripción.....	28
Desinfectante a base de cítricos.....	28
Usos, dosis y modo de aplicación, usos en porcicultura, dilución forma de aplicación.....	29
Usos en sector avícola (granjas o incubadoras) dilución formas de aplicación....	29
Beneficios de los cítricos.....	30

OBJETIVO.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIÓN.....	37
LITERATURA CITADA.....	38

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición de extracto de semillas de cítricos sobre la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis de la comunidad de Téjaro, Michoacán. Se trabajó en 16 unidades de producción. El estudio fue llevado a cabo en tres fases la primera; dirigida a realizar un diagnóstico de la prevalencia de mastitis clínica y subclínica a través de la prueba de California, la segunda; comprendió el aislamiento y caracterización de los agentes patógenos causantes de la mastitis bovina en el ganado lechero en estudio, la tercera; procesamiento de las muestras y realización de un antibiograma a través de la prueba de Muller -Hinton para corroborar la efectividad del extracto de semillas de cítricos. Con un total de 488 muestras tomadas de los cuatro cuartos en cada una de las vacas, se encontró, que 308 de los 488 cuartos analizados, se encontraban afectados de mastitis. Y de las 50 muestras sometidas al antibiograma todas resultaron sensibles al extracto, por lo tanto, en base a los resultados de laboratorio obtenidos en esta investigación, utilizando extracto de semillas de cítricos para el control de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus*, éste puede ser utilizado de manera segura y efectiva contra dicho patógeno dado a la inhibición que el extracto ejerce sobre él mismo.

Palabras clave: Semillas de cítricos, *Staphylococcus aureus*, Mastitis,

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una de las principales enfermedades que afectan a la glándula mamaria causando grandes pérdidas económicas para los productores de leche en el mundo debido a una disminución de la producción láctea. Es una enfermedad compleja que puede definirse simplemente como una inflamación de la glándula mamaria (Heringstad *et al.*, 2000). Normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica (Leigh, 1999; dos Santos *et al.*, 2002).

En la glándula mamaria bovina se han identificado hasta 140 especies, subespecies y serovariedades microbianas, de las cuales las más importantes son (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma sp*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus fecalis*, estafilococos coagulasa negativos, entre otros (Aguado, 2008). Las técnicas microbiológicas han permitido la determinación precisa de la identidad de muchos microorganismos patógenos de la mastitis (National Mastitis Council, 1992; y Philpot y Nickerson, 1998).

Para caso específico de este trabajo se procesaron muestras de leche de 16 establos con la finalidad de determinar la presencia de *Staphylococcus aureus*, para posteriormente evaluar el efecto de la adición de extracto de semillas de cítricos sobre la inhibición de crecimiento de bacterias *Staphylococcus aureus*, causantes de mastitis.

ANTECEDENTES

Fisiología de la lactación

El desarrollo de la glándula mamaria

El desarrollo de la glándula mamaria se inicia en el feto en todas las especies mamíferas. En el feto bovino, desde el ectodermo, las líneas mamarias son visibles desde el día 35. Alrededor del tercer mes los canales mamarios y se forman los conductos excretorios y luego se forman los alvéolos. El sistema excretorio es completado al final del segundo trimestre de la vida fetal.

Durante el primer estadio postnatal, el proceso de crecimiento es a una tasa igual que el resto del cuerpo (crecimiento isométrico). Al comienzo del tercer mes la glándula mamaria comienza a crecer 2-4 veces más rápido que el resto del cuerpo hasta la pubertad (crecimiento alométrico). Previo a la pubertad el tejido mamario es influenciado por factores de crecimiento y hormonas (Glauber, 2007).

A edad adulta el ciclo de la lactación puede dividirse en periodos consecutivos: mamogénesis, lactogénesis, galactopoyesis e flujo sanguíneo mamario. Cada fase caracterizada por un estricto control hormonal. Tres categorías de hormonas están involucradas: hormonas reproductivas (estrógenos, progesterona, lactógeno, placentaria, prolactina y oxitocina) actúan directamente sobre la glándula mamaria. Hormonas del metabolismo (hormona crecimiento, corticosteroides, tiroides, insulina) que funcionan en distintas partes del cuerpo y a menudo tienen efecto sobre la glándula.

Finalmente hormonas de producción local que incluyen la hormona de crecimiento, prolactina, paratiroideapeptídica (PTHrp) y leptina (recientemente descrita, hormona con síntesis en el tejido adiposo pero también en la glándula mamaria).

La PTHrp se expresa en células del epitelio mamario durante la lactación y recientes experimentos en cobayos informan que su secreción puede relacionarse con las concentraciones de calcio extracelular y su importancia en el transporte de calcio desde la sangre a la leche (Glauber, 2007).

Mamogénesis

Hormonas del metabolismo, factores de crecimiento y prolactina son necesarios para el normal desarrollo de la glándula mamaria con especial referencia a las hormonas sexuales esteroideas. A través de la gestación, la proliferación del epitelio mamario es dependiente de estrógenos y progesterona. Los receptores específicos para esas hormonas se expresan en niveles muy bajos durante la mamogénesis o lactogénesis. Los estrógenos también estimulan la secreción de IGF-I (Factor crecimiento-insulina) a partir de las células del estroma de la glándula mamaria y causa el crecimiento de células epiteliales. La mamogénesis no ocurre en ausencia de prolactina y hormona de crecimiento (Glauber, 2007).

Lactogénesis y Galactopoyesis

La producción de leche es controlada por las hormonas lactogénicas Prolactina y Hormona de Crecimiento (HC) durante la lactogénesis y lactopoiesis. Prolactina y HC son esenciales para la transición de proliferativo a glándula mamaria lactando a través del dominio de HC sobre la prolactina durante la galactopoyesis en rumiantes a diferencia de humanos y cobayos. En el mantenimiento de la producción lechera o galactopoyesis la prolactina (PRL) en la vaca lechera reviste importancia. La acción de la prolactina es a través del epitelio mamario en forma directa o factores de transcripción, semejante a la HC que actúa en forma directa en la glándula o indirectamente con producción de IGF-I local o producida en el

hígado. Las células mamarias bovinas presentan receptores IGF-I y II, receptores de insulina y proteínas de unión IGF (Glauber, 2007).

Flujo sanguíneo mamario

El parénquima mamario y su red de capilares se desarrollan en paralelo y comparativamente en una tasa más lenta desde la preñez. El desarrollo de conductos y bifurcaciones del parénquima mamario madura a lo largo con el crecimiento mamario. El volumen sanguíneo se expande en el animal preñado y alrededor del 15 % de la producción cardiaca está directamente relacionada con la unión placentofetal hasta el fin de la preñez. Al parto la mayoría del flujo es removido del útero a la glándula mamaria. Un óptimo flujo sanguíneo de la glándula es esencial para la producción de leche para proveer los precursores en la síntesis necesaria de los elementos de la leche.

Asimismo otros órganos como el tracto gastrointestinal y el hígado también usan parte de ese elevado volumen sanguíneo. La producción de CO₂ ha sido directamente correlacionada con el flujo sanguíneo mamario. Aunque el flujo sanguíneo mamario aumenta tremendamente al parto, el completo desarrollo de la red capilar y actividad metabólica a juzgar por la actividad de la anhidrasa carbónica en el endotelio capilar no se alcanza hasta varios días después del parto en la cabra. El flujo sanguíneo de la glándula mamaria es luego correlacionado con la producción de leche y disminuye luego del pico de lactancia cuando comienza a declinar la producción (Glauber, 2007).

MASTITIS

El término mastitis se deriva de las palabras griegas “mastos”, que significa “pechos” e “itis” que quiere decir “inflamación de”. La inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche en la ubre a una lesión traumática o la presencia de microorganismos infecciosos u otros agentes que han ingresado a la ubre. El propósito de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar el agente ofensivo, reparar los tejidos dañados y retornar la glándula a su función normal (National Mastitis Council, 1998 y Philpot y Nickerson, 1992).

La mastitis es una enfermedad altamente prevaleciente en el ganado lechero, y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución en el rendimiento de leche y un aumento en el número de tratamientos clínicos y desecho temprano de vacas, por lo que se ha reconocido, durante algún tiempo, como la enfermedad más costosa en los hatos lecheros (Correa *et al.*, 2002; Ceron-Muñoz *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2002).

Es una enfermedad compleja que puede definirse simplemente como una inflamación de la glándula mamaria (Smits *et al.*, 1998; Heringstad *et al.*, 2000; De Oliveira *et al.*, 2000; Riffon *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2001; Menzies y Ramanoon, 2001; Yazdankhah *et al.*, 2001; Kerr *et al.*, 2001; Zadoks, 2002). Inflamación causada más comúnmente por infección intramamaria con un patógeno, pero también puede ser causada por una lesión (herida), menos frecuente por alergia y neoplasias (Menzies y Ramanoon, 2001).

La mastitis bovina normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica (Leigh, 1999; Dos Santos *et al.*, 2002). Es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no. Una inflamación intramamaria está

asociada con un aumento en el conteo de células somáticas (CCS) en la leche. Sin embargo, la magnitud del aumento en el conteo de células somáticas varía de acuerdo a la bacteria involucrada en la infección intramamaria (Djabri *et al.*, 2002).

Tipos de mastitis

Mastitis clínica

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 (Djabri *et al.*, 2002).

La mastitis clínica es una anomalía fácilmente observada por los granjeros en cualquiera de los dos casos: la leche y/o la ubre (de Mol, 2000). Es un problema que subsiste en muchos hatos lecheros (Barkema *et al.*, 1999).

Se caracteriza por la 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; Schrick *et al.*, 2001).

La mastitis clínica debida a *Escherichia coli* (*E. coli*), estreptococos ambientales, y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) continua siendo un problema importante (Schukken *et al.*, 1999). Y puede ser una condición aguda y dolorosa que afecta el comportamiento animal (Zadoks, 2002). 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).

En un estudio realizado por Barker *et al.* (1998), demostraron que las vacas con mastitis clínica durante la primera lactación presentaron un prolongado intervalo hasta el primer servicio (94 días) comparado con animales que no presentaron mastitis clínica (71 días).

Además, las vacas con mastitis clínica entre el primer servicio y el establecimiento de la gestación tuvieron un aumento en el número de días abiertos y un doble aumento de servicios por concepción (Hockett *et al.*, 2000).

La mastitis clínica es una enfermedad costosa en las granjas lecheras de los Estados Unidos, con una tasa promedio de incidencia lactacional de 14.2% de acuerdo a un análisis retrospectivo de 62 reportes realizados (Smith *et al.*, 2001).

En el Reino Unido, la incidencia de mastitis clínica es aproximadamente de 40 casos por cada 100 vacas por año o un millón de casos anualmente (Hillerton y Kliem, 2002).

Según Heringstad *et al.* (2000) en 1993, el número de casos de mastitis clínica por 100 vacas al año fue de 56, 32, 30 y 21 en Dinamarca, Finlandia, Noruega y Suiza respectivamente. En varios estudios realizados en California, Michigan y Ohio las incidencias de mastitis que se encontraron fueron de 30, 33 y 37 casos por 100 vacas por año respectivamente. Estas estimaciones incluyen las mastitis reportadas por los dueños y tratadas por los veterinarios.

Los costos estimados por mastitis clínica varían dependiendo del país y presupuesto e incluyen los costos del tratamiento y veterinario, la reducida producción de leche durante la parte restante de la lactación, las pérdidas de leche que ha sido desechada debido a contaminación con antibióticos, eliminación temprana, labor extra, disminución de la calidad de la leche e incremento de los riesgos de la enfermedad en el futuro. Los costos estimados

por caso de mastitis clínica en Noruega son de 460 dólares americanos, en base a todos los costos arriba mencionados.

Las pérdidas económicas estimadas en Finlandia debido a un caso de mastitis clínica fueron de 215 dólares americanos en base al valor de leche desechada, costos en veterinario, medicina y de labor extra. Los costos de la mastitis clínica reportados por granjeros de Estados Unidos varían de 108 a 122 dólares por caso, en base a medicamentos y veterinario, preventivos, de trabajo extra, desecho y pérdidas de leche (Heringstad *et al.*, 2000).

Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas de la leche (de Mol, 2000). El conteo elevado de células somáticas en la leche indica mastitis subclínica (Hultgren, 2002).

Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche (Schrack *et al.*, 2001), composición alterada de la leche y la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche (Heringstad *et al.*, 2000).

Cuando los signos no son visibles, la presencia de patógenos y las modificaciones citológicas de la leche traen como resultado una 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).

La mastitis, particularmente subclínica y crónica, es la más persistente y más común del grupo de enfermedades de importancia por la higiene de la leche en el ganado lechero. La mastitis subclínica 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. En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador (Wellenberg *et al.*, 2002).

Según Wellenberg *et al.* 2002, actualmente las pérdidas ocasionadas por ambos tipos de mastitis clínica y subclínica pueden ascender a 20% de la producción potencial.

CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA

En la glándula mamaria bovina se han identificado hasta 140 especies, subespecies y serovariedades microbianas. Las técnicas microbiológicas han permitido la determinación precisa de la identidad de muchos microorganismos patógenos de la mastitis. Tomando como base la epidemiología y la fisiopatología, se han clasificado estos microorganismos como causantes de la mastitis contagiosa o ambiental, en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente (Green, 2001; Riffon *et al.*, 2001; Radostits *et al.*, 2002; Bradley y Rossitto *et al.*, 2002).

Según Riffon *et al.* 2001, las bacterias responsables de la mastitis bovina pueden ser clasificadas como contagiosas y ambientales, dependiendo de su reservorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria infectad

Microorganismos causantes de la mastitis contagiosa

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y al *Mycoplasma spp.* (Riffon *et al.*, 2001; Rossitto *et al.*, 2002; Djabri *et al.*, 2002). Son organismos transmitidos de vaca a vaca a través de los paños utilizados para limpiar las ubres, la leche residual en las pezoneras y un equipo de ordeño inadecuado 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; Radostits *et al.*, 2002), y la exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso de la ordeña (Bradley y Green, 2001; Zadoks *et al.*, 2001; Zadoks, 2002).

Los patógenos contagiosos de la mastitis como el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son infecciosos a nivel individual y a nivel de población (Zadoks, 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 (Rossitto *et al.*, 2002).

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

En general, un programa de control de la mastitis concienzudo puede erradicar a *Streptococcus agalactiae* de la mayoría de los rebaños lecheros. Es mucho más difícil tratar los rebaños en los que *Staphylococcus aureus* tiene una prevalencia alta (Radostits *et al.*, 2002).

Microorganismos causantes de la mastitis ambiental

Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp.* (Rossitto et al., 2002). Otros microorganismos patógenos se incluyen en la clase ambiental de este tipo de infecciones.

Se trata generalmente de oportunistas que invaden la glándula mamaria cuando los mecanismos de defensa están disminuidos o cuando se introducen inadvertidamente en la glándula mamaria al realizar un tratamiento intramamario. Este grupo de microorganismos oportunistas incluyen a *Pseudomona spp.*, levaduras, *Prototheca spp.*, *Serratia marcescens* y *Nocardia spp.* Cada uno de estos agentes poseen características de cultivo, mecanismos patógenos y consecuencias clínicas singulares (Radostits et al., 2002).

La fuente de estos agentes patógenos es el entorno de la vaca. La forma de transmisión principal es del ambiente a la vaca a través de un manejo inadecuado del primero. Algunos ejemplos incluyen la cama húmeda, terrenos sucios, ubres mojadas por la leche, preparación inadecuada de la ubre y los pezones antes del ordeño y sistemas de estabulación que favorecen las lesiones en los pezones (Radostits et al., 2002). Y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales que puede ocurrir en cualquier momento durante la vida de una vaca (Zadoks et al., 2001).

Estas infecciones generalmente ocurren de forma esporádica. Sin embargo, se pueden producir brotes en los rebaños o en una región entera, normalmente como consecuencia de problemas con la higiene o el tratamiento. Por ejemplo, se ha producido mastitis causada por *Pseudomona aeruginosa* en brotes relacionados con la contaminación de las conducciones de goma en las salas de ordeño (Radostits 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 cs/ml) (Rossitto *et al.*, 2002).

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

Los patógenos principales son definidos como los patógenos responsables, la mayoría de las veces, de las mastitis clínicas o de fuertes respuestas inflamatorias (conteos elevados de células somáticas en la leche) y comprenden al *Staphylococcus aureus*, estreptococos (*S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*) y coliformes (Ariznabarreta *et al.*, 2002; White *et al.*, 2001; Djabri *et al.*, 2002).

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 estafilococos (principalmente *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, y *S. xylosus*) o por *Corynebacterium bovis* y *Micrococcaceae* coagulasa-negativos (Ariznabarreta *et al.*, 2002; White *et al.*, 2001; Djabri *et al.*, 2002).

Género *Staphylococcus*

Los estafilococos son cocos Gram-positivos (de 0.5 a 15 μm de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 o 4 células) y más característicamente en grupos irregulares en forma de racimos (su denominación procede del griego *staphylé*, racimo de uvas). Son anaerobios facultativos, catalasa positiva, generalmente oxidasa negativos, no esporulados, inmóviles y generalmente no forman cápsula o tienen una limitada formación capsular.

En la actualidad en el género *Staphylococcus* se reconocen 32 especies y varias subespecies, si bien sólo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico. Los estafilococos según produzcan o no la enzima coagulasa, se dividen en dos grandes grupos: Estafilococos coagulasa positivos (ECP) y estafilococos coagulasa negativos (ECN). Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de los estafilococos de tal manera que, en general, se considera que los ECP son patógenos y que los ECN no lo son. No obstante, algunas especies de ECN se han relacionado con procesos patológicos tanto en animales como en el hombre (Vadillo *et al.*, 2002).

Aislamiento e identificación

Los estafilococos crecen en los medios de cultivo ordinarios, como el agar nutritivo, si bien para la siembra de muestras clínicas (exudados, pus de abscesos, leche mamítica, raspados de piel, orina, etc.) se utiliza habitualmente el agar sangre (preferentemente de oveja), medio en que puede apreciarse la capacidad hemolítica producido por las bacterias.

Existen varios medios selectivos para los estafilococos, como el agar sal manitol y el medio de Baird-Parker, que se utiliza principalmente para análisis de alimentos. Las colonias aparecen normalmente a las 24 horas de incubación pueden alcanzar los 4 mm de diámetro. Estas colonias son redondas, lisas y brillantes y en agar sangre opacas, lo que las diferencia de las colonias de los estreptococos beta-hemolíticos, que son más pequeñas y translúcidas. Las colonias pueden ser o no pigmentadas mostrando en este caso distintas tonalidades, desde el crema pálido al amarillo vivo.

El criterio generalmente utilizado para la identificación de las especies patógenas es la capacidad de coagular el plasma. Esta capacidad se determina bien con una prueba de tubo, o bien con una prueba de porta.

La prueba en tubo, permite detectar la coagulasa libre y se realiza añadiendo a 0.5 ml de plasma de conejo citratado o con EDTA un par de gotas bien en un cultivo líquido de 18 horas, o bien de una suspensión densa preparada a partir de un cultivo de agar. La lectura de la prueba se hace a las 4 y a las 24 horas. La prueba de la coagulasa en parte permite detectar el clumping factor y se realiza preparando una suspensión muy densa de bacterias en una gota de agua depositada en un portaobjetos y sobre la suspensión se añade con un asa de platino una gota de plasma de conejo y se mezcla rotando el asa (Vadillo *et al.*, 2002)

Staphylococcus aureus

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es la principal causa de infección intramamaria en los rumiantes (Bayles *et al.*, 1998; Yugueros *et al.*, 1999; Zadoks *et al.*, 2000; Mullarky *et al.*, 2001) por lo que se le considera el agente causal más importante y frecuente de la mastitis bovina (Iannelli *et al.*, 1998; Ferens *et*

al., 1998; Lammers *et al.*, 2000; Sordelli *et al.*, 2000; Tollersrud *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2002).

Aunque varios patógenos bacterianos pueden causar la mastitis, el *S. aureus* es el primer agente etiológico en la mayor parte del mundo (Tollersrud *et al.*, 2000), ha surgido como el más prevaleciente, y una vez establecido en la glándula mamaria es muy difícil de erradicar (Sordelli *et al.*, 2000) y causa las pérdidas económicas más considerables en la industria de la leche (Lammers *et al.*, 2000).

En muchos países el *S. aureus* es un patógeno de la ubre, muy importante que causa la mastitis (Bjorland *et al.*, 2001). En 1998 Smith, informo de un brote de mastitis causada por *S. aureus*, en el estado de Washington, en un hato lechero (Middleton *et al.*, 2002); el *S. aureus* y las bacterias estreptococales son los agentes etiológicos más comunes involucrados en los casos clínicos y subclínicos de mastitis en los hatos lecheros de Nueva Zelanda (Douglas *et al.*, 2000).

El *S. aureus* es el patógeno principal responsable de una amplia gama de infecciones agudas y crónicas. El primer paso en las infecciones por *S. aureus* es la adherencia a las diferentes superficies y colonización de tejidos del organismo infectado. Para este propósito el *S. aureus* presenta una familia de adherencias llamada MSCRMMs (componentes de la superficie microbiana que reconocen las moléculas adhesivas de la matriz).

Estas interacciones permiten al *S. aureus* adherirse a una variedad de líneas celulares y promover la invasión y muerte por apoptosis de células epiteliales infectadas. Otro paso en la colonización del *S. aureus* es la formación de una biopelícula. La formación de esta biopelícula es una inquietud importante en las infecciones porque protege a los microorganismos de los leucocitos y antibióticos, llevando a la infección crónica y septicemia. Fenómenos similares

ocurren con otras bacterias patógenas, como *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae* (Cucarella et al., 2002).

El *S. aureus* se reconoce mundialmente como una causa frecuente de infecciones intramamarias subclínicas en las vacas lecheras (Riollet et al., 2001). El reservorio principal del *S. aureus* parece ser el cuartero infectado y la transmisión entre las vacas, normalmente, ocurre durante la ordeña (Akinaden et al., 2001), la interacción del *S. aureus* con las células de la glándula mamaria bovina es considerada esencial en el rol que desempeña en la patogénesis de la mastitis (Lammers et al., 1999).

Recientemente se ha demostrado que el *S. aureus* induce la apoptosis en las células epiteliales de la glándula mamaria bovina, indicando que este proceso pudiera estar involucrado en la persistencia o patogénesis de este patógeno (Wesson et al., 1998).

En recientes experimentos que evalúan la invasión y supervivencia intracelular del *S. aureus* en las células del tejido endotelial, epitelial y osteoblasto; se ha indicado que la supervivencia intracelular pudiera contribuir a la persistencia del patógeno, induciendo endocarditis, mastitis bovina y osteomielitis (Gresham et al., 2000).

El *S. aureus* es actualmente uno de los patógenos más difíciles de controlar porque puede extenderse rápidamente entre el hato y puede responder pobremente a una terapia antibiótica convencional (Soltys y Quinn, 1999); la naturaleza crónica de la mastitis bovina por *S. aureus*, indica que algunos productos o componentes de este patógeno pueden interferir en el desarrollo de la inmunidad protectora (Ferens et al., 1998).

Este patógeno puede causar muchas enfermedades en los humanos y animales (Fitzgerald *et al.*, 2001), es el agente causal de muchas infecciones oportunas en los humanos y los animales (Yugueros *et al.*, 1999). Las infecciones debidas al *S. aureus* es de la mayor importancia en la medicina veterinaria y humana (Zadoks *et al.*, 2000). En el humano el *S. aureus* es un patógeno responsable de la septicemia, endocarditis y el síndrome del shock tóxico; ocasionando la mastitis en las vacas y ovejas (Fitzgerald *et al.*, 2001).

El *S. aureus* exporta una gran variedad de enzimas, algunas de las cuales tienen factores de virulencia conocidos (Reed *et al.*, 2001), algunas de estas enzimas son capaces de incrementar las características invasoras del microorganismo y lo protegen de los mecanismos corporales de defensa.

El *S. aureus* sigue siendo un patógeno persistente alrededor del mundo que causa serias infecciones. Las enfermedades que se han asociado con el *S. aureus* son diversas, yendo de las infecciones en heridas menores a las enfermedades más serias, incluso la endocarditis, osteomielitis y el shock séptico (Wesson *et al.*, 1998).

Staphylococcus chromogenes

El *Staphylococcus chromogenes* (*S. chromogenes*) es considerado un patógeno secundario de la mastitis bovina; sin embargo, muchos estudios recientes, han mostrado la importancia que ha adquirido en la infección de la glándula mamaria bovina. El *S. chromogenes* puede causar infecciones más severas que, en promedio, puede causar otra especie de estafilococos (Devriese *et al.*, 2002).

En un estudio realizado por Zhang y Maddox. (2000); se encontró que no había ninguna diferencia significativa en los parámetros de inflamación entre una infección por *S. aureus* y una infección ocasionada por *S. chromogenes*.

El *S. chromogenes* es una especie que prevalece en la mastitis subclínica, con un impacto bien establecido en el conteo de las células somáticas. En un estudio realizado con 70 muestras de *S. chromogenes* se determinó que todas eran susceptibles a la acción de la neomicina, gentamicina, eritromicina, enrofloxacin, penicilina y a las cefalosporinas, representadas en este estudio por la cloxacilina (Devriese *et al.*, 2002).

Corynebacterium bovis

El *Corynebacterium bovis*, frecuentemente se aísla de la leche de glándulas mamarias de vacas infectadas de mastitis (Hommeze *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 2000) y es asociado con la reducción en la producción de leche (Watts y Rossbach, 2000). Está relacionado con formas muy apacibles de inflamación mamaria. La única manifestación de esta infección, es un ligero aumento de la cuenta de células somáticas (Hommeze *et al.*, 1999).

Corynebacteria nonlipophilic

La *Corynebacteria nonlipophilic* ha sido asociada con mastitis clínica y subclínica en vacas lecheras; se han identificado cuatro especies: El *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis* y el *Corynebacterium minutissimum* (Hommeze *et al.*, 1999).

Mycoplasma bovis

El *Mycoplasma bovis* induce varias manifestaciones clínicas en el ganado, como la mastitis, artritis y pulmonía; se ha extendido mundialmente, sobre todo en Europa y América del Norte, produciendo grandes pérdidas económicas en la industria lechera y en la producción de carne (Brank *et al.*, 1999).

Mycoplasma agalactiae

El *Mycoplasma agalactiae* es el principal agente causal de la agalactia contagiosa. Este síndrome es caracterizado por la agalactia, la mastitis, la artritis y a veces la Queratoconjuntivitis. Causa severas pérdidas económicas, particularmente en los hatos de ganado lechero, debido a que el *Mycoplasma agalactiae* es persistente y muy contagioso, que hace casi imposible la producción regular de queso (Fleury *et al.*, 2001).

Género *Streptococcus*

El término *Streptococcus* (Streptós, trenzado; kókkos, grano) fue utilizado por primera vez por Billroth, en 1874. Para describir unos microorganismos de forma cocácea, dispuestos en cadena. Son células esféricas u ovoides, con un diámetro de 0.5 a 2 μm , que se dividen en un plano y pueden quedar adheridas y formar parejas o bien cadenas largas cuando crecen en medios de cultivo líquido. A excepción de algunas especies, son generalmente inmóviles y no capsuladas (Vadillo *et al.*, 2002).

Los estreptococos son organismos Gram-positivos, de catalasa negativa, que frecuentemente son aislados de la glándula mamaria bovina y de tanques de leche cruda (Sawant *et al.*, 2002).

Algunos organismos que pertenecen al género *Enterococcus* y *Streptococcus* en particular el *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus* y el *Streptococcus uberis*, han sido bien documentados como agentes etiológicos de mastitis bovina y sus resultados han provocado severas pérdidas económicas a la industria lechera (Sawant *et al.*, 2002).

Los estreptococos son, probablemente, el segundo grupo en importancia, después de los estafilococos, responsables de la mastitis. Aunque el *Streptococcus agalactiae*, el *Streptococcus uberis* y el *Streptococcus dysgalactiae* son las especies más frecuentemente identificadas, otra especie de estreptococos, el *Streptococcus parasanguinis*, ha sido implicado en las infecciones de la glándula mamaria (Las Heras *et al.*, 2002).

Aislamiento e identificación

Para el aislamiento de los estreptococos se utilizan medios enriquecidos con sangre o suero y medios de cultivo selectivos, que pueden llevar en su composición cristal violeta, sulfato de talio y, en ocasiones, sustancias antimicrobianas; la incubación se realiza a 37 °C en aerobios o microaerofilia durante 18 a 24 horas, transcurridas las cuales se pueden observar colonias con un diámetro de 0.5 a 2 mm, de bordes regulares, transparentes u opacas y convexas.

En medios de cultivo con sangre, los estreptococos pueden producir distintos tipos de hemólisis: Hemólisis β que se caracteriza por una lisis total de los hematíes, hemólisis α , que corresponde a una decoloración incompleta alrededor de la colonia, rodeada de una zona de tonalidad verdosa de 1 a 3 mm, y hemólisis γ o ausencia de hemólisis. La capacidad hemolítica de la bacteria se

debe a dos enzimas: la estreptolisina O (que se inactiva en presencia de oxígeno) y la estreptolisina S (que permanece estable en presencia de oxígeno, y cuya producción es inducida por el suero) (Vadillo *et al.*, 2002).

Streptococcus agalactiae

El *Streptococcus agalactiae* es considerado una de las mayores causas de infecciones intramamarias bovinas. Es un patógeno muy contagioso de la glándula mamaria, donde puede sobrevivir por largos períodos de tiempo (Martínez *et al.*, 2000); esta bacteria es considerada una de las mayores causas de infecciones intramamarias bovinas particularmente en América del Norte (Poyart *et al.*, 2001).

En los países donde se ha controlado el *Streptococcus agalactiae*, los patógenos más importantes son el *Staphylococcus aureus*, el *Streptococcus dysgalactiae* y el *Streptococcus uberis*. En general las especies normalmente aisladas, a nivel mundial, de estafilococos coagulasa negativos parecen ser de *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis* y de *Staphylococcus simulans*. Algunas diferencias en la patogenicidad entre las diferentes especies de ECN han sido observadas. Así, se encuentra al *Staphylococcus simulans* más frecuentemente asociado con las infecciones clínicas que las otras especies y asociado con la reacción de una inflamación aumentada (Møller *et al.*, 1999).

Streptococcus uberis

El *Streptococcus uberis* es una bacteria patógena medioambiental que induce, en una proporción significativa, la mastitis clínica bovina en todo el mundo (Johnsen *et al.*, 1999; Leigh *et al.*, 1999; Phuektes *et al.*, 2001); Por consiguiente la mastitis medioambiental se ha vuelto un gran problema (Phuektes *et al.*, 2001).

El *Streptococcus uberis* es un importante patógeno medioambiental involucrado en los casos de mastitis subclínica y clínica durante el periodo de lactación temprana y el periodo seco (Douglas *et al.*, 2000); y es responsable del 12 al 14% de la mastitis clínica en vacas lactantes (Smits *et al.*, 1998).

En el Reino Unido es responsable de alrededor del 20% de todos los casos de mastitis bovina (Johnsen *et al.*, 1999); sin embargo Ward *et al.* (2001), afirman que es el responsable del 33% de los casos detectados de mastitis bovina. En Dinamarca podrían relacionarse el 23% de los casos de mastitis en los hatos lecheros con la infección por este patógeno (Johnsen *et al.*, 1999). Se han diferenciado 31 especies del género *Streptococcus* incluidas las especies *S. uberis* y *S. parauberis*, ambas especies son bien conocidas como agentes causales de mastitis bovina (Hassan *et al.*, 2001).

Streptococcus dysgalactiae

La mastitis causada por patógenos medioambientales es un gran problema que afecta a los hatos lecheros. De entre los patógenos medioambientales, el *Streptococcus dysgalactiae* ha sido frecuentemente aislado de las infecciones intramamarias durante la lactación y el período seco (Calvinho *et al.*, 1998).

El *Streptococcus dysgalactiae* es una de las especies bacterianas más importantes aislada en la mastitis bovina. El de la especie hemolítica, es un patógeno muy común en la mastitis clínica y subclínica (Vasi *et al.*, 2000).

La prueba serológica de Lancefield a la bacteria *Streptococcus dysgalactiae*, del grupo C, la identifica como uno de los patógenos más comunes de mastitis bovina, que causa pérdidas económicas más grandes en la industria de la leche (Vasi *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001).

Este patógeno es muy capaz de sobrevivir en la boca, vagina y piel de los animales saludables que pastan. Debido a su situación medioambiental, los métodos de higiene normales y la terapia del antibiótico son menos eficaces previniendo las infecciones por *Streptococcus dysgalactiae* que las infecciones por otro patógeno contagioso (Vasi *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001).

Escherichia coli

La mastitis medioambiental es causada por bacterias coliformes. La mayoría de las bacterias coliformes son clasificadas como *Escherichia coli* (*E. coli*). La mastitis ocasionada por la *E. coli* es normalmente esporádica y las señales clínicas varían desde muy severa, incluso formas fatales, a mastitis apacible, donde las vacas tienen solo señales locales en la ubre (Kaipainen *et al.*, 2002).

La mastitis es un problema importante en la industria lechera y la mastitis producida por *E. coli* es sobre todo la principal enfermedad en las vacas (Correa y Marín, 2002).

La razón para la importancia de la mastitis por *Escherichia coli* es su creciente incidencia y los síntomas severos. Este aumento puede ser debido al uso rutinario de la terapia de la vaca seca, la cual es eficaz contra el organismo

contagioso Gram positivo, pero no contra el patógeno medioambiental como *E. coli*. La infección de la ubre por este patógeno probablemente es resultado de contaminación fecal (Correa y Marín, 2002).

De la gran variedad de patógenos microbianos que pueden causar la mastitis bovina, la *E. coli* y la *Klebsiella pneumoniae* son los patógenos medioambientales más frecuentemente aislados de las infecciones intramamarias y son los principales causantes de la mastitis clínica (Barkema *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999).

La *E. coli* ha sido clasificada como un agente patógeno medioambiental que induce la mastitis clínica, que es caracterizada por una intensa concentración de neutrofilos, que lleva a la eliminación de las bacterias (Riollet *et al.*, 2000); (Bradley y Green, 2001).

La tasa de mastitis clínica ocasionada por este coliforme varía entre los países. En Finlandia menos de 20%, pero en Israel más del 60% de casos de mastitis son causados por coliformes (Kaipainen *et al.*, 2002).

Diversos factores de virulencia detectados a partir de bacterias *E. coli* patogénicas ocasionan infecciones del tracto urinario, diarrea, septicemia y meningitis en animales y humanos. La mastitis bovina es semejante a la infección del tracto urinario en que la infección es ascendente, causada por bacterias del ambiente (Kaipainen *et al.*, 2002).

Arcanobacterium pyogenes

El *Arcanobacterium pyogenes* es un habitante común de los tractos respiratorio superior, urogenital y el gastrointestinal de muchas especies animales domésticas. Sin embargo, una herida física o microbiana a la ubre puede ocasionar una variedad de infección supurativa de tipo piogénico, como la mastitis en las vacas y cabras lecheras (Jost *et al.*, 2001).

Hongos y levaduras

La incidencia de mastitis debida a hongos es usualmente muy baja en los hatos lecheros, pero algunas veces puede ocurrir en proporciones epizooticas (Krukowski *et al.*, 2000).

Diversas especies de levaduras han sido reportadas en muchos países como causantes de mastitis. La infección fungal de la glándula mamaria es predominantemente causada por levaduras del género *Cándida*. Los hongos no son un agente extraño en la mastitis bovina y son frecuentemente considerados en la mastitis medioambiental debido a la pobre higiene animal (Krukowski *et al.*, 2000).

Algas

La Protothecosis es una forma severa de mastitis en ganado bovino causada por las algas descoloridas del género *Prototheca* (Roesler *et al.*, 2001).

EXTRACTOS DE SEMILLAS DE CÍTRICOS

Propiedades del extracto de semillas de cítricos

El género *Citrus* cuyo término común es cítrico, designa las especies de grandes arbustos o arbolillos perennes (entre 5 y 15 m) cuyos frutos o frutas, de la familia de las *Rutáceas*, poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, el cual les proporciona ese típico sabor ácido tan característico. Oriundo del Asia tropical y subtropical, este género contiene tres especies y numerosos híbridos cultivados, inclusive las frutas más ampliamente comercializadas, como el limón, la naranja, la lima, el pomelo y la mandarina, con diversas variedades que dependen de la región en la que se cultive cada una de ellas (www.wikipedia.org).

Su fruto es un hesperidio, característico del género

Debido a la facilidad de hibridación de los cítricos, todos los cultivos para uso comercial se obtienen injertando las especies cultivares deseadas sobre plantones seleccionados por su resistencia a las enfermedades.

En Medicina

El ácido cítrico es usado muy abundantemente en la industria farmacéutica. En Medicina se utiliza entre otras cosas como digestivo, sustancia que favorece la digestión, estando incluido en la clasificación internacional ATC dentro del grupo A09, con el código concreto de A09AB04.

CitroBio 10

100% Orgánico bt Agroindustrial

Citrobio 10 es un bactericida y fungicida sistémico de origen natural elaborado a partir de extractos cítricos. Exhibe propiedades tanto preventivas como curativas, permite la eliminación y el control de una gran variedad de microorganismos asociados con enfermedades de diversos cultivos. Permite prolongar la vida útil de los productos agrícolas usando el producto para el manejo post-cosecha (www.bioproductos.com.mx).

Características

- Producto 100% natural
- Inocuo a seres humanos, animales y vegetales
- Tiene un amplio y poderoso espectro germicida
- Efecto preventivo y curativo
- Presenta poder residual por un mínimo de 72 horas
- No es corrosivo ni volátil
- No es toxico.

Sugerencias de aplicación

- Aplicar el producto previamente diluido.
- Llenar el recipiente hasta la mitad con agua, agregar citrobio 10 y agitar ligeramente. Posteriormente completar con agua. No mezclar el producto con desinfectantes o plaguicidas químicos ni con fungicidas metálicos (www.bioproductos.com.mx).

Control microbiológico de CitroBio 10

Cholera, E. Coli, Salmonella, Germenés, Amibas, Pseudomonas spp, Xanthomonas spp, Clavibacter spp, Agrobacteriums, Fusarium sp, Ascochyta, Botritis spp, Alternarias spp, Mycosphaerella, Colletotrichum (www.bioproductos.com.mx).

Descripción

Desinfectante poderoso de origen natural obtenido a partir de Extractos Cítricos, biodegradable, Orgánico Certificado, con un amplio espectro germicida que permite la eliminación de bacterias gram positivas, gram negativas, hongos y levaduras entre otros (www.bioproductos.com.mx).

Desinfectante a base de extractos cítricos

CITRIK MAX es un *desinfectante* poderoso recomendado para todo tipo de instalaciones ya sean rastros, empacadoras y procesadoras de productos cárnicos y derivados; granjas, establos, clínicas y hospitales veterinarios, etc. Se puede utilizar para la desinfección de áreas, maquinaria, equipos y accesorios. Se emplea también en camiones y otros vehículos motorizados; así mismo, en tapetes y vados y arcos sanitarios. Al no ser un producto corrosivo, permite prolongar la vida útil de las instalaciones, equipo e implementos que ante la presencia de agentes químicos tradicionales se oxidan, corroen, agrietan y deterioran rápidamente. No contamina leche, huevos, carnes, ni derivados (www.corpocitrik.com).

Usos, dosis y modo de aplicación usos en porcicultura dilución forma de aplicación

Desinfección de instalaciones en general 1 ml/5 litros Aspersión, cepillo, esponja

Desinfección de maternidades 1 ml/2.5 litros Aspersión, cepillo, esponja

Desinfección de comederos y bebederos 1 ml/5 litros Aspersión, cepillo, esponja

Desinfección de instrumental para cirugía 5 ml/litro Aspersión, inmersión

Desinfección de Vehículos 1 ml/5 litros Aspersión exterior (arco sanitario) e interior

Usos en sector avícola (granjas o incubadoras) dilución forma de aplicación

Desinfección de instalaciones en general 1 mL./5 litros de agua Aspersión cepillado o esponja (según sea el caso)

Desinfección de equipo 1 mL/5 litros de agua Aspersión o inmersión antes y después de su uso

Desinfección de utensilios 1 mL/5 litros de agua Aspersión, inmersión, cepillo o esponja.

Pediluvios, rodoluvios y arcos sanitarios

1 mL./ 2.5 – 5.0 litros de agua

Inmersión o aspersión.

Desinfección de huevo fértil o para plato

1 mL./ 1 – 2.5 – 5.0 litros de agua Aspersión (www.corpocitrik.com).

Beneficios de los cítricos

Las frutas cítricas tienen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, el cual les da un sabor ácido muy exclusivo.

A continuación algunos beneficios y propiedades de los cítricos (www.cuidadodelasalud.com).

- Poseen una cantidad considerable de vitamina C.
- Las frutas ácidas consiguen desintoxicar y dar fluidez a la sangre, disuelven los ácidos úricos y ayudan a fijar mejor el calcio en los tejidos óseos.
- Por todas estas propiedades, previenen los trastornos vasculares, los cálculos renales y el reuma.
- De la misma manera, desarrollan una acción cicatrizante, desinfectante y antibacteriana.
- Proporcionan fitoquímicos, un tipo de Flavonoide que aumenta la capacidad defensiva de los leucocitos (glóbulos blancos) de la sangre.
- Por ejemplo, "el limón, debido a su grado de acidez, actúa como un antibiótico natural si se coloca sobre la piel, en las fosas nasales, boca y garganta.
- En uso interno potencia las defensas antiinfecciosas y tiene acción inmunoestimulante.

Frutas con cítricos:

- Entre los cítricos más habituales se encuentran las naranjas, las mandarinas, los kiwis, la lima, las fresas, el limón y los pomelos o toronjas (www.corpocitrik.com).

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la adición de extracto de semillas de cítricos sobre la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis de la comunidad de Tégaro, Michoacán.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó de Septiembre del 2010 a Enero del 2011 en la comunidad de Téjaro, Municipio de Tarímbaro Michoacán, la cual se encuentra ubicada en las coordenadas 19°54' de latitud norte y 101°17' de longitud oeste, a una altura snm de 1900 metros (INEGI, 2009).

Se muestrearon 16 hatos lecheros de la raza Holstein-Friesian, explotados bajo un sistema de producción a pequeña escala. Para determinar la prevalencia de mastitis bovina se utilizó la prueba de California para mastitis (CMT). Se obtuvieron un total de 488 muestras, las cuales fueron recolectadas de 122 vacas en producción.

El estudio se desarrolló en tres etapas, la primera, dirigida a realizar un diagnóstico de la prevalencia de mastitis clínica y subclínica a través de la prueba de California; la segunda, comprendió el cultivo, incubación, identificación, aislamiento y caracterización de los *Staphylococcus aureus* causantes de la mastitis en el ganado lechero en estudio; la tercera, comprendió el procesamiento de las muestras y realización de un antibiograma a través de la prueba de Muller-Hinton para corroborar la efectividad del extracto de semillas de cítricos (CitraBio 10).

El número de unidades de muestreo (n=16 establos) se calculó con un modelo aleatorio con distribución proporcional en función de la caracterización del sistema de lechería a pequeña escala mediante componentes principales y conglomerados (Sánchez *et al.*, 2004).

Para la recolección de muestras de leche se procedió a la limpieza y desinfección de los pezones con toallas de papel desechable impregnadas con alcohol a 70° en seguida, se desecharon los primeros chorros y se procedió a realizar la prueba de California (CMT), para lo cual se utilizó una paleta de plástico, depositando en

ella una muestra de leche de cada pezón, la cual se mezcló con un reactivo de nombre comercial Diagmastin (aquil-aril sulfonato de bromocresol), haciendo movimientos rotativos, la leche de los pezones infectados forman un gel, la consistencia del gel se evaluó en forma visual. Estas reacciones se relacionan en general con el número de células somáticas de la leche, una reacción positiva indica mastitis. Los resultados se leyeron como negativos, trazas, 1^o+, 2^o+, 3^o+, y mastitis clínica.

Enseguida, se continuó con la toma de muestras de leche utilizando para ello tubos de plástico esterilizados llenándolos hasta dos tercios, en los cuales previamente se anotó los datos de la vaca y el pezón. La toma de muestra se hizo con una presión del pezón. Posteriormente, los tubos se colocaron en una gradilla dentro de una hielera cerrada herméticamente para transportarlas al laboratorio de bacteriología de la USAD de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para su procesamiento inmediato o refrigeración.

Procesamiento de las muestras de leche y aislamiento de los patógenos

Las muestras se sembraron en agar sangre con azida ASA (bioxon), y agar 110 estafilococos (bioxon). Enseguida, las placas de agar se incubaron a 37 °C y se examinaron a las 24 y 48 horas. Los aislamientos de *Staphylococcus aureus* fueron identificados a través de su morfología colonial, tinción de Gram, prueba de catalasa, coagulasa, manitol, gelatina. Asimismo, fueron resembrados en base de agar sangre adicionada con sangre de borrego e identificados por los patrones de hemólisis y pigmentación.

Sensibilidad antimicrobiana al extracto de semillas de cítricos (CitroBio 10)

Para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, se procedió a la inoculación del *Staphylococcus aureus* utilizando para ello el método de difusión en medio Muller-Hinton, con discos impregnados con 25 µL de extracto de semillas de cítricos (CitroBio 10). Posteriormente las muestras fueron incubadas a 37 °C por 24 horas, determinando de esta manera los halos de inhibición (cm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se puede observar que del total de 488 muestras tomadas de los cuatro cuartos en cada una de las vacas, se encontró, que 308 de los 488 cuartos analizados, se encontraban afectados de mastitis

Tabla 1. Porcentaje de mastitis encontrado en las muestras de leche del ganado lechero en estudio a través de la Prueba de California.

Grado de infección	DD	TD	DI	TI	No.	%
Negativas	42	45	47	42	176	36.1
Trazas	37	34	35	26	132	27
1	29	20	18	19	86	17.6
2	13	18	15	21	67	13.7
3	10	2	5	5	22	4.5
Mastitis clínica	0	0	1	0	1	0.2
Cuartos afectados	89	74	74	71	308	63.1
Cuartos ciegos	1	0	0	3	4	0.9
Total	132	119	121	116	488	100

En base a lo anterior, la prevalencia durante el periodo de estudio fue de 63.1%, la cual fue evaluada por métodos clínicos y bacteriológicos para definir la naturaleza de esta enfermedad económicamente importante. Esta prevalencia obtenida resulta elevada con lo que señala la Dairy Herd Improvement Association (DHIA) que un nivel aceptable de prevalencia por hato por año es de un 15%, asimismo es alta en relación a lo reportado por Medina (2002) y Guizar y Bedolla (2008), los cuales encontraron una prevalencia de mastitis subclínica de 14.54% y de 43.14% en un estudio realizado por cada uno de ellos en los municipios de Vista Hermosa y de Tarímbaro, Michoacán respectivamente. Sin embargo, es baja en comparación con lo reportado por Baez (2002), el cual encontró que la prevalencia de ganado afectado durante el periodo de estudio fue de un 66%, el cual fue realizado con 374 vacas en producción en la población de Tégaro, Michoacán.

La tabla 2, muestra la sensibilidad de las bacterias *Staphylococcus aureus* al extracto de semillas de cítricos, donde las 50 muestras sometidas al extracto fueron sensibles, mostrando un diámetro de halo promedio de 2.96 ± 0.91 cm; valor superior al sugerido por el fabricante del reactivo.

Tabla 2. Resultado de las muestras de los antibiogramas con extracto de semillas de cítricos.

Muestra	Diámetro	Muestra	Diámetro	Muestra	Diámetro	Muestra	Diámetro	Muestra	Diámetro
1	3	11	3	21	2.5	31	2.5	41	3
2	3	12	3	22	3	32	3.5	42	2.8
3	2.9	13	3	23	2.9	33	3.2	43	2.7
4	3.1	14	3	24	2.9	34	3.5	44	2.9
5	2.9	15	3	25	3	35	2.9	45	2.6
6	2.9	16	3	26	3	36	3	46	2.8
7	2.9	17	2.8	27	3	37	2.8	47	3
8	3	18	2.9	28	3	38	3	48	3
9	3	19	2.5	29	2.7	39	3.2	49	3.2
10	3	20	3	30	2.9	40	3	50	3.5

CONCLUSIÓN

Se concluye que en base a los resultados de laboratorio obtenidos en esta investigación, utilizando extracto de semillas de cítricos para el control de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus*, éste puede ser utilizado de manera segura y efectiva contra dicho patógeno dado a la inhibición que el extracto ejerce sobre él mismo.

LITERATURA CITADA

Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F. 2002. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk With Special Reference to Staphylococci. J. Dairy Sci. 85: 1370-1375.

Akineden, Ö., Annemüller, C., Hassan, A. A., Lämmle, C., Wolter, W. y Zschöck, M. 2001. Toxin Genes and other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates From Milk of Cows with Mastitis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.

Báez, G.J.J. 2002. Estudio epidemiológico de la mastitis subclínica bovina en el sector II de Tétraro, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México. 40-4.

Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J. G. M., Beiboer, M. L., 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.

Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E. , Fox, L. K., Bohach, G. A., y Trumble, W. R., 1998. Intracelular *Staphylococcus aureus*. Escapes the Endosome and Induces Apoptosis in Epithelial Cell. Infection and Immunity. 66: 336-342

Berry, E. A., and Hillerton, J. E. 2002. The Effect of Selective Dry Cow Treatment on New Intramammary Infections. J. Dairy Sci. 85: 112:-121.

Bedolla, C.C. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera-Economic causalities inflited by the bovine mastitis in the milk industri. REDVET. Revista electrónica de veterinaria. Volumen IX. Número 4.

Bjorland, J., Sunde, M., and Steinar, W. 2001. Plasmid- Borne smr Gene Causes Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Bovine *Staphylococcus aureus*. Jornal of Clinical Microbiology. 39: 3999-4004.

Brank, M., Le Crand, D., Poumarat, F., Bezille, P., Rosengarten, R. y Citti, C. 1999. Development of a Recombenant Antigen for Antibody Based Diagnosis of *Mycoplasma Bovis* Infection in Cattle. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 6: 861-867.

Calvinho, L. F., Almeida, R. A. y Oliver, S. P. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. Veterinary Microbiology. 61: 93-110.

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.

Citrobio 10. “productos” [en línea]. 2010. Disponible en la web: www.bioproductos.com.mx/sitio/productos/citrobio-10.html - En caché [consulta el 15 Enero 2011].

CITRIK MAX. “Corpo citric” [en línea]. 2008. Disponible en la web:www.corpocitrik.com/pages/citrikmaxhs.pdf[consulta el 15 de Enero del 2011].

Correa, M. G. P. y Marin, J. M. 2002. O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. Veterinary Microbiology. 85: 125-132.

Cucarella, C., Tormo, M. A., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, I., T. J. y Penadés, J. R. 2002. Expression of the Biofilm-Associated Protein Interferes with Host Protein Receptors of *Staphylococcus aureus* and Alters the infective Process. *Infection and Immunity*. 70: 3180-3186.

De Mol, R. M. 2000. Chapter 1 “A framework for automated dairy cow status monitoring”. Automated detection of oestrus and mastitis in dairy cows. PhD. thesis. Wageningen University, Netherlands. pp. 1-13.

De Oliveira, 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.

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, J. N., Netto dos Santos, K.R., Gentiline, E., Sordelli, D., de Freire Bastos, M. C. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 85: 133-144.

Devriese, I. A., Baelea, M., Veneechoutteb, A., Haesebroucka, M. F. 2002. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramamary infections of dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 87: 1775-182.

Ferens, W. A., Davis, W. C., Hamilton, M. J., Park, Y. H., Deobald, C. F., Fox, L. and Bohach, G. 1998. Activation of bovine Lymphocyte Subpopulations by Staphylococcal Enterotoxin C. *Infection and Immunity*. 66: 573-580.

Fitzgerald, R. J., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J., y Smyth, C. J. 2001. Characterization of a Putative Pathogenicity Island from Bovine *Staphylococcus aureus*. Encoding Multiple Superantigens. *Journal of Bacteriology*. 183: 63-70.

Fleury, B., Bergonier, D., Berthelot, X., Schlatter, Y., Frey, J. y Viles, E. M. 2001. Characterization and Analysis of a Stable Serotype-Associated Membrane Protein of *Mycoplasma agalactiae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2814-2822.

Glauber E. Claudio. 2007. Fisiología de la lactación en la vaca lechera. Dpto. Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinaria Buenos Aires, Argentina. 24(234):274-281.

Gresham, H. D., Lowrance, H. H., Caver, T. E., Wilson, B. S., Cheung, A. L., y Lindberg, F. P. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. *The Journal of Immunology*. 164: 3713-3722.

Guizar. F.J.I y Bedolla, C.J.L.C. 2008. Determinación de la prevalencia de mastitis bovina en el Municipio de Tarímbaro, Michoacán, mediante la prueba de California-Determination of the prevalence of bovine mastitis in the California test. *Revista Electrónica de Veterinaria*. Vol IX.

Hassan, A. A., Khan, I. U., Abdulmawjood, A. y Lämmler, C. 2001. Evaluation of PCR Methods for Rapid Identification and Differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *Jornal of Clinical Microbiology*. 39: 1618-1621.

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

Hillerton, J. E. y Kliem, K. E. 2002. Effective Treatment of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis to Minimize the Use of Antibiotics. J. Dairy Sci. 85: 1009-1014.

Hockett, M. E., Hopkins, F.M., Lewis, M. J., Saxton, A. M., Dowlen, H. H., Oliver, S. P., Schrick, F. N. 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. Animal Reproduction Science. 58: 241-251.

Hommeze, J., Devriese, L. A., Venechoutte, M., Riegel, P., Butaye, P., y Haesebrouck, F. 1999. Identification of Nonlipophilic *Corynebacterium* Isolated from Dairy Cows with Mastitis. Journal of Clinical Microbiology. 37: 954-957.

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

Johnsen, L. B., Poulsen, K., Kilian, Mogens. y Petersen, T. E. 1999. Purification and Cloning of a Streptokinase from *Streptococcus uberis*. Infection and Immunity. 67: 1072-1078.

Jost, B. H., Songer, J. G. y Billington, S. J. 2001. Cloning, Expression, and Characterization of a Neuraminidase Gene from *Arcanobacterium pyogenes*. Infection and Immunity. 69: 4430-4437.

Kaipainen, T., Pohjanvirta, Shpigel, N. Y., Shwimmer, A., Pyörälä, S., Pelkonen, S. 2002. Virulence Factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. Veterinary Microbiology. 85: 37-46.

Kerr, D. E., Plaut, K., Bramley, A. J., Williamson, C. M., Lax, A. J., Moore, K. 2001. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nature Biotechnology. 19:66-70.

Krukowski, H., Tietze, M., Majewski, Rózan'ski, P. 2000. Survey of yeast mastitis in Dairy herds of small-type farms in the Lublin region Poland. Mycopathology. 150: 5-7.

Lammers, A., Kruijt, E., van de Kuijt, C., Nuijten, P. J. M. y Smith, H. E. 2000. Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis. Microbiology. 146: 981-987.

Lammers, A., Nuijten, P. J. M., Kruijt, E., Stockhofe-Zurwieden, N., Vecht, U. Smith. H. E. y van Zijdeveld, F. G. 1999. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. Veterinary Microbiology. 67: 77-89.

Las Heras, A., Vela, A. I., Fernández, E., Legaz, E., Domínguez, L. y Fernández-Garayzábal, J. F. 2002. Inusual Outbreak of Clinical Mastitis| in Dairy Sheep Caused by *Streptococcus equi* subsp. Zooepidemicus. Journal of Clinical Microbiology. 40: 1106-1108.

Leigh, J. A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?. Veterinary Journal. 157(3): 225 -38.

Lin, J., Hogan, J. S. y Smith, K. L. 1999. Antigenic Homology of the Inducible Ferric Citrate Receptor (FecA) of Coliform Bacteria Isolated from Herds with Naturally Occurring Bovine Intramammary Infections. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 6:920-927

Long, E., Capuco, A. V., Wood, D. L., Sonstegard, T., Tomita, G., Paape, M. J. 2001. *Escherichia coli*.Induces apoptosis and proliferation of mammary cells.Cell Death and Differentiation. 8:808-816.

Martinez, G., Harel J., Higgins, R., Lacouture, S., Daignault, D. y Gottschalk M. 2000. Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates of Bovine and Human Origin by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 38:71-78.

Menzies, P. I., Ramanoon, S. Z. 2001. Mastitis of sheep and goats. Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice. 17(2):333-358.

Middleton, J. R., Fox, L. K., Gay J. M., Tyler, J. W. y Besser, T. E. 2002. Influence of *Staphylococcus aureus* Strain-type on Mammary Quarter Milk Somatic Cell Count and N-acetyl- β -D-glucosaminidase Activity in Cattle from Eight Dairies. J. Dairy Sci. 85:1133 –1140.

Møller, F. A., Dugaard, H. L., Jensen, N. E., 1999. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains isolated from cases of Bovine mastitis. Veterinary Microbiology. 66:165-170.

Nash, D. L, Rogers, G. W, 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 Protein Yield. J. Dairy Sci. 85:1273-1284.

National Mastitis Council. Current Concepts of Bovine Mastitis. 1998. 4th ed. Natl. Mastitis Council, Madison, WI.

Philpot, W.N. y Nickerson, S.C. 1992. Mastitis: El contra ataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Publicado por Babson Bros. Co. 1-138.

Phuektes, P., Mansell, P. D., Dyson, R. S., Hooper, N. D., Dick, J. S. y Browning G. F. 2001. Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Isolates from Dairy Cows with Mastitis. Journal of Clinical Microbiology. 39:1460-1466.

Poyart, C., Pellegrini, Elisabeth., Gaillot, Olivier., Boumaila, C., Baptista, M. y Trieu-Cuot, Patrick. 2001. Contribution of Mn-Cofactored Superoxide Dismutase (SodA) to the Virulence of *Streptococcus agalactiae*. Infection and Immunity, 69(8): 5098-5106.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. y Hinchcliff, K. W. 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9a ed. Vol. 1. Ed. McGraw – Hill Interamericana. Madrid, España, pp. 711-718.

Reed, S. B., Wesson, C. A., Liou, L. E., Trumble, W. R., Schlievert, P. M., Bohach, G. A., Bayles, K. W. 2001. Molecular Characterization of a novel *Staphylococcus aureus* Serine Protease Operon. Infection and Immunity. 69:1521-1527.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. y Lagacé J. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 39:2584-2589.

Riollet, C., Rainard, P. y Poutrel, B. 2000 Differential Induction of Complement Fragment and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 7:161-167.

Roesler, U., Scholz, H. y Hensel, A. 2001. Immunodiagnostic Identification of Dairy Cows Infected with *Prototheca zopfii* at Various. Journal of Clinical Microbiology. 39:539-543.

Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J. L. 2002. Antibiotic Susceptibility Patterns for Environmental *Streptococci* Isolated from Bovine Mastitis in Central California Dairies. J. Dairy Sci. 85:132-138.

Sawant, A. A., Shreekumar R. P. and Jayarao, B. M., 2002. Evaluation of Feve Selective Media For Isolation of Catalase-Negative Gram-positive Cocci from Bulk Tank Mil. J. Dairy Sci. 85:1127-1132.

Schrack, F. N., Hockett, M. E., Saxton, A. M., Lewis, M. J., Dowlen, H. H., Oliver, S. P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. J. Dairy Sci. 84:1407-1412.

Smith, G. W., C. Peter D. y Morin, D. E. 2001. Ability of hematologic and serum biochemical variables to differentiate gram-negative and grampositive mastitis. J Vet Intern Med. 15:394-400.

Smits, E., Burvenich, C., Guidry A. J. and Roets, E. 1998. In Vitro Expression of Adhesion Receptors and Diapedesis by Polymorphonuclear Neutrophils during Experimentally Induced *Streptococcus uberis* Mastitis. Infection and Immunity. 66:2529-2534.

Soltys, J. y Quinn, M. T., 1999. Selective Recruitment of T-Cell Subsets to the Udder During Staphylococcal and Streptococcal Mastitis: Analysis of Lymphocyte Subsets and Adhesion Molecule Expression. Infection and Immunity. 76:6293-6302.

Song, X., Perez-Casal, J., Bolton, A. and Potter, A, A. 2001. Surface Expressed Mig Protein Protects *Streptococcus dysgalactiae* against Phagocytosis by Bovine Neutrophil. Infection and Immunity. 69:6030- 6037.

Sordelli, D. O., Buzzola, F. R., Gomez, M. I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E. Catalano, M., Reitz, A. J., Tollersrud, T., Denamiel, G., Jeric, P. y Lee, J. C. 2000. Capsule Expression by Bovine Isolates of *Staphylococcus aureus* from

Argentina: Genetic and Epidemiologic Analyses. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 846-850.

Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A, J. Jr. y Lee, J.C. 2000. Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus spp.* From Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*.

Vadillo, S., Pìriz, S. y Mateos, E. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. España.

Valdez, A. J. J. 2008. Epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* en la mastitis bovina en granjas familiares del estado de Michoacán. Proyecto de investigación. FMVZ-UMSNH. Morelia, Michoacán.

Valdez, P. J., Fulgencio, N. F., Torres, M. R., Martínez, P.M. M., López, G. R, Hernández, G. A. y Salgado, G. R. s/f. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de aguacate criollo mexicano (*Persea americana* var. *Drymifolia*). Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH. Resumen.

Vasi, J., Frykberg, L., Carlson, L. E., Lindberg, M. y Guss, B. 2000. M-Like Proteins of *Streptococcus dysgalactiae*. *Infection and Immunity*. 68:294-302.

Watts, J. L., De Lowery., Teel, J. F, y Rossbach, S. 2000 Identification of *Corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci*. 83:2373-9.

Watts, J. L y Rossbach, S. 2000. Susceptibilities of *Corynebacterium bovis* and *Corynebacterium amycolatum* Isolates from Bovine Mammary Glands to 15 Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44:3476-3477.

Wellenberg, G.J., van der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*. Article 2361.

Wesson, C. A., Liou, L. E., Todd, K. M., Bohach, G. A., Trumble, W. R. and Bayles., K. W., 1998. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar Global Regulators Influence Internalization and Induction of Apoptosis. *Infection and Immunity*. 66:5238-5243.

White, L. J., Schukken, Y. H., Lam, T. J. G. M., Medley, G. F., Chappell, M. J. A. 2001. Multispecies model for the transmission and control of mastitis in dairy cows. *Epidemiol. Infect.* 127:567-576.

Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschöck, M. 2004. Mastitis bovina prevención diagnóstico y tratamiento. Ed. Universitaria. Universidad de Guadalajara. México.

Yazdankhah, S. P., Sørum, H., Larsen, H. J. S. y Goghstad 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: 3228-3233.

Yugueros, J. M., Soriano, A. C., Salazar, M. S., Moral, C. H., Ramos, S. S., Smeltzer, M.S. y Carrasco, G. N. 1999. Rapid Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *aroA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 570-574.

Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon O., Verbrugh, H., Schukken, Y. H. y van Belkum, A. 2000. Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Binary Typing as Tools in Veterinary Clinical Microbiology and Molecular Epidemiologic Analysis of Bovine and Human *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 1931-1939.

Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Gröhn, Y. T., Schukken, Y. H. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. J. Dairy Sci. 84(3): 590-599.

Zadoks, R. N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine: 2-3, 239.

Zhang, S. y Maddox, C. W., 2000. Cytotoxic Activity of Coagulase-Negative Staphylococci in Bovine Mastitis. Infection and Immunity. 68:1102-1108.