



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PREVALENCIA Y ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS BOVINA EN LA COMUNIDAD  
DE TÉJARO MICHOACÁN**

TESIS

QUE PRESENTAN:

LAURA HERNÁNDEZ LUZ

ADRIAN PEÑUELAS GUTIERREZ

PARA OBTENER EL TITULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

ASESOR: MC. José Luis Carlos Bedolla Cedeño

COASESORES: DR. José Herrera Camacho

Q.F.B. Rosalba Mejía Alfaro.

Morelia Michoacán, Noviembre de 2011.



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
**PREVALENCIA Y ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS BOVINA EN LA  
COMUNIDAD DE TÉJARO MICHOACÁN**

TESIS

QUE PRESENTAN:

LAURA HERNÁNDEZ LUZ

ADRIAN PEÑUELAS GUTIERREZ

PARA OBTENER EL TITULO DE

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

MORELIA MICHOACÁN, NOVIEMBRE DE 2011.



## ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Tipos de mastitis.....	5
Mastitis clínica.....	5
Mastitis subclínica.....	5
Clasificación de los agentes patógenos causantes de la mastitis bovina.....	7
Contagiosos.....	7
Ambientales.....	8
Estafilococos.....	8
Clasificación de los estafilococos.....	8
Estafilococos coagulasa negativos (ECN).....	9
Estafilococos coagulasa positivos (ECP).....	10
<i>Staphylococcus aureus (S. aureus)</i> .....	10
Aislamiento e identificación de estafilococos.....	13
Coliformes.....	14
<i>Escherichia coli (E. coli)</i> .....	14
<i>Citrobacter intermedius</i> .....	15
<i>Enterobacter aerogenes</i> .....	15
Enterobacterias.....	16
<i>Proteus vulgaris (P. vulgaris)</i> .....	16

<i>Alcaligenes fecalis (A. fecalis)</i> .....	17
<i>Moraxella sp.</i> .....	17
<i>Enterobacter cloacae</i> .....	18
<i>Moraxella bovis</i> .....	19
<i>Serratia sp.</i> .....	19
Aislamiento e identificación de coliformes.....	19
Pruebas bioquímicas para la identificación de las Gram-Positivas.....	20
Tinción de Gram.....	20
Prueba de gelatina.....	25
Prueba de manitol.....	25
Prueba de coagulasa.....	25
Prueba de catalasa.....	26
Pruebas bioquímicas para la identificación de las Gram-Negativas.....	27
Agar TSI (triple azúcar hierro).....	27
Agar LIA (Lisina, hierro, agar).....	28
Agar citrato de Simmons.....	30
Agar Urea.....	31
Medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad).....	31
Caldo MR (Rojo de Metilo).....	32
Caldo VP (Vogesproskauer).....	32
Caldo Fenilalanina-Malonato.....	33

Medio de glucosa (oxidación, fermentación de Hugh y Leifson).....	34
Glucosa, Lactosa y Sacarosa.....	35
Prueba de Oxidasa.....	36
Prueba de california.....	37
Prevalencia.....	38
Higiene y manejo de la ordeña.....	39
Higiene del ordeño.....	39
Preordeño y vaso de Preordeño.....	40
Limpieza de la ubre/desinfección de los pezones antes del ordeño.....	41
Cuidado y desinfección del pezón después del ordeño.....	42
Objetivos.....	44
Material y métodos.....	45
Resultados y discusión.....	47
Conclusión.....	50
Literatura citada.....	51



## RESUMEN

Los objetivos de la presente investigación, fueron determinar la prevalencia, por medio de la prueba de california, así como la identificación de los agentes patógenos causantes de la mastitis bovina en la comunidad de Téjaro, Michoacán. El trabajo se realizó en 16 unidades de producción. Con un total de 484 muestras tomadas de los cuatro cuartos en cada una de las vacas, se encontró, que 308 de los 484 cuartos analizados, se encontraban afectados de mastitis bovina. Para lo cual se procedió a la identificación del grado de afección de los mismos, se revisó si eran trazas, 1-2-3 y mastitis clínica. De acuerdo a los resultados que se obtuvieron, que fueron, del total de los cuartos afectados (308), los cuales están divididos en anterior derecho, 89; posterior derecho, 74; anterior izquierdo, 74; posterior izquierdo, 71. Para la determinación de la prevalencia de mastitis bovina se utilizó la prueba de california para la mastitis (CMT). Se muestrearon en total 484 cuartos, de los cuales 176 resultaron negativos a la prueba.

Los agentes patógenos identificados que se encontraron en mayor porcentaje fueron, estafilococos coagulasa negativos, seguidos de estafilococos aureus, así como algunas coliformes y enterobacterias, posteriormente se desarrolló una tabla para visualizar de una mejor forma los agentes patógenos que se encontraron en mayor proporción, en los cuartos afectados.



## INTRODUCCIÓN

La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es por lo general consecuencia de la infección causada por patógenos microbianos que encuentran su camino hacia la luz de la glándula a través del canal del pezón (Tomasinsig, *et al.*, 2010).

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 (Sixtos, 2011).

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 (Gallegos y Moncada, 2011).

La mastitis es una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero y el más costoso para la industria lechera en todo el mundo, causando pérdidas económicas considerables debido a la disminución en la calidad y cantidad de la producción de leche, el aumento de los costos de tratamiento y los servicios veterinarios, y la pérdida de animales (Tomasinsig, *et al.*, 2010).

La mastitis puede ser causada por una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, micoplasmas, etc., sin embargo, las bacterias son los patógenos más frecuentes de estas enfermedades (Kaliwal, *et al.*, 2011).



La mastitis bovina normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica. Es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no. Una inflamación intramamaria está asociada con un aumento en el conteo de células somáticas en la leche. Sin embargo, la magnitud del aumento en el conteo de células somáticas (CCS) varía de acuerdo a la bacteria involucrada en la infección intramamaria (Djabri, 2002; Field, 2003; Sixtos, 2011).

La mastitis, causa pérdidas considerables a la industria de productos lácteos, entre los patógenos bacterianos que pueden causar mastitis, el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es probablemente el agente más letal, ya que causa infecciones crónicas y profundas en las glándulas mamarias que es extremadamente difícil para curar (Momtaz, *et al.*, 2010).

Es una enfermedad compleja que puede definirse simplemente como una inflamación de la glándula mamaria. Inflamación que es causada más comúnmente por infección intramamaria con un patógeno, pero también puede ser causada por una lesión (herida) y, menos frecuente, por alergia y neoplasias (Guizar y Bedolla, 2008).

A nivel mundial, la mastitis es una de las enfermedades más importantes en el sector lácteo. La mastitis bovina causada por *S. aureus* ha aumentado en muchos rebaños de las zonas urbanas y rurales del país (Unakal, *et al.*, 2010).

*S. aureus* constituyen la mayoría de las bacterias que causan enfermedades. El *S. aureus* se origina en el medio ambiente de la vaca e infecta la ubre a través del canal del pezón (Unakal, *et al.*, 2010).



Los costos más importantes en la producción lechera se relacionan con la alimentación, pérdida de la producción de leche, trastornos de la reproducción debido a la enfermedad, así como el trabajo y el tratamiento de los animales enfermos (Andersen, *et al.*, 2010).

Mastitis por estafilococos ha sido reportado como un 25-30% de la infección de mastitis y las pérdidas de leche entera varía entre el 10 y el 25% (Kumar, *et al.*, 2011).

En el diagnóstico de la mastitis, los estafilococos se dividen en *Staphylococcus coagulasa positivos* (SPC) y *coagulasa negativo* (SNC) sobre la base de la capacidad de coagulasa plasma de conejo (Kaliwal, *et al.*, 2011).

La infección por *S. aureus* es un proceso complejo que involucra una serie de los acontecimientos, dando lugar a un mal funcionamiento o destrucción de los tejidos del huésped. La adherencia del microorganismo a los tejidos del huésped representa un primer paso crítico (Tomasinsig, *et al.*, 2010).

Además, transmitidas por los alimentos por *S. aureus* se ha convertido la salud pública debido a la preocupación por la rápida evolución de linajes resistentes. Una vacuna contra el *S. aureus* causa mastitis en las vacas lecheras que representan un medio seguro e ideal de prevención y control de mastitis (Tomasinsig, *et al.*, 2010).

La mastitis bovina normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica. 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 (Gallegos y Moncada, 2011).



## **Tipos de mastitis**

### **Mastitis clínica**

La mastitis clínica es definida como una anomalía observada por los ganaderos en cualquiera de los dos casos: la leche y/o la ubre. Es un problema que subsiste en muchos hatos lecheros (De Mol, 2000; Tollersrud, 2000; Sixtos, 2011).

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 (Gallegos y Moncada, 2011).

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 (Barkema, *et al.*, 1999; Guizar y Bedolla, 2008).

En su forma aguda, la mastitis clínica se caracteriza por su condición de aparición súbita, la leche es de apariencia anormal, hay enrojecimiento, tumefacción, y dolor en la ubre, con o sin síntomas sistémicos (Sixtos, 2011).

En la forma crónica, se presenta una infección de la ubre de larga duración con leche de apariencia anormal y cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre (Schrack, *et al.*, 2001).

### **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. El conteo elevado de células somáticas en la leche indica mastitis subclínica (Gallegos y Moncada, 2011).



La mastitis subclínica es una gran preocupación en la industria láctea, ya que causa pérdidas económicas y puede conducir a la mastitis clínica. Los mecanismos de la aparición y progresión de mastitis subclínica no están totalmente entendidos, y un nuevo procedimiento para la detección y predicción adecuada de mastitis subclínica que conduce a mastitis clínica es necesaria para el manejo de las vacas lecheras (Sakemi, *et al.*, 2009).

La mastitis subclínica en las glándulas mamarias infectadas desarrolla fácilmente una inflamación por un aumento de recuento de células somáticas (SCC) y puede no tener tratamiento (Sakemi, *et al.*, 2009).

Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche, composición alterada de la leche y la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche (Gallegos y Moncada, 2011).

La mastitis subclínica, es la más persistente en el ganado lechero. Ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas debido al reducido rendimiento de leche, y 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 (Gallegos y Moncada, 2011; Sixtos 2011).

Cuando los signos no son visibles, la presencia de patógenos y las modificaciones citológicas de la leche traen como resultado una M. subclínica, 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 (Sixtos, 2011).

En los Estados Unidos, los costos anuales de la mastitis han sido estimados entre 1.5-2.0 billones de dólares americanos, mientras que las pérdidas de producción de leche, debidas a mastitis subclínica y los costos elevados por el reemplazo de vacas asociado con un conteo elevado de células somáticas han



sido estimados en 960 millones de dólares americanos (Kerr, *et al.*, 2001; Wellenberg, *et al.*, 2002; Nash, *et al.*, 2003).

## CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSANTES DE LA MASTITIS BOVINA.

Generalmente, los patógenos de la mastitis han sido divididos en organismos contagiosos y ambientales; en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente (Bedolla y Castañeda, 2003).

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 infectada (Sixtos, 2011).

### Contagiosos

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.* Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, donde el reservorio primario que alberga los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre, 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; Bedolla y Castañeda, 2003; Sixtos, 2011).

Los patógenos contagiosos de la mastitis como el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son infecciosos a nivel individual y a nivel de población, 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; Bedolla y Castañeda, 2003; Guizar y Bedolla, 2008; Sixtos, 2011).



## Ambientales

Los patógenos ambientales a diferencia de los contagiosos son transmitidos entre las ordeñas por el ambiente que sirve como la fuente primaria de estos organismos. 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; Bedolla y Castañeda; 2003; Guizar y Bedolla, 2008).

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; Sixtos, 2011).

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).

## ESTAFILOCOCOS

Los estafilococos, son cocos Gram-positivos (de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro) que se presentan sueltos, en parejas, en pequeñas cadenas (de 3 a 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 positivos, generalmente oxidasa negativos, no esporulados, inmóviles y generalmente no forman cápsula o tienen una limitada formación cápsular (Vadillo, *et al.*, 2002; Guizar y Bedolla, 2008; Sixtos, 2011).

### Clasificación de los estafilococos

Los estafilococos, según produzcan o no la enzima coagulasa, se clasifican en dos grupos: Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) y Estafilococos Coagulasa Positivos (ECP). 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 (Vadillo, *et al.*, 2002; Guizar y Bedolla, 2008).

En el grupo de los Estafilococos Coagulasa Negativos se incluyen el *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, y otros como *Staphylococcus sciuris* y *Staphylococcus slentus*.

En el grupo de Estafilococos Coagulasa Positivos se incluyen al *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus*. Estas especies producen procesos patológicos en los animales (Sixtos, 2011).

### **Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN)**

Los ECN son cocos Gram (+) que habitan tanto en el exterior como en el interior de las ubres infectadas. Muchas veces se les denomina oportunistas de la flora de la piel, porque pueden ser aislados de: la piel del pezón, el canal del pezón, la vagina, el pelaje y las fosas nasales (Navarro, 2011).

Los ECN incluyen un numeroso grupo de especies que se caracterizan, como su nombre indica, por no producir coagulasa. Las especies que se presentan en los animales domésticos, no producen ADN termoestable en que algunos pueden mostrar actividad hemolítica, ésta suele aparecer lentamente y ser débil (Vadillo, *et al.*, 2002).

Aunque se consideran tradicionalmente como no patógenos, desde hace años se sabe que determinadas estirpes pueden comportarse como oportunistas patógenos tanto en los animales domésticos como en el hombre. En los animales domésticos estos patógenos se han asociado básicamente a infecciones intramamarias, que por lo general tienen carácter subclínico, pero también pueden dar lugar de vez en cuando a mastitis clínicas (Sixtos, 2011).

Los ECN se consideran como patógenos secundarios o menores en la mastitis bovina porque generalmente producen infecciones subclínicas con un incremento moderado de recuento de células somáticas (RCS, el indicador de



infección mamaria más aceptado). *S. chromogenes*, *S. simulans* y *S. epidermidis*, son las especies más comunes en las infecciones intramamarias bovinas (Vadillo, *et al.*, 2002).

Así como *S. epidermitis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* y *S. warneri* pertenecen a la flora bacteriana normal de la piel del pezón, mientras otras como *Staphylococcus xylosus* y *Staphylococcus sciuri* parecen provenir del ambiente. *S. chromogenes* puede colonizar la piel del pezón y también otros lugares del cuerpo del animal como el pelaje, la vagina y el canal de pezón (Navarro, 2011).

## **Estafilococos Coagulasa Positivos (ECP)**

### ***Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)**

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es la principal causa de infección intramamaria en los rumiantes, por lo que se le considera el agente causal más importante y frecuente de la mastitis bovina (Sixtos, 2011).

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 prevalente, 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 (Guizar y Bedolla, 2008; Sixtos, 2011).



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) (Guizar y Bedolla, 2008).

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 (Guizar y Bedolla, 2008).

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; Guizar y Bedolla, 2008).

El *S. aureus* se reconoce mundialmente como una causa frecuente de infecciones intramamarias subclínicas en las vacas lecheras (Riollet *et al.*, 2000). El reservorio principal del *S. aureus* parece ser el cuarto infectado y la transmisión entre las vacas, normalmente, ocurre durante la ordeña (Akineden *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; Guizar y Bedolla, 2008).

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 (Sixtos, 2011).

Este patógeno puede causar muchas enfermedades en los humanos y animales, es el agente causal de muchas infecciones oportunas en los humanos y los animales. Las infecciones debidas al *S. aureus* es de la mayor importancia en la medicina veterinaria y humana. 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, algunas de estas enzimas son capaces de incrementar las características invasoras del microorganismo y lo protegen de los mecanismos corporales de defensa (Guizar y Bedolla, 2008).

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 (Sixtos, 2011).



## **Aislamiento e identificación de estafilococos**

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 mamática, 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 (Gallegos y Moncada, 2011).

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 (Gallegos y Moncada, 2011).

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 (Sixtos, 2011).

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 (Gallegos y Moncada, 2011).

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 (Guizar y Bedolla, 2008).

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 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 (Gallegos y Moncada, 2011).



## Coliformes

Bacterias Gram negativas en forma bacilar que fermentan la lactosa a temperatura de 35 a 37 °C, produciendo ácido y gas en 24 horas, aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimático de la B-galactosidasa (Carrillo y Lozano, 2008). Entre ellos se encuentran los diferentes *Escherichiacoli*, *citrobacter*, *enterobacter* y *klebsiella* (Carrillo y Lozano, 2008).

### ***Escherichia coli (E. 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; Guizar y Bedolla, 2008).

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 (Sixtos, 2011).

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; Guizar y Bedolla, 2008).

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; Sixtos, 2011).

La *E. coli* ha sido clasificada como un agente patógeno medioambiental que induce la mastitis clínica, que es caracterizada por una intensa concentración de neutrófilos, 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).

### ***Citrobacter intermedius***

El género *Citrobacter* es un grupo de bacilos Gram-negativos aerobios que se encuentran frecuentemente en el agua, suelo, comida y el tracto intestinal de animales y humanos como flora saprófita (Navarro, 2011).

### ***Enterobacter aerogenes***

Es una bacteria Gram-negativa, anaerobias facultativas, de la familia de enterobacterias, muchas son patógenas y son causa de infecciones oportunistas en huéspedes comprometidos generalmente hospitalizados, causa infección del tracto urinario y de tracto respiratorio (Carrillo y Lozano, 2008).



Se encuentra en el tracto digestivo humano, aunque también libremente en el suelo y agua; sus colonias son grandes y mucosas, algunas cepas llegan a formar capsula, como fuente de carbono pueden utilizar glucosa y lactosa, no forman sulfato de hidrogeno (Carrillo y Lozano, 2008).

### **Enterobacterias**

Son una familia de bacterias Gram-negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos. Los miembros de esta familia forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales (Chacón, 2009).

Algunas especies pueden vivir en tierra, en plantas o en animales acuáticos. Sucumben con relativa facilidad a desinfectantes comunes, incluido el cloro. Con frecuencia se encuentran especies de *Enterobacteriaceae* en la bio-industria: para la fermentación de quesos y productos lácteos, alcoholes, tratamientos médicos, producción de toxinas en el uso de cosméticos, fabricación de agentes antivirales de la industria farmacéutica (León, *et al.*, 2009).

### ***Proteus Vulgaris (P. vulgaris)***

Es una bacteria Gram-negativa, facultativamente anaeróbico en forma de bacilo que habita en el tracto intestinal del hombre y varios animales. Puede también ser aislado de la tierra, agua y materia fecal. Se agrupa con las enterobacteriaceae y es un patógeno oportunista en humanos, causando infecciones urinarias, de heridas y en abscesos hepáticos.

El *P. vulgaris* tiene, por lo general, sensibilidad a la ciprofloxacina, ceftazidima, sulbactam, piperacil y unasin, entre otros antibióticos. Es fácil aislar al *P. vulgaris* en individuos que habitan hogares de cuidados de larga duración, hospitales y en pacientes con enfermedades crónicas o un estado inmune



comprometido. *P. vulgaris* es un microorganismo que fermenta glucosa, sucrosa y amigdalina, pero no fermenta la lactosa ni el manitol.

### ***Alcaligenes fecalis (A.fecalis)***

Es una bacteria Gram negativa perteneciente al género *Alcaligenes*. Presenta forma bacilar y motilidad flagelar. Como características bioquímicas más notables, no es nitrato-reductora, es oxidasa-positiva, catalasa-positiva y citrato-positiva (aerobio estricto) (Chacón, 2009).

*A. fecalis* es un microorganismo que se encuentra fácilmente en el entorno. Su nombre se debe a que su descubrimiento se realizó en heces, pero más tarde se ha documentado su presencia en muchos otros entornos. El crecimiento óptimo de esta bacteria se sitúa sobre los 37 °C. Se le considera un microorganismo patógeno, aunque también se le puede encontrar como parásito oportunista. En este último caso, se suele encontrar a la bacteria infectando el tracto urinario (Chacón, 2009).

La bacteria degrada urea, generando ion amonio que aumenta el pH del entorno. A pesar de que *A. fecalis* es considerado un organismo alcalino-tolerante, mantiene un pH neutro en su citosol para impedir el daño o la desnaturalización de sus especies y macromoléculas cargadas. *A. fecalis* ha sido utilizado para la producción de aminoácidos no estándar. *A. fecalis* es encontrado comúnmente en tierra, agua, y entornos en asociación con humanos (Chacón, 2009).

### ***Moraxella sp***

Diplococos Gram-negativos, inmóviles no producen esporas, aeróbicos, no tienen exigencias nutricionales. No producen oxidación de azúcares, son asacarolíticos. La especie más importante de este grupo es la *M. catarrhalis* (León, et al., 2009).



La *moraxella sp* está formada por un lípido A, unido a una estructura interna formada por oligosacáridos. Se han distinguido tres serotipos de los cuales el A es el más predominante. *Moraxella* es un género de bacterias Gram negativas con forma de bacilo corto, cocobacilo o, como en el caso de *Moraxella catarrhalis*, cocos asociados en parejas (diplococos), o incluso en pequeñas cadenas (León, *et al.*, 2009).

La mayoría de estos microorganismos son inmóviles, no espatulados, con características oxidasa-positiva y catalasa-positiva. Unos son hemolíticos y algunas especies son capsuladas, aerobios aunque algunos pueden ser anaerobios facultativos y no son muy hábiles para fermentar los carbohidratos (León, *et al.*, 2009)

Su hábitat es el ambiente en general, pero son más abundantes en la región nasofaríngea de algunos animales, como los bovinos. Estos microorganismos no son muy exigentes, pero muestran una mejoría en su crecimiento en agar sangre y más si les agregamos suero, además, vemos una hemólisis en el agar (León, *et al.*, 2009).

### ***Enterobacter cloacae***

Es una bacteria que pertenece al género *Enterobacter*, de la familia de las Enterobacteriaceae. Es un bacilo Gram negativo Oxidasa negativo y Catalasa positivo presente. Se han descrito casos de infecciones del tracto urinario, de herida quirúrgica e incluso bacteriemia. No obstante, lo más frecuente son infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos (Chacón, 2009).

El tratamiento de elección en las infecciones por *E. cloacae* consiste en la asociación de un carbapenem (ertapenem, imipenem, meropenem) y un aminoglucósido (gentamicina). Se recomienda hacer siempre un antibiograma, dado que se conoce la aparición de múltiples resistencias por expresión de cefalosporinasas (Chacón, 2009).



### ***Moraxella bovis***

Son cocos y bacilos Gram negativos, aerobios, y corresponden a la Familia Neisseriaceae. Presentan un factor hemolítico importante siendo las más virulentas, las más hemolíticas. La mayoría de los autores sostienen que este agente es el único en la etiología, aunque pudieran estar implicados secundariamente virus *Clamydías*, *Rickettsias* y *Mycoplasmas*. De hecho el Virus IBR produce conjuntivitis, pero no queratitis. *Moraxella bovis* presenta a la bacteriología una morfología típica, en parejas o cadenas cortas y presenta factor de patogenicidad, factor hemolítico, productor de una dermonecrotina, más patente en cepas más hemolíticas (Chacón, 2009).

### ***Serratia* sp**

Es un género que pertenece a la familia Enterobacteriaceae y como tal, es un bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, oxidasa negativo, que crece abundantemente sobre agar sangre, agar chocolate y agar McConkey, produciendo colonias que pueden ser pigmentadas, especialmente *Serratia marcescens* y *Serratia rubias*, las cuales producen un pigmento rojo muy característico llamado prodigiosina (Chacón, 2009).

### **Aislamiento e identificación de Coliformes**

Los medios más frecuentemente utilizados para el aislamiento de *coliformes* son el Agar MacConkey con lactosa y el medio de eosina con azul de metileno (EMB o LEVINE); en el segundo las colonias presentan un característico verde con brillo metálico que lo distingue como fermentador rápido de la lactosa, característica que comparte con dos géneros más de enterobacterias: *Enterobacter* y *Klebsiella* (Vadillo, et al., 2002).



## PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS GRAM-POSITIVAS.

### Tinción de Gram

La tinción de Gram o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo Danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color moradas y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa o rojo (Aulton, 2004).

Procedimiento:

Recoger muestras.

Hacer el extendido en espiral.

Dejar secar a temperatura ambiente.

Fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor (flameado 3 veces aprox.)

Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 min. Todas las células Gram positivas y Gram negativas se tiñen de color azul-purpura.

Enjuagar con agua.

Agregar lugol y esperar entre 1 minuto.

Enjuagar con agua.

Agregar acetona y/o alcohol y esperar 4 segundos (parte crítica de la coloración)

Enjuagar con agua.

Tinción de contraste agregando safranina o fucsina básica y esperar 1-2 min Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.

Enjuagar con agua.

Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión (Aulton, 2004).



El cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana. El lugol es un compuesto formado por (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio), el cual está presente para solubilizar el yodo, y actúa de mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana (Madigan, *et al* 2004).

El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta. La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo  $I_2$ /cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen (Madigan, *et al* 2004).

Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules (Bergey, *et al* 2005).

La safranina puede o no utilizarse, no es crucial para la técnica. Sirve para hacer una tinción de contraste que pone de manifiesto las bacterias Gram negativas. Al término del protocolo, las Gram positivas se verán azul-violáceas y las Gram negativas, se verán rosas (si no se hizo la tinción de contraste) o rojas (si se usó, por ejemplo, safranina) (sogaard, *et al* 2007).

Un microorganismo Gram positivo debe presentar una pared celular sana. El mismo microorganismo, si sufre daño de la pared por una u otra causa, se vuelve Gram negativo. Esto indica la importancia de la pared para la retención o el escape del colorante. Una posible teoría del mecanismo de tinción es la siguiente:



El colorante básico entra al microorganismo, donde forma con el yodo una laca insoluble en agua. El alcohol o la acetona empleados para aclarar, deshidratan las paredes de los microorganismos Gram positivos, tratados con mordiente, y forma una barrera que la laca no puede atravesar (Aulton, 2004).

En las células Gram negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células Gram positivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo de cristal violeta con yodo. Algunos autores objetan esta teoría, pero es indudable la importancia general de la pared celular (Aulton, 2004).

La pared celular de los microorganismos Gram positivos y Gram-negativos es permeable al violeta cristal. Sin embargo, la de los primeros no lo es al complejo de yodo y colorante formado en el interior de la célula. Los resultados experimentales obtenidos con una difusión celular exenta de proteínas, y la escasa solubilidad del complejo de yodo y violeta cristal en alcohol y acetona, parecen sustentar la opinión de que la reacción Gram positiva consiste esencialmente en la formación, dentro de la célula, de una cantidad apreciable de complejo de yodo y colorante difícil de eliminar con el disolvente (Madigan, *et al* 2004).

#### Procedimiento de la coloración Gram

Fijar un frotis.

Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe un poco.

Tomar el asa (previamente flameada) y con ésta tomar un poco de muestra.

Una vez obtenida una pequeña cantidad de la muestra (con el asa), hacer que ésta tenga contacto con una lámina portaobjetos, la cual servirá para depositar la muestra contenida en el asa (sogaard, *et al* 2007).



Con el asa (conteniendo la muestra) sobre la lámina portaobjetos, proceder a realizar la extensión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa) sobre la lámina, de tal forma que al terminar la extensión, tengamos como producto una espiral en la parte media de la lámina (sogaard, *et al* 2007).

Esperar que seque al aire libre o ayudarse con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar. El calor deseable es aquél en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano (sogaard, *et al* 2007).

Tinción: Con violeta cristal, violeta de genciana, azul de metileno o en todo caso tinta china utilizando una cantidad suficiente de dicho colorante sobre la muestra, como para lograr cubrirla por completo. Se deja actuar al colorante por 1 minuto. Esta tinción de 1 minuto está dada para trabajar a una temperatura ambiente de 25 °C (sogaard, *et al* 2007).

Enjuague: Al transcurrir el minuto, se debe enjuagar la lámina conteniendo la muestra con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua no debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser un chorro delgado, aproximadamente de medio a un milímetro de espesor. También el enjuague se debe realizar poniendo la lámina portaobjetos en posición inclinada hacia abajo. La solución de cristal violeta, se recomienda sea al 1% (sogaard, *et al* 2007).

Mordiente: Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplica como mordiente yodo o lugol durante 3 minutos más. El mordiente es cualquier sustancia que forme



compuestos insolubles con colorantes y determine su fijación a las bacterias (sogaard, *et al* 2007).

Decoloración: Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decolora con etanol al 75 %, etanol al 95 %, acetona o alcohol-acetona, hasta que ya no escurra más líquido azul. Para esto se utiliza el gotero del frasco del decolorante. Se van añadiendo cantidades suficientes del decolorante, hasta lograr que éste salga totalmente transparente, es decir, hasta que ya no escurra más líquido azul (sogaard, *et al* 2007).

Lavado y secado: Lavar con agua para quitar los residuos de decolorante y esperar que seque la lámina al aire libre o con la ayuda de la llama de un mechero de la forma anteriormente descrita (sogaard, *et al* 2007).

Tinción de contraste : Una vez que la lámina ya secó, procedemos a teñir nuevamente, pero esta vez se va a utilizar un colorante de contraste como por ejemplo la safranina, dejar actuar durante 1 minuto (sogaard, *et al* 2007).

Nuevo enjuague: Pasado el minuto correspondiente, se procede a enjuagar la lámina con agua, se escurre el agua sobrante y se seca en la forma anteriormente descrita. De esta manera, ya tendremos listo el frotis para su respectiva observación microscópica (sogaard, *et al* 2007).

A partir de la tinción de Gram pueden distinguirse varios morfo tipos distintos: Los cocos son de forma esférica. Pueden aparecer aislados después de la división celular (*Micrococos*), aparecer por pares (*Diplococos*), formar cadenas (*Estreptococos*), o agruparse de manera irregular (*Estafilococos*) (Bergey, *et al* 2005).

Los bacilos poseen forma alargada. En general suelen agruparse en forma de cadena (*Estreptobacilos*) o en empalizada. También pueden distinguirse los



espirales, que se clasifican en espirilos si son de forma rígida o espiroquetas si son blandas y onduladas. Si por el contrario, poseen forma de "coma", o curvados, entonces se los designa vibrios (Bergey, *et al* 2005).

### **Prueba de Gelatina**

Se usa para valorar la licuefacción o licuación de la gelatina por acción de las gelatinasas bacterianas producidas por algunas Enterobacterias. La reacción positiva hace que el medio permanezca líquido después de la incubación aún después de dejarse en refrigeración durante media hora. La reacción negativa permite nuevamente la solidificación (Madigan, *et al* 2004).

### **Prueba del Manitol**

Sirve para detectar si los gérmenes son capaces de fermentar el manitol liberando productos ácidos que serán detectados gracias al indicador rojo de fenol que cambiará a color amarillo. Para esta prueba el medio manitol movilidad incluye 7,5 g/l de D-Manita. Bacterias manitol (-) son, dentro de las entero bacterias, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Shigella dysenteriae*. Entre las bacterias de importancia clínica, la prueba del manitol sirve para diferenciar *Staphylococcus aureus* (+) de *Staphylococcus epidermidis* (-) (Bergey, *et al* 2005).

### **Prueba de Coagulasa**

La coagulasa es una proteína producida por varios microorganismos que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina. En el laboratorio, se usa para distinguir entre diferentes tipos de *Staphylococcus*. Un resultado de coagulasa positivo indica que la muestra contiene *S. aureus*. Esta proteína también es producida por *Yersinia pestis* (Bergey, *et al* 2005).

La coagulasa reacciona con la protrombina en la sangre. El complejo resultante se llama staphylothrombina, y permite que la enzima proteasa convierta el fibrinógeno en fibrina. Esto hace que se coagule la sangre. La coagulasa está



estrechamente relacionada con la superficie de la bacteria *S. aureus* y puede revestir su superficie con fibrina al entrar en contacto con la sangre. Se cree que está cubierta de fibrina del *Staphylococcus* es capaz de resistir la fagocitosis haciendo esta bacteria tenga un factor de virulencia mayor (Bergey, *et al* 2005).

**Prueba de portaobjetos:** Prueba del portaobjetos se hace conjuntamente con un control negativo para descartar auto aglutinación. Se ponen 2 gotas de solución salina en el portaobjetos microscópico rotulado con un número de muestra, Test (T) y control (C). Las 2 gotas son emulsionadas con la prueba de organismo mediante el uso de un cable de lazo, cable recto, o un palo de madera. Se pone una gota de plasma (plasma de conejo con anticoagulante (EDTA) en la gota de solución salina inoculada correspondiente a la prueba y se mezcla bien con un una varilla de madera. Agitar el portaobjeto con cuidado unos 10 segundos (Bergey, *et al* 2005).

Si es *positivo*: Se podrá observar aglutinación macroscópica en el plasma en los 10 segundos mientras que no se observara aglutinamiento en la gota de solución salina.

Si es *negativo*: No se observara aglutinamiento (Bergey, *et al* 2005).

### **Prueba de Catalasa**

Se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococos* (Maldigan, *et al* 2004).

**Método del portaobjetos:** Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.

Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.



Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.

Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos (Bergen, *et al* 2005).

### **PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS GRAM-NEGATIVAS.**

Medios de cultivo: Agar TSI (triple azúcar hierro), agar LIA (lisina, hierro, agar) agar urea, agar citrato de simmons, caldo MR (rojo metilo), caldo VP (vogesproskauer), caldo fenilalanina-malonato, medio SIM (sulfuro, indol, movilidad), medio de glucosa (oxidación, fermentación) (Murcia, 2009).

Otros: reactivo de oxidasa (dimetil para fenilnediamina o tetrametil para fenilnediamina), aceite mineral, rojo de metilo, reactivo de Erlich, koh 40%, alfa naftol5%, cloruro férrico 10% (Murcia, 2009).

**Agar TSI (triple azúcar hierro):** siembre el agar TSI haciendo una punción central hasta el fondo del tubo y estría en superficie (Murcia, 2009).

Principio: en TSI se determina la capacidad de un microorganismo para atacar los hidratos de carbono glucosa, lactosa y/o sacarosa, con producción o no de gases ( $CO_2$  y  $H_2$ ), junto con la producción o no de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) (Murcia, 2009).

Lectura: se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Se lee un quebrado, la reacción ocurrida en la superficie del medio corresponde al numerador (parte aerobia) y la reacción ocurrida en la profundidad del medio



corresponde al denominador (parte anaerobia) La acidez se denomina con la letra A (color amarillo) y la alcalinidad con la letra K (color rojo) (Murcia, 2009).

Fundamento: en este medio se leen las siguientes reacciones bioquímicas:

- Fermentación de la glucosa (k/a).
  
- Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa (a/a)
  - No fermentación de los carbohidratos (k/k), la bacteria no utiliza los hidratos de carbono, produciendo aminas que alcalinizan el fondo y la superficie del medio. Algunas bacterias no fermentadoras solamente atacan la peptona aeróbicamente dando un tsi: k/n, es decir no hay cambio en el fondo del tubo (Murcia, 2009).
  
- Producción de gas: ruptura del medio.
  
- Producción de h<sub>2</sub>s: ennegrecimiento del medio

Agar TSI tiene tres azúcares: glucosa (1 g/l), lactosa (10 g/l) y sacarosa (10 g/l). Como indicador de ph tiene rojo de fenol el cual vira al color amarillo en presencia de acidez y al color rojo en presencia de alcalinidad. Tiene como fuente de azufre el tiosulfato de sodio, necesario para que las bacterias puedan producir h<sub>2</sub>s y como indicador de h<sub>2</sub>s, sulfato ferroso el cual reacciona con el h<sub>2</sub>s produciendo un precipitado negro e insoluble de sulfato ferroso. Para que se produzca h<sub>2</sub>s, se requiere de un medio ácido por lo que dicha producción generalmente está limitada al fondo del medio, razón por la cual un fondo negro debe leerse como A (ácido), aunque el color amarillo usual esté tapado por el color negro (Murcia, 2009).

**Agar LIA (Lisina, Hierro, Agar):** Sembrar con asa recta, por doble picadura hasta el fondo del tubo y en superficie (Murcia, 2009).



Principio: en agar LIA se determina la capacidad de un microorganismo para atacar el aminoácido lisina descarboxilándolo o desaminándolo, la fermentación de glucosa, la producción o no de gases ( $\text{CO}_2$ ), junto con la producción o no de ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Murcia, 2009).

Lectura: Se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación (48 horas si es necesario) a  $37^\circ\text{C}$ . Se lee un quebrado, la reacción ocurrida en la superficie del medio corresponde al numerador (parte aerobia) y la reacción ocurrida en la profundidad del medio corresponde al denominador (parte anaerobia). La acidez se denomina con la letra A (color amarillo) y la alcalinidad con la letra K (color púrpura) (Murcia, 2009).

Fundamento: en este medio se leen las siguientes reacciones bioquímicas:  
a- Fermentación de la glucosa (k/a), la bacteria no ataca el aminoácido solo fermenta la glucosa (Murcia, 2009).

b- Descarboxilación de la lisina: (k/k)

c- Diseminación de la lisina: r/a rojo/ amarillo

d- Producción de gas: ruptura del medio

e- Producción de  $\text{H}_2\text{S}$ : ennegrecimiento del medio

El indicador del pH del medio es púrpura de bromocresol, el cual en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color púrpura. Por contener pequeña cantidad de Glucosa (1 g/ l) al ser fermentada al fondo del tubo es amarillo y la superficie alcalina. Muchas bacterias poseen descarboxilasas que atacan el aminoácido lisina, con liberación de aminas de reacción alcalina y con producción



de  $\text{CO}_2$ . Para que actúen las descarboxilasas se requiere PH ácido que se obtiene por la fermentación de la glucosa que tiene el medio (Murcia, 2009).

La diseminación de la lisina es un proceso oxidativo que se manifiesta por la aparición de color rojo en el tendido, siendo el fondo del tubo amarillo por fermentación de la glucosa que posee el medio. Tiene como fuente de azufre el tiosulfato de sodio, necesario para las bacterias puedan producir  $\text{H}_2\text{S}$  y como indicador  $\text{H}_2\text{S}$ , citrato férrico de amonio el cual reacciona con el  $\text{H}_2\text{S}$  produciendo un precipitado negro e insoluble de sulfato ferroso. Para que se produzca  $\text{H}_2\text{S}$  se requiere de un medio ácido por lo que dicha producción generalmente está limitada al fondo del medio, razón por la cual un fondo negro debe leerse como A (ácido), aunque el color amarillo usual esté tapado por color negro (Murcia, 2009).

**Agar citrato de simmons:** sembrar con asa recta, solamente en superficie (Murcia, 2009).

Principio: en agar citrato de simmons se determina la capacidad de un microorganismo de emplear el citrato como única fuente de carbono en ausencia de fermentación de azúcares o de producción de ácido láctico (Murcia, 2009).

Lectura: se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación (48 horas si es necesario) a  $37^\circ\text{C}$  (Murcia, 2009).

Fundamento: Normalmente el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El medio utilizado contiene también sales de amonio inorgánicas. Un organismo capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono también es capaz de utilizar las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio se desdoblán en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) con la consiguiente alcalinidad del medio. El indicador de pH es el azul de bromotimol el cual en presencia de alcalinidad vira al color azul indicando que la prueba es positiva. Cuando no hay



cambio de color ni crecimiento se dice que la prueba es negativa. Si no hay cambio de color, pero sí hay crecimiento la prueba es dudosa (Murcia, 2009).

**Agar urea:** Sembrar con asa recta, solamente en superficie (Murcia, 2009).

Principio: en agar urea se determina la capacidad de un microorganismo de producir ureasa y desdoblar la urea, formando 2 moléculas de amoníaco (Murcia, 2009).

Lectura. Se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C (Murcia, 2009).

Fundamento: El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, denominada carbamida. Todas las amidas ( $\text{R-CO-NH}_2$ ) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica que es la ureasa es una enzima microbiana importante, relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos (Murcia, 2009).

Las enzimas bacterianas se clasifican en adaptativas o constitutivas. Una enzima adaptativa o inducida es aquella que es producida por una bacteria solamente cuando se encuentra presente su sustrato específico. La ureasa es una enzima constitutiva ya que la sintetizan ciertas bacterias sin tener en cuenta si hay o no el sustrato urea. El indicador de pH es rojo de fenol, el cual en alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba positiva. Si el color es amarillo indica una prueba negativa (Murcia, 2009).

**Medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad):** sembrar con asa recta, por picadura central hasta la mitad del tubo (Murcia, 2009).

Principio: en agar sim se determina la capacidad e un microorganismo de moverse (presencia e flagelos), de producir indol y  $\text{H}_2\text{S}$  (Murcia, 2009).



Lectura: Se efectúa de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Agregar 10 gotas de reactivo de erlich (Murcia, 2009).

Fundamento: el indol es uno de los productos del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol se puede detectar en un medio adecuado observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Erlich o de Kovacs indicando una prueba positiva, debido a que el indol reacciona con el grupo aldehído del p- dimetilaminobenzaldehído. Si el color es amarillo indica una prueba negativa. El sim es un medio semisólido sin hidratos de carbono que inhiban la producción de h<sub>2</sub>s y tiene tiosulfato de sodio fuente de azufre y hierro peptonado como indicador de h<sub>2</sub>s, lo que lo hace más sensible en la detección de H<sub>2</sub>S por producción de un precipitado negro de sulfuro ferroso (Murcia, 2009).

La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación final de especie, se realiza en medios semisólidos como el sim, debiéndose leer antes que la prueba de indol porque al agregar el reactivo de Erlich ésta se puede enmascarar. La prueba de motilidad se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación (Murcia, 2009).

**Caldo MR (Rojo de Metilo).**

**Caldo VP (Vogesproskauer).**

sembrar en cada caldo con asa recta (Murcia, 2009).

Principio: En el caldo mr- vp se determina por qué vía metabólica fermenta la glucosa la bacteria (Murcia, 2009).



Lectura: Se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Agregar 10 gotas de rojo de metilo al tubo mr, la aparición inmediata de un color rojo indica que la prueba es positiva para mr, la aparición de un color amarillo indica que la prueba es negativa. al tubo vp agregar 10 gotas de koh al 40% y 5 gotas de alfa naftol al 5%, mezclar fuerte después de la adición de cada reactivo, esperar 15 minutos y leer, la aparición de un color rojo indica una prueba de vp positiva, la aparición de un color amarillo o café indica una prueba de vp negativa (Murcia, 2009).

Fundamento: La bacteria puede fermentar la glucosa por la vía ácida mixta con producción de metabolitos como ácido láctico, fórmico y succínico, los cuales van a hacer descender el ph inicial del medio de 6.9 a 4.2, lo cual se visualiza al agregar el indicador de ph rojo de metilo, el cual a pH ácido vira a un color rojo (Murcia, 2009).

La bacteria puede fermentar la glucosa por la vía butilén glicol con producción de productos neutros como el acetil metil carbinol (acetoina), el 2,3 butilén glicol y el diacetil. El producto final más frecuente es el 2,3 BUTILEN GLICOL, que es fácilmente oxidado a acetil metil CARBINOL y luego a di-acetil. El vp realmente es una búsqueda de di-acetil. El vp realmente es una búsqueda de di-acetil, ya que las condiciones de la prueba convierten fácilmente los otros dos componentes en diacetil. Las 3 sustancias son neutras con el resultado de que ph del medio no baja sensiblemente y por lo tanto la bacteria es mr negativa y vp positiva (Murcia, 2009).

La bioquímica de la fermentación de la glucosa hace muy poco probable encontrar cultivos mr y vp positivos. Lo sí es más probable es encontrar las 2 pruebas negativas en el caso de bacterias no fermentadoras (Murcia, 2009).

**Caldo fenilalanina- malonato:** Sembrar con asa recta (Murcia, 2009).



Principio: En el caldo fenilalanina – malonato se determina la capacidad que tiene una bacteria de desaminar la fenilalanina y de utilizar el malonato como única fuente de carbono (Murcia, 2009).

Lectura: Se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Primero se lee la prueba de malonato si cambia al color azul indica que la prueba es positiva, si continua de color verde la prueba es negativa. Para leer la prueba de la fenilalanina agregar 10 gotas de cloruro férrico al 10%, mezclar fuerte. La aparición de un color verde oscuro indica que la prueba es fenilalanina positiva. Si el color es amarillo castaño la prueba es negativa (Murcia, 2009).

Fundamento: la bacteria puede utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono con la consiguiente alcalinidad del medio. El indicador de pH es azul de bromotimol que en alcalinidad vira al color azul. Algunas bacterias tienen la capacidad de desaminar la fenilalanina produciendo ácido fenilpirúvico por su actividad enzimática, con la consiguiente acidez resultante. Este ácido se visualiza al agregar el cloruro férrico (Murcia, 2009).

#### **Medio de glucosa (oxidación fermentación de Hugh y Leifson):**

Sembrar por duplicado con asa recta por picadura cenral. A uno de los dos tubos agregar 1 ml de aceite mineral estéril (Murcia, 2009).

Principio: determinar si una bacteria presenta metabolismo fermentativo u oxidativo de un hidrato de carbono (Murcia, 2009).

Lectura: Se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C (Murcia, 2009).



Fundamento: Algunas bacterias pueden metabolizar un hidrato de carbono (producción de ácido) solo en condiciones aeróbicas, mientras que otras producen ácido aeróbica y anaeróbicamente (Murcia, 2009).

La fermentación es un proceso anaeróbico que requiere la fosforilación inicial de la glucosa previa a su degradación, mientras que la oxidación en ausencia de compuestos inorgánicos como nitrato y sulfatos es un proceso estrictamente aerobio, que comprende la oxidación directa de una molécula de glucosa no fosforilada (inicialmente). La fermentación produce una acidez más elevada que la producida por la oxidación (Murcia, 2009).

El medio contiene una elevada concentración de hidrato de carbono, con una baja concentración de peptona, para obviar la posibilidad de que un organismo aeróbico utilice la peptona, produciendo así una condición alcalina que neutraliza la más ligera acidez producida por una bacteria oxidativa. La baja concentración de agar permite observar la movilidad del microorganismo, además de la capacidad oxidativa o fermentativa, ya que permite la difusión por todo el tubo de la acidez (Murcia, 2009).

El indicador de PH es el azul de bromotimol el cual en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color azul. Cuando la bacteria es fermentadora los 2 tubos el tapado (tubo con aceite mineral) y el destapado van a presentar color amarillo). Cuando la bacteria es oxidadora el tubo tapado permanece de color verde y la superficie del medio destapado vira al color amarillo. Si la bacteria es no sacarolítica (ni oxida ni fermenta) los dos tubos son de color verde, aunque el tubo destapado en una superficie puede presentar un color azul por degradación de peptonas produciéndose aminas (Murcia, 2009).

**Glucosa, lactosa y sacarosa:** sembrar cada tubo de hidrato de carbono con asa recta (Murcia, 2009).



Principio: Determinar si una bacteria fermenta o no éstos hidratos de carbono. Con o sin producción de gas (Murcia, 2009).

Lectura: se efectúa después de 18 a 24 horas de incubación a 37°C. Se debe observar cuidadosamente la campana de fermentación o campana de Durham, para precisar si hay o no producción de gas por desplazamiento de líquido de la campana (Murcia, 2009).

Fundamento: algunas bacterias pueden metabolizar (fermentar) diversos hidratos de carbono con producción de ácido, anaeróticamente. El indicador de pH es el rojo de fenol que en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color rojo (Murcia, 2009).

**Prueba de oxidasa:** coloque sobre las colonias 5 gotas de reactivo de oxidasa (Murcia, 2009).

Principio: determinar la presencia de las enzimas oxidadas (Murcia, 2009).

Lectura: se efectúa después de 10 a 15 segundos después de agregado el reactivo (Murcia, 2009).

Fundamento: la prueba de la oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Todas las bacterias aeróbicas obtienen su energía por la respiración, proceso responsable de la oxidación de algunos sustratos (Murcia, 2009).

El oxígeno molecular oxida un sustrato con la intervención del sistema de transporte de electrones. El oxígeno es el aceptor de hidrógeno final, produciendo



a partir del H<sub>2</sub> agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana y su sistema enzimático. El sistema citocromo sólo se encuentra por lo general en los aerobios, lo que los hace capaces de utilizar el O<sub>2</sub> como un aceptor de H<sub>2</sub> final para reducir el O<sub>2</sub> molecular en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el último enlace de la cadena de la respiración aeróbica (Murcia, 2009).

Los diversos colorantes para la prueba de oxidasa son aceptores de electrones artificiales. La aparición de un color violeta a negro indica la positividad de la prueba. Compare sus resultados con los de sus compañeros, observe las diferentes lecturas en cada uno de los medios de identificación (Murcia, 2009).

## **PRUEBA DE CALIFORNIA**

La prueba de California para Mastitis ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero. Es una 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 si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Pimentel, 2011).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aril sulfato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la leche y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. 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 (Saran y Chaffer, 2000).

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 paleta con cuatro pozos independientes, permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Saran y Chaffer, 2000).



### PREVALENCIA

Se refiere a la cantidad de enfermedad presente en una población conocida durante un periodo de tiempo determinado, sin distinguir los casos nuevos de los antiguos (Silva, 2007).

Así se puede describir una prevalencia anual, mensual o de toda la vida. La prevalencia generalmente se expresa como prevalencia puntual, la cual es la cantidad de enfermedad que existe en una población en un momento determinado del tiempo. A pesar de que la prevalencia puede ser definida simplemente como el número de animales afectados, generalmente se expresa en términos del número de animales enfermos en relación con el número de animales existentes en la población en riesgo de desarrollar la enfermedad (Pimentel, 2011).

Todos los casos de una enfermedad específica en un momento y área dados.

$$\text{Tasa de prevalencia} = \frac{\text{Todos los casos de una enfermedad específica en un momento y área dados.}}{\text{Población en ese mismo momento y área.}} \times 1000$$

**NOTA:** en la presente investigación para el uso de la formula se utilizó, como unidad de estudio los cuartos de las vacas afectadas con mastitis bovina.

(Silva, 2007)



## **HIGIENE Y MANEJO DE LA ORDEÑA**

Para poder lograr y asegurar una salud estable de las glándulas mamarias del hato, deben ser optimizados en general muchos factores al mismo tiempo. Una importancia principal la tiene el proceso de ordeño y todo lo que está relacionado con este. Pero también las mejoras sencillas en la técnica de ordeño, en el proceso de ordeño y la higiene, no serán efectivas cuando la alimentación, el manejo del hato y las instalaciones no se mejoren al mismo tiempo (Pimentel, 2011).

El propósito del ordeño es una extracción completa, cuidadosa y rápida de la leche. Una parte importante en el ordeño es el manejo de las vacas antes, durante y después del ordeño. Las vacas deben ser conducidas tranquilamente hacia la sala de ordeño. El lugar de espera debe tener un espacio suficientemente grande. No debe haber obstáculos que dificulten la salida de las vacas y de acuerdo con el tamaño del animal deben salir hacia los corrales. En la sala de ordeño deben evitarse cualquier tipo de situaciones estresantes (vacunaciones, inyecciones, tratamientos, toma de sangre etc.) (Pimentel, 2011).

## **HIGIENE DEL ORDEÑO.**

Una higiene del ordeño óptima evita infecciones nuevas en los animales con una ubre sana. Mediante una óptima higiene en el ordeño se evita la diseminación y el aumento de agentes patógenos de la mastitis en el hato y claramente se pueden disminuir. Se pueden tomar medidas higiénicas a nivel del pezón y la base de este. Las medidas higiénicas deben ser tomadas de acuerdo con; la situación actual del estado general de salud de la ubre de las vacas, con el número de infecciones que se presenten y con las necesidades que tenga el hato en ese momento. Enseguida se hace una reseña de las medidas prácticas de higiene (Báez, 2002).



Seguir un orden en el ordeño.

En un establo fijo: para evitar la diseminación de los agentes patógenos de la mastitis, las vacas deben seguir un orden fijo de ordeño, este debe ser terminado por la salud de la ubre. Las vacas sanas se ordeñan invariablemente al inicio, después las vacas sospechosas de enfermedad, enseguida las vacas con problemas de mastitis. Las vacas sospechosas son aquellas que poseen un número muy elevado de células somáticas, las vacas infectadas son aquellas a las cuales se les ha diagnosticado como positivas en el laboratorio microbiológico. Obviamente los animales en tratamiento serán ordeñados al final (Báez, 2002).

Formación de grupos en un establo libre; aquí debe haber la posibilidad de separar, las vacas sanas es decir no sospechosas, de aquellas que estén contagiadas con agentes patógenos que causan la inflamación de la glándula mamaria y de las vacas sospechosas de estar infectadas. El primer grupo en ser ordeñado en el establo es el de las vacas sanas, no sospechosas, enseguida las vacas sospechosas y después las vacas infectadas (Báez, 2002).

### **Preordeño y vaso de preordeño.**

Se debe hacerse un preordeño con un vaso especial, el cual debe tener cubierta negra u obscura, o una coladera obscura dentro del vaso. Un buen preordeño en el vaso oscuro nos ayudara a evitar la diseminación de leche con agentes patógenos. Además en la Unión Europea existe una ley, que ordena el comprobar el estado de la leche antes del ordeño. Una leche visiblemente alterada no debe ser puesta a la venta o al consumo (Báez, 2002).



### **Limpieza de la ubre / desinfección de los pezones antes del ordeño.**

En la limpieza de la ubre se deben observar dos principios: Para cada vaca se utilizara una toalla de papel limpia. Las puntas de los pezones deben de ser lavados cuidadosamente. Frecuentemente pareciera a primera vista que los pezones están limpios. Pero a la observación cuidadosa se nota que hay acumulación de suciedad en las puntas de los pezones con heces fecales secas. Esto ocasiona en el ordeño mecánico un aerosol que puede penetrar en la ubre, entonces los pezones que no han sido correctamente lavados aumentan drásticamente el riesgo de una mastitis (Pimentel, 2011).

El método de lavado de la ubre debe de hacerse de acuerdo con el grado de suciedad de la ubre. En las ubres con muy poca suciedad es suficiente la limpieza con una toalla seca de papel desechable. También es posible el uso de toallas lavables de textiles como de algodón. Tras cada uso deben ser nuevamente lavadas (agua hirviendo) (Baez, 2002).

En caso de la ubre muy sucia, se ha generalizado el uso de toallas húmedas (reutilizables, toallas lavables, que pueden ser utilizadas húmedas). Idealmente pueden ser lavadas (en agua hirviendo) antes del ordeño y utilizadas húmedas. Si esto no fuera posible, las toallas no deben ser guardadas si están húmedas, ya que de un ordeño a otro puede haber crecimiento en un medio húmedo de bacterias y levaduras. En este caso las toallas después de ser lavadas se secaran y antes de ser nuevamente utilizadas deben de ser humedecidas (Pimentel, 2011).



Otra posibilidad en la limpieza de la ubre es la desinfección con un lavado húmedo de la ubre. Para ello son utilizadas toallas de papel desechables, las cuales son introducidas en una solución Cl-Desinfectina al 0.5% (agente activo Cloramina). Esta desinfección con lavado húmedo de la ubre ha demostrado que reduce notablemente la presentación de mastitis causadas mediante las bacterias del medio ambiente (Pimentel, 2011).

Lo que no es recomendable usar es la ducha de la ubre. En un caso normal escurre un agua sucia en dirección de los pezones. El lavado de la ubre es aceptable únicamente en caso de que la ubre este extremadamente sucia. Cuando se utiliza este procedimiento, toda la ubre debe ser inmediatamente secada de forma cuidadosa (Pimentel, 2011).

Tampoco se recomienda, según nuestra experiencia, utilizar soluciones de desinfectantes, las cuales utilizan toallas de textil reutilizables, que son lavadas y almacenadas. En una prueba al azar, fueron analizadas bacteriológicamente 20 de las toallas de limpieza antes mencionadas. En 19 casos se comprobó la existencia de una contaminación bacteriana muy elevada (Pimentel, 2011).

Es necesario lavarse las manos antes de la limpieza de las ubres (Báez, 2002).

### **Cuidado y desinfección del pezón después del ordeño.**

Las soluciones desinfectantes de los pezones deben matar a bacterias patógenas causantes de mastitis y deben actuar en la piel de los pezones y en las puntas de estos. Además de un agente desinfectante debe de contener un



componente para el cuidado del pezón (frecuentemente glicerina o lanolina). Con una desinfección cuidadosa de los pezones, se puede reducir la presentación de nuevas infecciones intramamarias en un 50-70%. Para una desinfección efectiva se ha preferido el uso de compuestos yodados (yodopolivinilpirrolidona, yodonoxinol) y soluciones cloradas (Clorhexidingluconato, Tosilcloramida, Hipoclorito de sodio) (Pimentel, 2011).

En numerosas ocasiones se ha discutido si es mejor el uso del aerosol o del dipp. Ambos métodos son utilizados en la práctica. Con el uso del dipp o sellador se observa un mejor recubrimiento de todo el pezón que con el aerosol, por lo que si se quiere lograr una mayor protección se recomienda el uso del dipp o sellador. El vaso que contiene el sellador, se debe de llenar solo con la cantidad del Dipp o sellador a utilizar en dos ordeños. El resto de la solución debe ser desechado. Antes de volver a llenar nuevamente el vaso, este debe ser bien lavado. Cuando se utiliza el Dipp este debe de cubrir mínimo 2 terceras partes del pezón (Pimentel, 2011).

Independientemente del método utilizado, se debe de hacer una desinfección de los pezones inmediatamente después del ordeño y a todas las vacas deben de aplicarse un sellador. Un buen efecto, es decir, el evitar nuevas infecciones, puede ser logrado, cuando se realiza una desinfección metódica y por largo tiempo de los pezones (Pimentel, 2011).



## OBJETIVOS

Determinar la prevalencia de mastitis bovina en la comunidad de T jaro, Michoacán a través de la prueba de California.

Identificar los agentes etiológicos causantes de la mastitis bovina en la comunidad de T jaro Michoacán.



## Material y métodos

El presente trabajo se realizó de marzo a agosto del 2011 en la comunidad de Tájaro, 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 msnm de 1900 metros (INEGI, 2002).

### Material biológico

Se muestrearon 16 hatos lecheros de la raza Holstein-Friesian, explotados bajo un sistema de producción a pequeña escala, los cuales representan el 12% de la población total del municipio (Asociación Ganadera, 2010). Para determinar la prevalencia de mastitis bovina, para lo cual se utilizó la prueba de California para mastitis (CMT). Se obtuvieron un total de 484 muestras, las cuales fueron recolectadas de 122 vacas en producción.

### Método

Para la recolección de muestras, de leche de acuerdo con (Sixtos, 2011) 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-arilsulfonato 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<sup>o</sup>+, 2<sup>o</sup>+, 3<sup>o</sup>+, y mastitis clínica.



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 en el laboratorio

El procesamiento de las muestras de leche de los pezones fue realizado al día siguiente del muestreo. Es decir, después de un enfriamiento a 4°C en el laboratorio de bacteriología de la USAD de la FMVZ-UMSNH. Las muestras fueron sembradas en agar sangre con azida (Bioxon), y agar 110 estafilococos (Bioxon). Las placas de agar fueron incubadas a 37°C y examinadas después de 24 y 48 hrs. Los aislamientos de estafilococos fueron resembrados en agar con sangre de borrego e identificados a través de la morfología, la tinción de Gram, la prueba de catalasa, la prueba de coagulasa de plasma de conejo, así como la prueba de manitol y gelatina.

Asimismo, todos los aislamientos de *Staphylococcus aureus* fueron identificados por los patrones de hemólisis después de 24 hrs. de incubación a 37°C. La hemólisis fue registrada como alfa hemólisis, y beta hemólisis, doble hemólisis (alfa +beta), y negativa (no hemólisis).

Las colonias que desarrollaron en agar McConkey y azul eosina de metileno, se identificaron por su morfología microscópica y pruebas bioquímicas.



## Resultados y discusión

Para la determinación de la prevalencia de mastitis bovina se utilizó la prueba de california para la mastitis (CMT). Se muestrearon en total 484 cuartos, de los cuales 176 resultaron negativos a la prueba.

Del total de los cuartos afectados (308), los cuales están divididos en anterior derecho, 89; posterior derecho, 74; anterior izquierdo, 74; posterior izquierdo, 71.

**Tabla 1. Porcentaje de cuartos infectados con mastitis bovina.**

Grado de infección	AD	PD	AI	PI	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
Total	131	119	121	113	484	100

En base a los resultados obtenidos del estudio realizado en el periodo de investigación sobre la mastitis bovina en el municipio de Téjaro, Michoacán, se determinó una prevalencia de 63.6% , la cual resulta elevada en comparación con estudios realizados por (Guizar y Bedolla, 2008), ya que en estudios realizados en Tarímbaro Michoacán se determinó una prevalencia de 43.14%. Los cuales van acorde con lo reportado por (Pimentel, 2011), quien reporta en estudios realizados en Jalostotitlan, Jalisco, una prevalencia de 43.92%.

Sin embargo, el porcentaje encontrado en este estudio es bajo en comparación con lo reportado por Tena (1999), el cual encontró que la prevalencia de ganado afectado durante el periodo de estudio fue de un 80.31%. El estudio

mencionado fue realizado en 8 establos de 13 vacas en producción de T jaro, Michoacán.

**Cuadro 2. Agentes patógenos identificados en las muestras de leche de vacas con mastitis bovina de la comunidad de T jaro, Michoacán.**

Agentes patógenos	N�	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	41	23.4
<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i>	61	34.8
<i>Citrobacter intermedius</i>	14	8.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	2.2
<i>Escherichia coli</i>	3	1.7
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0.6
<i>Alcaligenes fecalis</i>	16	9.1
<i>Moraxella sp</i>	10	5.8
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	5.8
<i>Moraxella bovis</i>	6	3.4
<i>Serratia sp</i>	6	3.4
<i>Flavobacterium sp</i>	3	1.7
<b>TOTAL</b>	<b>175</b>	<b>100</b>

En el presente trabajo, todos los aislamientos de *Staphylococcus aureus* fueron identificados por los patrones de hemólisis después de 24 hrs. de incubación a 37 C. Asimismo, la hemólisis fue registrada como  $\alpha$ ,  $\beta$ , doble ( $\alpha + \beta$ ), y negativa (no hemólisis), como lo señalan Saran y Chaffer, (2000); Boerlin, *et al.* (2003); Zschock, *et al.* (2004); Bedolla, *et al.* (2004).

En un estudio realizado por Bedolla, *et al.* (2007) en Cotzio, Michoacán, se encontró también que los principales agentes patógenos causantes de mastitis en los hatos lecheros fueron los Estafilococos coagulasa negativos, los cuales se encontraron en un 39% de las muestras, seguidos por los *streptococos spp* encontrados en un 36% de estas. Lo cual demostró que la mastitis causada principalmente por la falta de higiene en los corrales y durante el proceso de la



ordeña ya que estos patógenos no son propios de la glándula mamaria sino que son transmitidos por el ordeñador a la vaca por contacto directo.

Por otra parte, los resultados del examen bacteriológico de las muestras de leche de los cuartos de la glándula mamaria de las 78 vacas en ordeña obtenidas por Galeana, et al (2008) realizado en Pátzcuaro Michoacán identificaron 64 (18.44%) aislamiento de *Staphylococcus aureus* el cual es considerado el principal agente causante de mastitis bovina contagiosa, que ocasionan las pérdidas económicas más considerables a la industria lechera en el mundo, mientras que el 24.49% (85) correspondieron a es estafilococos coagulasa negativos, los cuales representaron el grupo de bacterias aisladas más frecuentemente. Un 6.91% (24) correspondieron a estreptococos esculina positivos, 0.57% a *Escherichia coli* y el resto 122 (35.46%) fueron identificados como otros patógenos causantes de mastitis.

Como se puede observar en estos dos estudios realizados en diferentes municipios del estado de Michoacán, los estafilococos coagulasa negativos son los patógenos más frecuentemente identificados en el laboratorio, por lo que se deben tomar las medidas adecuadas de higiene, limpieza y manejo de los hatos lecheros por parte de los productores para de esta manera evitar excesivas pérdidas económicas.



## Conclusión

Se concluye que la frecuencia de mastitis bovina en este municipio fue de un 63.6%, lo que representa un problema serio para los productores participantes en este estudio, ya que los niveles encontrados son moderadamente altos en comparación con otros estudios realizados por otros investigadores, por lo tanto, las pérdidas económicas que ocasiona en la producción láctea resulta ser elevadas.

Por otra parte, se encontró que los agentes causantes de la mastitis bovina en los hatos lecheros en estudio, es causada principalmente por estafilococos coagulasa negativos, seguida por el *S. aureus*, agente principal causante de la mastitis contagiosa, que es una de las enfermedades más costosas y prevalentes en el ganado lechero y difícil de erradicar, así como enterobacterias y coliformes. Por lo que se recomienda implementar un programa adecuado de control de la mastitis que comprenda las medidas adecuadas en el uso de desinfectantes de la ubre, higiene y desinfección de los pezones antes y después de la ordeña, desecho, mantenimiento y lavado adecuado de los utensilios y del equipo de ordeño, así como una terapia antibiótica intramamaria adecuada de las infecciones.



### Literatura citada

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

Andersen, F., Østerås, O., Reksen, O., and Gröhn, Y., T. 2010. Mastitis and the shape of the lactation curve in Norwegian dairy cow, Department of Population Medicine and Diagnostic Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA.

Asociación Ganadera Local de Tarimbaro, 2010. Listado General de Productores.

Aulton, M., E. 2004. Ciencia y diseño de formas farmacéuticas. 2a edición, Ed. Elsevier. España.

Baéz, G., J., J. 2002. Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Tégjaro, Michoacán. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Morelia, Michoacán, México. P.p.13-16.

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 DairySci*. 82: 1643–1654.

Bedolla, C., C., y Castañeda, V., H. 2003. Agentes patógenos causantes de la mastitis bovina. *Cuatro Vientos*. No. 38:27-29.

Bedolla, C., C. 2004. Mastitis Bovina. *Cuatro Vientos* No. 41 febrero-marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 24-25.



Bedolla, C., C., Castañeda, V.,H., Wolter, W., 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina.

Bergey, D., H., Holt, J., G., H., Krieg, N., R., Krieg, Sneath, P., H. (2005). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th Ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.

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

Boerlin, P., Kuhnert, P., Hussy, D., Schaellibaum, P. 2003. Methods for identification for *Staphylococcus aureus* isolates in case of bovine mastitis. Journal of Clinical Microbiology. 41(2):767 a 771.

Bradley, J., y Green, M., J. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland. Journal of Clinical Microbiology.39: 1845 -1849.

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.

Carrillo, Z., E., M., Lozano, C., A., M. 2008. Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult.

Chacón, C., 2009. Bacteriología Médica.



Correa, M., G., P., y Marín, 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.

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.

Field, T., R., Ward, P., N., Pedersen, L., H., and James, A., Leigh, J., A. 2003. The Hyaluronic Acid Capsule of *Streptococcus uberis* Not Required for the Development of Infection and Clinical Mastitis. *Infection and Immunity*. 71(1):132-139.

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.



Galeana, T., Cisneros, J., J., Solís, E., I., Ortega, V., M., González, V., E., Mejía, A., R., Rentería, S., I., y Bedolla, C., C. 2008. Etiología de la mastitis bovina en el municipio de Pátzcuaro Michoacán. Memorias del V Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. Centro de Investigaciones en Óptica. León, Guanajuato. México. pp. 1-4.

Gallegos, A., Moncada, J., N. 2011. Uso De Extractos De Semillas De Cítricos Para El Control De La Mastitis Bovina

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 municipality of Tarimbaro, Michoacan, by means of the California test). Revista electrónica de Veterinaria. Vol. IX No. 10. pp.1-34.

INEGI. (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). 2002. Anuario Estadístico del Estado de Michoacán. Censo General de Población y Vivienda.

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.



Kaliwal, B., Sadashiv, S., O., Mahantesh, M., Rajeshwari, K., Sanakal, D. 2011. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Coagulase- Negative *Staphylococci* isolated from Bovine Mastitis. 2011, Vol.4, P. G. Department of Studies in Biotechnology and Microbiology, Karnatak University, Dharwad-580 003, Karnataka, India.

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.

Kumar, R., Yadav, B., Anand, S., K., Singh, R., S. 2011. Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle *World J Microbiol Biotechnol*.

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.

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.

León, J., Avalos, R., Y Ponce, M. 2009. *Flavobacterium psychrophilum* su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio. *Flavobacterium psychrophilum* and its pathology in alevins of *Onchorhynchus*.

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



Madigan, M., T., Parker M., J. (2004). Brock Biology of Microorganisms (10th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-13-066271-2.

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- $\beta$ -D-glucosaminidase Activity in Cattle from Eight Dairies. J. Dairy Sci. 85:1133 –1140.

Momtaz, H., Tajbakhsh, E., y Rahimi, E. 2010. Manochehr Momeni Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub-clinical bovine mastitis in Isfahan and Chaharmahalva Bakhtiari provinces of Iran.

Murcia, M., A. 2009. IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

Nash, D., L., Rogers, G., W., Cooper, J., B., Hargrove, G., L., Keown, J., F. 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.

Nash, D., L., Rogers, G., W., Cooper, J., B., Hargrove, G., L., Keown, J., F. 2003. Heritability of Intramammary Infections at First Parturition and Relationships with Sire Transmitting Abilities for Somatic Cell Score, Udder Type Traits, Productive Life, and Protein Yield. J Dairy Sci. 86:2684-2695.

Navarro, C. 2011. Mastitis bovina causada por ECN, Artículos Rumiantes Archivo. Edita: Grupo Asís Biomedica, S.L. Andador del Palacio de Larrinaga, 2 50013 Zaragoza.



Pimentel, G., E., P. 2011. Determinación de la prevalencia de mastitis subclínica en el municipio de jalostotitlán, Jalisco mediante la prueba de california. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Morelia, Michoacán, México.

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.

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.

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. DairySci*. 85:132-138. 66.Saran, A. y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires.

Saran, A., y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires.

Sakemi, Y., Tamura, Y., Hagiwara, K. 2009. Food Microbiology and Food Safety, School of Veterinary Medicine, R, Japan Veterinary Virology, School of Veterinary Medicine.



Schrick, F., N., Hocket, 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. DairySci.* 84:1407-1412.

Silva, F. 2007. Prevalencia en incidencia de mastitis bovina en el sistema de lechería familiar de Téjaro y Cotzio, Michoacán.

Sixtos, E., S. 2011. Frecuencia y etiología de la mastitis bovina en Cherán, Michoacán. Servicio profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 46 pp.

Sogaard, M., Nørgaard, M., Schonheyder, H. 2007. "First notification of positive blood cultures: high accuracy of the Gram stain report (Epub ahead of publication)". *J ClinMicrobiol.*

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.

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.

Tena, M., M. 1999. Estudio epizootiológico de la mastitis en hatos lecheros en sistemas de explotación familiar. Tesis de Maestría. Morelia, Michoacán. pp. 56-82.



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*

Tomasinsig, L., De Conti, G., Skerlavaj, B., Piccinini, R., Mazzilli, M., D'Este, F., Tossi, A., and Zanetti, M. 2010. Broad-Spectrum Activity against Bacterial Mastitis Pathogens and Activation of Mammary Epithelial Cells Support a Protective Role of Neutrophil Cathelicidins in Bovine Mastitis. *Infect. Immun.* 78: 1781 - 1788.

Unakal, C., y Kaliwal, B. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis.

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

Wellenbergh, G., J., van der poel, W., H., M., and Van oirschot, J., T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, article 2361, pp. 21

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.

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., B., E., Gillespie, H., W., Barkeman, O., C., Sampimon, S., P., Oliver, Andy H., Schukken. 2002. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. 130:335-349.

Zschöck, M., Riße, K., y Sommerhäuser, J. 2004. Ocurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quarter milk samples of cows suffering from mastitis. Letters in Applied Microbiology. 38: 493-498.