

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

7

ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA MASTITIS BOVINA CAUSADA POR *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVOS

206903

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA:
LAURA HERNANDEZ ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS: GUSTAVO A. GARCIA DELGADO
COASESOR: GRACIELA TAPIA PEREZ
COASESOR: CARLOS ROSALES ORTEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología) del INIFAP SAGAR como parte de las investigaciones que se llevan a cabo en Ganado Lechero.

Este trabajo estuvo totalmente financiado por el programa "Apoyo a la investigación" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al MC Gustavo A. García Delgado, por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

A la MC Graciela Tapia Pérez, por su gran ayuda en la parte estadística y por su amistad.

A la MC Laura Jaramillo Meza, por su orientación y ayuda en el trabajo de adherencia. Gracias por su valiosa amistad.

Al MC Dionicio Córdoba López, por su orientación en el análisis de datos de esta tesis.

Al MVZ Martín Cruz Alamilla, por haber brindado las facilidades para los muestreos de los establos participantes.

Al MVZ Guillermo Arroyo Gómez, por su ayuda durante algunos de los muestreos realizados.

Al MC Carlos Rosales Ortega, por su apoyo en la realización de la tesis.

A todas las personas que de una o de otra forma ayudaron en la realización de este trabajo. Gracias

ÍNDICE

RESUMEN	Página
INTRODUCCIÓN	
1 MASTITIS BOVINA	10
1.1 MASTITIS SUBCLÍNICA POR <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVOS (SCN)	11
2 EPIDEMIOLOGÍA. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PRESENTACIÓN DE MASTITIS	12
2.1 DEL INDIVIDUO	13
2.2 DEL MEDIO AMBIENTE	14
2.3 DE LOS MICROORGANISMOS	16
3 ETIOLOGÍA	17
3.1 <i>Staphylococcus spp.</i> , RASGOS MICROBIOLÓGICOS Y CLASIFICACIÓN	18
3.2 <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVOS	19
4 PATOGENIA: ESTADIOS INICIALES DE LA INFECCIÓN	22
4.1 ADHERENCIA	23
4.2 MECANISMOS DE DEFENSA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	24
4.3 FACTORES Y MECANISMOS DE VIRULENCIA DE <i>Staphylococcus spp</i>	27
5 DIAGNÓSTICO DE MASTITIS	28
5.1 MÉTODO DIRECTO: DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	29
5.2 MÉTODO INDIRECTO: RECUENTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS	31
6 CONTROL DE MASTITIS	32

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

7	LA MASTITIS POR <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVOS EN MEXICO	34
	HIPÓTESIS	35
	OBJETIVOS	36
	MATERIAL Y MÉTODOS	37
	MARCO MUESTRAL	37
	POBLACIÓN DE ESTUDIO	37
	MÉTODO	37
	DISEÑO EXPERIMENTAL	38
	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	40
	ELABORACIÓN Y APLICACIÓN DEL CUESTIONARIO SOBRE MANEJO	41
	PRUEBA MODIFICADA DE WISCONSIN	43
	ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LA LECHE	43
	IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVOS	44
	PRUEBA DE ADHERENCIA A CÉLULAS EPITELIALES DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA	45
	PRUEBA DE ADHERENCIA A MATERIAL PLÁSTICO	46
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
	ANÁLISIS UNIVARIADO	47
	ANÁLISIS BIVARIADO	47
	RESULTADOS	49
	PREVALENCIA DE MASTITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA: FACTORES AMBIENTALES Y DE INDIVIDUO QUE INTERVIENEN EN SU PRESENTACIÓN	49

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	52
RESULTADOS CON RELACIÓN CON EL AISLAMIENTO DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVOS	52
ANÁLISIS BIVARIADO. RAZONES DE MOMIO DE LAS VARIABLES EN ASOCIACIÓN A MASTITIS SUBCLÍNICA	56
RAZONES DE MOMIOS EN RELACIÓN AL AISLAMIENTO DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVOS	58
ADHERENCIA A CÉLULAS EPITELIALES DE LA GLÁNDULA MAMARIA	59
PRUEBA DE ADHERENCIA A MATERIAL PLÁSTICO	60
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	71
LITERATURA CITADA	72
ANEXO 1 CUESTIONARIO PARA EL ESTUDIO DE LA MASTITIS BOVINA CAUSADA POR <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVOS.	93
ANEXO 2 CODIFICACIÓN DE VARIABLES DE ESTUDIO.	97

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

LISTA DE CUADROS

- 1 Número de muestras de cada establo según el tamaño de la muestra calculada.
- 2 Resultados de la prueba de Wisconsin modificada en leches de 1,107 vacas de los Edos. de México e Hidalgo.
- 3 Frecuencia de mastitis en los diez establos participantes.
- 4 Resultados de la prueba modificada de Wisconsin de acuerdo a los tres estratos de población.
- 5 Porcentaje de mastitis en los establos agrupados de acuerdo a los índices de higiene y manejo.
- 6 Prevalencia de mastitis por explotación de acuerdo a los índices de higiene y manejo.
- 7 Frecuencia de mastitis según producción de leche.
- 8 Frecuencia de mastitis en relación a días en leche.
- 9 Frecuencia de mastitis según número de parto.
- 10 Mastitis en relación a higiene de la sala de ordeño.
- 11 Mastitis en relación a estado de las pezoneras.
- 12 Mastitis en relación a caída de pezoneras.
- 13 Mastitis en relación a sobreordeño.
- 14 Mastitis en relación a estado de la cama.
- 15 Mastitis en relación a material de la cama.
- 16 Porcentajes de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) en los diez establos de estudio.
- 17 Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos.
- 18 *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) aislados en leche de 1,107 vacas con cuentas celulares normales y con mastitis subclínica.
- 19 Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos en los tres estratos de estudio.
- 20 Especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos aislados en los tres estratos (% calculados tomando en cuenta solamente cultivos positivos).
- 21 Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos con base en la calificación otorgada al rancho según higiene y manejo.
- 22 Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos de acuerdo a la higiene en la sala de ordeño.
- 23 Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos con base en el número de parto.
- 24 Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos en relación con la producción de leche.
- 25 Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos de acuerdo al número de días en leche.
- 26 Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y la existencia de sobreordeño.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

- 27 Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y caída de pezoneras durante el ordeño.
- 28 Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y el material de la cama.
- 29 Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y la humedad de la cama.
- 30 Medias mínimo cuadráticas de adherencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y positivos a células epiteliales ductulares de glándula mamaria bovina.
- 31 Promedio de *Staphylococcus coagulasa* negativos adheridos por célula epitelial ductular de glándula mamaria bovina.

RESUMEN

Laura Hernández Andrade. Estudio epidemiológico de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus coagulasa* negativos. Asesorado por: MC. Gustavo A. García Delgado, MC Graciela Tapia Pérez, MC. Carlos Rosales Ortega.

Con el objetivo de identificar las principales especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) en la mastitis bovina en México, e identificar los factores de riesgo asociados a su presentación; así como de conocer el grado de adherencia de estos microorganismos a células epiteliales ductulares de glándula mamaria bovina y a material plástico, se realizó un estudio epidemiológico en diez establos ubicados en los estados de México e Hidalgo. Por medio de un muestreo estratificado y sistemático se tomaron muestras de leche de 1,107 vacas seleccionadas al azar, con la finalidad de aplicar la prueba de Wisconsin modificada para conocer la prevalencia de mastitis, así como aislar e identificar a los gérmenes presentes especialmente *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN); los cuales se identificaron por medio de pruebas convencionales complementadas con el sistema APIG20. Se mezclaron *in vitro* suspensiones de SCN y células epiteliales y se contaron las bacterias adheridas por célula. Para observar la adherencia en tubo las suspensiones de SCN, se tiñó con safranina la pared de tubos de plástico que tuvieron cultivos en caldo, para observar a simple vista si existió crecimiento adherido a la pared del tubo. La prevalencia de mastitis clínica fue de 1.99% (22/1107), la de mastitis subclínica fue de 60.25% (667/1107). El porcentaje de vacas sin mastitis fue de 37.76% (418/1107). Se lograron 533 aislamientos bacterianos, de los cuales 118 (22.1%) correspondieron a coagulasa negativos (SCN); de éstos, 76 (64.4%) provinieron de mastitis subclínica y 42 (35.5%) de leches con cuentas celulares de menos de un millón de células/ml. La especie bacteriana más frecuentemente aislada en ambos tipos de leche fue *S. xylosus*. Otras especies aisladas en orden decreciente fueron: *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. kloosi*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* y *S. cohnii*. Otros microorganismos aislados incluyeron

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Streptococcus spp y *Corynebacterium spp*. Todos los SCN mostraron adherencia a células epiteliales ductulares de glándula mamaria bovina sin diferencia estadística entre ellos, *S xylosus* mostró mayor promedio de adherencia al material plástico. No se encontró ningún factor de riesgo en la mastitis causada por (SCN), probablemente por la falta de potencia del muestreo realizado.

Palabras clave: mastitis, *Staphylococcus coagulasa* negativos, adherencia, factores de riesgo.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

Abstract

Pathogenic differences between coagulase negative *Staphylococci* (CNS) have been found, the bacteria induce several inflammatory responses from subclinical to severe clinical mastitis. This study was carried out with the purposes of know the most frequently strains of coagulase negative *Staphylococci* in bovine mastitis, know risk factors and know the adhesiveness capacity to produce mucous which allows them to adhere to smooth surfaces as plastic tubes. Other purpose was to know the adherence degree of CNS to mammary epithelial cells. This study was made in ten herds from Edo. México and Hidalgo. 1107 samples milk were taken from Holstein cows with the purpose to make Wisconsin test. CNS were identified with the API G20 system. The mucous producing and adherence capacity to smooth surfaces was observed in esteril plastic tubes containing brain infusion broth and inoculated with the CNS strains, after 24 h incubation period the liquid media was descarted and 0.25% safranina O was added, 15 minutes latter the liquid was decanted and the tubes were washed and observed. An adderent positive growth had a pink -red smear in the internal side of the tube and not only in the bottom or air-liquid interphase. CNS strains had adhesiveness capacity that could be importat in transmision of those CNS present in linners to the mammary quarters, it can be also related to the high incidence of those microorganisms in bovine mastitis. Strains of *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*, isolated of mastitis adjusted with the 0.5 Nephelometer tube of Mc Farland. Epithelial cells were obtained from mammary glands of recently sacrifice cattle. The bacterial suspension were mixed with the cells. The test was made three times with each CNS strains. *S. xylosus* had a cell adherence of 28%, *S. haemolyticus* 36%, *S. hominis* 32%, *S. warneri* 12%, *S. chromogenes* 34%, *S. simulans* 19%, *S. epidermidis* 21% and *S. saprophyticus* 33%. The average adhesiveness of bactria for most CNS species was 4 bacteria for each cell. Risk factors were not found for mastitis by coagulase negative *Staphylococci*.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

Key words: Coagulase negative *Staphylococci*. Bovine mastitis, adherence

INTRODUCCIÓN

1 MASTITIS

La mastitis es definida como una inflamación de la glándula mamaria, originada usualmente como consecuencia de una infección que puede ser producida por numerosos agentes etiológicos.

La mastitis origina pérdidas económicas graves por efecto de las siguientes causas:

- Disminución de la producción de leche.
- Aumento de los costos por eliminación y reposición del ganado.
- Disminución del valor de venta de la leche producida por vacas con mastitis clínica.
- Eliminación de leche que no resulta apta para el consumo.
- Disminución de la calidad de los subproductos derivados de la leche.
- Aumento de gastos en medicamentos.
- Incremento de costos en servicios veterinarios.

La mastitis clínica se caracteriza por anomalías visibles en la ubre o en la leche. La mastitis subclínica no puede detectarse por observación visual, sin embargo se puede diagnosticar con ayuda de métodos indirectos.

En las infecciones naturales, la contribución relativa de las pérdidas en producción de leche ocasionada por la mastitis subclínica es de un 80%, debido a que tiene una frecuencia de 20 a 50 veces superior a la mastitis clínica. No todos los animales con mastitis subclínica presentan un mismo porcentaje de pérdidas en la producción de leche, ya que éste asciende en relación directa al contenido celular de la leche (1).

En la predisposición de mastitis bovina se han considerado factores intrínsecos como: morfología del pezón, producción lechera, edad, estado de lactación,

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

inmunidad y equilibrio hormonal. Entre los factores extrínsecos o del medio ambiente se consideran: época del año, desequilibrio en la alimentación, higiene de la explotación, prácticas de manejo y ordeño. Entre los factores de tipo ocasional se encuentran: retención de leche y traumatismo del pezón. En cuanto a los gérmenes asociados a mastitis infecciosa, se considera que son factores importantes su especificidad, patogenicidad y frecuencia (2)

El status de infección de una glándula mamaria constituye el factor más importante de variación del recuento celular de la leche de dicha glándula. La respuesta específica de los principales tipos celulares presentes en la leche guarda una estrecha relación con la gravedad de la infección.

En el ganado vacuno, la edad de los animales del hato explica el 8% de la varianza total del conteo celular, ya que este aumenta con la edad del animal, debido fundamentalmente al aumento de la concentración de los polimorfonucleares a lo largo de lactaciones sucesivas; mientras que el resto de los tipos celulares sufren tan sólo un ligero incremento a partir de la segunda lactación (1)

1.1 MASTITIS SUBCLÍNICA POR *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVOS (SCN).

Entre los gérmenes causantes de mastitis subclínica se encuentran los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) las infecciones subclínicas causadas por SCN son frecuentes, no son severas y aumentan muy poco las cuentas de células somáticas en leche de tanque. Los signos clínicos son poco aparentes y se limitan a coágulos y escamas en la leche. La incidencia de infecciones por SCN es mayor durante el período de secado (descanso lactacional), cuando el pezón no está expuesto a germicidas, por lo tanto el porcentaje de glándulas infectadas es más alto en el parto.

Los SCN son los microorganismos aislados con mayor frecuencia en procesos subclínicos y se ha comprobado su variabilidad patógena: algunas especies son

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

capaces de producir mastitis clínica (*S. chromogenes*), subclínicas (*S. simulans*) o ligeras elevaciones del recuento de células somáticas (*S. xylosum*). También se ha aislado *S. simulans* y *S. epidermidis* en gran número de infecciones clínicas (4, 5).

En un estudio realizado por Hodges (6) a partir de 900 muestras de casos de mastitis bovina, encontró mastitis clínica en un 30.6% asociada con *Staphylococcus coagulasa* positivos y 15.3% con *Staphylococcus coagulasa* negativos.

En infecciones experimentales bilaterales por *S. simulans* realizadas en ganado ovino lechero, se han observado pérdidas en la producción láctea de un 20 a 30 % durante varias semanas, como consecuencia de la mastitis subclínica originada por este microorganismo (7).

2 EPIDEMIOLOGÍA

La mastitis bovina es un síndrome multifactorial, por lo que para la comprensión de su presentación y evolución es preciso conocer con exactitud la interrelación de todos los factores que influyen en su aparición los ligados al individuo, a los diferentes microorganismos y al medio ambiente, incluyendo factores de manejo como: ordeño, amamantamiento y alojamiento (8). Es necesario conocer la dinámica de las infecciones mamarias, es decir, su origen, transmisión, persistencia y evolución, para proponer los medios de prevención y control con fundamentos de eficacia.

La prevalencia de mastitis en un hato lechero indica el número o porcentaje de vacas o glándulas mamarias que se encuentran infectadas con la enfermedad en cualquier momento. La incidencia se refiere a la frecuencia con que se presentan nuevas infecciones (8, 9). A nivel mundial la prevalencia de mastitis ha disminuido aproximadamente en un 50% en los últimos 25 años como resultado de programas de control (1).

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Se han evidenciado ciertos parámetros que influyen en la presentación de mastitis, por ejemplo la importancia de la contaminación de las camas en las infecciones por enterobacterias, *S. faecalis*, *S. uberis* y los reservorios en las mastitis por *Mycoplasmas*; pero quedan incógnitas respecto a los factores de presentación de los *Staphylococcus coagulasa* negativos y en cierta medida también de *S. aureus*, ya que son los microorganismos más frecuentes en las mastitis bovinas y ovinas. Hasta fechas muy recientes no se habían discriminado las diferentes especies de SCN (10) y se tenía idea de que eran microorganismos patógenos secundarios sin gran relevancia clínica, epidemiológica o económica. Nuevos reportes han prestado mayor importancia a este grupo de microorganismos (11, 12).

FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS QUE INTERVIENEN EN LA PRESENTACIÓN DE MASTITIS

2.1 DEL INDIVIDUO

En el ganado bovino lechero, el diámetro del canal del pezón es un rasgo anatómico ligado a la predisposición de mastitis (1). Las ubres firmemente implantadas son menos susceptibles que las colgadas, además la forma del extremo del pezón está correlacionada con la susceptibilidad a la mastitis. Algunos rasgos de la morfología mamaria, especialmente el ángulo de implantación de los pezones y la altura de los senos lactíferos en la glándula mamaria son importantes en muchos casos de caídas de pezoneras durante el ordeño, ya que al no quedar bien colocadas por la anatomía de la glándula mamaria se presenta la caída de ellas. También pueden existir inhibiciones en la salida de leche y de la magnitud de la leche retenida en la ubre después de su ordeño a máquina (7).

En cada animal, la susceptibilidad a la mastitis puede atribuirse a diversas causas:

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

- Edad. Conforme avanza la edad aumenta la susceptibilidad a la mastitis. En la edad de máxima producción suelen aumentar los casos de infecciones subclínicas.
- Producción láctea. A mayor productividad puede existir mayor susceptibilidad.
- Características anatómicas y genéticas de susceptibilidad al ordeño mecánico. Estos factores son de importancia en la predisposición a mastitis, entre los que se encuentran el diámetro del canal del pezón, pezones demasiado largos o cortos, o implantados incorrectamente y ubres caídas.
- Período de lactación. La probabilidad de infección es mayor alrededor de tres semanas post-parto y después del destete.
- Infecciones antiguas y/o crónicas. Los animales que han sufrido episodios de mastitis clínica especialmente de tipo gangrenoso, tienen una alta probabilidad de permanecer infectados durante periodos de tiempo muy prolongados.
- Animales portadores de infecciones inaparentes, los que pueden ser el origen de la infección de los animales sanos. Algunos microorganismos pueden ser eliminados desde la piel, glándulas, mucosas, también en una variedad de productos animales como carne, leche y queso. Consecuentemente los microorganismos pueden ser eliminados al medio ambiente (tierra, polvo, agua).

2.2 DEL MEDIO AMBIENTE

Las instalaciones donde se encuentran los animales presentan asociaciones con los casos de mastitis:

- Higiene, la cual juega un papel primordial en la profilaxis de las infecciones, sobre todo la limpieza de las camas.
- Humedad, si la renovación de la cama es insuficiente y se acumula humedad en ésta, las bacterias presentes normalmente en las heces, como son las enterobacterias y estreptococos, se multiplican activamente con lo que aumenta la posibilidad de contacto con la apertura natural del pezón y con ello la posibilidad de casos clínicos. Esta relación ha sido suficientemente

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

documentada en países que han aplicado planes de control de mastitis durante años (8).

- Modelo de instalación. En particular la construcción con materiales rugosos y con todo aquello que pueda incidir en la producción de traumatismos en la ubre o lesiones en la abertura del pezón debe ser considerado como factor principal de riesgo de mastitis. Los suelos pueden alojar microorganismos y materia orgánica. Los suelos emparillados minimizan el contacto de los animales con las heces, y con ello tienden a disminuir los procesos bacterianos, incluyendo la mastitis (8).
- Variaciones bruscas de la temperatura. Las corrientes de aire por ventilación inadecuada y/o excesiva, asociados a edificaciones mal orientadas tienden a disminuir las defensas y con ello la resistencia a las infecciones.
- Tipo de material de la cama, que influye en la proliferación microbiana posterior. Se ha observado que las camas de aserrín de madera favorecen la presentación de mastitis colibacilares, debido a que algunas bacterias como *Klebsiella* y *Enterobacter* son capaces de multiplicarse activamente; por otro lado, se ha observado que la paja es un sustrato más adecuado para *Streptococcus uberis*.
- Ordeño. Es el factor primordial en los hatos lecheros, ya que es el momento más importante de contagio de los patógenos implicados en mastitis. Las observaciones a efectuar en relación con la aparición de mastitis son diferentes según el sistema de ordeño empleado, aunque existen ciertos factores en común. En las instalaciones de ordeño manual, sin foso u otro sistema que permita realizar dicha operación con cierta comodidad, resulta difícil que el riesgo de contagio sea bajo. En el ordeño mecánico, tendencia a la que están abocadas la mayoría de las explotaciones lecheras, la técnica de ordeño y sobre todo el correcto funcionamiento de la instalación es decisivo para evitar el contagio. El sobreordeño es cuando las pezoneras se dejan más tiempo del necesario en contacto con el pezón y la leche ya dejó de fluir. Este es un factor importante de daño físico a considerar

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

- Estrés. También esta condición predispone a la mastitis por la constante tensión que todos los factores adversos generan en la vaca al momento del ordeño, de alimentación y reposo.

2.3 DE LOS MICROORGANISMOS

Se considera que las ubres infectadas de las vacas pueden ser una fuente de microorganismos contagiosos, ya que se pasan de vaca a vaca durante el ordeño (13). Las fuentes más importantes de microorganismos del medio ambiente como es *Pseudomonas aeruginosa*, están ubicadas en los lugares donde vive y se explota la vaca, por lo que fácilmente tienen acceso a la piel y consecuentemente al interior de la ubre en el intervalo entre ordeños.

Entre los microorganismos contagiosos e importantes se encuentran: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*; otros que también se incluyen son *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis*. Estos microorganismos se adaptan bien al crecimiento dentro de la ubre, usualmente comienzan con infecciones subclínicas de larga duración y se eliminan en gran proporción en la leche producida por las glándulas mamarias infectadas.

Los hatos donde la mastitis contagiosa ha sido controlada, algunas veces tienen mayor incidencia de mastitis clínica causada por microorganismos del medio ambiente, entre los que se incluyen varias especies del género *Streptococcus* a excepción del *Streptococcus agalactiae* y coliformes entre los que destacan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* y otros géneros bacterianos menos frecuentes como *Pseudomona aeruginosa*.

Una gran variedad de otros microorganismos pueden causar mastitis en ciertas condiciones, entre ellos se encuentran *Nocardia*, *Pasteurella*, *Prototheca*, *Bacillus* y levaduras.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

Las infecciones son usualmente causadas por una sola cepa; las características de ésta deben ser demostradas y contrastadas con otras cepas con la discriminación o repetibilidad que confirme que la infección existe o persiste.

Microorganismos oportunistas como los SCN se encuentran casi siempre en grandes cantidades en la superficie de la ubre y pezón, constituyendo una fuente de infección constante; usualmente son los más prevalentes en la leche, pero causan sólo una ligera inflamación. Los SCN incluyen más de 20 especie(10, 14,15).

Cuando ocurre un brote de mastitis debe ser estudiado para determinar el origen de la cepa, la forma de transmisión y el efecto de terapia preventiva y curativa. En el caso de SCN aislados de humanos tienen la capacidad para acumular resistencia a antibióticos, la cual puede ser transmisible a especies de *Staphylococcus* más agresivas (16, 17,18).

3 ETIOLOGÍA

Clásicamente se ha distinguido entre microorganismos patógenos mayores (primarios) y menores (secundarios), en función de la gravedad de las infecciones que ambos provocan, evaluada por la severidad de los signos e intensidad de la reacción inflamatoria. Así, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, enterobacterias, *Pseudomonas* y *Mycoplasma* han sido considerados como patógenos primarios y los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) hasta hace relativamente poco tiempo, como patógenos secundarios (19). Sin embargo, diversos estudios taxonómicos y resultados de infecciones experimentales con distintas cepas, han demostrado que a pesar de existir diferencias marcadas de patogenicidad, algunas especies de SCN inducen varios grados de respuesta inflamatoria, desde infecciones subclínicas hasta casos clínicos graves (1)

La asociación de los *Staphylococcus* con la medicina veterinaria coincide con el aislamiento por Nocard en 1887, de los agentes microbianos procedentes de

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

mastitis en ovejas. La relación que tienen los microorganismos del género *Staphylococcus* con la mastitis bovina, caprina y ovina ha sido estudiada por diversos investigadores y son varios los que consideran a los SCN como agentes capaces de desarrollar la infección mamaria, siendo menos conocido su mecanismo de virulencia pese al constante aislamiento en estos procesos clínicos (20, 21, 22).

3.1 *Staphylococcus* spp, RASGOS MICROBIOLÓGICOS Y CLASIFICACIÓN

Los primeros esquemas de clasificación de los *Staphylococcus*, categorizaban como coagulasa positivos exclusivamente a *S. aureus* y coagulasa negativos a *S. epidermidis* y *Micrococcus* spp. *S. aureus* era considerado como el único patógeno mayor del grupo, y se creía que los otros dos eran poco patógenos e incluso apatógenos. Posteriormente, se ha puesto de manifiesto la complejidad y diversidad de este género en la última edición del Manual de Bergey (18), ya que de dos especies contempladas inicialmente se ha pasado a las 27 de la actualidad, de las cuales *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. delphini* presentan el carácter positivo de la coagulasa y el resto son consideradas como coagulasa negativas. De estas últimas, al menos 14 especies de SCN. han sido aisladas en mastitis de los rumiantes (23, 10, 24).

Los rasgos microbiológicos más sobresalientes de este género son: morfología cocácea de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, agrupándose en pares, tetradas y en la forma más característica de racimos. Son gram positivos, no móviles. Son anaerobios facultativos, catalasa positivos, la mayoría de las cepas crecen en concentraciones de 10% de NaCl y a temperaturas de 18 a 40 C.

Los *Staphylococcus* pertenecen a la familia *Micrococcaceae* que reúne cuatro géneros: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus* (18). El género *Staphylococcus* puede ser subdividido al menos en cuatro grupos de especies con base en su relación de DNA y características fenotípicas: el grupo de *S. epidermidis* está compuesto de las especies, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. saccharolyticus*. Otro grupo es el de *S.*

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

saprophyticus que está compuesto de esa especie, *S. cohnii* y *S. xylosus*. El grupo de *S. simulans* está compuesto por esta especie y *S. carnosus*. El grupo de *S. sciuri* consta de *S. sciuri* y *S. lentus*. Las otras especies *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. caseolyticus* no pueden ser fácilmente acomodadas en otro grupo y además son muy diferentes entre sí, para formar otro grupo (18,25).

Las especies de *Staphylococcus* son fermentativas, con producción de pigmentos carotenoides, que pueden estar presentes en muchas especies. Los carbohidratos y los aminoácidos son utilizados como fuente de energía y de carbono. Una variedad de carbohidratos pueden ser utilizados aeróbicamente con la producción de ácido.

Los requerimientos nutricionales son variables, la mayoría de las especies requieren un origen orgánico de nitrógeno. Algunas especies son resistentes a novobiocina, mientras otras son típicamente susceptibles. Poseen la enzima catalasa, menaquinonas insaturadas, citocromos a y b, L-lisina como diaminoácido, en el peptidoglicano de la pared. El género *Staphylococcus* se distingue por poseer en la pared ácidos teicoicos, y menor cantidad de glicina en el peptidoglicano, lo que los hace sensibles a lisostafina, ya que ésta rompe las uniones glicil-glicina del peptidoglicano. El contenido en G + C del ADN es bajo (30-31%) (18).

3.2 ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS

La patogenicidad de los SCN no se ha estudiado con amplitud en medicina veterinaria pero se tienen ya conocimientos acerca de su virulencia en algunos casos de mastitis ovina. Es importante mencionar que el término coagulasa negativo en *Staphylococcus* de origen animal y de humano no es idéntico, ya que las cepas de un origen u otro se comportan de diferente modo, lo cual se manifiesta en la fagotipificación, caracterización bioquímica y virulencia. Así, la

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

patogenicidad de los SCN se ha discutido en relación con la mastitis bovina, considerándolos en algunos casos como causantes naturales de la inflamación clínica y subclínica de la ubre (26, 27).

No todas las especies de SCN son tomadas en cuenta en su relación etiológica con las mastitis con el mismo interés por parte de los diferentes investigadores que han trabajado sobre este tema, algunos trabajos muestran una exclusiva preferencia por *S. hyicus*, por *S. chromogenes* o *S. sciuri* en mastitis de cabras. A continuación se describirán algunas especies de mayor frecuencia epidemiológica.

S. epidermidis. Algunas cepas producen envoltura mucoide, esta producción es variable entre cepas y puede ser influenciada por la composición del medio de crecimiento, las colonias pueden ser lisas, circulares, brillantes y pueden medir de 2.5 a 6 mm de diámetro, algunas cepas que producen esta envoltura son viscosas. Generalmente no es detectado ningún pigmento, la mayoría de las cepas producen colonias que son de color gris o blanco, la fosfatasa alcalina es producida por la mayoría de las cepas. El habitat más común de *S. epidermidis* es la piel humana, aunque también se encuentra en otras especies animales, particularmente los que viven en asociación con el hombre. Este microorganismo es ahora reconocido como un patógeno oportunista, el cual puede colonizar artefactos médicos como válvulas o prótesis (28).

S. warneri. Las colonias miden 3 a 6 mm. son colonias lisas. usualmente con un centro ligeramente elevado, algunas son traslúcidas u opacas, pueden llegar a ser brillantes. La producción de pigmento es variable, sin embargo la mayoría de las cepas producen un color amarillo o amarillo-naranja, en algunas cepas de humanos, las colonias son grises o blancas con un puente amarillo. La producción de pigmento aumenta con la temperatura ya sea ambiente o de refrigeración, pero a menudo es genéticamente inestable y puede ser perdido en el subcultivo, se produce ácido aeróbicamente a partir de fructosa, sucrosa, trehalosa y glicerol. La mayoría de las cepas producen ácido de manitol y maltosa. Presentan una fuerte

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

actividad β -glucosidasa y algunas cepas muestran actividad β -glucuronidasa. Las hemolisinas pueden ser producidas, pero su actividad es débil. *S. warneri* puede estar asociado con una variedad de infecciones en humanos, tales como septicemias, endocarditis, conjuntivitis e infecciones urinarias (29, 30).

S. haemolyticus, las colonias son lisas, ligeramente convexas, circulares y opacas, pueden ser colonias grandes de 5-9 mm de diámetro. La producción de pigmento es variable, sin embargo muchas cepas producen colonias que no son pigmentadas (grises o blancas) o tienen un ligero color amarillo, el cual se incrementa con el paso del tiempo, son urea negativa, muchas cepas muestran fuerte actividad β -glucosidasa y/o β -glucuronidasa. La actividad hemolítica es usualmente moderada a fuerte, detectable en 48-72 h en agar sangre.

S. hominis. Las colonias son lisas y algunas de textura butirosa, circulares, opacas, las colonias pueden tener un tamaño de 3- 5 mm de diámetro. El pigmento es variable, muchas cepas producen colonias con un amplio centro amarillo o amarillo naranja y dos o hasta más anillos concéntricos claros y oscuros. Las cepas no pigmentadas son relativamente poco comunes. No pueden ser conservados en medios convencionales a temperatura de refrigeración, ya que no permanecen viables por más de un mes.

S. saprophyticus, las colonias son convexas, circulares, lisas y usualmente opacas, pueden tener un tamaño de 5 a 9 mm de diámetro, la mayoría de las cepas no son pigmentadas o son ligeramente de tonos amarillos, este pigmento se puede incrementar con el paso del tiempo; también existen colonias de color naranja. Esta especie es aislada frecuentemente de la piel de humanos y de otros mamíferos (31).

S. cohnii. Las colonias son convexas, ligeramente umbilicales, lisas y opacas, pueden llegar a medir de 4 - 7 mm de diámetro, las colonias son usualmente de color blanco.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

S. xylosus. La morfología de sus colonias es muy variable e incluye formas no observadas en otras especies, las colonias son elevadas, ligeramente convexas, pueden ser lisas o rugosas, opacas y pueden llegar a medir de 4 - 10 mm de diámetro, su color puede ser amarillo o amarillo-naranja, grises, blancas. Algunas cepas fermentan la glucosa débilmente y algunas son clasificadas como *Micrococcus* con base a la prueba de oxidación-fermentación. Muchas cepas tienen fuerte actividad β -glucosidasa, β -glucoronidasa y β -galactosidasa, las cuales le diferencian de *S. saprophyticus* y *S. cohnii*. Estudios de hibridación de DNA han indicado que cepas de *S. xylosus* de origen humano y de animales están muy relacionadas, mostrando hasta un 70% de homología (26. 32.)

4 PATOGENIA: ESTADIOS INICIALES DE LA INFECCIÓN

La infección de la glándula mamaria se produce como consecuencia del ingreso del microorganismo a través de la apertura natural y canal del pezón (19). La contaminación de la abertura del pezón, que puede suceder durante o entre ordeños, se ve favorecida por condiciones ambientales adversas, por ciertas características anatómicas de la ubre y de forma muy especial por lesiones, la mayor parte de las cuales se producen a consecuencia de una técnica y/o funcionamiento incorrecto del equipo de ordeño (8).

La penetración bacteriana puede facilitarse por la lesión del pezón o por contaminación de la apertura natural del pezón, bien por las manos del ordeñador, o por el reflujo de leche contaminada, desde la glándula infectada hacia la glándula sana durante el ordeño mecánico (23). En otros casos, la infección de la glándula mamaria es posible por vía endógena como el caso de los *Mycoplasmas*. Esto también es factible en otras enfermedades sistémicas como brucelosis, salmonelosis y clamidiasis, en las que puede producirse la excreción de microorganismos por la leche, sin existir necesariamente un proceso de mastitis.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

Colonización del pezón . Una vez que la bacteria logra pasar por el canal del pezón, se enfrenta a varios mecanismos de defensa. Uno de ellos es el flujo de leche producido por el ordeño, mediante el cual se eliminan muchas bacterias, sin embargo, la capacidad de adherencia bacteriana a células del epitelio mamario antagoniza dicha eliminación (33).

4.1 ADHERENCIA BACTERIANA A SUPERFICIES

La adherencia bacteriana a superficies celulares o epiteliales es un evento inicial esencial en la patogénesis en las infecciones bacterianas, antes de que se lleve a cabo la colonización y producción de sustancias extracelulares, esto ha sido demostrado por estudios de inhibición competitiva usando adhesinas bacterianas purificadas, material receptor de la célula huésped. La inhibición de la adherencia por medio de anticuerpos contra adhesinas y la supresión de la adherencia con carbohidratos específicos han revelado la importancia de la adherencia como un prerequisite para la infección. En forma breve: Sin adherencia no se produce la infección (34).

La adherencia bacteriana es necesaria para resistir la eliminación de estos microorganismos por parte de los fluidos corporales como saliva u orina; una vez que los microorganismos se adhieren a la célula también pueden llegar a producir una liberación de toxinas a los receptores en la membrana celular.

Las lectinas son un grupo de adhesinas bacterianas localizadas en la superficie bacteriana que presentan cadenas laterales de carbohidratos enlazados a proteínas principalmente. Las moléculas receptoras de la célula huésped pueden ser también glicoproteínas o glucolípidos con sitios de reconocimiento. En muchas ocasiones las interacciones que se establecen entre el receptor y la adhesina bacteriana y células huésped pueden inhibirse específicamente por simples oligosacáridos; indicando con ello la participación de proteínas con capacidad de unión a carbohidratos, de origen no inmune.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Se ha sugerido que la hidrofobicidad de la superficie bacteriana interviene en la adherencia de las bacterias a los tejidos del hospedador (35, 36), proponiendo que las bacterias hidrofóbicas son más susceptibles a la fagocitosis que las hidrofílicas, ya que la fagocitosis se facilita cuando existen interacciones hidrofóbicas entre las bacterias y los neutrófilos. El comportamiento hidrofóbico de la bacteria parece ser atribuible a la presencia de proteínas en la superficie bacteriana, mientras que la presencia de un exopolisacárido se asocia a un comportamiento hidrofílico. De hecho se ha sugerido que esta característica puede ser un criterio para determinar la presencia de exopolisacáridos bacterianos en cepas de *S. aureus* obtenidos de mastitis bovina (37).

En el caso de la mastitis se ha considerado que los microorganismos implicados pueden adherirse a los ductos glandulares mamarios y alvéolos mediante la unión a proteínas basales de la membrana o a través de receptores de las células epiteliales, para posteriormente formar microcolonias rodeadas de exopolisacáridos (35).

Diversas especies y cepas bacterianas presentan distintos grados de adherencia al epitelio, dependiendo de una serie de factores como pH, temperatura y concentración bacteriana (34). Las bacterias pueden adherirse a proteínas extracelulares como fibronectina, colágeno, laminina, vitronectina y fibrinógeno.

4.2 MECANISMOS DE DEFENSA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La defensa de la glándula mamaria está mediada por una variedad de factores específicos e inespecíficos, los cuales pueden actuar individual o conjuntamente para proteger a la glándula frente a la infección. Para eliminar la infección en sus primeras etapas se supone el desarrollo de una respuesta inflamatoria en la glándula, con una llegada de proteínas séricas y de células inflamatorias, leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN). En caso de que la infección no sea controlada por estos fagocitos, el agente infectante persiste, produciéndose una inflamación crónica.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Los mecanismos de defensa mamarios pueden ser clasificados como independientes o dependientes de la inflamación. La primera categoría comprende los mecanismos intrínsecos que operan en la glándula mamaria sana: intervención de elementos solubles (lactoferrina, lisozima, sistema lactoperoxidasa/H₂O₂, complemento) y de células fagocitarias, especialmente macrófagos presentes en la leche en un número reducido. Los mecanismos dependientes de la inflamación incluye fundamentalmente la fagocitosis mediada por leucocitos PMN (34).

Una vez que la bacteria ha conseguido penetrar, para llegar a establecerse en el tejido mamario deberá resistir la acción de los factores bactericidas del canal del pezón y de la leche, incluyendo la lisozima, y no ser eliminada junto al flujo lácteo durante el ordeño y/o el amamantamiento y eludir la fagocitosis mediada por macrófagos y neutrófilos. Posteriormente tras atravesar esta barrera, los microorganismos deben enfrentarse al sistema inmune en sus variantes humoral y celular. En la fase aguda de la inflamación los PMN migran desde los capilares hasta el sistema ductular mamario, incrementando el recuento de células somáticas característico de la mastitis.

Estudios realizados en la glándula mamaria bovina han mostrado que la migración de los PMN desde los capilares hasta las cavidades de la glándula se realizan en varias fases. Con posterioridad a los cambios vasculares primarios, los PMN migran desde los capilares y vénulas, acumulándose en el tejido conectivo subepitelial. Cuando atraviesan el epitelio ductular, los PMN pasan primero entre las células basales para acceder a la capa de células lumbinales y para posteriormente atravesar el epitelio de los alvéolos. Para esta migración intervienen mediadores que estimulan y dirigen a los PMN, éstos se acumulan entonces en las superficies lumbinales y se adhieren unos a otros o al epitelio durante algún tiempo, antes de pasar a la leche.

La deficiencia, la ausencia o el retraso en la respuesta inflamatoria permiten la manifestación de los mecanismos de virulencia bacteriana: adherencia y

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

producción de toxinas dentro de la glándula y posiblemente formación de exopolisacáridos, lo cual puede tener graves consecuencias, entre las más graves, la aparición de gangrena y necrosis (33).

En el caso de *S. aureus* se ha visto que el material capsular es importante en la virulencia ya que los microorganismos encapsulados resisten la opsonización del suero normal. La expresión de un material de superficie antifagocítico inducido por la multiplicación del microorganismo en el lumen de la glándula mamaria pone en ventaja a las cepas de origen mastítico, ya que se ha observado que resisten la fagocitosis de PMN cuando crecen en presencia de leche (37).

Sin embargo, los patógenos que invaden la ubre y causan mastitis rara vez son invasivos, aunque en la mastitis estafilocócica grave, el epitelio mamario llega a erosionarse casi totalmente. La rapidez en la migración leucocitaria es esencial para una respuesta eficaz que controle la proliferación bacteriana de *S. aureus* y *E. coli*. De acuerdo con varios autores, la mayoría de las especies bacterianas aisladas de casos de mastitis bovina son eliminadas fácilmente de la glándula cuando la concentración leucocitaria supera el valor de 10^6 células/ml.

Un importante componente en la defensa de las superficies epiteliales es la aglutinación bacteriana por anticuerpos específicos, la cual previene la colonización de los epitelios, facilitándose de este modo la eliminación de los microorganismos. Esto es importante en mastitis donde la posibilidad de eliminación bacteriana durante los ordeños es grande (35).

La concentración de inmunoglobulinas en la leche normal es baja (1 mg/ml); sin embargo, cuando se altera la permeabilidad vascular por el proceso inflamatorio o en las secreciones colostrales, la concentración puede alcanzar tasas más elevadas (80 mg/ml). Entre los diferentes isotipos (IgG₁, IgG₂, IgM e IgA), la IgG₁ es la que juega un papel primordial, siendo transferida selectivamente desde la sangre, la IgG₂ va íntimamente ligada a los neutrófilos transferidos durante la inflamación. Los otros isotipos son sintetizados localmente por las células plasmáticas. De ellas la IgA no opsoniza las bacterias, pero previene la

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

adherencia de las mismas al epitelio secretor, neutraliza las toxinas y aglutina las bacterias (8).

4.3 FACTORES Y MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *Staphylococcus spp*

Se ha demostrado muchas veces que los cultivos *in vitro* no permiten que los *Staphylococcus* expresen sus caracteres de virulencia del mismo modo que cuando actúan *in vivo*, siendo en estas últimas condiciones, más patógenos al elaborar componentes especialmente de superficie que *in vitro* no se consiguen. En estudios realizados por la presencia de envoltura mucoide se ha determinado como uno de los factores comunes en todas las cepas de SCN. Existe controversia en cuanto al papel en la virulencia que parece desempeñar esta envoltura tanto en la colonización de tejidos y superficies inertes como en catéteres y prótesis quirúrgicas; al igual que en su efecto antifagocitario al prevenir la opsonización, y disminuir el quimiotactismo de los polimorfonucleares. Además, se ha determinado que la presencia de esta envoltura inhibe el contacto con los antibióticos.

La persistencia de los SCN puede estar relacionada a la capacidad de los microorganismos a producir una sustancia extracelular o envoltura mucoide conocida como "slime", y a replicarse como colonias con una matriz protectora en superficies artificiales. La envoltura extracelular de los SCN es una sustancia compuesta por 40% de carbohidratos y 27% de proteína. Esta sustancia tiene un efecto adverso en la defensa del huésped ya que la quimiotaxis y la respuesta oxidativa de los fagocitos son inhibidas. Esta envoltura mucoide es un compuesto que puede reconocerse con facilidad por su afinidad a ciertos colorantes.

Se ha llegado a pensar que la adherencia es un fenómeno de carácter específico, algunos de estos microorganismos han sido capaces de adherirse también a materiales inertes (28).

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

Se ha observado que *S. aureus* está adherido al epitelio mamario de animales infectados experimentalmente y a células epiteliales de la glándula de animales infectados de forma natural (34).

Aunque hasta el momento no se ha podido evidenciar la existencia de receptores específicos en las células epiteliales, sí se han identificado dos proteínas de la pared bacteriana de *S. aureus* que actúan como adhesinas. Una de ellas con un peso molecular de 116 Kda, se une a células epiteliales y es reconocida por anticuerpos específicos hacia la proteína de unión a fibronectina de *S. aureus* (cepa Newman). La otra proteína es de peso molecular 145 Kda, no reacciona con dichos anticuerpos y además es capaz de unirse a células epiteliales, a membranas de glóbulos grasos y a eritrocitos, en este caso produciendo hemaglutinación. Esta unión se inhibe al tratar previamente las células o membranas con agentes degradantes de carbohidratos, por lo que se piensa que su receptor tiene un componente de esta naturaleza (38). Así mismo, algunas cepas de *S. aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos* y de *Streptococcus* poseen receptores específicos para determinadas proteínas que se encuentran en la membrana basal como son la fibronectina, la laminina, el colágeno y la vitronectina.

Los SCN son capaces de sintetizar más de diez proteínas extracelulares como posibles factores de virulencia, pudiendo desempeñar una acción específica o inespecífica sobre el hospedador, entre estos se encuentran: La producción de "slime", adherencia sobre superficies inertes, factor de aglutinación, proteína A, hemólisis, dermatoxina, lisozima, hialuronidasa, fibrinolisisina, DNAsa, fosfatasa, ureasa, gelatinasa, caseinasa, lipasa (27, 39, 40, 41).

5 DIAGNÓSTICO DE MASTITIS

Para detectar la presencia de la mastitis en las vacas individuales o en el hato, pueden hacerse varias pruebas ya sea a nivel de laboratorio o de establo. Se puede realizar un examen físico en la vaca, después del ordeño, la prueba de

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

pañó negro, en la que se utilizan los primeros chorros de leche usando una taza especial de prueba.

En el diagnóstico de mastitis es conveniente referirse a las células somáticas, las que son definidas como leucocitos, junto con un menor número de células epiteliales del tejido glandular. La proporción de leucocitos y células epiteliales varía de acuerdo al tipo de infección, pero como regla los leucocitos constituyen el 98 al 99% del total. Los leucocitos se encuentran presentes en grandes cantidades en respuesta a una herida o a una infección (42).

5.1 MÉTODO DIRECTO: DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

La siembra de un inóculo mínimo (20 μ l) y estandarizado permite la cuantificación de la excreción bacteriana y asegura el aislamiento del agente patógeno, siempre que su tasa de eliminación sea superior a 250 bacterias/ml (5 colonias idénticas). Para determinados microorganismos como *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*, se ha sugerido valorar la presencia de una única colonia, lo que supone aumentar la sensibilidad de la técnica de aislamiento a 50 bacterias/ml. Por otra parte, inóculos superiores a 100 μ l incrementarían su sensibilidad, aunque con el peligro de proporcionar falsos positivos por microorganismos contaminantes.

Para los SCN, se puede emplear la morfología colonial propia de cada especie, como criterio de identificación en cultivos recientes. Las colonias de *S. epidermidis*, son de pequeño tamaño observándose habitualmente una ligera β -hemólisis, mientras que las colonias aisladas, son más grandes, brillantes, lisas y en ellas no se aprecia la hemólisis con facilidad. *S. simulans* no tiene unos rasgos muy típicos, forma colonias blancas, lisas, con un tamaño algo superior a la mayoría de los SCN. En las cepas de *S. chromogenes*, el principal atributo es la pigmentación, que va desde amarillo pálido hasta el amarillo anaranjado. Las colonias de *S. xylosus* tienen morfología variable, pueden ser blanquecinas o amarillentas, lisas u onduladas, circulares o estrelladas, de tamaño también

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

variable, siendo los cultivos normalmente poco densos. En general las cepas de SCN muestran un tamaño colonial menor que las de *S. aureus*. Su identificación resulta bastante más laboriosa, siendo necesario para ello combinar varias pruebas de laboratorio. En ocasiones es necesario recurrir a algunos micrométodos comerciales que proporcionan resultados satisfactorios. Estos sistemas han mejorado su rendimiento, ampliando considerablemente sus bases de datos, sobre todo a partir de cepas de origen animal (18).

La diferenciación del género *Staphylococcus* con el *Micrococcus* se realiza por la capacidad fermentativa de los *Staphylococcus* a diferencia del otro género que es oxidativo. La detección de coagulasa es importante en la rutina de identificación de *Staphylococcus*; esta prueba debe realizarse bajo condiciones estandarizadas. La prueba en tubo es la recomendada por el Subcomité de Taxonomía de *Staphylococcus* y *Micrococcus*. La prueba en tubo es recomendada para la detección de coagulasa libre y otra prueba usada es la de porta objetos que detecta la coagulasa unida a la pared celular, esta última es una prueba tamiz y la prueba confirmatoria es la de tubo. El plasma de diversas especies puede ser usado para la prueba, pero el plasma de conejo es el más recomendado para cepas de origen humano y de animales. El plasma obtenido con EDTA es superior a los plasmas citratados.

La identificación de las diferentes especies de *Staphylococcus* se realiza con base a las características fenotípicas, incluyendo composición de pared celular, morfología de colonias, actividad de varias enzimas, producción de ácido a partir de varios carbohidratos, resistencia a ciertos antibióticos (43).

Dentro de los *Staphylococcus* se pueden considerar dos grandes grupos en función de la enzima coagulasa: Las especies coagulasa positivas (SCP) y negativas (SCN). En el caso de las SCP, ayudan a la identificación su morfología colonial característica, la producción de pigmentos blanquecinos o amarillentos y la presentación de β -hemólisis. La detección de proteína A, componente de la pared celular bacteriana, que posee afinidad específica hacia la fracción Fc de las

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

IgG presente en el 95% de las cepas de *S. aureus*, junto con la determinación de la presencia de coagulasa ligada, también conocida como factor de agregación, mediante pruebas de aglutinación en portaobjetos, empujando partículas de látex sensibilizados con plasma humano (fibrinógeno e IgG) permite la identificación rápida de los SCP.

5.2 DIAGNÓSTICO INDIRECTO: CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Una prueba de diagnóstico muy utilizada es el estudio de la concentración de células somáticas en leche, la que se fundamenta en el hecho de que la concentración de células en la leche se eleva marcadamente al comienzo de la enfermedad particularmente en la fase inflamatoria, debido al paso de leucocitos de la sangre a la glándula mamaria y llega a alcanzar varios millones por mililitro de leche (44).

El conteo de células somáticas en la leche es ampliamente utilizado para identificar aquellas vacas que pueden estar infectadas y para estimar el grado de mastitis en un hato. La leche de vacas normales o sin infecciones generalmente tienen cuentas de células somáticas en el rango de 50,000 a 200,000 cel/ml. Cuando estas cuentas exceden las 200,000 cel/ml las probabilidades de infección son mayores (42, 45).

Los valores de conteo celular somático presentan gran variación, lo que hace necesario tener cautela para juzgar como enferma o sana una vaca. El conteo celular individual está influido por el manejo y el estado fisiológico, así como por el tipo de microorganismo que produce la infección, pudiendo incluso observarse variaciones en los niveles normales de células somáticas entre vacas no infectadas.

Es necesario tener en cuenta que hay muchos tipos de células que están involucrados en la cuenta de células somáticas. Los macrófagos tienen un papel fisiológico en la eliminación de detritus, células y materias extrañas en la glándula

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

mamaria, por lo que su presencia puede considerarse como normal. Cuando hay una infección en la ubre, se produce como consecuencia de ello un incremento de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) fagocíticos, que migran desde la sangre durante la fase inflamatoria, incrementando con ello la cuenta celular somática, otras células implicadas son las epiteliales degeneradas.

Para la determinación del número de células somáticas, entre los métodos indirectos destacan:

- Prueba de California (CMT), basada en la aglutinación del material nucleico de las células presentes en la leche. Debido a su fácil aplicación en pruebas de campo, se halla ampliamente difundida entre los ganaderos.
- Prueba de Wisconsin, que es una prueba cuantitativa y da rangos de cuentas celulares, sigue el mismo principio de la prueba de California. Es una técnica que puede aplicarse tanto en campo como en laboratorio (42).
- El uso de contadores electrónicos y computarizados de células hace posible la cuenta de células somáticas en leche.
- Otro método para detectar la mastitis es la conductividad eléctrica, pero tiene una aplicación muy limitada en los hatos. Este método consiste en detectar diferentes niveles de concentración de sal que ocurre entre las glándulas mamarias infectadas y las sanas de la misma vaca. La presencia de bacterias infecciosas aumentan el sodio y cloro en la leche mientras disminuyen los iones de calcio y lactosa.

6 CONTROL DE MASTITIS

El control de la mastitis comprende dos grandes áreas: profilaxis sanitaria y tratamiento, esto consiste en la eliminación de animales con lesiones crónicas, desinfección post-ordeño, tratamiento con antibiótico al final de la lactación y tratamiento eficaz de la mastitis clínica.

Profilaxis sanitaria durante el ordeño: es aconsejable realizar un lavado de pezones con antisépticos que tengan eficacia para controlar los microorganismos

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

ambientales, alternando los productos mensualmente. Se puede realizar la inmersión del pezón o preferentemente por pulverización, siempre que se tenga la precaución de que el aerosol tenga contacto con la extremidad del pezón, esta medida es básica en los hatos de alta prevalencia, ya que limita eficazmente la transmisión de infecciones por patógenos ligados a los animales infectados; además de estas medidas profilácticas es aconsejable la estimulación de los mecanismos inmunitarios: esto se logra a través de la vacunación y en menor medida de otras estrategias (inserción de un dispositivo intramamario DIM), diferentes sustancias como selenio, vitamina E, levamisol.

El tratamiento al finalizar la lactación de la vaca con quimioterapéuticos tiene como fin la curación de la mastitis aparecida durante la lactación (en especial las de tipo subclínico), así como la protección de la glándula mamaria durante las primeras semanas del período seco. Este tipo de tratamiento ha dado buenos resultados con los SCN, una eficacia del 100% para ellos y de un 75% para *S. aureus* (46, 47).

En el control de las mastitis deben considerarse también medidas generales de higiene y manejo: el mantenimiento de una higiene razonable en torno de los animales, sobre todo de las camas en la época de partos, puede contribuir a evitar casos clínicos. Se debe evitar el sobreordeño y la retirada de pezones se efectuará cortando previamente el vacío.

Limpieza y desinfección de la instalación de ordeño. Se efectuará con un sistema y productos de limpieza y desinfección adecuados.

Se recomiendan los diagnósticos periódicos mediante pruebas como las de California o de Wisconsin.

La relación óptima vaca-máquina de ordeño es aquella en la que se consigue: un vaciado lo más completo de la ubre, una mínima incidencia de la caída de pezoneras y la no alteración del estado sanitario de la ubre.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

7 MASTITIS POR *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVOS EN MEXICO

En los estudios realizados de frecuencia de mastitis en México, se ha observado que los SCN han incrementado su incidencia. Sin embargo, existen pocos estudios directamente relacionados a los SCN. En uno realizado con 150 muestras de leche bovina, con cuentas celulares de más de $2,500 \times 10^3$ Cel/ml, de vacas de los estados de México e Hidalgo, se aislaron 49 cepas de *Staphylococcus spp*, de las cuales 25 fueron *Staphylococcus aureus* y el resto coagulasa negativos. A la prueba de susceptibilidad a los antibióticos los SCN y *Staphylococcus aureus* mostraron resistencia a la estreptomina, penicilina, ampicilina y kanamicina (48).

HIPÓTESIS

- 1- Existen diferentes especies de SCN capaces de producir mastitis en vacas lecheras
- 2- Existen factores, tanto de manejo en los establos, como de características de las vacas, que influyen en la presencia de mastitis ocasionada por SCN en hatos lecheros.
- 3- Los aislamientos de SCN muestran diferentes grados de adherencia a células epiteliales ductulares de glándula mamaria *in vitro*.
- 4- Los aislamientos de SCN tienen capacidad de adherirse a superficies plásticas y esta capacidad es un índice indirecto de adherencia a células epiteliales ductulares de glándula mamaria *in vitro*.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar la frecuencia de mastitis clínica y subclínica, causada por SCN en diez establos lecheros localizados en los Edos. de Hidalgo y México.
- 2.- Determinar las especies de SCN aislados de leche de vacas de estos establos.
- 3.- Identificar los factores de riesgo involucrados en las mastitis causadas por SCN, enfocados a manejo del ordeño, número de parto, días en leche y producción de leche.
- 4.- Conocer el grado de adherencia de los diferentes aislamientos de SCN a células epiteliales ductulares de glándula mamaria bovina.
- 5.- Determinar si existe adherencia de los SCN a material plástico.

MATERIAL Y MÉTODOS

MARCO MUESTRAL

Estuvo constituido por los registros de diez explotaciones ubicadas en los Estados de Hidalgo, (Tizayuca, Atitalaquia, Pachuca y Actopan) y de México (Chalco, Texcoco, Tequixquiac y Zumpango), de donde se obtuvo el total de vacas en producción.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Vacas Holstein en producción provenientes de establos con diferentes rutinas de manejo calificados de 6 al 10 de acuerdo con: higiene en la sala de ordeño, estado del equipo de ordeño, tipo de camas, aplicación de programa de control de mastitis, sobreordeño, entrada de vacío y resbalado de pezoneras; estratificados de acuerdo con el número de vacas en producción (1: < 200 vacas, 2: 200-400, 3 > 400); ubicados en Hidalgo y Estado de México. Los propietarios mostraron buena voluntad y dieron facilidades para llevar a cabo el trabajo.

METODOLOGÍA

Un mes antes del inicio del estudio en cada establo se realizó un muestreo general por medio de la prueba de Wisconsin modificada, para conocer la prevalencia de mastitis y considerarla al calcular el tamaño de la muestra. Para obtener la información epidemiológica de cada rancho, un médico veterinario aplicó el cuestionario mostrado en el anexo 1.

Se incluyeron vacas sanas y con mastitis, independientemente del número de parto, etapa de lactación y producción.

La unidad de muestreo lo constituyó una vaca, a la que se tomó una muestra de leche de cada glándula mamaria. Así mismo la unidad de análisis fue una vaca.

Se realizaron tres muestreos por conveniencia en los diez establos de estudio

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

- 1.- San Epigmenio, localizado en Zumpango, Méx., con 570 vacas en producción, y 8% de mastitis subclínica.
- 2.- Granja Ray, localizado en Zumpango, Mex., con 300 vacas en producción y 19% de mastitis subclínica
- 3.- San Sebastián, localizado en Tequixquiac, Mex., con 800 vacas en producción y 11% de mastitis subclínica.
- 4.- Establo 148, localizado en Tizayuca, Hgo., con 160 vacas en producción y 9% de mastitis subclínica.
- 5.- El Olimpo, localizado en Atitalaquia, Hgo., con 300 vacas en producción y 12% de mastitis subclínica.
- 6.- Establo México, localizado en Texcoco, Mex., con 360 vacas en producción y 19% de mastitis subclínica.
- 7.- El Cupido, localizado en Chalco, Mex., con 480 vacas en producción y 16% de mastitis subclínica.
- 8.- Sta. Clara, localizado en Pachuca. Hgo., con 360 vacas en producción y 20% de mastitis subclínica.
- 9.- La Quinta, localizado en Actopan, Hgo., con 800 vacas en producción y 9% de mastitis subclínica.
- 10.- Establo 147, localizado en Tizayuca, Hgo., con 150 vacas en producción y 20% de mastitis subclínica.

DISEÑO EXPERIMENTAL

De acuerdo a la clasificación de Méndez y Col., este estudio es observacional, longitudinal, comparativo.

Se realizó un muestreo estratificado y sistemático (49). Los estratos se clasificaron con base en el número de animales de cada hato: estrato 1)

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

clasificado con <200 vacas, estrato 2) entre 200-400 vacas, estrato 3) > 400 vacas. El muestreo dentro del establo fue sistemático con arranque al azar, esto es, se seleccionó cada X número de animales dependiendo del tamaño del hato. Así todos los animales de la población de estudio tuvieron la misma probabilidad de participar.

Para calcular el tamaño de muestra y la asignación de "n" a cada rancho se usaron las siguientes ecuaciones.

$$n = \frac{\left(\sum_{i=1}^L N_i \sqrt{\hat{p}_i \hat{q}_i} \right)^2}{N^2 D + \sum_{i=1}^L N_i \hat{p}_i \hat{q}_i} \quad D = \frac{B^2}{4}$$

Donde:

N_i es el tamaño de la población de cada uno de los estratos $i = 1, 2, 3$.

\hat{p}_i es la prevalencia de mastitis en el i -ésimo estrato (Prevalencia de mastitis en el estrato 10%, estrato 2 prevalencia de 18%, estrato 3 prevalencia de 13%)

$$\hat{q}_i = (1 - \hat{p}_i)$$

B es el error de estimación fijado en 3%

Asignación proporcional:

$$n_i = n \left(\frac{N_i}{N} \right) \quad i = 1, 2, 3 \quad \text{Donde}$$

n_i es el tamaño de muestra asignado al i -ésimo hato.

n es el tamaño de muestra obtenido con la ecuación anterior.

N_i es el tamaño de la población del i -ésimo estrato.

N total de la población

El nivel de confianza utilizado fue del 95%.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

El número de muestras calculadas se encuentra en el cuadro 1

Cuadro 1. Número de muestras de cada establo según la n calculada

Estrato	Establo	N determinada por asignación proporcional	Total de los tres muestreos	Prevalencia de mastitis (%)	N Vacas en producción
1	Tizayuca 148	12	26	9	160
	Tizayuca 147	13	34	20	150
Total del estrato		25	60		
2	Olimpo	30	91	12	300
	Sta. Clara	35	114	20	360
	Establo México	35	103	19	360
	Granja Ray	30	90	19	300
Total del estrato		130	398		
3	Quinta	69	181	9	800
	San Sebastián	69	190	11	800
	Cupido	41	121	16	480
	San Epigmenio	49	157	8	570
Total del estrato		228	649		
TOTAL		383	1107		4280

Estrato 1 (hatos con < 200 vacas en producción), estrato 2 (hatos con 200-400 vacas), estrato 3 (>400 vacas)

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se realizaron tres muestreos en cada rancho (ver anexo 2), el muestreo de los animales se realizó con base en el tamaño determinado de muestra, pero en algunos casos debido al manejo de cada establo, se eliminaron algunos animales debido a que no se contaban con los datos completos para el estudio epidemiológico, por lo que el número final de muestras tomadas fue: en el caso del estrato 1, 60 muestras, estrato 2 se estudiaron 398 y finalmente en el estrato 3 el

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

tamaño fue de 649 siendo el total de la población estudiada 1,107 vacas (Cuadro 1).

ELABORACIÓN Y APLICACIÓN DEL CUESTIONARIO SOBRE MANEJO

Se elaboró un cuestionario para recabar la información epidemiológica requerida para identificar las variables asociadas a la presencia de mastitis y al aislamiento de SCN (anexo 1).

En el desarrollo del cuestionario se plantearon los objetivos para establecer las variables de interés del estudio, y se definió el personal a quien estaría dirigido; con el propósito de conseguir un claro planteamiento de las preguntas.

Este cuestionario contenía preguntas cerradas y abiertas sobre las diferentes variables que permitieran identificar o esbozar las posibles asociaciones con la existencia o no de mastitis, y con el aislamiento de *Staphylococcus coagulasa negativos*.

Este cuestionario permitió además recabar la información sobre los posibles factores de riesgo, incluyéndose las variables relacionadas con el manejo durante el ordeño (anexo 1).

El cuestionario fue aplicado siempre en entrevista por la misma persona al médico veterinario encargado del control de mastitis del establo, al momento de tomar las muestras de leche.

Se consideró necesario tener un sistema subjetivo de evaluación para tomarlo como base de relación con los resultados de este trabajo, los criterios y las calificaciones se explican a continuación.

Se dio una calificación del 6 al 10 según los siguientes criterios:

Calificación 10. Establos con buena higiene en la sala de ordeño. Uso de toallas de papel o jerga única para secar las glándulas mamarias. Ubres limpias y sin pelo. Equipo de ordeño en buen estado. No hay sobreordeño. Existe cambio de

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

pezoneras según las necesidades. Ausencia de entradas de vacío en las pezoneras y sin resbalado de ellas durante la ordeña, uso de antisépticos. Camas secas y de arena o tierra. Programa de control de mastitis bien aplicado en el establo.

Calificación 9. Buena higiene en sala de ordeño. Ubres parcialmente limpias y sin pelo. Equipo de ordeño en estado regular. No hay sobreordeño. Existe cambio de pezoneras según las necesidades. Existen entradas de vacío y resbalado de algunas pezoneras. Uso de antisépticos. Camas de bagazo de caña y tierra, secas. Programa de control de mastitis bien aplicado.

Calificación 8. Higiene regular en sala de ordeño. Ubres mojadas y con pelo. Usan una jerga única para todos los animales. Equipo de ordeño en estado regular. Hay sobreordeño. Cambio no frecuente de pezoneras. Existen entradas de vacío y resbalado frecuente de pezoneras. Uso de selladores. Camas de estiércol seco o tierra pero un poco húmedas. Programa de control de mastitis regularmente aplicado en el establo.

Calificación 7. Higiene mala en sala de ordeño. Ubres mojadas y con pelo. Uso de una jerga única para todos los animales, pero sin lavado frecuente en desinfectante. Equipo de ordeño en estado regular. Hay sobreordeño. Cambio no frecuente de pezoneras. Existen entradas de vacío y resbalado de pezoneras. Uso de selladores. Camas de estiércol seco o tierra húmedas. Programa de control de mastitis mal llevado en el establo.

Calificación 6 Higiene mala en sala de ordeño. Ubres mojadas. No secan. Equipo de ordeño en mal estado. Se observó sobreordeño. No hay mantenimiento en pezoneras, entradas de vacío y resbalado de pezoneras. Uso de selladores. Camas de estiércol seco o tierra húmedas. Programa de control de mastitis no aplicado en su totalidad en el establo.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

PRUEBA MODIFICADA DE WISCONSIN

Se tomaron asépticamente muestras de leche de los cuatro cuartos en un solo frasco. La determinación de mastitis subclínica fue mediante la prueba modificada de Wisconsin, para la cual:

a) Se colocaron 3 ml de leche en los tubos especiales para esta prueba, se agregaron 3 ml de reactivo (usando el reactivo de California, diluido 1:1 con agua destilada, se taparon los tubos y posteriormente se movió la gradilla durante 10 seg, casi hasta la posición horizontal.

b) Se dejaron reposar los tubos durante 15 seg.

c) Se invirtió la gradilla en posición vertical y se dejó que saliera la mezcla durante 15 seg.

d) Se regresó la gradilla a la posición normal

e) Se realizó la lectura de los mililitros sobrantes y se interpretó de acuerdo a la siguiente tabla:

Mililitros	Células (X 1000)/ml
0 - 1.0	0 - 100
1.1 - 1.5	101 - 500
1.6 - 2.0	501 - 1000
2.1 - 2.5	1001 - 1700
2.6 - 3.0	1701 - 2500
> 3.0	> 2500

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LECHE

De cada animal seleccionado se tomaron muestras de los cuatro cuartos en condiciones de asepsia, los pezones se desinfectaron con etanol al 70% y se eliminaron los primeros chorros de leche. Las muestras fueron transportadas en refrigeración hasta el laboratorio de bacteriología del CENID- Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias SAGAR, en donde se realizaron los estudios correspondientes.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVOS

Las muestras se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron de 24 a 48 h a una temperatura de 37 °C. A las colonias desarrolladas se les realizó tinción de Gram, para observar su morfología y pureza. También fue observado el tipo de hemólisis que producían en gelosa sangre.

Se hizo una identificación preliminar por medio de la prueba de catalasa, utilizando unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre una colonia en un portaobjetos y así poder observar la formación de las burbujas indicadoras de la reacción.

Para diferenciar del género *Micrococcus* se realizó la prueba de oxidación/fermentación, ya que el género *Staphylococcus* produce fermentación y el *Micrococcus* oxidación.

Prueba de coagulasa. De un cultivo de 24 h en agar sangre se tomó una colonia y se suspendió en plasma de conejo, diluido 1:5 en solución salina fisiológica y se incubó a 37 °C. Se examinó después de 1, 2, 4, 8 y 24 h para observar la formación del coágulo. En cada prueba se incluyeron un testigo positivo de *S. aureus* y un testigo negativo.

La caracterización final de los aislamientos hasta género y especie, se logró mediante la detección de sistemas enzimáticos, utilizando un microsistema de identificación Uniscept 20 GP (Analytab products). Para la identificación de los *Staphylococcus* con este microsistema, se utilizó un cultivo de 18- 24 h de los diferentes aislamientos a identificar. Las colonias fueron suspendidas en solución salina fisiológica. Esta suspensión fue estandarizada al equivalente del tubo 0.5 de McFarland; a partir de éste se hizo una dilución 1/100 en solución salina. Este inóculo se uso dentro de 15 min después de su preparación. Se colocaron 100 µl del inóculo en cada microtubo de el Uniscept 20 GP y se cubrió la placa con plástico (para evitar la evaporación). Se hizo la lectura de las pruebas que contenía el sistema: fosfatasa, urea, β-glucosidasa, β-glucoronidasa, β-

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

galactosidasa, arilimidasa, hidrólisis de arginina, esculina-bilis y diferentes carbohidratos como: manosa, manitol, trehalosa, salicin, arabinosa, sorbosa, rafinosa, sorbitol y glicerol.

La identificación se realizó según las tablas numéricas del sistema. En los casos que no se podía identificar por este procedimiento, se usaron las tablas de identificación del Manual Bergey (19).

PRUEBA DE ADHERENCIA A CÉLULAS EPITELIALES DE GLÁNDULA MAMARIA BOVINA.

Obtención de células epiteliales:

Se obtuvo la glándula mamaria de bovinos sacrificados en el rastro de Tlalnepantla, inmediatamente al sacrificio. Se escogieron glándulas en buen estado y se transportaron en refrigeración hasta el laboratorio donde fueron lavadas con agua para quitar suciedad del pelo y de la piel. Posteriormente se empezó a cortar a partir del seno del pezón hasta llegar al pezón, se lavó varias veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 0.01M. Para la obtención de las células epiteliales se realizó un raspado del tejido epitelial empezando desde el seno lactífero hacia el canal de la glándula mamaria. Las células obtenidas se resuspendieron en 10 ml de PBS pH 7.4. Esta suspensión fue lavada tres veces, centrifugando a 2,500 rpm durante 10 min a 4 C. El paquete de células fue resuspendido con 3 ml del medio RPMI. Posteriormente se realizó un conteo de células en cámara de Neubauer para ajustarlas a una concentración de 1×10^6 .

***Staphylococcus coagulasa negativos*:**

Los SCN fueron sembrados en base de agar sangre durante 18 a 24 h a 37 C. A partir de este cultivo se realizó una suspensión bacteriana en PBS pH 7.4 y se estandarizaron con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland el cual corresponde a una concentración de 5×10^8 UFC.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Prueba de adherencia:

A 1 ml de las células ya ajustadas en medio RPMI, se le adicionaron 20 μ l de la suspensión bacteriana ajustada, se incubaron durante 60 min a 37 C y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS, centrifugando a 2700 rpm durante 10 min. A partir del paquete celular se tomaron 20 μ l que fueron depositados en portaobjetos nuevos y debidamente identificados. Una vez secos se les realizó la tinción de Gram y se observaron al microscopio para poder hacer el conteo de células y de bacterias adheridas a las células epiteliales. A cada aislamiento de SCN se le realizó la prueba de adherencia por triplicado. Examinando 50 células por observación con el objetivo 100X para determinar el porcentaje de células que presentaban bacterias adheridas, así como el número de bacterias adheridas por célula.

PRUEBA DE ADHERENCIA A MATERIAL PLÁSTICO

Se realizó según el método de Christensen (29), para lo cual se cultivaron las cepas de *Staphylococcus* en tubos de plástico que contenían caldo infusión cerebro corazón, se incubaron 18 h a 37 C, posteriormente se eliminó el contenido de los tubos y se adicionó una solución de safranina al 0.5%. la cual se dejó en contacto 30 min. Se eliminó el colorante y se lavó con agua destilada. La observación de una película roja adherida a la pared interna del tubo vacío se interpretó como positiva. En un resultado negativo el tubo permanece sin coloración.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO (ver anexos 1 y 2)

Variables de respuesta

Los animales positivos a la prueba de Wisconsin modificada y al aislamiento de *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Variables de control (posibles modificadores de efectos, ya sean de interacción y/o de confusión)

Tamaño del hato en número de animales

Ordeño

Tipo de ordeño que se realiza en el rancho

Existencia del programa de control de mastitis

Días en leche

ANÁLISIS UNIVARIADO

Los datos se analizaron de la siguiente manera:

1. Presencia de mastitis subclínica
2. Presencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos
3. Mastitis subclínica y clínica producida por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

El análisis se realizó a cada una de las variables de estudio por medio de frecuencia simple que permitió conocer la naturaleza y distribución de las variables en la población estudiada.

ANÁLISIS BIVARIADO

La cuantificación de la asociación se realizó con una razón de momios (RM) para cada una de las variables de estudio que mostraron asociación estadísticamente significativa en las tablas de frecuencia. La RM fue interpretada como factor de riesgo cuando presentó un valor mayor de uno. Cuando la RM es igual o menor a uno indica que no hay asociación.

CREACIÓN DE LA BASE DE DATOS Y CAPTURA DE LA INFORMACIÓN

Para crear la base de datos de los resultados de adherencia a células epiteliales de glándula mamaria se utilizó el programa de computadora Lotus 123 V24, una

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

vez capturada la información se efectuó el análisis con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) para PC.

Para crear la base de datos del estudio epidemiológico se utilizó el programa de computadora Excel. La estructura de la base de datos de mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos constó de 16 variables (anexo 2). Se capturó la información de 1107 observaciones. Una vez capturada toda la información, se transformó la base de datos a formato DBF con éste se efectuó el análisis estadístico (Anexo 2) usando el programa STATA (Statistics/Data Analysis) V2.1 DOS.

RESULTADOS

Prevalencia de mastitis clínica y subclínica: Factores ambientales y de individuo que intervienen en su presentación.

Del total de 1107 vacas que constituyeron el estudio, 37.76% (n=418) se clasificaron como sanas bajo los criterios de la prueba de Wisconsin modificada, 1.99% (n=22) se clasificaron como afectadas por mastitis clínica, en tanto 60.25% (n=667) estaban afectadas por mastitis subclínica (Cuadro 2). En el Cuadro 3 se observan los porcentajes de mastitis por establo.

De acuerdo a los estratos de población en que se ubicaban las explotaciones, el estrato uno, con población de menos de 200 animales, la prevalencia de mastitis subclínica fue del 73.3% (44/60). El estrato dos, con 200 a 400 animales, fue del 58.7% (234/298). El estrato 3, con más de 400 vacas, la prevalencia fue del 63.3% (411/649) (Cuadro 4). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos por medio de la prueba χ^2 ($p=0.0645$).

En cuanto al sistema subjetivo de evaluación creado en este estudio para calificar la higiene y el manejo de los establos para relacionarlo con la prevalencia de mastitis subclínica, se encontró que la prevalencia de mastitis varió del 49 al 90% y no correspondió con las calificaciones otorgadas. Llamó la atención que la mayor prevalencia encontrada se observó en establos calificados con 8, cuando lo esperado era que apareciese en los establos con menor calificación. Si quitásemos los establos de esta calificación sí habría correlación de menor prevalencia de mastitis con mejor higiene y manejo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los establos con diferente higiene y manejo $\chi^2(p=0.00)$ (Cuadro 5).

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

La prevalencia de mastitis subclínica en cada explotación, en relación con las calificaciones asignadas respecto al índice de higiene y manejo variaron en el intervalo de 41.7 a 91.7% (Cuadro 6).

Considerando el nivel de producción de leche en relación a prevalencia de mastitis subclínicas, las vacas con 1-15 litros presentaron el 74.71% (127/170) de mastitis, las de 16/30 litros un 62.04% (340/358), las de 31 a 45 litros un 57.68% (214/371), y las de producción mayor a 46 litros tuvieron una prevalencia de mastitis del 44.4% (8/18). Se observó mayor prevalencia de mastitis asociada a menor nivel de producción láctea (cuadro 7).

El Cuadro 8 presenta los resultados de la relación de presentación de mastitis y el número de días en leche. Se observó una mayor prevalencia conforme los días en producción aumentaban.

En relación al número de parto que habían tenido las vacas y la prevalencia de mastitis. Se observó mayor prevalencia conforme las vacas habían presentado mayor cantidad de partos (Cuadro 9).

Con respecto a la relación de higiene de la sala de ordeño con la prevalencia de mastitis subclínica. Las explotaciones con mala higiene presentaron 67.1% (147/219) de prevalencia. En el caso de las explotaciones con regular higiene fue del 64.5% (195/302). Los establos con buena higiene mostraron 59.2% (347/586) (Cuadro 10).

En cuanto al buen o mal estado en que se tenían las pezoneras. En las explotaciones con malas condiciones la prevalencia de mastitis fue del 66.6% (78/117), en tanto que donde estaban las pezoneras en buenas condiciones era de 61.7% (611/990). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos χ^2 ($p=0.2963$) (Cuadro 11).

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

En cuanto a la presentación de caída de pezoneras y prevalencia de mastitis, las vacas de las explotaciones donde las pezoneras caían frecuentemente tuvieron una prevalencia de mastitis del 58.1% (218/375), donde la caída era ocasional fue del 91.7% (111/121), y donde no se observó que caían fue del 58.9% (360/611). Se observaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de χ^2 entre los grupos (Cuadro 12).

Al revisar la presencia o no de sobreordeño, las explotaciones donde había mucho sobreordeño tenían una prevalencia de mastitis del 77.7% (244/314). Donde había regular presencia de sobreordeño era de 67.7% (124/183), en tanto donde no se observaba sobreordeño fue del 52.6% (321/610) (Cuadro 13).

En relación al estado de la cama, la prevalencia de mastitis en vacas manejadas con camas húmedas fue del 80.8% (181/224), en las de cama con regular humedad fue del 60.6% (276/455) y en las de cama seca del 54.2% (232/428). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos χ^2 ($p=0.023721$) (Cuadro 14).

Las vacas de explotaciones donde se utilizaba cama de arena tuvieron una prevalencia de mastitis del 41.7% (38/91), las que estaban en cama de bagazo de caña con una prevalencia de 91.7% (111/121), para las de tierra un 55.2% (63/114) y las de explotaciones donde se usaba estiércol seco fue de 61% (477/781). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0.0000$) (Cuadro 15).

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

En cuanto a los resultados del análisis bacteriológico, de las 1,107 muestras sembradas para bacteriología, 533 (48%) fueron cultivo positivo, tuvieron diferentes microorganismos como levaduras, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia coli*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Klebsiella* y *Staphylococcus coagulasa* positivos (SCP) y negativos (SCN). En el caso de los SCP, *S. intermedius* se aisló en 79% (n=15) de mastitis subclínica y 21% de vacas sanas. Los tres aislamientos de *S. aureus* fueron de casos de mastitis clínica, lo que representa el 100%.

Otros microorganismos aislados por estrato

En el estrato uno los principales géneros bacterianos aislados en estos hatos fueron *Streptococcus* y *Corynebacterium*; en este estrato 36 muestras fueron negativas al cultivo representando el 60% de muestras.

En el estrato dos, para las muestras positivas al cultivo se encontró 24% de *Streptococcus* y el 12% de *Corynebacterium*. Se aisló 2% de *Staphylococcus coagulasa* negativa (SCP) aislándose solamente *S. intermedius*.

En el estrato tres se aisló 3% de *Staphylococcus coagulasa* positivos (SCP) y de éstos el 84% fue *S. intermedius* y el resto *S. aureus*. Entre los géneros más frecuentemente aislados se encontró 15% de *Corynebacterium* y 9% de *Streptococcus spp.*

Resultados con relación al aislamiento de *Staphylococcus coagulasa* negativos.

En el Cuadro 16 se muestran las especies de SCN aislados en cada establo. *S. xylosus* se aisló en cinco de los 10 establos. En dos de los establos no se aisló SCN y en dos establos se encontró un porcentaje relativamente alto (37%).

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Del total de 1107 muestras, solamente en el 48.1% (533/1107) se logró aislamiento; de éstos únicamente el 22.1% (118/533) correspondieron a *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN).

Los aislamientos por especie de SCN fueron de *S. xylosus* 24.5% (29/118), *S. warneri* 11.8% (14/118), *S. saprophyticus* 11% (13/118) y *S. hominis* 10.1% (12/118). Los restantes *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. kloosi* y *S. cohnii* se aislaron en menos del 10% de las muestras (Cuadro 17).

En cuanto al aislamiento de SCN en vacas con o sin mastitis, *S. aureus* se aisló en el 100% (2/2) de las vacas con mastitis clínica, en el 20.2% (15/74) de las que padecían mastitis subclínica y en el 28.5% (12/42) de las vacas aparentemente sanas bajo la prueba de Wisconsin modificada. *S. warneri* se aisló en 9.4% (7/74) de las muestras de vacas con mastitis subclínica y en el 16.6% (7/42) de las vacas sanas, en tanto no se logró aislarlo de vacas con mastitis subclínica y del 16.6% (7/42) de vacas sanas; en este caso tampoco se logró aislarlo de vacas con mastitis clínica (Cuadro 18).

Al analizar la frecuencia de aislamientos de SCN de acuerdo a los estratos de población en que se clasificaron las explotaciones, en el estrato con menos de 200 vacas no se obtuvo ningún aislamiento, en el estrato con poblaciones de 201 a 400 vacas la frecuencia de aislamiento de SCN fue del 9.79% (39/398) y en el de poblaciones con más de 400 vacas la frecuencia fue del 12.17% (79/649). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0.0109$) (Cuadro 19).

En lo que respecta a las especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos aislados por estrato, en el estrato uno no se lograron aislamientos; en el estrato dos las mayores frecuencias correspondieron a *S. xylosus* 28.2%, *S. saprophyticus* 17.9%, *S. warneri* 15.3% y *S. epidermidis* 10.2%. En el estrato tres,

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

las mayores frecuencias fueron para *S. xylosus* 22.7%, *S. hominis*, *S. chromogenes* y *S. kloosi* con 11.3% (Cuadro 20).

Con base en la calificación otorgada a los establos mediante las calificaciones por higiene y manejo, del grupo calificado con 6 puntos, el 22.6% (12/53) de las muestras positivas fueron aislamientos de SCN. Del grupo con calificación de 7 puntos, se obtuvo 14% (7/50) de aislamientos positivos a SCN. De los establos con calificación de 8 se obtuvo 13.9 % (13/93). Los establos calificados con 9 un 25.8% (66/255), y para la calificación de 10 puntos un 24.3% (20/82) (Cuadro 21).

En relación al aislamiento de SCN en distintas condiciones de higiene en la sala de ordeño, se logró el aislamiento de SCN en 17.2% (19/110) de los aislamientos obtenidos en la categoría de mala higiene, en la de regular un 22.5% (35/155) y en la de buena higiene un 23.8%(Cuadro 22).

En cuanto al número de aislamientos de SCN a partir de vacas que tenían diferente número de parto, en las vacas con un parto se aisló en el 25.3% (40/158) de las muestras positivas, en las de 2 partos en un 24.1% (43/178), en las de 3 partos en un 19.2% (24/125), en las de 4 partos en un 15.9% (7/44) y en las de 5 o más partos en un 14.2% (4/28) (Cuadro 23).

En referencia a la producción de leche, en vacas con producciones menores a 15 litros al momento del muestreo se logró un 18.7% (18/96) de aislamientos de SCN; en las de 16-30 litros un 21.4% (56/261), en las de 31-45 litros un 23.8% (40/168) y en las de producciones por arriba de 45 litros fue de 50% (4/8) (Cuadro 24).

De acuerdo al número de días en leche, las vacas que tenían en ese momento menos de 60 días tuvieron un 25.2% (24/95) de aislamientos de SCN, las de 61 – 120 días un 19.2% (21/109), las de 121-180 un 19.3% (25/129), las de 181-240 días un 17% (14/82), las de 241-310 un 33.3% (19/57), las de 311-370 un 13.5%

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

(5/37), y las que tenían más de 371 días en lactación o producción tuvieron un 41.6% (10/24) aislamientos positivos a SCN. Se observaron diferencias estadísticamente positivas entre grupos χ^2 (p=0.01596) (Cuadro 25).

En cuanto a la presencia de sobreordeño y el aislamiento de SCN, la frecuencia de aislamientos de SCN en las vacas de explotaciones donde había mucho sobreordeño fue del 17.8% (32/179), donde había regular cantidad de sobreordeño fue de 12.6% (11/87), y donde no había se obtuvo un 28% (75/276) de aislamientos de SCN. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos χ^2 (p=0.00257) (Cuadro 26).

La frecuencia de aislamientos de SCN en cuanto a la presentación de caída de pezoneras frecuente, ocasional y nunca, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos χ^2 (p=0.51218), ubicándose esta frecuencia de aislamiento entre un 17.1% y 23.2% (Cuadro 27).

Con relación al material utilizado para la cama, en las de arena se obtuvieron 27.7% (10/36) aislamientos de SCN, para bagazo de caña un 17.1% (13/76), para tierra un 21.7% (10/46), y para cama de estiércol seco un 22.6% (85/375) de aislamientos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos χ^2 (p=0.6049) (Cuadro 28).

En lo referente a la humedad de la cama (húmeda, poco húmeda y seca), la frecuencia de aislamientos de SCN se ubicó en el intervalo del 19.3 al 23.8% sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre grupos χ^2 (p=0.63451) (Cuadro 29).

ANÁLISIS BIVARIADO. RAZONES DE MOMIOS DE LAS VARIABLES EN ASOCIACIÓN A MASTITIS SUBCLÍNICA.

Mastitis y calificación del rancho

El riesgo de tener animales positivos a mastitis subclínica para la variable del índice "calificación de higiene y manejo", los ranchos con calificación 6 tuvieron un riesgo estimado a través de la Razón de Momios (RM) de 2.18 en comparación con lo de calificación 10. Los de calificación 7 una R.M. de 2.4. En el caso de calificación 8 la RM fue de 10.3, y para los 9 una R.M. de 1.35

RM para nivel de producción y mastitis

La variable de referencia utilizada en este caso fue una producción de más de 45 litros, pensando que estos animales tenían menor riesgo de mastitis por la alta producción de leche. Existiendo una R.M. de 3.69 para vacas con producción menor a 15 litros, animales con producción entre 16 a 30 litros una R.M. de 2.04 y vacas con mayor producción de 31 a 45 litros R.M. de 1.7.

RM para días en leche y mastitis

Se utilizó como referencia menos de 60 días en leche. Los animales que estaban entre 61 a 120 días tuvieron una R.M. de 0.9, de 121 a 180 días una R.M. de 0.96, vacas entre 181 a 240 una R.M. 0.73 y vacas de más de 241 días a 310 una R.M. de 0.57 en el caso de vacas de más de 311 días se obtuvo una R.M. muy similar de 0.59.

Número de parto y mastitis

Para esta variable, se utilizó como categoría de referencia a vacas de primer parto. Las vacas de segundo parto tuvieron una R.M. de 1.49, las de tres partos una R.M. de 1.58, las de cuarto parto una R.M. de 1.59 y las de más de 5 partos una R.M. de 1.49.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

RM para higiene y mastitis

Buena higiene fue la variable de referencia. Una mala higiene obtuvo una R.M. de 1.41 y una regular higiene una R.M. de 1.26

RM para estado de las pezoneras y mastitis

Se considero como bueno la variable de referencia. Un mal estado de las pezoneras dio una R.M. de 1.24.

RM para caída de pezoneras y mastitis

La caída escasa de pezoneras fue la variable de referencia. Existiendo una RM de 0.97 para una caída frecuente y una R. M. de 7.74 cuando se presentaba regular.

RM para sobreordeño y mastitis

La existencia de sobreordeño si representó un riesgo mayor que en los casos que no existía; RM =3.14 para mucho sobreordeño y para regular RM=1.89.

Humedad de la cama y mastitis.

Para la variable estado de la cama, se utilizó como categoría de referencia a seca, resultando para camas húmedas una R.M. de 3.56 y para regular 1.3.

Material de la cama y mastitis.

Para la variable material de la cama y utilizando como referencia arena, las razones de momios fueron para cama de bagazo de caña una R.M. de 15.4, tierra con R.M. 1.72 y estiércol seco con R.M. de 2.1

Resumen de las razones de momios significativas al análisis bivariado para mastitis.

Estrato

Establos con menos de 200 animales vs. Establos con más de 400 vacas

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

	1.93	(1.01-3.70)
Calificación del establo		
6 comparados contra 10	2.18	(1.29-3.70)
7 comparados contra 10	2.40	(1.37-4.22)
8 comparados contra 10	10.37	(5.42-20.14)
Parto		
2 comparados contra 1	1.49	(1.09-2.04)
3 comparados contra 1	1.58	(1.12-2.23)
Producción de leche		
1 a 15 litros comparados contra 46-60	3.69	(1.24-11.09)
Caída de pezoneras		
A veces comparado contra Escaso	7.74	(3.84-16.04)
Frecuente comparado Escaso	0.97	(0.74-1.27)
Sobreordeño		
Mucho comparado contra No hay	3.14	(2.28-4.33)
Regular comparado contra No hay	1.89	(1.32-2.72)
Estado de la cama		
Húmeda comparado contra Seca	3.56	(2.38-5.32)
Material de la cama		
Bagazo de caña comparado contra Estiércol seco	15.48	(6.79-36.17)
Arena comparado contra Estiércol seco	2.19	(1.39-3.48)

Razones de momios en relación al aislamiento de *Staphylococcus coagulasa* negativos.

En este caso no se encontró ninguna razón de momios significativa en las variables analizadas que son las mismas que se utilizaron para mastitis producida por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

Razones de momios en relación a mastitis subclínica producida por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

Calificación del establos y mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

No se encontro riesgo para ninguna de las calificaciones otorgadas a los establos, al nivel de producción de leche, días en leche, número de parto, higiene, estado y caída de pezoneras, sobreordeño, estado y material de la cama.

PRUEBA DE ADHERENCIA DE SCN A CÉLULAS EPITELIALES DE GLÁNDULA MAMARIA BOVINA

Se contó el número de bacterias adheridas hasta un total de 50 células en cada frotis. Los resultados se muestran en el cuadro 30. En el caso de los 8 aislamientos de *S. xylosum*, el promedio de células con bacterias adheridas fue de 23. En el caso de *S. warneri* 22. Los aislamientos de *S. haemolyticus* 27. En este Cuadro se incluye *S. aureus* como testigo, el cuál no mostró diferencia con SCN

En cuanto a promedio de bacterias adheridas por célula fue de 3.78 para *S. xylosum*, 3.80 en *S. warneri*, 6.11 para *S. simulans*. Se usaron 2 cepas de *S. aureus* como un control positivo de adherencia en las cuales se encontró un promedio de 5.15 bacterias adheridas en el 27% de células contadas (Cuadro 31) no existiendo diferencia significativa.

En el análisis estadístico se encontró un coeficiente de correlación de Pearson significativo entre el número de células somáticas y el porcentaje de células con adherencia de 0.366 ($p < 0.01$). Al hacer la comparación del grado de adherencia entre especies de SCN y *S. aureus* no se observó diferencia entre número de bacterias adheridas y cantidad de células que presentaban adherencia bacteriana para *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

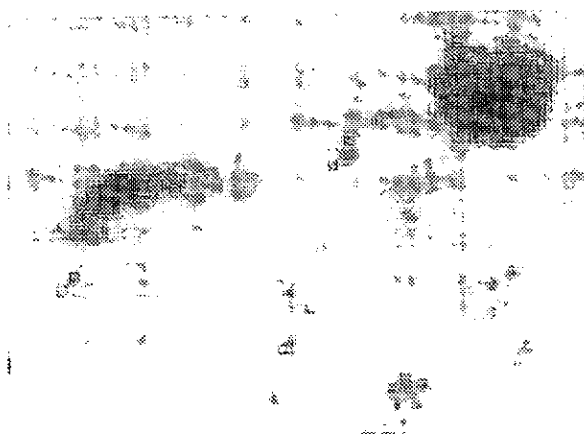


Figura 1 Microfotografía de células de glándula mamaria con una cepa de *S. saprophyticus* (X 100)

ADHERENCIA A MATERIAL PLÁSTICO

Se probaron un total de 42 cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativos para detectar adherencia a material plástico, se realizaron tres repeticiones. De estas cepas 77.5% (31) mostraron adherencia al tubo.

DISCUSIÓN

La prevalencia determinada de mastitis subclínica (60.25%) se considera elevada, este dato puede estar influenciado por diversos factores como la etapa de lactación en que se encontraban las vacas y la diferente época en que fueron recolectadas las muestras, ya que se realizaron tres muestreos en cada rancho en diferentes meses. La prevalencia de mastitis clínica (1.99%) se puede considerar dentro de los parámetros esperados en un programa de control de mastitis

Analizando los datos por estrato, el que incluía hatos con menor número de animales fue el que tuvo la mayor prevalencia de mastitis subclínica, aunque pueden intervenir otros factores como las prácticas de manejo. En los otros dos estratos la prevalencia de mastitis fue menor aunque también debido al mayor número de animales muestreados se incrementó la posibilidad de encontrar vacas con mastitis clínica.

El estudio inicial para dar una calificación en cuanto a higiene y manejo en cada establo fue realizada por una sola persona. Se esperaba que a una mejor calificación menor debería ser la prevalencia de mastitis, pero los resultados no coincidieron a estas expectativas. A lo largo de los muestreos los establos pudieron tener cambios de ordeñadores y de otros factores que pudieran cambiar la calificación del establo, pero este aspecto no se consideró en el estudio.

A menor producción de leche se encontró mayor prevalencia de mastitis (74.71%). Estos resultados son razonables, ya que las vacas sanas están produciendo mayor cantidad de leche a diferencia de las vacas con mastitis subclínica, en las cuales hay disminución de la producción láctea

En cuanto a los días en leche y casos de mastitis se pudo observar que a mayor número de días en lactación (241 a 640) se incrementó la prevalencia de mastitis a un 70%.

Los casos de mastitis se incrementaron a mayor número de parto, un resultado que sorprende en este estudio es que a partir del segundo parto se obtuvo un 65% de mastitis subclínica, el cual es un porcentaje elevado

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

En este trabajo no se encontró relación entre mastitis y el buen o mal estado de las pezoneras, aunque es sabido que este es un punto importante en la presentación de mastitis, aunque se puede pensar que en estos establos otros puntos fueron los determinantes para la presentación de mastitis, como la caída de pezoneras en la cual se observó una diferencia notoria en los casos de mastitis en los establos de estudio

Parece ser que la caída de pezoneras y el sobreordeño influyen más en los casos de mastitis que el estado de las pezoneras.

Como es conocido el estado de humedad de las camas tiene mucha influencia sobre la mastitis, en este estudio el 80% de los casos de mastitis se encontraron en establos con camas húmedas a diferencia de los establos con camas secas donde se encontró un 54% de casos.

En cuanto al tipo de material de la cama los casos de mastitis se presentaron con mayor frecuencia en las de bagazo de caña 91% y las de estiércol seco, las camas de arena fueron las que tuvieron menor prevalencia de mastitis 41.7%.

Diagnóstico bacteriológico

De las 1107 vacas muestreadas, aproximadamente la mitad fueron cultivo negativo y en el resto de muestras se aislaron diferentes microorganismos que son comunes en mastitis bovina como *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, y en menor frecuencia *Nocardia*, *Pasteurella* y *Klebsiella*.

Aislamiento de *Staphylococcus Coagulasa negativos* (SCN)

Hasta hace algunos años, en el campo de la salud se consideraba que dentro del género *Staphylococcus*, la única especie virulenta era *S. aureus*. De hecho, a los estafilococos coagulasa negativos se les consideraba como bacterias de baja o nula patogenicidad para el humano y para los animales; consecuentemente se aceptaba que la mayoría de las especies de este grupo fueran incluidas dentro de

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

una sola: *S. epidermidis*, su aislamiento se interpretaba como contaminación de las muestras con simples miembros de la flora habitual de piel y mucosas.

Sin embargo en la actualidad el planteamiento anterior se ha tenido que modificar de manera radical, ya que se ha demostrado ampliamente que varias cepas de SCN provocan numerosos y graves padecimientos infecciosos, en el caso de humanos, sobre todo en pacientes en quienes se han instalado sondas, catéteres, cánulas, dispositivos de venoclisis, e inclusive, prótesis cardiacas o articulares, o bien en individuos que se encuentran debilitados y/o inmunocomprometidos, por estado nutricional deficiente, cirugía, trasplante de órganos o traumatismos.

En medicina veterinaria los SCN son considerados como patógenos potenciales de la ubre, aunque también se ha demostrado que protegen contra infecciones producidas por otros microorganismos (16, 19). Satynarayan (43) comenta que los SCN frecuentemente colonizan la piel de la ubre, el canal del pezón y el interior de la glándula mamaria.

Los procedimientos para la identificación de SCN requiere de numerosos medios de cultivo por lo que en muchas ocasiones se realiza la identificación con microsistemas de identificación

Los aislamientos obtenidos de SCN a partir de leche no fueron plenamente identificados por el microsistema de identificación API G20, por lo que fue necesario realizar otras pruebas bioquímicas para su identificación adecuada, lo cual confirma lo establecido por algunos investigadores, de que estos microsistemas no identifican adecuadamente las especies de SCN de origen bovino. Infante (44) menciona que el sistema es de utilidad para la identificación de *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, pero no satisfactorio para *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* y concluye que el sistema API no es adecuado para identificación de *Staphylococcus* provenientes de la glándula mamaria bovina.

Hebert (32) utilizó los perfiles bioquímicos obtenidos con el Staph-ident system (Analytab products) combinados con los resultados de antibiogramas, producción

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

200 a 400 vacas y el de más de 400 vacas, se aisló un 10% y 12% respectivamente

Un dato interesante es que en los establos con mejor calificación en cuanto a higiene se encontraron los mayores porcentajes de aislamientos, establos con calificación 9 un 26% de 255 muestras y con calificación 10 un 24% de 82 muestras, esto se ve reflejado también en los resultados obtenidos en cuanto a la higiene de la sala de ordeño, mayor frecuencia de aislamientos de SCN 24% de 268 muestras en salas con buena higiene comparada en salas con mala higiene 17%. En este estudio el mayor número de *Staphylococcus coagulasa* negativos fueron aislados en ranchos que llevan un buen manejo del ordeño y de su equipo, con higiene regular y buena lo que concuerda con los informado por otros investigadores, en que es común en hatos con buen manejo que practican el sellado y terapia al secado, encontrar 10 a 20% de cuartos infectados con SCN. También Hogan (21) encontró que otros *Staphylococcus* diferentes a *S aureus* eran el grupo bacteriano más frecuentemente aislado de muestras de leche tomadas de vacas pertenecientes a hatos que aplicaban un programa efectivo de control de mastitis. En su estudio encontró que las muestras de leche tenían un alto conteo celular a diferencia de los cuartos no infectados, por lo que concluyeron que estos patógenos menores afectaban en forma adversa la calidad de la leche. Hogan (22) realizó también aislamientos de SCN en hatos con bajo conteo celular en donde habían controlado mastitis por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* en los cuales aisló SCN durante toda la lactación, tanto al parto y en el periodo seco el porcentaje de aislamientos fue similar.

En vacas de primer y segundo parto se observó un porcentaje similar de aislamientos de SCN, a partir del tercer parto ésta frecuencia disminuye, lo cual concuerda con la literatura. Satynarayan (43), encontró que estos microorganismos son frecuentemente aislados de infecciones intramamarias en vacas de primera lactación, resultando en alteraciones de la leche, también como en un decremento de la producción. Por lo que los SCN fueron previamente

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

considerados de baja patogenicidad, causando reacciones moderadas de inflamación que resultan en elevados conteos celulares

En los primeros días en lactación de las vacas de estudio se aislaron más SCN, pareciendo que los primeros y últimos días de lactación son los de mayor susceptibilidad para que las vacas sean infectadas por SCN. según los resultados obtenidos 25% de aislamientos en un periodo de 1 a 60 días y más de 241 días en leche. Según Timms (47) los SCN son microorganismos comunes involucrados en mastitis en vacas de primera lactación. Son capaces de causar mastitis clínica y severas alteraciones de leche. En estudios realizados durante toda una lactación a 139 vacas, al principio de la lactación 30% de las vacas y 13% de los cuartos estaban infectados con SCN, estos porcentajes aumentaron a través de la lactación a 55% de vacas y 27% de cuartos infectados al final de la lactación. La mayoría de estas infecciones tuvieron una larga duración con una cura espontánea del 15%.

En vacas con producción de leche de 31 a 45 litros se obtuvo el mayor número de aislamientos de SCN por lo que se puede considerar que vacas altas productoras es común encontrar estos microorganismos. A mayor producción láctea existió la tendencia de tener mayor aislamientos de SCN en los casos de mastitis. Este es un aspecto importante ya que si las vacas altas productoras son más susceptibles de ser infectadas por SCN la producción de leche debe disminuir según indican los estudios realizados por Timms (47) quien menciona que vacas con infecciones por SCN tuvieron un significativo conteo somático y actividad de la enzima Nagasa y un decremento de 821 kg en la producción de leche comparada con animales no infectados. Las vacas infectadas con SCN estuvieron asociadas con significativo decremento de la producción (-2.9 Kg al día).

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Se aislaron más *Staphylococcus* en camas de estiércol seco que en otro tipo de material de cama, pero el riesgo no fue significativo, por lo que existe la misma posibilidad de aislamiento en los diferentes tipos de camas.

La caída de pezoneras no mostró un efecto significativo en el aislamiento de estos microorganismos, presentando frecuencias similares de aislamientos tanto cuando se presentaba como cuando no existía.

Adherencia

En relación a adherencia, Miedzobrodzki (38) comenta que la supervivencia y multiplicación de *Staphylococcus* en el epitelio de la ubre son los eventos decisivos en la patogénesis de la mastitis bovina. Frost (33) demostró la adherencia de *Staphylococcus* a células del epitelio ductular *in vitro*. Sin embargo los eventos previos al establecimiento de una infección intramamaria por estafilococos no están bien definidos. El contacto de las células bacterianas con la leche ha sido descrita como el factor crítico en la supervivencia y multiplicación de *Staphylococcus* durante la infección intramamaria. El enlace de las células bacterianas a componentes del suero o tejidos tales como fibronectina, colágeno y fibrinógeno se han sugerido como el paso inicial en el desarrollo de una infección intramamaria (48).

Como este proceso es el paso inicial en la patogénesis de un microorganismo, se realizó la adherencia a células epiteliales de glándula mamaria y a material plástico considerando la posible transmisión de estos microorganismos por las pezoneras las cuales están manufacturadas con material de polivinilo o bien en vacas que se les haya puesto un dispositivo intramamario.

Numerosos autores han reportado la relevancia que adquieren algunos factores detectados en los SCN, entre los que figuran varios exopolisacáridos adherentes que conforman sus cápsulas y glicocálices, así como algunas otras sustancias

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

superficiales que se pueden unir a diferentes proteínas humanas y la naturaleza hidrofóbica de las cepas (49,50,51)

En cuanto a la adherencia las cepas estudiadas, a excepción de *S. intermedius*, presentaron un promedio de más de 20 células con adherencia de un total de 50 células observadas al realizar el estudio de adherencia. El promedio de SCN adheridos a cada célula fue de 4 y en la cepa control de *Staphylococcus aureus* de 5.

Adherencia a material plástico

Los estudios de adherencia a material plástico fueron primeramente realizados en humanos a los cuales se les había instalado catéteres, cánulas, dispositivos de venoclisis y prótesis cardíacas o articulares

En relación a los exopolisacáridos, se ha demostrado ampliamente que su presencia es fundamental para que los SCN puedan adherirse y permanecer, tanto en diversos tejidos humanos como en los catéteres de polivinilo, polietileno, tetrafluoroetileno, caucho, silicón, fluoroetileno-propileno y en las prótesis cardíacas y articulares.

En el caso de la adherencia de los microorganismos a los dispositivos médicos, se ha observado que puede verificarse en tiempos sorprendentemente cortos, que fluctúan entre los 5 y 30 minutos y representa el inicio de un proceso en el que el paso siguiente es la colonización observada desde los 40 a 60 minutos y que puede culminar con la erosión superficial de catéteres, sondas, prótesis, etc, además del riesgo a posibles diseminaciones bacterianas. La adherencia bacteriana puede realizarse en las pezoneras, ya que están manufacturadas de polivinilo y el tiempo de ordeño es el suficiente para que los microorganismos puedan quedar adheridos y en caso de que no exista una adecuada técnica de lavado se puede dar la transmisión de SCN de una vaca a otra. El hecho de que prácticamente todos los SCN aislados en este estudio, mostraran adherencia al material plástico indican que existe un importante y determinante factor de

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

adherencia a material plástico, que representa un riesgo latente de infecciones en los establos.

En cuanto a la técnica de Christensen utilizada para observar la adherencia a material plástico, se puede decir que es sencilla, rápida y económica y que puede observarse por tinción y es posible cuantificarse por espectrofotometría. En este caso solamente se observó visualmente la adherencia y no se cuantificó, todas las cepas de estudio mostraron adherencia a material plástico.

Algunos estudios han indicado que las infecciones por SCN son causadas principalmente por la adherencia y producción de la secreción mucoide. Así se ha sugerido que la positividad en la adherencia a tubo puede ser usada como un marcador de verdadera patogenicidad en una cepa. Muchos estudios también han mostrado que la capacidad de producir la secreción mucoide de una cepa infectada se correlaciona con una infección clínica. En otros estudios sin embargo tales asociaciones no se han confirmado. Estas discrepancias sugieren que aunque la producción de esta secreción es indudablemente un importante factor de virulencia, la correlación entre su producción e infecciones clínicamente significativas no es un fenómeno universal.

La identificación de los SCN en el laboratorio clínico sólo adquiere sentido cuando los médicos clínicos conocen la frecuente participación de estos microorganismos en los casos de mastitis bovina.

Cabe mencionar que los patrones asociados a la diferenciación de las especies de SCN, contemplan la realización de numerosas reacciones bioquímicas, pero con base a estudios de frecuencia se pueden seleccionar las 5 especies más frecuentes y obtener una batería confiable y abreviada de pruebas cuya implantación no representa mayor problema para el laboratorio, dados sus bajos costos, sencillez, disponibilidad y el corto tiempo que requieren para su identificación. Entre las pruebas citadas figuran la de la ureasa, de fermentación de sacarosa y fosfatasa alcalina.

Es importante resaltar el nuevo significado que se le debe conceder al aislamiento de los SCN a partir de muestras de leche de casos de mastitis bovina,

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

aunque la habilidad de SCN para causar mastitis es considerada menor que la de *S. aureus*.

No es claro si las infecciones por SCN disminuyen la producción de leche suficientemente para justificar un tratamiento durante la lactación. Así solamente el tratamiento de casos clínicos es recomendable.

Los SCN son aislados regularmente de hatos que practican programas de control de mastitis.

CONCLUSIONES

1 La prevalencia de mastitis clínica fue de 1.99% (22/1107), la de mastitis subclínica fue de 60.25% (667/1.107) en los establos participantes en este estudio.

El porcentaje de vacas sin mastitis fue de 37.76% (418/1.107).

2 La especie de SCN más frecuentemente aisladas en este estudio fue *S. xylosum*. Otras especies aisladas en orden decreciente fueron: *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. kloosi*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* y *S. cohnii*

3 Los factores de riesgo estudiados en relación a mastitis subclínica producida por *Staphylococcus coagulasa* negativos no fueron estadísticamente significativos.

4 Todas las cepas de SCN mostraron adherencia tanto a material plástico como a células epiteliales ductulares de glándula mamaria bovina.

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

LITERATURA CITADA

- 1 Amorena B, Baselga P. Importancia de la mastitis ovina y perspectivas genéticas. *Ovis tratado de Patología y Producción Ovina Mamitis Ovina* 1992; 21: 9-23.
- 2 Marco, J.C., Romeo, M., Romeo, L. y Pérez, I. Epidemiología y patogenesis. *Ovis tratado de Patología y Producción Ovina Mamitis ovina I* (21):59-74 (1992)
- 3 Devriese, L.A. and Keyser, H.: Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows *J. Dairy Res.* 47: 155-158 (1980)
- 4 Honkanen, T.B.: The role of coagulase-negative *Staphylococcus* species in bovine mastitis International Symposium on bovine mastitis, Indianapolis, Indiana USA 1990 National mastitis council American Association of bovine practitioners.
- 5 Trinidad, P., Nickerson, S.C. and Luther, D G.: Antimicrobial susceptibilities of Staphylococcal species isolated from mammary gland of unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73: 357-362 (1990)
- 6 Hodges, R.T., Jones, S. and Holland, T.S. Characterization of *Staphylococci* associates with clinical and subclinical bovine mastitis *New Zealand Vet J* 32: 141 -145 (1984).
- 7 Marco, M. J.C. Mastitis en la oveja Latxa. epidemiología, diagnóstico y control. *Tesis doctoral*. Universidad de Zaragoza Facultad de Veterinaria (1994)
- 8 Marco, J.C., Romeo, M., Romeo, L. Etiología *Ovis tratado de Patología y Producción Ovina. Mamitis ovina I* (21):25-43 (1992)
- 9 Schwabe, C.P., Riemann, H.P. and Franti, C.E. Epidemiology in Veterinary Practice. Lea & Febiger Philadelphia 1977
- 10 Watts, J.L.: Etiological agents of bovine mastitis *Vet. Microbiol.* 16: 41-66 (1988)
- 11 Jarp, J.: Classification of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine clinical and subclinical mastitis *Vet Microbiol* 27: 151-158 (1991)

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

- 12 Watts, J.L.: evaluation of the Staphy-Zym system with *Staphylococci* isolated from bovine intramammary infections. *J Clin. Microbiol.* 29:59-61 (1991)
- 13 Fox, L.K., Gershman, M., Hancock, D.D. and Hutton, C.T.: Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: the effect of milking time hygiene practices. *Cornell Vet.* 81: 183-193 (1991)
- 14 Todhunter, D.A., Cantwell, L.L., Smith, K.L., Hoblet, K.H. and Hogan, J.S. Characteristics of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine intramammary infections *Vet Microbiol* 34 373-380 (1993)
- 15 Timms, L.L. Schultz, L.H Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J Dairy Sci.* 70: 2648-2657 (1987)
- 16 Bramley, J.A. y Hogben, M.E. The adhesion of human and bovine isolates of *Streptococcus agalactiae* (group B) to bovine mammary gland epithelial cells. *J. Comp. Path.*, 92:131-137 (1982)
- 17 Brooker, D.E. and Fuller, R. The adhesion of coagulase negative *Staphylococci* to human skin and its relevance to the bacterial flora of milk. *J Appl Bact.*, 57: 325-332 (1984)
- 18 Kloos, W.E. and Keinzks . *Staphylococcus* In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1988.
- 19 Poutrel, B. Generalites sur les mammites de la vache laitiere. *Processus, infectieux, epidemiologie, diagnostic, methode de controle. Les Mammites bovine"* *Rec. Med. Vet.* 161 (numero especial) 495-512 (1985)
- 20 Harmon, R.J., Matthews, K.R and Langlois, B.E.: Coagulase-negative *Staphylococcus* species and *Staphylococcus aureus* prevalence during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. International Symposium on bovine mastitis Indianapolis, Indiana USA 1990. National mastitis Council/American Association of bovine practitioners

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

- 21 Hogan, J.S., Smith, K.L., Todhunter, D.A. and Schoenberger P.S.: Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. *J. Dairy Sci.* 71: 2520-2525 (1988)
- 22 Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, H., Schoenberger, P.S., Todhunter, D.A., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L. and Conrad, H.R.: Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy sci* 72: 1547-1556 (1989)
- 23 Craven, N y William S, M.R. Defenses of the bovine mammary gland infection and prospects for their enhancement. *Vet Immunol Immunopathol.* 10: 117-127 (1985).
- 24 Watts, J.L. and Owens, E.W. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. *Res vet Sci* 46: 1-4 (1989)
- 25 Kloos, W.E. and Jorgensen, J.H. *Staphylococci*. In: Ballows. Manual of clinical microbiology, edited by: American society for microbiology. Washington D.C. 1985
- 26 Gemmell, C.G. and Thelestam, M.: Toxinogenicity of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci towards various animal cells. *Acta path. microbiol. scand Sect B.* 89: 417-421 (1981)
- 27 Duchá, J., Latre, N.V. Factores de virulencia en cepas de estafilococos coagulasa negativos aislados de mastitis ovina. *Ovis tratado de Patología y Producción Ovina Mamitis Ovina I* (21) 45-58 (1992)
- 28 Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H., 1982. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37, 318-326.9
- 29 Pirkko, K.: Association of coagulase negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias. *J. Clin, Microbiol.* 28: 2779-2785 (1990)

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

- 30 Peniche, Q.E., Garza.V.R La importancia clínica de los estafilococos coagulasa negativa y su identificación en el laboratorio *Laborat-acta* 5(2) 77-82 (1993)
- 31 Per-Anders, M., Hovelius, B., Hovelius, K. and Nilsson, P.O.: Coagulase-negative, novobiocin- resistant staphylococci on the skin of animals and man, on meat and in milk. *Acta vet scand* 19 243-253 (1978)
- 32 Hébert, G.A., Cooksey, R.C., Clark, C.N., Hill, B.C., Jarvis, W.R. and Thornsberry, C.: Biotyping coagulase-negative *Staphylococci* *J. Clin. Microbiol.* 26: 1950-1956 (1988)
- 33 Frost, A.J.: Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland *Infect Immun* 1154-1156 (1975)
- 34 Amorena, B., Baselga, R y Aguilar B : Factors influencing the degree of in vitro bacterial adhesion to ovine mammary gland epithelial cells. *Vet Microbiol.*, 24: 43-53 (1990)
- 35 Baselga, R., Aguilar, B., Albizu I., Penadés, R y Amorena, B Aspectos moleculares de la mamitis ovina *Ovis tratado de Patología y Producción Ovina.* Mamitis Ovina II (22) 73-85 (1992)
- 36 Baselga, R., Albizu, I., De la Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M and Amorena, B.: Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*. Implications in colonization and virulence *Infect Immun.*, 61 4857-4862 (1993)
- 37 Iturralde, M., Aguilar, B., Baselga, R. and Amorena, B Adherence of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* strains to epithelial cells from ovine mammary gland primary cultures and from a rat intestinal cell line *Vet Microbiol.* 38: 115-127 (1993)
- 38 Miedzobrodzki, J., Naidu, A.S., Watts, J.L., Ciborowski, P., Palm, K. and Wadström, T. Effect of milk on fibronectin and collagen type I binding to *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *J Clin Microbiol* 27 540-544 (1989)

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

- 39 Daugherty, S. and Low, M. Cloning, expression and mutagenesis of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Staphylococcus aureus* a potential staphylococcal virulence factor. *Infect Immun.*, 61: 5078-5089 (1993)
- 40 Naidu, A.S., Miedzobrodzki, J., Andersson, M., Nilsson, L.E., Forsgren, A., Watts, J.L. Bovine lactoferrin binding to six species of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine intramammary infections. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2312-2319 (1990)
- 41 Raus, J. and Love, N.D. Comparison of the affinities to bovine and human prothrombin of the staphylocoagulases from *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* 29: 570-572 (1991)
- 42 Pérez, D.M.. Manual sobre ganado lechero. Diana St, México. D.F. 1984
- 43 Satyanarayan A, Miedzobrodzki J, Andersson M, Nilsson L, Forsgren A, Watts J. *J of clin. Microbio.* 28: (10) 2312-2319 (1990)
- 44 Infante F, Jasper DE, Dellinger J. Eficacia del sistema API para la identificación de estafilococos de la glándula mamaria bovina. Reunión de investigación Pecuaria en México, 1983 p 435-439
- 45 Gemmell CG. Coagulase-negative *Staphylococci*. *J Med Microbiol.* 285-295 (1986)
- 46 Moller A F, Daugaard L H, Einar JN. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains isolates from cases of bovine mastitis. *Vet Micro.* 66(2): 165-170 (1999)
- 47 Timms LL, Schultz LH. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J Dairy Sci* 70: 2648-2657 (1987)
- 48 Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett* 180:103-109 (1999)

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

- 49 Honkanen, T.B.: The role of coagulase-negative *Staphylococcus* species in bovine mastitis. International Symposium on bovine mastitis. Indianapolis, Indiana USA 1990 National mastitis council American Association of bovine practitioners
- 50 Quie, P.G. and Belani, K.K. Coagulase-negative Staphylococcal adherence and persistence. *J. Infec Dis* 156: 543-547 (1987)
- 51 Watts, J.L., Naidu, A.S. and Wadström, T. Collagen binding, elastase production, and slime production associates with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *J. Clin. Microbiol.* 28: 580-583 (1990)
- 52 Bedidi M.N., Greenland T. Richard Y. Exoprotein and slime production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk. *Vet Micro.* 59:139-145 (1998).
- 53 . <http://www.nimconfine.com>

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Cuadro 2. Resultados de la prueba de Wisconsin modificada en leches de 1,107 vacas de los Edos de México e Hidalgo.

ANIMALES	CÉLULAS SOMÁTICAS/ml x 10 ³	FRECUENCIA	%
Vacas sanas	0-500	418	37.76
Vacas con mastitis subclínica	501-2500	667	60.25
Vacas con mastitis clínica	> 2500	22	1.99
		N=1,107	100

Cuadro 3. Prevalencia de mastitis en los diez establos participantes.

RANCHO/ESTRATO	No. DE ANIMALES MUESTREADOS	No. DE ANIMALES CON MASTITIS SUBCLÍNICA	%
El Cupido/3	121	111	91.7
Tizayuca/1	34	30	88.2
San Epigmenio/3	157	110	70.0
Granja Ray/2	90	63	70.0
Establo México/2	103	70	67.9
San Sebastián/3	190	106	55.7
Santa Clara/2	114	63	55.2
Tizayuca/1	26	14	53.8
La Quinta/2	181	84	46.4
Olimpo/3	91	38	41.7
	1,107	689	62

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Cuadro 4. Resultados de la prueba modificada de Wisconsin de acuerdo a los tres estratos de población.

ESTRATO	CÉLULAS SOMÁTICAS > 1x10 ⁶ cel/ml	
	Frecuencia	%
1) < 200 vacas	44/60	(73.3)
2) 200-400 vacas	234/398	(58.7)
3) > 400 vacas	411/649	(63.3)

Cuadro 5. Porcentaje de mastitis subclínica en los establos agrupados de acuerdo a los índices de higiene y manejo.

Calificación	% de mastitis	Animales positivos
10	49.3	101/205
9	56.7	314/554
8	90.9	141/155
7	70.0	63/90
6	67.9	70/103

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Cuadro 6. Prevalencia de mastitis subclínica por establo de acuerdo a los índices de higiene y manejo.

Calificación	% de mastitis	Establo
10 (excelente)	70.0 (110/157)	1
10 (excelente)	53.8 (14/26)	2
9 (buena)	41.8 (38/91)	3
9 (buena)	55.8 (106/190)	4
9 (buena)	55.3 (63/114)	5
9 (buena)	91.7 (111/121)	6
8 (regular)	67.9 (70/103)	7
8 (regular)	70.0 (63/90)	8
7 (mala)	46.4 (84/181)	9
6 (mala)	88.2 (30/34)	10

Cuadro 7. Frecuencia de mastitis subclínica según producción de leche.

Producción (litros)	No. de animales	No. de animales positivos	%
1- 15	170	127	74.71
16-30	548	340	62.04
31-45	371	214	57.68
> 46	18	8	44.44
	Total 1,107	689	62.24

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

Cuadro 8. Frecuencia de mastitis subclínica en relación a días en leche.

Días en leche	No. de animales	No. de animales positivos	%
1/60	201	116	57.71
61/120	232	140	60.34
121/180	279	164	58.78
181/240	163	106	65.03
241/310	126	89	70.63
311/370	65	45	69.23
371/640	41	29	70.73

Cuadro 9. Frecuencia de mastitis subclínica según número de parto.

No. De parto	No. de animales	No. De animales positivos	%
1	349	193	55.3
2	355	230	64.7
3	263	174	66.1
4	86	57	66.2
5*	54	35	64.8
	Total 1,107	689	62

*incluye vacas de cinco o más partos

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Cuadro 10. Mastitis subclínica en relación a higiene de la sala de ordeño.

Higiene	No. de animales	No. de positivos	%
Mala	219	147	67.1
Regular	302	195	64.5
Buena	586	347	59.2
	Total 1,107	689	

Cuadro 11. Mastitis subclínica en relación a estado de las pezoneras.

Estado pezoneras	Número de animales	Animales positivos	%
Mala	117	78	66.6
Bien	990	611	61.7
	Total 1,107	689	

Cuadro 12. Mastitis subclínica en relación a caída de pezoneras.

Caída de pezoneras	Número de animales	Animales positivos	%
Frecuente	375	218	58.1
En ocasiones	121	111	91.7
Nunca	611	360	58.9
	Total 1,107	689	

Cuadro 13. Mastitis subclínica en relación a sobreordeño.

Sobreordeño	Número de animales	Animales positivos	%
Mucho	314	244	77.7
Regular	183	124	67.7
No hay	610	321	52.6
	Total 1,107	689	

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Cuadro 14. Mastitis subclínica en relación a estado de la cama.

Estado de la cama	Número de animales	Animales positivos	%
Húmeda	224	181	80.8
Regular	455	276	60.6
Seca	428	232	54.2
	Total 1,107	689	

Cuadro 15. Mastitis subclínica en relación a material de la cama.

Tipo de cama	Número de animales	Animales positivos	%
Arena	91	38	41.7
Bagazo de caña	121	111	91.7
Tierra	114	63	55.2
Estiércol seco	781	477	61.0
	1,107	689	

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Cuadro 16. Porcentajes de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) en los diez establos de estudio.

RANCHO	No. De animales cultivo positivo	Aislamientos de SCN %	Especies de SCN predominantes
San epigmenio	80	11 (13.7)	<i>S. xylosum</i> , <i>S. haemolyticum</i> , <i>S. saprophyticum</i>
Tizayuca	7	0 (0)	
Olimpo	36	10 (27.7)	<i>S. haemolyticum</i> , <i>S. saprophyticum</i>
San Sebastián	89	33 (37.0)	<i>S. xylosum</i> , <i>S. chromogenes</i>
Santa Clara	46	10 (21.7)	<i>S. haemolyticum</i> , <i>S. epidermidis</i>
El Cupido	76	13 (17.1)	<i>S. chromogenes</i> , <i>S. xylosum</i>
Establo México	53	12 (22.6)	<i>S. xylosum</i> , <i>S. warneri</i>
Granja Ray	50	7 (14.0)	<i>S. warneri</i> , <i>S. saprophyticum</i>
La Quinta	79	22 (27.8)	<i>S. xylosum</i> , <i>S. simulans</i>
Tizayuca	17	0 (0)	
	Total 533/1,107 (48.1%)	118 /533 (22.1)	

Mastitis por *Staphylococcus* coagulasa negativos.

Cuadro 17. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus* coagulasa negativos.

Especie	Frecuencia	Porcentaje
<i>S. xylosus</i>	29	24.5
<i>S. warneri</i>	14	11.8
<i>S. saprophyticus</i>	13	11.0
<i>S. hominis</i>	12	10.1
<i>S. epidermidis</i>	11	9.3
<i>S. kloosi</i>	10	8.4
<i>S. chromogenesi</i>	10	8.4
<i>S. haemolyticus</i>	7	5.9
<i>S. simulans</i>	7	5.9
<i>S. cohnii</i>	5	4.2
	Total 118	100

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Cuadro 18. *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) aislados en leche de 1,107 vacas con cuentas celulares normales y con mastitis subclínica.

Espece de SCN	Mastitis subclínica (frecuencia)	Leche normal (frecuencia)	Porcentajes
<i>S. xylosus</i>	15	12	24.6
<i>S. warneri</i>	7	7	11.8
<i>S. saprophyticus</i>	6	7	11.0
<i>S. hominis</i>	8	4	10.2
<i>S. epidermidis</i>	9	2	9.3
<i>S. chromogenes</i>	6	4	8.5
<i>S. kloosi</i>	8	2	8.5
<i>S. haemolyticus</i>	6	1	5.9
<i>S. simulans</i>	5	2	5.9
<i>S. cohnii</i>	4	1	4.2
	Total 76	Total 42	100.0

Cuadro 19. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos en los tres estratos del estudio.

Estrato	No. De animales	Animales con aislamiento de SCN	%
1	60	0	0.0
2	398	39	9.79
3	649	79	12.17
	Total 1107	118	10.65

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Cuadro 20. Especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos aislados en los diferentes estratos (% calculados tomando en cuenta solamente cultivos positivos).

Especie	Estrato 1		Estrato 2		Estrato 3	
	Cant.	%	Cant.	%	Cant.	%
	--		11	28.2	18	22.7
<i>S. xylosus</i>	--		6	15.3	8	10.1
<i>S. warneri</i>	--		3	7.6	4	5.0
<i>S. haemolyticus</i>	--		3	7.6	9	11.3
<i>S. hominis</i>	--		1	2.5	9	11.3
<i>S. chromogenes</i>	--		1	2.5	6	7.5
<i>S. simulans</i>	--		4	10.2	7	8.8
<i>S. epidermidis</i>	--		7	17.9	6	7.5
<i>S. saprophyticus</i>	--		1	2.5	9	11.3
<i>S. kloosi</i>	--		2	5.1	3	3.8
<i>S. cohnii</i>	--					

Nota: no hubo aislamiento en el estrato 1

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Cuadro 21. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos con base en la calificación otorgada al rancho según higiene y manejo.

Calificación	No. Muestras cultivo positivo	No. De aislamientos de SCN	%
6	53	12	22.6
7	50	7	14.0
8	93	13	13.9
9	255	66	25.8
10	82	20	24.3
	Total 533	Total 118	

Cuadro 22. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos de acuerdo a la higiene en la sala de ordeño.

Higiene	No. De muestras cultivo positivo	No. De aislamientos de SCN	%
Mala	110	19	17.2
Regular	155	35	22.5
Buena	268	64	23.8
	Total 533	118	

Cuadro 23. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos con base en el número de parto.

No. De parto	Muestras cultivo positivo	Aislamientos de SCN	%
1	158	40	25.3
2	178	43	24.1
3	125	24	19.2
4	44	7	15.9
5*	28	4	14.2
	Total 533	118	

5* Vacas de 5 o más partos

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Cuadro 24. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos en relación con la producción de leche.

Producción (l)	Muestras cultivo positivo	Aislamientos de SCN	%
1/15	96	18	18.7
16/30	261	56	21.4
31/45	168	40	23.8
46/80	8	4	50.0
	Total 533	118	

Cuadro 25. Frecuencia de aislamientos de *Staphylococcus coagulasa* negativos de acuerdo al número de días en leche.

Días en leche	No. De muestras cultivo positivo	No. De aislamientos de SCN	%
1/60	95	24	25.2
61/120	109	21	19.2
121/180	129	25	19.3
181/240	82	14	17.0
241/310	57	19	33.3
311/370	37	5	13.5
371/640	24	10	41.6
	Total 533	118	22

Cuadro 26. Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y la existencia de sobreordeño.

Sobreordeño	No. De muestras cultivo positivo	No. De aislamientos de SCN	%
Mucho	179	32	17.8
Regular	87	11	12.6
No hay	267	75	28.0
	Total 533	118	

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Cuadro 27. Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y caída de pezoneras durante el ordeño.

Caída de pezoneras	No. De muestras cultivo positivo	No. De aislamientos de SCN	%
Frecuente	182	41	22.5
En ocasiones	76	13	17.1
Nunca	275	64	23.2
	Total 533	118	

Cuadro 28. Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y el material de la cama.

Material de la cama	No. De muestras con cultivo positivo	No. De aislamientos de SCN	%
Arena	36	10	27.7
Bagazo de caña	76	13	17.1
Tierra	46	10	21.7
Estiércol seco	375	85	22.6
	Total 533	118	

Cuadro 29. Frecuencia de *Staphylococcus coagulasa* negativos y la humedad de la cama.

Estado de la cama	Muestras con cultivo positivo	Aislamientos de SCN	%
Húmeda	129	25	19.3
Un poco húmeda	210	50	23.8
Seca	194	43	22.1
	Total 533	118	

Mastitis por *Staphylococcus* coagulasa negativos.

Cuadro 30. Medias mínimo cuadráticas (+/- error estándar) de adherencia de *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) y positivos (SCP) a células epiteliales ductulares de glándula mamaria bovina.

SCN y SCP	Medias mínimo cuadráticas	Error estándar	Significancia
<i>S. haemolyticus</i>	27.34	4.34	a
<i>S. aureus</i>	27.29	5.20	a
<i>S. chromogenes</i>	26.97	3.04	a
<i>S. hominis</i>	24.40	3.26	a
<i>S. xylosus</i>	23.01	2.74	a
<i>S. saprophyticus</i>	22.94	3.27	a
<i>S. epidermidis</i>	22.48	4.08	a
<i>S. simulans</i>	22.40	4.08	a
<i>S. warneri</i>	22.10	3.15	a
<i>S. intermedius</i>	9.79	7.18	b

a, b Literales diferentes denotan diferencia significativa. ($p < 0.001$)

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

Cuadro 31. Promedio de *Staphylococcus coagulasa* negativos adheridos por célula epitelial ductular de glándula mamaria bovina.

SCN y SCP	Medias mínimo cuadráticas	Error estándar	Significancia
<i>S. simulans</i>	6.11	0.47	a
<i>S. aureus</i>	5.15	0.61	a
<i>S. hominis</i>	4.15	0.38	a
<i>S. epidermidis</i>	4.10	0.47	a
<i>S. warneri</i>	3.80	0.37	a
<i>S. saprophyticus</i>	3.79	0.38	a
<i>S. xylosus</i>	3.78	0.32	a
<i>S. chromogenes</i>	3.77	0.35	a
<i>S. haemolyticus</i>	3.54	0.50	a
<i>S. intermedius</i>	3.32	0.84	a

No se encontraron diferencias significativas entre aislamientos de SCN y SCP

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

ANEXO 1

FMVZ

INIFAP SAGAR

CUESTIONARIO PARA EL ESTUDIO DE LA MASTITIS BOVINA CAUSADA POR
Staphylococcus COAGULASA NEGATIVOS.

LOS DATOS QUE SE PROPORCIONEN SERAN CONFIDENCIALES Y
SOLAMENTE SE USARÁN CON FINES DE INVESTIGACIÓN.

Fecha _____

Nombre del
encuestador _____

Nombre del
rancho _____

Nombre del propietario del
rancho _____

Ubicación del
rancho _____

1 Número de animales en producción _____

2 Raza _____

3 Porcentaje de mastitis subclínica en el mes anterior del inicio del
estudio _____

4 Número de ordeñadores _____

5 Alojamientos _____

6 Ventilación ()

A) insuficiente (condensaciones, vapor amoniacal)

B) regular

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos

- C) suficiente ()
- 7 Tipo de cama ()
- A) estiércol seco
 - B) bagazo de caña
 - C) tierra
 - D) arena
- 8 Estado de la cama (humedad) ()
- A) mal (insuficiente)
 - B) regular
 - C) bien (seca)
- 9 Tipo de ordeño _____
- 10 Número de ordeños _____
- 11 Higiene de la sala de ordeño ()
- A) mala
 - B) regular
 - C) buena
- 12 Marca de equipo de ordeño _____
- 13 Número de unidades de ordeño _____
- 14 Retirada de pezoneras ()
- A) sin corte de vacío, con entradas de aire
 - B) sin corte de vacío, con escasas entradas de aire
 - C) con corte de vacío
- 15 Duración del ordeño (media en min) _____
- 16 Sobreordeño ()
- A) mucho
 - B) regular
 - C) no
- 17 Conservación de las pezoneras ()
- A) mala
 - B) buena

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

18 Caída de las pezoneras ()

- A) frecuente
- B) algunas veces
- C) casi nunca

19 Tratamiento de secado ()

- A) no
- B) si

20 Control de mastitis ()

- A) diagnóstico sólo por alteración en la producción
- B) prueba de California
- C) prueba de Wisconsin modificada

21 Tratamiento ()

- A) no se realiza
- B) deficiente (tardío, corto)
- C) tratamiento precoz y continuo

22 Vía de administración del tratamiento ()

- A) sólo intramuscular
- B) sólo intramamario
- C) combinado

23 Control de mastitis ()

- A) aislamiento durante el ordeño
- B) ordeño de vacas clínicas al final
- C) separación de lotes (mastitis subclínicas y clínicas)

24 Uso de selladores ()

- A) sí
- B) no

Para el encuestador

25 ¿En qué condiciones se encuentran las instalaciones?

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

26 ¿Cuál es el estado general del ganado?

27 ¿Cómo se aplica el programa de control de mastitis?

Condiciones: mala, regular, buena

ANEXO 2

CODIFICACIÓN DE VARIABLES DE ESTUDIO

Codificación de las variables para capturar la información a la base de datos estudio epidemiológico de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

Vaca= identificación del animal muestreado

Wisc= animales positivos a la prueba de Wisconsin modificada. Es una variable categórica

1= mastitis subclínica

2= sana

calif= calificación del rancho, otorgada con base base a la higiene de la sala de ordeño, estado del equipo de ordeña y otros factores que se comentan en la parte de material y métodos.

6 7 8 9 y 10

part= número de parto de los animales

1 2 3 4 y 5 (incluidos en esta categoría animales de 6, 7, 8 y 9 partos)

ledías= días en leche

1= 1 a 60

2= 60 a 120

3= 121 a180

4= 181 a 240

5= 241 a 310

6= 311 a 370

7 371 a 640

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

lechprod= producción de leche

1 = 1 a 15

2= 16 a 30

3= 31 a 45

4= 46 a 60

5= 61 a 80

estr= número de estrato

1= establos con menos de 200 animales

2= establos con 200 a 400 vacas

3= establos con más de 400 vacas

muestr= número de muestreos

1

2

3

ran= nombre del establo participante

1= San Epigmenio

6= El cupido

2 =Tizayuca 148

7= Establo México

3= Olimpo

8= Granja Ray

4= San Sebastián

9= La Quinta

5= Sta. Clara

10= Tizayuca 147

fecha= Días de muestreo en cada uno de los establos (se indica el mes y el año en que se realizó el muestreo)

1= 0194

7= 0797

2= 0793

8= 0894

3= 0394

9= 0994

4= 0494

10= 0993

5= 0893

11= 0294

6. 0694

12. 0695

hisa= higiene de la sala

1= mala

2= regular

3= buena

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

pezo= conservación de las pezoneras

1= mala

2= bien

soor= sobreordeño

1= mucho

2= regular

3= no hay

capez= caída de pezoneras

1= frecuente

2= algunas veces

3= casi nunca

esca= estado de la cama

1= mal

2= regular

3= seca

cama= material de la cama

1= estiércol seco

2= bagazo de caña

3= tierra

4= arena

aisla= diferentes microorganismos aislados en leche

1= *Staphylococcus xylosus*

2= *Staphylococcus warneri*

3= *Staphylococcus haemolyticus*

4= *Staphylococcus intermedius*

5= *Staphylococcus hominis*

6= *Staphylococcus chromogenes*

7= *Staphylococcus simulans*

Mastitis por *Staphylococcus coagulasa* negativos.

- 8= *Staphylococcus epidermidis*
- 9= *Staphylococcus saprophyticus*
- 10= *Staphylococcus aureus*
- 11= sin crecimiento
- 12= levaduras
- 13= *Streptococcus*
- 14= *Corynebacterium*
- 15= bacilos Gram negativos
- 16= diferentes microorganismos sin identificar
- 17= *Enterococcus*
- 18= *Escherichia coli*
- 19= *Micrococcus*
- 20= *Nocardia*
- 21= *Staphylococcus kloosi*
- 22= *Pasteurella*
- 23= *Klebsiella*
- 24= *Staphylococcus cohnii*