



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL

“DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA  
MOLECULAR (PCR MULTIPLEX) PARA LA  
DETECCIÓN DE LOS PRINCIPALES AGENTES DE  
MASTITIS CAPRINA”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
CIENCIAS

P R E S E N T A

ROCIO ANGELICA RUIZ ROMERO

TUTOR

Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares

COMITÉ TUTORAL

Dr. Andrés E. Ducoing Watty

Dra. Laura Hernández Andrade

México D.F

2010



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.

## DECLARACIÓN

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ EDV Rocío Angélica Ruiz Romero

## DEDICATORIA

Obviamente no hay personas más importantes en mi vida que mis papás este trabajo también es de ustedes por apoyarme siempre al 100%, nunca darme un NO como respuesta y siempre darme lo mejor sin pedirme nada a cambio, ya saben que sin ustedes no hubiera llegado ni a la mitad del camino que llevo recorrido, no lo digo muy seguido pero GRACIAS los quiero con todo mi corazón.

A la familia Hernández Ruiz o sea a mi sister, mi cuñis y al frijolito guapo (Carlos Daniel) los quiero con todo mi corazón y por supuesto a mis 5 peludos que me han acompañado a lo largo de mi vida, son y serán por siempre mi adoración...recuerden que fue por ustedes que descubrí lo mucho que amo mi profesión.

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un  
esfuerzo total es una victoria completa.”*

*Mahatma Gandhi*

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi hermosa "*alma mater*" por darme la mejor educación que podría haber recibido y a mi queridísima Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en especial al Departamento de Microbiología e Inmunología en donde se me dio la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

A mi querido tutor y papá académico el Dr. Roberto A. Cervantes Olivares por creer ciegamente en mí, por todo el apoyo, consejos, confianza y cariño que me ha dado en todos estos años, créame que lo quiero con todo mi corazón.

A los miembros de mi comité tutorial el Dr. Andrés Ducoing Watty y la Dra. Laura Hernández Andrade por su apoyo, consejos y por tomarse el tiempo para ayudarme a sacar adelante este proyecto a lo largo de estos 2 años.

Al Dr. Daniel Martínez Gómez del laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM-Xochimilco, mil gracias por recibirme con las puertas abiertas en su laboratorio, "adoptarme" como su tesista, confiar en mí, permitirme utilizar equipos, material y reactivos y sobre todo regalarme de su tiempo para sacar adelante toda la parte molecular de este trabajo, sin usted este proyecto no hubiera sido posible. MIL GRACIAS!!!!

Al los miembros de mi jurado, el Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dr. Daniel Martínez Gómez, Dr. Javier Gutiérrez Molotla y Dr. Enrique Salas Téllez por su tiempo y sus valiosas correcciones.

A la Dra. Cristina Rodríguez por enseñarme a amar la bacteriología, por ser una excelente jefa y darme todo el apoyo, cariño y facilidades para realizar el procesamiento de las muestras, no olvide que la quiero muchísimo.

Al Dr. Raúl Segura Candelas por todo el apoyo que me brindó en el área de preparación de medios y reactivos por consentirme tanto y siempre tener todo mi material listo, pero sobre todo por su amistad y hacerme reír en los momentos de mayor angustia.

A Samantha porque siempre estuviste en las buenas pero sobre todo en las malas, por ayudarme a superar la tristeza que me distraía de este proyecto, gracias mi Sam, ya sabes que te quiero como a una hermana!!!

A Mau y Nata porque siempre han estado conmigo los quiero!! =)

A mis compañeros del laboratorio de diagnóstico bacteriológico, del laboratorio de micología de la FMVZ-UNAM y del laboratorio de bacteriología de la UAM-Xochimilco por la ayuda brindada en este trabajo, en especial a mis amigos: Luis, Osvaldo y Blanca gracias por hacer mi estancia en la UAM tan divertida....sin ustedes hubiera enloquecido sola....que bueno que enloquecimos los cuatro juntos...los quiero!!!!

A todos los que participaron y que estuvieron conmigo a lo largo de este largo camino, GRACIAS.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN LOS LABORATORIOS DE  
DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO Y EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AGROPECUARIA  
DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA CAMPUS XOCHIMILCO  
Y FUE FINANCIADO POR EL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE  
INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) IN218708.  
LA SUSTENTATE RECIBIÓ BECA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (CONACYT) CON NÚMERO DE REGISTRO 264113.

## CONTENIDO

Página

<b>RESÚMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
• FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE .....	4
• FACTORES PREDISPONENTES A MASTITIS .....	9
• EPIZOOTIOLOGÍA .....	11
• TIPOS DE MASTITIS Y SIGNOS CLÍNICOS .....	12
• ETIOLOGÍA .....	13
• PREVALENCIA.....	14
• TRANSMISIÓN .....	15
• CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS BACTERIANOS CAUSANTES DE MASTITIS.....	16
• IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD .....	20
• INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA .....	21
• DIAGNÓSTICO .....	22
• TRATAMIENTO .....	27
• PREVENCIÓN Y CONTROL.....	28

<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	31
<b>HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	31
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
I. ORÍGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS.....	33
II. CRITERIOS DE INCLUSIÓN <b>DE LAS CABRAS SELECCIONADAS</b> .....	33
III. COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS .....	34
IV. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL.....	34
V. DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	36
a. Extracción de ADN a <b>partir de cepas ATCC</b> .....	36
b. Selección de <b>iniciadores</b> .....	39
c. PCR individual a partir de cepas ATCC.....	40
d. PCR múltiplex a partir de cepas ATCC.....	42
e. Extracción de ADN a partir de leche de cabra.....	42
f. PCR individual a partir de ADN <b>extraído de leche de cabra</b> .....	44
g. PCR múltiplex a partir de ADN extraído de leche de cabra....	44
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	45

## **RESULTADOS**

I. NÚMERO DE MUESTRAS .....	46
II. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL.....	46
III. PRUEBA DE CALIFORNIA Y MUESTRAS POSITIVAS A MASTITIS SUBCLÍNICA.....	47
IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
V. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	49
a. PCR individual a partir de cepas ATCC.....	49
b. PCR múltiplex a partir de cepas ATCC.....	50
c. PCR individual a partir de ADN extraído de leche de cabra.....	50
d. PCR múltiplex a partir de ADN extraído de leche de cabra....	50
<b>DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>REFERENCIAS</b> .....	61

## ÍNDICE DE CUADROS

	<u>Página</u>
<b>Cuadro 1.</b> Esquema General para la Identificación Bacteriana.....	70
<b>Cuadro 2.</b> Secuencia de los iniciadores utilizados para cada gen a detectar.....	71
<b>Cuadro 3.</b> Número total de muestras obtenidas por granja y sistema de producción.....	72
<b>Cuadro 4.</b> Número de muestras con y son crecimiento bacteriano por granja y sistema de producción.....	72
<b>Cuadro 5.</b> Porcentaje de géneros bacterianos aislados por granja y sistema de producción.....	73
<b>Cuadro 6.</b> Especies de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo aislados en muestras de leche.....	74
<b>Cuadro 7.</b> Total de muestras con mastitis subclínica.....	75
<b>Cuadro 8.</b> Resultados de la PCR múltiplex.....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
<b>Figura 1.</b> ADN de <i>Staphylococcus</i> spp.....	77
<b>Figura 2.</b> ADN de <i>Streptococcus uberis</i> ATCC 13386 .....	77
<b>Figura 3.</b> Homología del iniciador 16s Forward para <i>Staphylococcus</i> spp	78
<b>Figura 4.</b> Homología del iniciador 16s Reverse para <i>Staphylococcus</i> spp	78
<b>Figura 5.</b> Homología del iniciador <i>clfA</i> Forward .....	79
<b>Figura 6.</b> Homología del iniciador <i>clfA</i> Reverse .....	79
<b>Figura 7.</b> Homología del iniciador <i>coa</i> Forward.....	80
<b>Figura 8.</b> Homología del iniciador <i>coa</i> Reverse .....	80
<b>Figura 9.</b> Homología del iniciador 16s-23s ARNr Forward .....	81
<b>Figura 10.</b> Homología del iniciador 16s-23s ARNr .....	81
<b>Figura 11.</b> Homología del iniciador <i>skc</i> Forward.....	82
<b>Figura 12.</b> Homología del iniciador <i>skc</i> Reverse.....	82
<b>Figura 13.</b> Constantes de la PCR de la región 16s ARNr de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	83
<b>Figura 14.</b> Constantes de la PCR del gen <i>clfA</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
<b>Figura 15.</b> Constantes de la PCR del gen <i>coa</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	83
<b>Figura 16.</b> Constantes de la PCR de la región 16s-23s ARNr de <i>Streptococcus uberis</i> .....	84
<b>Figura 17.</b> Constantes de la PCR del gen <i>skc</i> de <i>Streptococcus uberis</i> ....	84
<b>Figura 18.</b> Constantes de la PCR múltiplex.....	85

<b>Figura 19.</b> ADN extraído a partir de leche de cabra .....	85
<b>Figura 20.</b> Animales positivos a mastitis subclínica por la prueba de California	86
<b>Figura 21.</b> PCR región 16s de <i>Staphylococcus</i> spp .....	87
<b>Figura 22.</b> PCR gen <i>clfA</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	87
<b>Figura 23.</b> PCR gen <i>coa</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	88
<b>Figura 24.</b> PCR gen <i>clfA</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> para <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo y <i>Streptococcus uberis</i> .....	88
<b>Figura 25.</b> PCR gen <i>coa</i> para <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo y <i>Streptococcus uberis</i> .....	89
<b>Figura 26.</b> PCR Múltiplex para <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo con ADN de cepas ATCC.....	89
<b>Figura 27.</b> PCR región 16S <i>Staphylococcus</i> spp con ADN extraído de leche de cabra.....	90
<b>Figura 28.</b> PCR gen <i>clfA</i> con ADN extraído de leche de cabra.....	90
<b>Figura 29.</b> PCR gen <i>coa</i> con ADN extraído de leche de cabra.....	91
<b>Figura 30.</b> PCR Múltiplex para <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo con ADN extraído de leche de cabra.....	91
<b>Figura 31.</b> PCR Múltiplex a partir de muestras clínicas.....	92

## RESUMEN

El término “mastitis” se utiliza para referirse a la inflamación de la glándula mamaria. A pesar de las pérdidas económicas que produce en cabras lecheras, existe escasa información relativa al estado epidemiológico de la misma en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue identificar bacterias presentes en leche cruda de cabras clínicamente sanas obtenida en sistemas de producción intensivo y semi-intensivo por métodos microbiológicos tradicionales y a partir de los resultados obtenidos desarrollar y estandarizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiplex para diagnosticar a los principales géneros bacterianos causantes de mastitis caprina. Se trabajaron con 28 animales en sistema de producción intensivo y 33 animales en sistema de producción semi-intensivo provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) perteneciente a la FMVZ-UNAM y la granja del Carmen, ambas ubicadas en Tequisquiapan, Querétaro, México. De cada una de las cabras se obtuvieron muestras de ambas glándulas, se realizaron muestreos cada 45 días junto con la prueba de California de las cabras seleccionadas hasta los 240 días de lactación. Se recibieron un total de 484 muestras para análisis bacteriológico tradicional, 90 muestras (18.60%) presentaron crecimiento bacteriano de las cuales se recuperaron 97 aislados. Los géneros bacterianos aislados con mayor frecuencia fueron *Staphylococcus* coagulasa Negativo (SCN) 62/97 (63.92%), *Streptococcus uberis* 10/97 (10.31%) y *Staphylococcus aureus* 5/97 (5.15%). La PCR múltiplex se desarrolló y estandarizó para identificar a los SCN y a *Staphylococcus aureus*. Para lograr la identificación del género *Staphylococcus* spp se utilizó el par de iniciadores diseñados por Mason *et al* correspondientes a la región 16s RNAr, para el caso de *S. aureus* se utilizaron 2 pares de iniciadores, el primer par de iniciadores corresponden al gen *clfA* también diseñados por Mason *et al* y el segundo par corresponden al gen *coa* de *S.aureus* diseñados para este estudio. Los resultados obtenidos a partir de la PCR Múltiplex en 30 muestras de leche demuestran que esta técnica es capaz de detectar a *S. aureus* a pesar de no haber logrado el aislamiento bacteriológico y reduce el tiempo de diagnóstico de la enfermedad.

**Palabras clave:** Mastitis, cabras, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Staphylococcus aureus*, PCR múltiplex.

## ABSTRACT

The inflammation of the udder is known as mastitis and despite the economic impact that it causes in goats, very scarce information exist about this problem in our country. The aim of this study was to identify bacteria in raw milk from clinically healthy goats in intensive and semi-intensive production systems through traditional microbiological methods and develop and standardize the multiplex polymerase chain reaction (PCR) to diagnose most common bacteria involved in caprine mastitis. 28 animals from intensive production system and 33 animals from semi-intensive production system were sampled from the Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA-FMVZ-UNAM) and Granja del Carmen both located in Tequisquiapan, Querétaro, México. The samples were obtained from both glands of each goat. The sampling was made to the selected goats every 45 days along the California mastitis test until 240 lactation days. A total of 484 samples were obtained for the traditional bacteriological analysis, 90 samples (18.60%) were positive to bacterial growth of which 97 isolates were recovered. The most frequently bacteria isolated were coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN) 62/97 (63.92%), *Streptococcus uberis* 10/97 (10.31%) and *Staphylococcus aureus* 5/97 (5.15%). The multiplex PCR was developed and standardized to identify SCN and *S. aureus*. To achieve the identification of *Staphylococcus* spp, the primers designed by Mason et al for the 16s rRNA region were used. Two pair of primers were used for *S. aureus*, the first pair of primers correspond to the *clfA* gene also designed by Mason et al and the second pair were designed for this study and correspond to the *S. aureus coa* gene. The results from the multiplex PCR in 30 milk samples showed that this technique is able to detect *S. aureus* even if isolated of the bacteria failed and if as well reduces the time of the diagnosis.

**Key words:** Mastitis, goats, coagulase-negative Staphylococci, *Staphylococcus aureus*, multiplex PCR.

## INTRODUCCIÓN

La cabra es una de las especies que formó parte de las primeras comunidades en la vida de los humanos, desde los inicios de nuestra civilización. Para el año 2007 la población de cabras a nivel mundial se estimó en 850 millones de cabezas, de las cuales el 5% se encuentra en América Latina y de estas aproximadamente 9.5 millones están en México.<sup>1</sup>

Introducidas por los españoles a México en el siglo XVI, las cabras se continuaron importando hasta el siglo pasado con el objeto de incrementar sus inventarios. En la actualidad dichas importaciones son casi exclusivamente de reproductores provenientes de EE.UU.<sup>1</sup> En casi todo el territorio nacional existen caprinos, pero la producción muestra marcadas características regionales relacionadas con su entorno ecológico, sus sistemas de producción y aspectos de mercado, conformándose en cuatro grandes regiones: <sup>1,2</sup>

**I. Región Árida y Semiárida:** Con una producción de 102 millones de litros\* de leche y con una participación nacional de 73%, prácticamente existen muy pocas explotaciones tecnificadas y prevalece el sistema extensivo.

**II. Región Centro Bajío:** Producción de 35 millones de litros de leche y una participación del 25%.

**III. Región Tropical:** Produciendo 1.5 millones de litros de leche y con una aportación del 1%.

**IV. Región Mixteca:** Con una producción de 1.2 millones de litros de leche y una participación nacional del 1%.

---

\* Millones de litros de leche reportados en el año 2004.

México produce el 42.8% del total de la leche de cabra en el continente Americano con casi 161 millones de litros registrados durante el año 2005 que con respecto a la producción de leche de vaca, representan el 1.6%.<sup>2,3</sup>

### **PRODUCCIÓN DE LECHE DE CABRA EN MÉXICO HASTA EL AÑO 2007<sup>3</sup>**

<b>AÑO</b>	<b>TONELADAS DE LECHE</b>
2003	151 842
2004	160 960
2005	160 952
2006	163 958
2007	167 423

### **FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE<sup>4, 5</sup>**

Existe una cantidad importante de elementos que modifican la producción de leche de cabra, los cuales pueden estar interrelacionados, siendo difícil determinar la influencia individual que pueden ejercer cada uno por separado, sin embargo pueden dividirse fundamentalmente en dos tipos:

#### **I. GENÉTICOS:**

- Raza

#### **II. AMBIENTALES**

- Número de lactancia
- Época del año

- Edad al parto
- Tipo de parto
- Estado de la lactancia
- Duración de la lactancia
- Peso vivo y estado corporal
- Sistema de alimentación
- Factores climáticos
- Infecciones intramamarias (mastitis)

Existen además efectos particulares de cada granja como el estado epidemiológico del rebaño, tipo de construcciones y el manejo en general entre otros.<sup>4</sup>

#### **a) RAZA**

La producción de leche está regida por factores genéticos que influyen significativamente sobre la cantidad y la calidad de la leche producida. La producción de las distintas poblaciones caprinas presenta una fuerte variación individual y además siempre va ligada al sistema de producción, el cual a su vez depende del área de ubicación; es decir, en los países desarrollados, los rebaños caprinos suelen beneficiarse de procesos de selección y el sistema de producción tiende a ser más intensivo, lo que implica un incremento de la productividad, mientras que, en los países en vías de desarrollo, ocurre lo contrario, por lo que sus razas nativas suelen ser poco productoras de leche.<sup>5</sup>

En México, los grupos genéticos utilizados para la producción de leche son el criollo y las razas Saanen, Toggenburg, Alpina, Nubia y Granadina.<sup>4, 6</sup>

### **b) ÉPOCA DEL AÑO**

La época de parto es uno de los factores que mayor influencia tienen sobre la producción total de leche, la duración y la persistencia de la lactancia,<sup>5</sup> en México se ha observado que los partos que ocurren en otoño tienen lactancias más prolongadas.<sup>4</sup>

### **c) EDAD AL PARTO**

La producción total de leche está influenciada por la edad del animal y de la misma forma, el peso de la cabra está fuertemente relacionado con la edad. Por ello, conforme se alcanza el grado de madurez sexual en relación al peso y edad en el menor tiempo posible, las cabras tendrán más temprano su primer parto, con lo que se incrementa la posibilidad de conseguir un mayor número de lactaciones a través de su vida productiva.<sup>4, 6</sup>

La glándula mamaria es uno de los tejidos del organismo con mayor capacidad de biosíntesis y secreción, la cual responde directamente a los estímulos fisiológicos; así, la formación de nuevos alvéolos funcionales en lactaciones sucesivas tiende a disminuir a partir de aquel número de parto en el cual se haya alcanzado el máximo nivel de producción.<sup>4</sup>

#### **d) TIPO DE PARTO**

Las cabras de parto múltiple alcanzan valores superiores debido a las siguientes causas:

- Mayor estímulo producido en la glándula mamaria por el mayor número de cabritos lactantes. Las cabras multíparas pueden producir hasta 11% más de leche que las de parto simple.<sup>4, 5</sup>
- El mayor número de cabritos gestados se corresponde con un aumento del volumen de la placenta, lo que produce un incremento de la hormona lactógeno placentario que favorece el desarrollo del tejido glandular de la ubre.<sup>5</sup>

#### **e) NÚMERO DE LACTANCIA**

La vida productiva de una cabra lechera puede ser de una a ocho lactancias, de las cuales, la mayor cantidad de leche se obtiene entre la segunda y cuarta lactancia, esto depende de la raza, la edad al primer parto, así como el manejo nutricional de los animales.<sup>4-6</sup>

#### **f) ESTADO DE LA LACTACIÓN**

La producción de leche diaria y su composición no permanecen constantes a lo largo de la lactación. La curva de lactación caprina presenta:<sup>5</sup>

- **Fase inicial o ascendente:** Su máximo se sitúa entre la cuarta y séptima semana postparto.
- **Fase de meseta o de producción máxima:** Dura de una a dos semanas.
- **Fase descendente:** Progresiva y lenta, va hasta el secado.

### **g) DURACIÓN DE LA LACTANCIA**

La duración de la lactancia depende del tipo de raza utilizada y de las diferentes condiciones ambientales y manejo particularmente alimenticio de los animales, de esta forma se han obtenido rangos de duración entre 200 y 300 días en grupos genéticos especializados en producción de leche<sup>4, 6</sup>

### **h) PESO DEL ANIMAL Y ESTADO CORPORAL**

El peso corporal es responsable de aproximadamente un 30% de la variación de la producción de leche, la diferencia en tamaño tiene una marcada influencia en la producción de leche en cabras criollas, especializadas o en cruza de criollas con estabuladas.<sup>4, 6</sup>

### **i) SISTEMA DE ALIMENTACIÓN**

La nutrición es uno de los factores determinantes de la producción de leche de cabra, la cual define el sistema y nivel productivo por lo que se pueden separar los sistemas por el tipo de manejo en intensivo en donde las granjas están totalmente tecnificadas empleando un sistema de ordeño mecánico y se les proporciona a los animales el alimento necesario para suplir sus necesidades tanto de mantenimiento como de gestación o lactación, alcanzando mayores producciones de leche, semi-intensivo en donde se comienza a suplementar el alimento al momento del parto y sistema extensivo en donde el rebaño aprovecha los recursos naturales mediante el pastoreo adaptándose a los factores limitantes y ecológicos del medio en el que se desarrollan.<sup>4, 6</sup>

## **j) FACTORES CLIMÁTICOS**

La temperatura tiene un efecto marcado sobre la producción de leche, la cual puede producir un estrés térmico y disminuir la producción de leche obtenida.<sup>4</sup>

## **k) INFECCIONES INTRAMAMARIAS**

El término “mastitis” es un término general que se utiliza para referirse a la inflamación de la glándula mamaria, independientemente de la causa. La primera consecuencia de la mastitis es una disminución de la producción de leche y esta se caracteriza por cambios físicos, químicos y bacteriológicos en la leche y cambios patológicos en la ubre.<sup>5, 7</sup>

## **FACTORES PREDISPONENTES A MASTITIS BACTERIANA**

Existen varios factores de riesgo que influyen en el tipo y frecuencia de los microorganismos causantes de mastitis como son: higiene en la ordeña, fase de lactación, ubicación geográfica, manejo, etapa de lactación.<sup>8-10</sup>

### **a) HIGIENE EN LA ORDEÑA**

El equipo y la rutina de ordeño son los principales factores predisponentes a mastitis durante la lactación. La máquina ordeñadora puede actuar como una bomba que impulsa a los microorganismos hacia dentro del pezón de las cabras. Las alteraciones en el aire pulsado, consecuencia de falta de limpieza en los pulsadores y las fluctuaciones de vacío, causadas por obstrucción de los colectores de leche, son las principales fallas encontradas en el funcionamiento de las unidades de ordeño que favorecen la presentación de mastitis.<sup>11</sup>

La máquina de ordeño favorece la transferencia de microorganismos de una ubre infectada a una ubre sana y la implantación de microorganismos en las lesiones

cutáneas o del epitelio del conducto del pezón, resultado de un vacío excesivo y/o de un sobreordeño.<sup>11</sup>

Si la máquina ordeñadora permanece en el pezón del animal en el momento que termina el ordeño, la parte superior del pezón puede cerrarse formándose un vacío en el lumen del conducto del pezón. Debido a que la leche contiene dióxido de carbono y otros gases, el gas puede expandirse y formar un “espacio vacío” que propicia la transferencia de los microorganismos hacia el interior de la luz del pezón, el espacio vacío puede aumentar dependiendo del tiempo en que el pezón este expuesto a la ordeñadora.<sup>11</sup>

Si el conducto galactóforo se bloquea debido al sub-ordeño, la secreción láctea continúa acumulándose por un tiempo en el seno y cavidades del pezón predisponiéndola a infecciones.<sup>11</sup>

## **b) FASE DE LACTACIÓN**

La fase de lactación puede influir en la frecuencia de la mastitis caprina, en cabras hay un periodo seco muy corto o puede no existir.<sup>10</sup> En la lactación temprana puede aumentar el riesgo de infecciones intramamarias, posiblemente debido a que la enfermedad se inició en el periodo seco y en lactación avanzada por el sobreordeño al que están sometidos los animales.<sup>11</sup>

## **c) UBICACIÓN GEOGRÁFICA**

El espectro de bacterias causantes de mastitis en diferentes países varía dependiendo de factores como el sistema de producción y el fin zootécnico.<sup>7-12</sup>

#### **d) MANEJO**

Las bacterias que causan las mastitis son numerosas, con diferentes factores de patogenicidad, pudiéndose distinguir entre patógenos saprófitos oportunistas que viven habitualmente en camas, agua, estiércol, y patógenos mamarios que son los que viven en el interior de ubres infectadas y tienen poca resistencia en el medio externo. Los patógenos ambientales, como enterobacterias y enterococos, suelen penetrar a la ubre en los periodos entre ordeños, cuando el animal reposa y entra en contacto con las heces o la cama contaminada por lo que la transmisión en los periodos entre ordeños adquiere especial relevancia. Por el contrario, los patógenos mamarios (estafilococos, estreptococos) se transmiten de glándulas infectadas a glándulas sanas a través del ordeño, haciendo difícil su erradicación.<sup>12</sup>

#### **e) ETAPA DE LACTACIÓN**

En cabras se ha observado que el mayor número de casos de mastitis se presenta al iniciar el ordeño mecánico durante el primer tercio de lactación.<sup>10</sup>

#### **EPIDEMIOLOGÍA**

La mastitis caprina es cosmopolita, la mastitis se puede transmitir cuando las cabras son transportadas de un área geográfica a otra y los animales son mezclados con motivo de ferias, exposiciones ganaderas o importaciones de cabras. Este constante desplazamiento ha originado que el contagio de microorganismos patógenos productores de mastitis sea cada vez más frecuente.

<sup>10, 11</sup>

## **TIPOS DE MASTITIS Y SÍGNOS CLÍNICOS**

La mastitis puede ser clasificada según la gravedad de las lesiones o intensidad de la reacción inflamatoria en clínica y subclínica.<sup>13</sup>

### **1. MASTITIS CLÍNICA**

En la mastitis clínica se observan signos como cambios en la glándula ya que el medio afectado puede tener aumento de tamaño y también alteraciones en la leche que puede contener grumos, coágulos y cambios de color.<sup>7</sup>

Los casos agudos se caracterizan por una presentación súbita, dolor, inflamación, enrojecimiento, disminución y alteraciones en la secreción láctea de las glándulas afectadas. La secreción de coágulos, grumos y leche con aspecto de agua son los signos clínicos más comunes y en algunos casos pueden ser fatales. La inflamación aguda de la ubre puede producir claudicaciones, porque el miembro posterior roza con la glándula afectada. Si la mastitis es unilateral, la glándula afectada puede estar más grande que la sana.<sup>7, 11,</sup>

### **2. MASTITIS SUBCLÍNICA**

En la mastitis subclínica no se observan signos visibles de enfermedad y la leche es aparentemente normal. Este tipo de mastitis sólo puede ser detectada midiendo el contenido celular de la leche (células somáticas). Las células predominantes en la leche son las células epiteliales y leucocitos, las cuales incrementan su cantidad (millones/ml).<sup>7, 11</sup>

La presentación subclínica es importante, debido a:<sup>7</sup>

- Tiene de 15 a 40 veces más prevalencia que la forma clínica.
- Usualmente precede a la forma clínica.
- Es de larga duración.
- Es difícil de detectar.
- Reduce la producción láctea.
- Afecta la calidad de la leche.
- Constituye un reservorio de microorganismos que pueden llevar a la infección de otros animales del rebaño.

## **ETIOLOGÍA**

La mastitis puede ser causada por agentes infecciosos como bacterias, hongos, virus, micoplasmas y rickettsias o por origen traumático. Si se trata de una mastitis bacteriana, que es la más común, debe realizarse la identificación del agente y el antibiograma para indicar el tratamiento específico.<sup>8, 12</sup>

Las bacterias causantes de mastitis, pueden dividirse en dos grandes grupos:

1. Patógenos mamarios en los cuales se incluyen a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.
2. Patógenos ambientales en los que se encuentran bacterias Gram negativas y otras especies de estreptococos.<sup>9, 10</sup>

## PREVALENCIA

En México existe poca información concerniente a la mastitis en cabras, Amezcua *et al*, en 1981, analizó 565 muestras de leche de cabra para determinar la prevalencia de mastitis subclínica en cabras ordeñadas mecánicamente en la zona central del Bajío y encontró que el 16.3 % de las muestras resultaron infectadas y los agentes bacterianos aislados con mayor frecuencia fueron: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus* spp, otras bacterias aisladas fueron *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Escherichia coli*.<sup>14</sup>

La persistencia en las infecciones de la ubre se debe a la carencia de una detección precoz de infecciones intramamarias (IIM) y la falta de una aplicación sistemática de programas de control de antisepsia del pezón, antibioterapia o sacrificio.<sup>10</sup>

La persistencia bacterial extra-mamaria se debe principalmente a fallas en las técnicas de higiene que se aplican en las ordeñadoras, una mala desinfección de maquinas y un mal uso de selladores.<sup>10</sup>

También una alta densidad de población durante el periodo de lactancia contribuye a tener en el ambiente una alta concentración de microorganismos mesofílicos, coliformes y estafilococos, que seguramente se asocian a una incorrecta ventilación y una alta humedad.<sup>11</sup>

La prevalencia del hato se puede calcular analizando el conteo de células somáticas en leche del tanque ya que es la manera más fácil y económica de estimar el estado sanitario del rebaño, esto se puede realizar con una frecuencia mensual.<sup>10</sup>

## TRANSMISIÓN

La mastitis casi siempre es contagiosa y se puede transmitir de cabra a cabra, a través de las manos del ordeñador, toallas, pezoneras de la máquina ordeñadora, cama, pisos y también por medio de los cabritos (vía oral). La penetración de microorganismos en la ubre se da a través del ducto del pezón.<sup>10, 11</sup>

La principal fuente de infección son los animales con mastitis subclínica ya que son los principales reservorios de *Staphylococcus* spp. Tanto *Staphylococcus* coagulasa negativos y *S. aureus* se pueden aislar a partir de la piel sana del pezón, otras bacterias que pueden estar presentes son *Streptococcus agalactiae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mannheimia haemolytica*, esta última se transmite a través del amamantamiento.<sup>8, 10</sup>

Las bacterias presentes en el ambiente son enterobacterias y enterococos principalmente en el suelo y *Pseudomonas* spp esta presente en el agua y en ambientes húmedos. También existen hongos filamentosos presentes como *Aspergillus fumigatus* que se ha aislado a partir del forraje y el aire. *Streptococcus uberis* y *Streptococcus suis* tienen como reservorio a los animales infectados y el medio ambiente.<sup>10</sup>

## CARACTERÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS BACTERIANOS CAUSANTES DE MASTITIS

### a) *Staphylococcus* spo

Son cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro que pueden estar solos, en pares, tetradas, cadenas cortas (3 – 4 células) o estar agrupados en forma de racimos irregulares. Estas bacterias son catalasa positiva y anaerobios facultativos con excepción de *S. aureus* subsp *anaerobius* y *S. saccharolyticus* que son anaerobios estrictos.<sup>15</sup> Hasta la fecha se han caracterizado más de 50 especies y subespecies del género *Staphylococcus*, este se divide en *Staphylococcus* coagulasa positivos (SCP) y *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) basados en su habilidad para coagular el plasma sanguíneo.<sup>16,17</sup>

*S. aureus* es capaz de producir 2 tipos de coagulasa: libre o unida a la célula bacteriana. La coagulasa libre (gen *coa*) es responsable de la coagulación del plasma sanguíneo y la coagulasa unida (gen *clfA*) es responsable del factor de agregación o *clumping factor*;<sup>18</sup> la producción de ambos tipos de coagulasa está asociada a la virulencia.<sup>19</sup>

La coagulasa libre es producida por la mayoría de las cepas de *S. aureus* y su producción es el principal criterio utilizado en el laboratorio de microbiología para la identificación de esta especie.<sup>19</sup> Esta coagulasa libre o estafilocoagulasa es una proteína extracelular que se une a la protrombina formando un complejo de estafilotrombina que estimula la reacción de coagulación en el plasma convirtiendo el fibrinógeno en fibrina.<sup>20</sup>

Se cree que los SCP diferentes a *S. aureus* presentan distintas proteínas a esta especie pero con actividad similar para coagular el plasma o posiblemente presenten una coagulasa similar a *S. aureus*, por lo anterior, es posible que los diferentes tipos de coagulasa y la diversidad de sus secuencias en cepas diferentes a *S. aureus* jueguen un papel importante en la especificidad de especies.<sup>17</sup>

Además de *S. aureus*, se han reportado otras 6 especies de SCP los cuales son: *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*, *S. Schleiferi* subsp *coagulans*, *S. hyicus* y *S. lutrae*. Tales especies al igual que *S. aureus* colonizan la piel y mucosas de los mamíferos.<sup>17, 21, 22</sup>

Como se mencionó anteriormente, el gen *clfA* codifica a una proteína (adhesina) de superficie de unión a fibrinógeno, también conocida como factor de agregación o *clumping factor* que está localizada en la superficie de la célula bacteriana.<sup>23</sup>

Dicho gen se encuentra en el cromosoma de todas las cepas de *S. aureus*.<sup>24, 25</sup> El factor de agregación juega un papel importante en la virulencia de este patógeno<sup>18</sup> y ha sido caracterizada como la principal proteína de unión a fibrinógeno de *S. aureus*.<sup>26</sup> La habilidad de *S. aureus* de adherirse al fibrinógeno es fundamental para el inicio de la infección.<sup>23</sup> La interacción bacteria-fibrinógeno resulta en una agregación instantánea de las bacterias. La afinidad es muy elevada y la agregación ocurre con bajas concentraciones de fibrinógeno.<sup>24</sup>

Un grupo importante de *Staphylococcus* spp son los llamados *Staphylococcus* coagulasa negativos, en un diagnóstico rutinario de mastitis normalmente los SCN no son identificados a nivel de especie y son tratados como un grupo uniforme.

Los SCN han sido considerados como patógenos menores causantes de mastitis ya que generalmente ocasionan una mastitis subclínica en comparación con otros patógenos mayores como *S. aureus*, *Streptococcus* spp y coliformes.<sup>16, 17</sup>

Los SCN han sido considerados como microbiota normal de la piel y existen estudios donde se menciona que *S. chromogenes* y otros SCN pueden jugar un papel importante brindando protección contra infecciones intramamarias causadas por otras bacterias como *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* pero solamente se ha demostrado *in vitro*,<sup>27, 28</sup> sin embargo, estos SCN también actúan como bacterias oportunistas causando mastitis y la epidemiología de la mastitis causada por este grupo sigue siendo incierta.<sup>29</sup>

Varios autores resaltan la importancia de las infecciones intramamarias causadas por SCN, a pesar de esto, los factores de virulencia de estos agentes aún no están del todo claros, los SCN al igual que *S. aureus* expresan varias toxinas y enzimas que contribuyen a la virulencia tales como hemolisinas, leucocidinas, lipasas, proteasas y Dnasa.<sup>30</sup>

*S. chromogenes* es causante de un mayor número de infecciones que otros SCN además de incrementar el nivel del CSS, algunas cepas presentan una metaloproteasa de 34-36 kDa que podría ser su mayor factor de virulencia por ser citotóxica. Zhang *et al.*<sup>30</sup> desafiaron cabras con cepas de *S. chromogenes* citotóxicas ocasionándoles mastitis clínica y subclínica, así como edema, daño epitelial e infiltración por neutrófilos en el tejido mamario, por lo que proponen que esta metaloproteasa causa daño en el epitelio mamario causando daño vascular y migración de neutrófilos.<sup>30,31</sup>

Otros factores de virulencia que posiblemente presentan los SCN aislados de mastitis de rumiantes son enterotoxinas y toxinas del síndrome del shock tóxico que originalmente se identificaron en *S. aureus*, Park *et al.*<sup>32</sup> identificaron a estas toxinas a través de PCR pero llegaron a la conclusión de que los genes que codifican a estas toxinas en los SCN aislados de infecciones intramamarias son inestables perdiendo su estabilidad de generación en generación.<sup>32</sup>

En el caso de *S. xylosus* se ha identificado una lipasa de aproximadamente 70 kDa posiblemente implicada en procesos patogénicos pero no esta clara su actividad en los casos de mastitis.<sup>33</sup>

#### **b) *Streptococcus spp***

Este género bacteriano está compuesto por cocos Gram positivos con un diámetro menor a 2 µm, la división celular ocurre en un solo plano por lo tanto las células nacientes forman cadenas, son bacterias facultativas, catalasa negativo, inmóviles, la mayoría de las especies patógenas poseen un carbohidrato serológicamente activo que es antigénicamente diferente entre grupos de especies. Estos antígenos de pared están agrupados en los llamados serogrupos de Lancefield designados en grupos que van del A – H y K –V. En los serogrupos B, C, D, E, L, U y V se encuentran las especie biogénicas que afectan a los animales y humanos.<sup>15</sup> Las especies de *Streptococcus spp* asociadas a casos de mastitis son *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*.<sup>15</sup>

En cuanto a los factores de virulencia, el gen activador del plasminógeno (*skc*) de *S. uberis* codifica a una proteína de 286 aminoácidos (aa) que incluye un péptido señal de 25 aa. Los activadores de plasminógeno de diferentes microorganismos

ayudan a éstos a lisar la fibrina y otras proteínas de la matriz extracelular facilitando la penetración de las bacterias a los tejidos facilitando la colonización bacteriana.<sup>34</sup> Una vez activado el plasminógeno por la estreptokinasa de *S. uberis*, éste adquiere actividad de plasmina localizada en la superficie y esta plasmina unida a la superficie bacteriana es susceptible de incrementar las concentraciones de NaCl y lisina. Para un microorganismo capaz de producir mastitis como *S. uberis*, la producción de un activador de plasminógeno puede ser importante de dos maneras: Además de generar la actividad de la plasmina necesaria para la degradación de las proteínas de la matriz extracelular y la subsecuente colonización, la activación del plasminógeno endógeno presente en la leche puede llevar a una hidrólisis de las proteínas de la leche y por lo tanto a la liberación de péptidos de los cuales *S. uberis* puede obtener aa esenciales para su metabolismo.<sup>34</sup>

### **IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD**

La importancia de la mastitis es principalmente económica y de salud pública.<sup>10</sup> Para mantener la calidad sanitaria de la leche, se deben de controlar varias fuentes de contaminación que pueden ser endógenas (organismos que contaminen la leche *in vivo*) o exógenas (manejo de la leche después del ordeño).<sup>18</sup>

Algunas enfermedades pueden ser transmitidas a los humanos a través de la leche como salmonelosis, tuberculosis, brucelosis, listeriosis, toxoplasmosis, infecciones causadas por estreptococos, estafilococos.<sup>7, 35, 36</sup>

## **INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

El intenso manejo al que pueden estar sometidos los animales afecta la defensa de la glándula mamaria.<sup>37</sup> El ganado lechero está expuesto a factores genéticos, fisiológicos y ambientales que comprometen la inmunidad del animal incrementando la incidencia de mastitis en el rebaño. Existe una correlación negativa entre la capacidad de producir leche y la resistencia a mastitis. Las máquinas ordeñadoras pueden ocasionar traumatismos en el pezón que facilita la penetración de organismos causantes de mastitis.<sup>37</sup>

Uno de los factores más importantes que tiene influencia en la defensa de la glándula mamaria es el estado de lactación ya que los animales son especialmente susceptibles a padecer mastitis en el parto debido a una baja en la defensa de la glándula mamaria.<sup>37</sup>

La glándula mamaria está protegida por varios mecanismos que se pueden dividir en dos categorías: inmunidad innata e inmunidad adquirida. La inmunidad innata de la glándula mamaria está mediada por barreras físicas de la parte terminal del pezón, macrófagos, neutrófilos, células NK y factores solubles; la parte terminal del pezón está considerada la primera línea de defensa contra la mastitis ya que es la ruta de entrada de los patógenos de la glándula mamaria, el pezón se cierra entre ordeños y evita la penetración bacteriana. El canal del pezón está recubierto de queratina la cual es crucial para mantener la función de barrera del pezón, la queratina actúa obstruyendo el paso de las bacterias evitando la migración a la cisterna de la glándula mamaria, además los ácidos grasos presentes en la queratina como el ácido mirístico, ácido palmítico y linoleico

actúan como agentes bacteriostáticos.<sup>37, 38</sup> Si el patógeno es capaz de evadir o no es completamente eliminado por el sistema de defensa innato se activa la inmunidad específica o adquirida conformada por linfocitos e inmunoglobulinas.<sup>37,39</sup>

## **DIAGNÓSTICO**

### **1. CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN EL REBAÑO**

El diagnóstico clínico y bacteriológico son útiles, sin embargo, el diagnóstico se enfoca a la detección de mastitis subclínica mediante el conteo de células somáticas (CCS).<sup>7, 40</sup>

La cuenta de leucocitos en leche, procedentes de la sangre junto con un número relativamente menor de células epiteliales derivadas de la descamación del tejido glandular mamario son conocidas como células somáticas (CS). Estas células son parte importante del mecanismo de defensa inespecífico de las cabras.<sup>40</sup>

La leche normal de cabra tiene un conteo celular mayor que la leche normal de vaca lo cual se debe a un aumento en la descamación de estas células y a la presencia de masas citoplasmáticas que ocurre como consecuencia del proceso de secreción apócrina en la que, además de la leche secretada se liberan células secretoras y por lo tanto su citoplasma.<sup>7, 41, 42</sup>

La cuenta de células somáticas en la leche de cabra está ampliamente aceptada como indicador del estado de salud de la glándula mamaria. Para su determinación, se dispone de diferentes procedimientos los cuales se basan en la identificación de los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de las células somáticas.

Los procedimientos más empleados en México son la prueba de California para

mastitis y la prueba de Wisconsin utilizadas a nivel de campo.<sup>8</sup> Otros métodos de importancia son la cuenta microscópica de células somáticas, el contador infrarrojo y el contador electrónico o Fossomatic.<sup>41</sup>

Los contadores celulares electrónicos no pueden diferenciar entre células epiteliales, masas citoplasmáticas o células blancas, por lo tanto cuando las dos primeras están presentes en altas cantidades los contadores celulares también van a enumerar a estas células.<sup>7</sup>

Existen algunos factores que afectan la cuenta de células somáticas en la leche de cabra, entre ellos se encuentran: raza, edad, parto, número de crías, etapa de lactación, estro, nivel de producción, condiciones de manejo y las infecciones intramamarias presentes en el momento de la medición.<sup>9, 41, 42</sup>

## INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA DE CALIFORNIA EN LECHE DE CABRA<sup>43</sup>

PUNTUACIÓN PRUEBA DE CALIFORNIA	REACCIÓN	NÚMERO DE CÉLULAS/ML
0	Sin reacción	0 - 480 000
Trazas	Se forma un precipitado ligero en el piso de la paleta que tiende a desaparecer con los movimientos circulares.	$\leq 750\ 000$
1	Se forma un precipitado pero sin la formación de un gel.	750 000 – 2 000 000
2	Se forma un gel de inmediato.	$\geq 2\ 000\ 000$
3	Se forma un gel muy denso que se adhiere a la paleta	$\geq 10\ 000\ 000$

## 2. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL

El aislamiento de bacterias en leche de cabras con mastitis es considerada como el diagnóstico definitivo para esta entidad, además de proporcionar información importante para la prevención y control de la enfermedad. En la mayoría de los laboratorios clínicos, los métodos de identificación se basan en el cultivo microbiológico de la leche y en pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas. Las ventajas del cultivo microbiológico son que las bacterias causantes pueden ser identificadas y realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos para orientar a

los productores acerca del tratamiento que pueden llevar a cabo para controlar la enfermedad en el rebaño.<sup>44, 45</sup>

Sin embargo, también hay varias desventajas asociadas al cultivo microbiológico ya que los animales con mastitis subclínica pueden eliminar al microorganismo causante de manera intermitente durante la lactación, por lo que el cultivo microbiológico de la leche no garantiza el aislamiento del agente causal de los medios afectados con mastitis subclínica debido a que el número de microorganismos es muy bajo al momento de colectar la muestra. Los cultivos negativos también pueden deberse a la aplicación de antibióticos, presencia de leucocitos y un alto CCS en leche que inhiben el crecimiento bacteriano *in vitro*, además los cultivos microbiológicos de leche toma más de 48 horas en lograr el aislamiento e identificación bacteriana utilizando pruebas bioquímicas. Debido a estas limitantes, se han desarrollado técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar varios patógenos involucrados en la mastitis que ofrecen una opción rápida para la identificación de bacterias.<sup>44, 45</sup>

### **3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

La introducción de métodos de biología molecular en los laboratorios de microbiología clínica es de gran apoyo a la hora de obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor intervalo de tiempo posible. Estos métodos no sustituyen, sino que complementan los métodos microbiológicos tradicionales. El análisis integrado de todos ellos está llevando a resultados más confiables. De entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la PCR ha adquirido un gran valor

diagnóstico, permitiendo la detección de agentes etiológicos, y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez.<sup>46</sup>

Desde hace algunos años, ha tomado gran interés el desarrollo de las denominadas PCR múltiplex, reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias blanco, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés.<sup>46, 47</sup> En el caso de una PCR múltiplex, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada blanco y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de iniciadores, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo. En el caso de los iniciadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias premisas:<sup>46</sup>

- a) Escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen dímeros.
- b) Tener temperaturas de alineamiento similares.
- c) Cada par de iniciadores debe amplificar una única secuencia blanco.
- d) Deben generar amplificaciones de tamaño suficientemente diferente como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación.

En un principio, los protocolos partían del ADN extraído a partir de colonias bacterianas o de cultivos líquidos puros, sin embargo, actualmente el objetivo es

realizar la identificación directamente a partir de las muestras clínicas, con lo que el diagnóstico sería mucho más rápido.<sup>46</sup>

La combinación óptima en la temperatura de alineamiento y la concentración de sales es esencial para obtener amplificadores específicos en la PCR, La concentración de cloruro de magnesio debe ser proporcional a la cantidad de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). En la PCR múltiple el ajuste de la concentración de los iniciadores es esencial para lograr la amplificación de cada gen y aunque no existe un "límite" en el número de secuencias que pueden ser amplificadas, se han reportado PCR múltiple en las que se han logrado amplificar hasta nueve fragmentos del gen de la distrofia muscular humana.<sup>47</sup>

El PCR múltiple se proyecta como una herramienta de diagnóstico muy útil en el futuro inmediato, aunque los métodos clásicos (pruebas de rutina y aislamientos) no pueden dejarse de lado y deben ir en paralelo, para corroborar los resultados de las pruebas moleculares.<sup>46, 47, 48</sup>

## **TRATAMIENTO**

Se debe evaluar el costo del tratamiento y si es recomendable aplicarlo o es más conveniente el desecho del animal. Sin embargo, el primer paso es salvar la vida del animal así como la glándula afectada.<sup>7</sup> En algunos países la antibioterapia es ampliamente utilizada en el periodo seco para mantener el control en el conteo celular de la leche.<sup>10</sup>

La resistencia a los antimicrobianos observada en los últimos años se debe al tratamiento con estos productos como penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas,<sup>12</sup> sin haber realizado los aislamientos bacterianos y

su antibiograma correspondiente, a pesar de que el costo de los exámenes y tratamientos específicos para la mastitis es mínimo en comparación con las grandes pérdidas que esta enfermedad significa en la producción de leche. Además, la proporción de aislados resistentes depende de las condiciones sanitarias que favorecen la presencia de algunos géneros bacterianos y los patrones de uso de estos fármacos tienen un papel importante. Por esto, es necesario realizar muestreos regulares, en cada granja, para conocer los cambios en la ecología bacteriana y la resistencia a antimicrobianos para indicar terapias anti-mastíticas eficientes.<sup>7</sup>

## **PREVENCIÓN Y CONTROL**

Debido a que la mastitis no puede ser eliminada totalmente del rebaño, la prevalencia se puede reducir al mínimo.<sup>7</sup>

### **1. MANEJO DEL REBAÑO**

Un buen manejo del rebaño es importante en el control de la enfermedad. La importancia de una cama limpia y seca, ausencia de lesiones en la glándula y un ordeño eficiente ayuda considerablemente en el control. El establo y sala de ordeña deben de tener una buena ventilación para proveer un ambiente limpio y confortable al rebaño. Todas las cabras deben de estar descornadas, esto ayuda a reducir riesgo de lesiones en la glándula y pezones. Las cabras con abscesos abiertos deben de aislarse del resto o de preferencia ser eliminadas del rebaño. El pelo en la ubre debe de ser recortado para evitar la acumulación de suciedad y humedad.<sup>7, 11</sup>

## **2. UBRE**

Las ubres deben de ser examinadas antes del ordeño o en el período seco y estar seguros de que sean suaves y flexibles, sin áreas de tejido cicatrizal. Los pezones deben tener buena apariencia y ningún daño.<sup>7, 11</sup>

## **3. PROCEDIMIENTOS ANTES DEL ORDEÑO**

Antes del ordeño, los pezones deben ser lavados con toallas de papel individual conteniendo una solución antiséptica. Esto es especialmente importante cuando los animales son ordeñados con máquina ya que la reversión de flujo de aire pueden forzar a los microorganismos a introducirse a la cisterna del pezón.<sup>7, 11</sup>

## **4. PREORDEÑO**

Los pezones se deben lavar con agua tibia y secarla con una toalla de papel desechable. La cabra debe ser ordeñada rápida y totalmente evitando el sobre o subordeño.<sup>11</sup>

## **5. ORDEÑO MANUAL**

Los ordeñadores deben lavarse, desinfectarse las manos y mantenerlas secas. Se recomiendan los guantes de plástico ya que son más fáciles de limpiar y desinfectar.<sup>11</sup>

## **6. ORDEÑO MECÁNICO**

El equipo de ordeño requiere de revisiones constantes, manteniendo y verificando diario los niveles de vacío, pulsaciones efectivas y pérdida de vacío.<sup>11</sup>

## **7. ELIMINACIÓN DE ANIMALES INFECTADOS**

Las cabras con infecciones crónicas deben de ser eliminadas del rebaño, ya que si el tratamiento previo no dio resultado, probablemente no se podrá eliminar la infección, además de ser animales que disminuirán su producción va a ser la fuente de infección al resto de los animales.<sup>7</sup>

## **JUSTIFICACIÓN**

A pesar de las pérdidas económicas que produce la mastitis en cabras lecheras en México, existe escasa información relativa al estado epidemiológico de la misma en nuestro país, el presente estudio tiene la finalidad de establecer los grupos bacterianos presentes en leche de cabras con mastitis clínica y subclínica y si existen diferencias entre los géneros bacterianos aislados en la leche de acuerdo a los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo.

## **HIPÓTESIS**

Al utilizar los aislados más frecuentes para desarrollar y estandarizar la PCR múltiple, se podrán identificar de forma rápida a los principales géneros bacterianos causantes de mastitis caprina.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y estandarizar la técnica de PCR múltiple para diagnosticar a los principales géneros bacterianos causantes de mastitis caprina.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar bacterias presentes en leche cruda de cabras clínicamente sanas obtenida en los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo por métodos bacteriológicos tradicionales.
2. Conocer el estado sanitario de la leche a través de la prueba de California y el aislamiento bacteriológico seleccionando las muestras con mastitis clínica y subclínica para conocer a los agentes bacterianos involucrados en esta enfermedad.

3. Estandarizar la técnica de PCR múltiplex que ayudará a tener un diagnóstico rápido de los principales agentes bacterianos involucrados en la mastitis caprina en México y ofrecer una nueva alternativa más precisa en el diagnóstico de esta enfermedad a los productores.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **I. ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS**

#### **a) CENTRO DE ENSEÑANZA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN EN PRODUCCIÓN ANIMAL EN ALTIPLANO (CEIEPAA)**

Ubicado en Tequisquiapan, Querétaro, México, esta granja pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Se trabaja con un sistema intensivo pero fundamentalmente con un sistema de doble propósito orientado a la producción de leche con las razas especializadas Alpino Francés, Toggenburg y Saanen; la alimentación se basa en el pastoreo y complementación estratégica dependiendo del estado productivo del rebaño. Se seleccionaron 17 cabras pertenecientes al sistema de producción intensivo y 17 cabras pertenecientes al sistema de producción semi-intensivo.

#### **b) GRANJA DEL CARMEN**

Ubicado en Tequisquiapan, Querétaro, México, al igual que en el CEIEPAA las razas son las que se trabajan son Alpino Francés, Toggenburg y Saanen en un sistema de producción intensivo y semi-intensivo. Se seleccionaron 11 cabras del sistema de producción intensivo y 16 cabras del sistema de producción semi-intensivo.

### **II. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LAS CABRAS SELECCIONADAS**

Todas las cabras se encontraban clínicamente sanas al momento del muestreo, presentaban de uno a cinco partos y con una condición corporal media, el ordeño se realiza de forma mecánica una vez al día.

### **III. COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**

De cada una de las cabras se obtuvieron muestras de los 2 medios, a partir del día 15 post-parto se realizaron muestreos cada 45 días junto con la prueba de California de las cabras seleccionadas hasta los 240 días de lactación en las hembras que lograron tal persistencia en la misma, de tal forma que los muestreos se realizaron en los días 15, 60, 105, 150, 195 y 240 días post-parto. Dichos muestreos consistieron en la desinfección de los pezones con torunda y alcohol al 70% y la extracción manual y desecho de los tres primeros chorros de leche de cada una de las glándulas, posteriormente, se obtuvieron 30 ml de leche de los dos medios en frascos nuevos, estériles y herméticos, las muestras fueron congeladas a -20 °C y trasladadas al Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico del Departamento de Microbiología e Inmunología (DMEI) de la FMVZ-UNAM para realizar el cultivo, aislamiento e identificación bacteriana.

### **IV. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL**

#### **a) DEMOSTRACIÓN**

Todas las muestras que se recibieron, se descongelaron gradualmente colocándose a 4°C durante 24 horas, transcurrido este tiempo, las muestras se agitaron en vórtex\* para homogenizarla y liberar las bacterias que pudieran encontrarse atrapadas en los glóbulos de grasa. Se realizó un frotis directo y se llevó a cabo la tinción de Gram.

---

\* Agitador Vortex MS2 Minishaker Ika.

## **b) AISLAMIENTO**

Con el fin de identificar únicamente bacterias mesofílicas facultativas, se colocaron 30 µl de la muestra en una placa de agar sangre y agar MacConkey en la primera estría para realizar el primocultivo, ambas placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones de aerobiosis, en caso de no observar crecimiento se incubaron durante 48 horas más hasta descartar crecimiento bacteriano.

## **c) IDENTIFICACIÓN**

Los cultivos fueron examinados para determinar la morfología macroscópica de las colonias desarrolladas y su número relativo de acuerdo al número de cuadrantes del agar en donde se observó crecimiento bacteriano. A partir de las colonias representativas se realizó un frotis fijo teñido con Gram para guiar la identificación bioquímica recomendada por Carter *et al.*<sup>49</sup> En cuanto a los cocos Gram positivo catalasa positivo se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para identificarlos como *Staphylococcus* spp o *Micrococcus* spp; en el caso de pertenecer al género *Staphylococcus* se realizó la prueba de coagulasa en tubo para identificarlos como *Staphylococcus* coagulasa positivo (*S. aureus* o *S. intermedius*) o *Staphylococcus* coagulasa negativo. En el caso de los cocos Gram positivo catalasa negativo se identificaron como *Streptococcus* y con la prueba de Christie, Atkins y Munch-Petersen (CAMP) - esculina se llegó a la especie (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* o *S. uberis*), los bacilos Gram positivo, catalasa negativo fueron identificados como *Arcanobacterium pyogenes* y por último los bacilos Gram negativo oxidasa negativo fueron identificados como enterobacterias con las pruebas bioquímicas recomendadas. **(Cuadro 1)**

Cada aislado fue identificado en género y en algunos casos hasta el nivel de especie, los aislados se sembraron nuevamente por cultivo puro en agar tripticosa soya o en agar sangre de acuerdo a los requerimientos nutricionales de cada bacteria para conservarlos en viales estériles con 1 ml de leche descremada con glicerol al 20% y conservarlos a -20 °C.

Para realizar la identificación de los *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) se utilizó el sistema API Staph (V4.1) de laboratorios Biomérieux siguiendo las instrucciones del fabricante, cada galería se incubó 24 horas a 37 °C y mediante la clave numérica obtenida de cada aislado se llevó a cabo la identificación de la especie desde el sitio web<sup>^</sup> del fabricante.

## V. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

### a) EXTRACCIÓN DE ADN DE CEPAS ATCC

Para dar validez a la prueba de la PCR múltiple se utilizaron las siguientes cepas del American Type Culture Collection (ATCC):

GÉNERO Y ESPECIE	NÚMERO ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	29737
<i>Staphylococcus xylosus</i>	700404
<i>Streptococcus uberis</i>	13386

---

<sup>^</sup> <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>

Para extraer el ADN bacteriano se utilizó el método de fenol-cloroformo descrito por Johnson *et al.*<sup>50</sup> con las siguientes modificaciones: se inocularon 5 colonias en 15 ml de caldo infusión cerebro corazón (CICC) para cada cepa y se incubaron a 37 °C en agitación durante 18 horas, transcurrido este tiempo cada muestra de 15 ml se centrifugó a 10 000 rpm/10 minutos, se descartó el sobrenadante y posteriormente se resuspendió el pellet en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 con 10 mM de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) añadiendo 20 µl de lisozima (200 µg/ml) y en el caso del género *Staphylococcus* spp se añadieron además 10 µl de lisostafina. (100 µg/ml) incubando a 37 °C durante 60 min, transcurrido este tiempo se agregaron 55 µl de dodecyl sulfato de sodio (SDS) al 10% y 10 µl de proteinasa K (200 µg/ml) homogenizando perfectamente y se incubó en baño María durante 45 min a 56 °C. Se agregaron 100 µl de bromuro de cetiltrimetilamonio/ cloruro de sodio (CTAB/NaCl) homogenizando 15 veces por inversión y se incubó en baño María por 10 min a 56 °C. Se añadió un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) mezclando con vórtex y se centrifugó a 10 000 rpm/ 10 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio evitando tomar la interfase, se añadió un volumen de fenol-cloroformo (25:25) se mezcló con vórtex y se centrifugó a 10 000 rpm/ 10 min transfiriendo la fase acuosa a un tubo limpio, se añadió un volumen de cloroformo mezclando con vórtex y se centrifugó a 10 000 rpm/ 10 min transfiriendo la fase acuosa a un tubo limpio para añadir 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos y se centrifugó a 12 000 rpm/12 min. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla

resultante con 1 ml de etanol al 70% centrifugando a 10 000 rpm/5 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente la pastilla se resuspendió en 50  $\mu$ l de solución TE (tris(hidroximetil)aminometano-ácido etilendiaminotetraacético 10:1 mM pH 8) y se agregaron 2  $\mu$ l de RNAsa (200  $\mu$ g/ml) incubando 30 min a 37 °C. El ADN resultante se conservó a -20 °C hasta su uso. Para comprobar la presencia y pureza del ADN, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando solución de tris, ácido acético y EDTA (TAE 1X) como solución de corrida, para cada extracción de ADN se cargaron en cada pozo 3  $\mu$ l de ADN resuspendido en TE mezclados con 3  $\mu$ l de solución de carga, las condiciones de la electroforesis fueron 45 min a 85 volts, finalmente el gel fue visualizado utilizando bromuro de etidio como colorante para poder observarlo por medio de un fotodocumentador.<sup>∞</sup> **(Figura 1 y 2)**

Posteriormente, se cuantificó la concentración del ADN por medio de espectrofotometría<sup>§</sup> a una absorbancia de 260 nm, estableciendo un valor de  $A_{260}$  de 45  $\mu$ g/ml, se realizó una dilución inicial para obtener una concentración del ADN de 100 ng/ $\mu$ l y a partir de esta, realizar diluciones décuples seriadas para obtener concentraciones de 10 y 1 ng / $\mu$ l para determinar la concentración mínima de ADN que es capaz de detectar la PCR individual.

---

<sup>∞</sup> Fotodocumentador BIORAD. Blvd John F. Kennedy No.1500, Philadelphia, PA 19102-1737 USA.

<sup>§</sup> Espectrofotómetro BIORAD SmartSpec-Plus Spectrophotometer.

## **b) SELECCIÓN DE INICIADORES**

Para lograr la identificación del género *Staphylococcus* spp se utilizó el par de iniciadores diseñados por Mason *et al.*<sup>51</sup> estos iniciadores corresponden a la región 16s del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) la cual es única para este género en comparación con otras eubacterias.<sup>51</sup> Para el caso de *S. aureus* se utilizaron 2 pares de iniciadores, el primer par de iniciadores también fueron diseñados y publicados por Mason *et al.*<sup>51</sup> y corresponden al gen *clfA* exclusivo de *S. aureus* el cual codifica para una proteína de superficie de unión a fibrinógeno que es conocida como factor de agregación o *clumping factor* (coagulasa unida) y que de acuerdo a estudios anteriores este gen está presente en el cromosoma de todas las cepas de *S. aureus*.<sup>51</sup> El segundo par de iniciadores fueron diseñados para este trabajo y corresponden al gen *coa* de *S. aureus* el cual codifica para la enzima coagulasa (coagulasa libre) la producción de esta enzima es el principal criterio utilizado para la identificación de *S. aureus* además de ser un factor de virulencia importante.<sup>52</sup> En el caso de *S. uberis* se probaron 2 pares de iniciadores, el primer par corresponde a iniciadores previamente publicados por Phuektes *et al.*<sup>44</sup> los cuales amplifican un segmento del espacio intergénico 16S -23s del ARNr; el segundo par de iniciadores corresponden a los iniciadores diseñados para este estudio para el gen *skc* que codifica a la estroptokinasa que actúa activando al plasminógeno del hospedero.<sup>52</sup> **(Cuadro 2)**

Para diseñar los iniciadores del gen *coa* y del gen *skc*, se utilizó el programa DNAMAN versión 7.02 (Lynnon Corporate) para Windows.

La homología de los iniciadores de cada gen fue comprobada por medio de la base de datos BLAST (Basic local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center of Biotechnology Information).<sup>‡</sup> **(Figuras 3-12)**

### **c) PCR INDIVIDUAL A PARTIR DE ADN DE CEPAS ATCC**

Para cada uno de los iniciadores, cada reacción de PCR consistió en 45 µl de PCR Supermix (Invitrogen)<sup>β</sup>, 2 µl de cada iniciador (forward y reverse) a una concentración de 10 µM y 1 µl de ADN a una concentración de 100, 10 o 1 ng/ µl para cada reacción.

#### **16s ARNr *Staphylococcus* spp.**

El protocolo del termociclador<sup>±</sup> consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento 56 °C por 1 min, extensión 72 °C por 1 min y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. **(Figura 13)**

#### **Gen *clfA* de *Staphylococcus aureus***

El protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min 30 seg, alineamiento 62 °C por 1 min 45 seg, extensión 72 °C por 1 min 30 seg y finalmente un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min. **(Figura 14)**

---

<sup>‡</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>β</sup> Invitrogen No. Catálogo 10572014 Carlsbad, California 92008, USA.

<sup>±</sup> Termociclador Corbett Research Modelo CG1-96. 27220 Turnberry Lane Suite 200 Valencia, CA 91355, USA.

### **Gen *coa* de *Staphylococcus aureus***

El protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento 56 °C por 1 min 30 seg, extensión 72 °C por 2 min y finalmente un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min. **(Figura 15)**

### **16s-23s ARNr *Streptococcus uberis***

El protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento 56 °C por 1 min, extensión 72 °C por 1 min y finalmente un ciclo de extensión final de 72 °C por 7 min. **(FIGURA 16)**

### **Gen *skc* de *Streptococcus uberis***

El protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento 56 °C por 1 min 30 seg, extensión 72 °C por 2 min y finalmente un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 min. **(Figura 17)**

Para observar los productos de cada amplificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida, para cada pozo se cargaron 5 µl de cada reacción mezclados con 5 µl de solución de carga, las condiciones de la electroforesis fueron 40 min a 80 volts, finalmente el gel fue visualizado utilizando bromuro de etidio como colorante para poder observarlo por medio de un fotodocumentador.<sup>∞</sup>

---

<sup>∞</sup> Fotodocumentador BIORAD. Blvd John F. Kennedy No.1500, Philadelphia, PA 19102-1737 USA.

#### **d) PCR MULTIPLEX A PARTIR DE CEPAS ATCC**

Cada reacción consistió en 45 µl de PCR Supermix, adicionado con 2.5 µl de Taq Polimerasa\* (5 U/µl), 2 µl de los iniciadores del gen *coa* a una concentración de 20 µM, 0.5 µl de los iniciadores del gen *clfA* y de la región 16s de *Staphylococcus* spp a una concentración de 5 µM y 1 µl de ADN de *S. aureus* ATCC 29737 a una concentración de 10ng/µl. El protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento 56 °C por 1 min 30 seg , extensión a 72 °C por 2 min y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. **(Figura 18)**

Para observar la amplificación de cada producto esperado se corrió un gel de agarosa al 1.5% utilizando TAE 1X como solución de corrida, para cada reacción de PCR se cargaron en cada pozo 5 µl de la reacción y 5 µl de solución de carga, el gel se corrió durante 60 min a 75 volts y el gel se tiñó con bromuro de etidio para poder visualizarlo por medio de un fotodocumentador.

#### **e) EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE LECHE DE CABRA**

Para obtener ADN de las muestras de leche de cabra se realizó el procedimiento descrito por Cremonesi *et al.*<sup>53</sup> con modificaciones: cada muestra de 10 ml de leche se centrifugó a 10 000 rpm/10 min, se descartó el suero para resuspender la pastilla en 500 µl de solución salina estéril (NaCl) al 0.9% y se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm/15 min a 4°C eliminando el sobrenadante, este paso se realizó una vez más. La pastilla se disolvió en 50 µl de solución salina y se

---

\* Invitrogen No. Catálogo 10342053, Carlsbad, California 92008, USA.

agregaron 300 µl de solución de lisis (3 M isotiocianato de guanidina, 20 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, tritón 40 mg/ml, ditiotretitol 10 mg/ml) y 200 µl de solución de unión (40 mg/ml de silica resuspendida en solución de lisis), se homogenizaron 15 seg en vórtex y se dejaron reposar 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 13 000 rpm/30 seg eliminando el sobrenadante, se realizaron 2 lavados añadiendo 200 µl de solución de lisis homogenizando perfectamente y se centrifugó a 13 000 rpm/30 seg eliminando el sobrenadante, se realizaron 2 lavados más con 200 µl de solución de lavado (25% etanol absoluto, 25% isopropanol, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8) centrifugando con las mismas constantes anteriores, se realizó un último lavado con 200 µl de etanol absoluto centrifugando nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla durante 10 min a 37 °C, se añadieron 50 µl de solución de elusión (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) y se incubaron en baño María durante 15 min a 65 °C. Por último se centrifugó 10 000 rpm/5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

Para observar el ADN resultante se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida, para cada extracción de ADN se cargaron en cada pozo 3 µl de ADN resuspendido en solución de elusión mezclados con 3 µl de solución de carga, las condiciones de la electroforesis fueron 45 min a 85 volts, finalmente el gel fue visualizado utilizando bromuro de etidio como colorante para poder observarlo por medio de un fotodocumentador,<sup>∞</sup> el ADN se cuantificó por medio de espectrofotometría con las mismas condiciones

---

<sup>∞</sup> Fotodocumentador BIORAD. Blvd John F. Kennedy No.1500, Philadelphia, PA 19102-1737 USA.

descritas anteriormente, se realizó una dilución inicial para obtener 100 ng/μl y se conservó a -20 °C hasta su uso. **(FIGURA 19)**

#### **f) PCR INDIVIDUAL A PARTIR DE ADN EXTRAÍDO DE LECHE DE CABRA**

Se probaron los iniciadores individualmente utilizando ADN extraído de leche de cabra con la finalidad de comprobar que fueran capaces de reconocer ADN bacteriano presente en la leche, cada reacción de PCR consistió en 45 μl de PCR Supermix, 2 μl de cada iniciador a una concentración de 10 μM y 1 μl de ADN a una concentración de 100 ng/ μl para cada reacción utilizando las mismas constantes en el termociclador descritas anteriormente para cada par de iniciadores.

#### **g) PCR MULTIPLEX A PARTIR DE ADN EXTRAÍDO DE LECHE DE CABRA**

Cada reacción consistió en 45 μl de PCR Supermix, adicionado con 10 μl de Taq Polimerasa (5 U/ μl), 2 μl de los iniciadores del gen *coa* a una concentración de 20 μM, 0.5 μl de los iniciadores del gen *clfA* y de la región 16s de *Staphylococcus* spp a una concentración al 5 μM y 2 μl de ADN extraído de leche de cabra a una concentración de 100ng/μl. Se utilizaron 2 controles positivos: en el primero se utilizaron 2 μl de ADN de *S. aureus* ATCC 29737 a una concentración de 10 ng/μl y en el segundo control positivo se utilizaron 2 μl de ADN de *S. xylosus* ATCC 700404 a la misma concentración que el anterior y como control negativo se sustituyó el ADN por 1 μl de agua inyectable estéril, en cada uno de los controles se utilizaron las cantidades estandarizadas de los iniciadores.

El protocolo del termociclador siguió las mismas constantes que para la PCR múltiplex a partir de ADN de cepas ATCC.

## **VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa JMP versión 8.0 (SAS Institute Inc.) para Windows, por medio de cuadros de contingencia, Chi cuadrada y análisis de regresión logística.<sup>54</sup>

## RESULTADOS

### I. NÚMERO DE MUESTRAS

Se obtuvieron un total de 484 muestras de leche de cabra para su análisis bacteriológico, en el caso del CEIEPAA sistema intensivo, se obtuvieron 181/484 (37.40%) muestras, en el sistema semi-intensivo se obtuvieron 111/484 (22.93%) muestras. Para el caso de la Granja del Carmen en sistema intensivo se obtuvieron 102/484 (21.07%) muestras y 90/484 (18.60%) muestras en el sistema semi-intensivo. **(Cuadro 3)**

### II. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO TRADICIONAL

Un total de 90/484 muestras (18.60%) presentaron crecimiento bacteriano de las cuales se recuperaron 97 aislados. En el caso del CEIEPAA sistema intensivo las muestras que presentaron crecimiento fueron 27/181 (14.92%) y en el sistema semi-intensivo las muestras con crecimiento fueron 6/111 (5.41%). En cuanto a la Granja del Carmen 37/102 (36.27%) muestras de leche en sistema intensivo y 20/90 (22.22%) muestras de leche en sistema semi-intensivo fueron positivas a crecimiento bacteriano. **(Cuadro 4)**

Del total de los aislados bacteriano obtenidos, los principales géneros bacterianos que se encontraron con mayor frecuencia fueron los *Staphylococcus coagulasa* Negativo (SCN) 62/97 (63.92%), *Streptococcus uberis* 10/97 (10.31%) y *Staphylococcus aureus* 5/97 (5.15%) por lo que el PCR multiplex se desarrolló y estandarizó a partir de estos 2 géneros, los 20 aislados restantes (20.62%) restante corresponden a otros géneros bacterianos. **(Cuadro 5)**

### **a) IDENTIFICACIÓN DE SCN**

De los 62 aislados identificados como SCN, las especies que se presentaron fueron las siguientes: *Staphylococcus. chromogenes* 30/62 (48.39%), *Staphylococcus simulans* 14/62 (22.58%), *Staphylococcus. xylosus* 13/62 (20.97%), *Staphylococcus. sciuri* 2/62 (3.23%), *Staphylococcus haemolyticus* 1/62 (1.61%), *Staphylococcus caprae* 1/62 (1.61%) y *Staphylococcus epidermidis* 1/62 (1.61%). **(Cuadro 6).**

### **III. PRUEBA DE CALIFORNIA Y ANIMALES POSITIVOS A MASTITIS SUBCLÍNICA**

Únicamente se lograron obtener los resultados de la prueba de California de las muestras de leche de las cabras pertenecientes al CEIEPAA en ambos sistemas de producción, en el caso de las muestras del sistema intensivo, 14/181 (7.73%) fueron positivas a mastitis subclínica (California grado 2) y solamente 4/14 (28.57%) presentaron crecimiento bacteriano (*S. xylosus* 2/4 - 50%, *S. simulans* 1/4 - 25% y *S. uberis* 1/4 - 25%) en cuanto a las muestras del sistema semi-intensivo, 4/111 (3.60%) fueron positivas a mastitis subclínica y no se obtuvo crecimiento bacteriano en ninguna de esas muestras. **(Figura 20)**

Las cabras consideradas como positivas a mastitis subclínica fueron aquellas con una calificación grado 2 en la prueba de California (CMT) independientemente del crecimiento bacteriano y aquéllos que presentaron crecimiento del mismo género en dos o más muestreos consecutivos, de acuerdo a lo reportado por Min *et al* y Contreras *et al*<sup>9, 55</sup> En el CEIEPAA, en el sistema intensivo 14/181 (7.73%) muestras presentaron crecimiento bacteriano consecutivo, en el sistema semi-

intensivo no hubo crecimiento consecutivo de ninguna muestra. En cuanto a la granja del Carmen en el sistema intensivo 25/102 (24.51%) muestras y en el sistema semi-intensivo 12/90 (13.33%) muestras presentaron crecimiento bacteriano consecutivo. Por lo que un total de 65/484 muestras (13.43%) fueron positivas a mastitis subclínica, no se obtuvieron muestras de animales con mastitis clínica. **(Cuadro 7)**

#### **IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En cuanto a los resultados obtenidos en las muestras de leche se observó que existe evidencia significativa de asociación entre los aislamientos bacterianos y la granja de procedencia de las muestras de leche ya que en los 60, 195 y 240 días de lactación se encontraron mayor cantidad de aislados bacterianos en la granja del Carmen ( $p < 0.05$ ). Se observó asociación entre los aislamientos bacterianos obtenidos y el sistema de producción de la granja (intensivo y semi-intensivo) ya que a los 15, 60 y días post-parto las frecuencias de aislamientos bacterianos obtenidos es mayor en el sistema de producción intensivo de ambas granjas ( $p < 0.05$ ). En cuanto al resultado de grado 2 de la prueba de California realizada en el CEIEPAA se encontró evidencia significativa de asociación con el sistema de producción intensivo a los 15 y 60 días post-parto ( $p < 0.05$ ). No se encontró asociación entre ninguna especie de SCN y *S. uberis* con el sistema de producción empleado ( $p > 0.05$ ), solamente se encontró que existe asociación entre *S. aureus* y *S. intermedius* con el sistema intensivo ( $p < 0.05$ ). Se encontró evidencia significativa de asociación entre *S. chromogenes*, *S. uberis* y *S.*

*intermedius* con la granja del Carmen ya que en esta se aislaron con mayor frecuencia ( $p < 0.05$ ). En los resultados obtenidos a partir del modelo de regresión logística se observa que en los aislamientos obtenidos por efecto del sistema y periodo de lactación hay diferencias entre los 60 y 105 días post-parto, 105 y 150 días post-parto y por último entre los 150 y 195 días post-parto ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias en *S. uberis*, *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. chromogenes*, *S. simulans* y *S. xylosus* por efecto del sistema de producción y la prueba de California. ( $p > 0.05$ )

## **V. DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

### **a) PCR INDIVIDUAL A PARTIR DE ADN DE CEPAS ATCC**

Se estandarizó la PCR individual para la detección de la región 16s de *Staphylococcus* spp, el gen *coa* y el gen *clfA* de *S. aureus* para confirmar el tamaño esperado de cada producto utilizando ADN de cepas ATCC a concentraciones de 100, 10 y 1 ng/ $\mu$ l, además se probaron con el ADN de cada una de las cepas ATCC para confirmar que no amplificaran bandas inespecíficas, cada par de iniciadores fue capaz de detectar hasta 1 ng/ $\mu$ l de ADN. No fue posible obtener la amplificación del espacio intergénico 16s-23s del ARNr ni del gen *skc* de *Streptococcus uberis*, por lo que solamente se incluyeron a los *S. aureus* y a los *Staphylococcus* spp en la PCR múltiplex. **(Figuras 21-25)**

#### **b) PCR MULTIPLEX A PARTIR DE ADN DE CEPAS ATCC**

Se estandarizó la PCR Múltiplex para el género *Staphylococcus* spp con los iniciadores 16s, *clfA* y *coa* utilizando ADN de *S. aureus* ATCC 29737 y fue capaz de detectar hasta 10 ng/μl de ADN. **(Figura 26)**

#### **c) PCR INDIVIDUAL A PARTIR DE ADN EXTRAIDO DE LECHE DE CABRA**

Se logró estandarizar la PCR individual de los iniciadores utilizados para el género *Staphylococcus* y *S. aureus* utilizando ADN extraído de leche de cabra positiva a crecimiento bacteriano con *S. aureus* y SCN. **(Figuras 27-29)**

#### **d) PCR MULTIPLEX A PARTIR DE ADN EXTRAIDO DE LECHE DE CABRA**

Se estandarizó la PCR Múltiplex para el género *Staphylococcus* spp con los iniciadores 16s, *clfA* y *coa* utilizando ADN extraído de leche de cabra positiva a crecimiento de *Staphylococcus aureus*, SCN u otro género bacteriano por medio de bacteriología tradicional. Se realizó el diagnóstico en 30 muestras al azar de leche de cabra de las cuales 11 resultaron positivas a todas las bandas (36.67%), 3 muestras amplificaron solamente para las bandas correspondientes a 16s y *clfA* (10%) una muestra amplificó únicamente para *clfA* (3.33%) y 15 muestras fueron negativas a todas las bandas (50%) **(Cuadro 8, Figura 30 y 31)**

## DISCUSIÓN

Con el fin de conocer los géneros bacterianos asociados a la mastitis caprina, se realizó el análisis microbiológico de todas las muestras obtenidas de las dos granjas en los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo, en donde los géneros bacterianos aislados con mayor frecuencia en este estudio fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativo, seguido de *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus*. De acuerdo a estudios realizados en diferentes países de Europa como España, Francia, Italia, Inglaterra y Escocia los SCN son los principales agentes causales de la mastitis clínica y subclínica, seguidos de *S. aureus*, siendo *S. uberis* patógeno secundario. Sin embargo, *S. uberis* es un patógeno que se puede aislar de piel de la glándula mamaria y de otros sitios anatómicos así como también de pisos y camas, posiblemente existen diferencias en el porcentaje de aislamientos entre los resultados de este estudio y los resultados de otros países de Europa ya que en muchas ocasiones no llegan hasta el nivel de especie al realizar la identificación bacteriana.<sup>10, 41, 42, 55, 56, 57, 58</sup>

En los resultados obtenidos en estudios realizados en México por Amezcua *et al.*<sup>14</sup> en 1981, los microorganismos aislados con mayor frecuencia en 565 cabras lecheras ordeñadas mecánicamente localizadas en Guanajuato, fueron *S. aureus* (32.6%), *S. epidermidis* (32.6%) y *Micrococcus* spp (30.4%), el 4.4% restante correspondió a *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y *E. coli*.<sup>14</sup> Bonilla *et al.* en el año 1998 en un estudio realizado en Puebla con 113 cabras con mastitis subclínica se determinó que las frecuencias asociadas a esta condición eran: *S. cohnii*, *S.*

*capitis*, *S. aureus*, y en menor cantidad *Alcaligenes faecalis*, *Mannheimia haemolytica*, *Acinetobacter* spp, *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp.<sup>59</sup>

En el 2008, Figueroa *et al.*<sup>40</sup> analizaron 118 muestras de leche de cabras ordeñadas de forma mecánica, donde el 64.5% (76 muestras) resultaron positivas a mastitis subclínica, de estas 76 muestras el 81.5% resultaron negativas y el 18.5% resultaron positivas donde se aisló únicamente a *Staphylococcus* spp.<sup>40</sup> Por lo que el género *Staphylococcus* también es el principal género involucrado en mastitis en cabras en nuestro país, ya sean SCN o SCP como *S. aureus*, esta diferencia posiblemente se deba al medio ambiente y sistema de producción al que están sometidos los animales, ya que existen reportes que indican que las mastitis causadas por *S. aureus* es más común al utilizar equipo de ordeño mecánico.<sup>10</sup>

En este estudio las especies de SCN que se aislaron con mayor frecuencia fueron *S. chromogenes*, *S. xylosus* y *S. simulans* lo que concuerda con estudios realizados en España por Contreras *et al* en el año 2003. Sin embargo, en Francia las especies de SCN causantes de mastitis son *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* y *S. chromogenes*,<sup>42</sup> al igual que en Italia en donde *S. caprae* ha sido la única especie relacionada con mastitis.<sup>58</sup> En el continente africano las especies causantes de mastitis que han sido aisladas son *S. epidermidis* y *S. simulans*<sup>19</sup> mientras que en el continente asiático (Israel) las especies relacionadas con mastitis caprina son *S. simulans*, *S. caprae*, *S. chromogenes* y *S. xylosus*.<sup>60</sup> Esta variedad en las especies de SCN pueden deberse al sistema empleado para la identificación de especies, ya que se menciona que las pruebas bioquímicas

tradicionales no son de gran utilidad para llegar hasta el nivel de especie, siendo preferible utilizar sistemas comerciales de identificación que proporcionan resultados más confiables.<sup>49</sup>

Las mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* ocupan el primer lugar en bovinos, sin embargo, en cabras, las infecciones causadas por *S. aureus* ocupan el segundo lugar, siendo los SCN los principales agentes causantes de mastitis clínica y subclínica.<sup>10, 56</sup> Sin embargo, en este trabajo la mastitis causada por *S. aureus* ocupa el tercer lugar después de los SCN y *S. uberis*, este resultado puede deberse las medidas de bioseguridad que existen en las granjas en donde se realizaron los muestreos, ya que la transmisión de este agente puede ocurrir cuando existe poca higiene durante el ordeño en donde los animales con una infección crónica actúan como el principal reservorio de este agente.<sup>61</sup>

De acuerdo a la prueba de California, en el sistema de producción intensivo del CEIEPAA se encontró un mayor porcentaje de mastitis subclínica en comparación con el sistema semi-intensivo de producción basándose en una calificación de 2 (> 2 millones cels/ml). Sin embargo, al no contar con los resultados de la prueba de California de la Granja del Carmen fue imposible de comparar el porcentaje de mastitis observada en dicha granja en sus 2 sistemas de producción; a pesar de esto, el porcentaje de mastitis observada en el sistema intensivo, concuerda con estudios realizados en Venezuela en donde se comparó el porcentaje de mastitis subclínica de acuerdo al sistema de producción empleado encontrando un 87% de mastitis subclínica en el sistema intensivo y un 44.4% en el sistema semi-intensivo

de igual forma, Kyozaire *et al.*, en la ciudad de Pretoria en África encontraron un 43.3% y un 36.7% en los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo respectivamente, ya que en las máquinas ordeñadoras del sistema intensivo encontraron el mayor número de bacterias lo que indica que el manejo influye en la aparición de mastitis, pues cuanto más intensivo sea el sistema de producción y no se cumplan las medidas de bioseguridad, la incidencia y prevalencia de esta enfermedad aumentará.<sup>12, 35</sup>

A pesar de que el CCS es utilizado como monitor de la salud de la ubre y calidad de la leche en la industria ganadera de leche en varios países,<sup>62</sup> existen varios factores no patológicos que influyen en los niveles de estas células, además de que los neutrófilos predominan en la leche de cabra en un nivel más alto que la leche de vaca bajo condiciones normales. Los estudios histopatológicos de ubres de cabras con un alto contenido de CS, se ha observado una histología normal por lo que las cabras pueden presentar un alto conteo de CS de manera normal.<sup>62</sup>

El estro también aumenta el nivel del CCS pero aún no existen estudios definitivos en cabras. Las muestras de leche obtenidas antes, durante y después del ordeño difieren significativamente en el conteo de CCS,<sup>62</sup> por lo que se han propuesto distintas escalas para clasificar el estado sanitario de las ubres en base al CCS ya que a diferencia del ganado vacuno no hay un estándar oficial para el CCS en leche de cabras por lo que el valor predictivo de las infecciones en la ubre es muy variable.<sup>62</sup> En este estudio únicamente se obtuvieron aislamientos bacterianos de cuatro muestras positivas a grado dos en la prueba de California en el sistema intensivo de producción del CEIEPAA por lo que el aislamiento bacteriano

consecutivo en dos o más muestras fue de mayor ayuda para conocer la presencia de infecciones intramamarias en los animales.

En cuanto a la cantidad de aislamientos bacterianos que se obtuvieron, fue mayor en el sistema intensivo de ambas granjas únicamente a los 15 y 60 días post-parto, es decir, al inicio de la lactación lo que concuerda con Bergonier *et al*,<sup>10</sup> en donde la mayor incidencia de mastitis subclínica la encontraron al inicio del ordeño mecánico, es decir, en el primer tercio de la lactación.<sup>10</sup> En cuanto a los géneros bacterianos aislados en las muestras de leche provenientes de los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo, únicamente se encontró que *S. aureus* esta asociado al sistema intensivo de producción lo que indica que las máquinas ordeñadoras podrían servir como reservorio de este agente y al igual que Kyozaire *et al*,<sup>35</sup> no se encontraron diferencias en el espectro bacteriano entre sistemas de producción.

Con respecto al diagnóstico molecular, se logró desarrollar y estandarizar la PCR múltiple para SCN y *S. aureus*, el género aislado con mayor frecuencia en este estudio. Para lograr la identificación del género *Staphylococcus* spp, se utilizaron los iniciadores correspondientes a la región 16s, es decir, a los genes de la subunidad menor del ARNr; estos genes son conservados entre los *Staphylococcus* spp y son únicos en comparación con otras eubacterias.<sup>33</sup> Estos genes sirven como blanco para la identificación de microorganismos a nivel de familia, género o especie, ya que contienen regiones con variabilidad suficiente para una identificación específica de bacterias.<sup>63</sup>

Para la identificación de *S. aureus*, se utilizaron los iniciadores correspondientes al gen *coa* y al gen *clfA*, a pesar de que existen otras especies de *Staphylococcus* capaces de producir la coagulasa libre o unida, los iniciadores son específicos para la secuencia de los genes de *S. aureus* y se pudo comprobar a través de la PCR individual que este par de iniciadores no amplificaron para las otras dos cepas utilizadas correspondientes a *S. xylosus* ATCC 700404 y *S. uberis* ATCC 13386.

En cuanto al género *Streptococcus*, en este estudio la especie aislada con mayor frecuencia fue *Streptococcus uberis* con 16 casos. *Streptococcus uberis* es la especie aislada con mayor frecuencia en casos de mastitis de pequeños rumiantes en Francia <sup>10</sup>. Este patógeno es capaz de provocar mastitis clínica y subclínica y a diferencia de *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae* se puede encontrar en la superficie de la ubre y otras partes del cuerpo de las cabras, así como en el medio ambiente.<sup>34</sup>

A pesar de que *S. uberis* ocupó el segundo lugar de géneros bacterianos aislados en este estudio, no fue posible integrarlo a la PCR múltiple; se utilizaron 2 pares de iniciadores distintos para lograr identificar a este género bacteriano, el primer par de iniciadores correspondió al espacio intergénico 16s-23s utilizando iniciadores previamente publicados por Phuektes *et al*;<sup>44</sup> el segundo par de iniciadores corresponden al gen de la estreptokinasa (*skc*) de *S. uberis* diseñados específicamente para este estudio; no se logró amplificar ninguna banda a pesar de utilizar la cepa de *S. uberis* ATCC 13386 (misma que utilizó Phuektes *et al* <sup>44</sup>) y de comprobar la homología de los iniciadores, sin embargo, en estudios

recientes, gracias a técnicas de biología molecular como hibridación de ADN cromosomal se sugirió la existencia de 2 genotipos de *S. uberis* denominados *S. uberis* Tipo I y II, este último clasificado actualmente como *S. parauberis* el cual carece del gen *skc*.<sup>52, 64</sup> La diferenciación entre *S. uberis* y *S. parauberis* con métodos tradicionales es prácticamente imposible provocando que se llegue a conclusiones erróneas sobre la epidemiología de *S. uberis* como la identificación de su reservorio y métodos de transmisión.<sup>52, 64</sup>

En cuanto a la PCR múltiplex, los iniciadores de la región 16s del ARNr de *Staphylococcus* spp y del gen *cifA* diseñados por Mason *et al*,<sup>51</sup> fueron utilizados con éxito en una PCR múltiplex para diagnosticar infecciones por SCN y *S.aureus* en muestras de sangre de humanos y en este estudio también fueron útiles para identificar a los *Staphylococcus* spp aislados de leche de cabra, junto con estos iniciadores se pudo integrar los iniciadores para el gen *coa* de *S. aureus* logrando una temperatura de alineación óptima para los 3 pares de iniciadores a 56 °C facilitando que pudieran ser utilizados en una misma reacción de amplificación; en cuanto a los iniciadores utilizados para el espacio intergénico 16s-23s de *S. uberis* fueron utilizados con éxito por Phuektes *et al*.<sup>44</sup> al utilizarlos en una PCR múltiplex donde lograron identificar a *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S.uberis* de muestras de leche de bovino con mastitis, sin embargo, no se obtuvo ningún amplificado ni tampoco con los iniciadores de la *skc*, por lo que es necesario seguir probando estos iniciadores con otras cepas de *S. uberis*.

En los resultados obtenidos en la PCR múltiplex, se pudo identificar a *S. aureus* en 10 muestras de leche en las cuales no se obtuvo el aislamiento bacteriológico, por

lo que la PCR tiene la ventaja de detectar el ADN blanco dejando a un lado la expresión fenotípica o reacciones metabólicas de las bacterias siendo capaz de hacer el diagnóstico en horas;<sup>45</sup> la PCR múltiplex tiene la ventaja de detectar más de una secuencia blanco ahorrando tiempo y dinero en el diagnóstico; a pesar de utilizarse con éxito en el diagnóstico de varias enfermedades, también existen varias desventajas como tener una sensibilidad y especificidad mucho más baja que una PCR simple, esto puede deberse a la competencia que existe por los dNTPs y la taq polimerasa cuando varios pares de iniciadores se combinan en una sola reacción,<sup>44</sup> posiblemente por esto, se obtuvo un caso en el que solo amplificó la banda correspondiente a *clfA*.

Existieron 3 casos en los que el gen *coa* no fue detectado a pesar de amplificar para la banda *clfA* y 16s de *Staphylococcus* spp, se ha reportado la existencia de cepas de *S. aureus* coagulasa negativo debido a mutaciones en el gen que están asociadas a la pérdida de habilidad para producir la coagulasa,<sup>29, 65</sup> solamente en el caso de haberse logrado el aislamiento bacteriológico de estas cepas se podría realizar la prueba de coagulasa en tubo, por lo que se realizó la PCR individual de estas muestras dando un resultado negativo. Es necesario seguir probando esta PCR múltiplex en más muestras de leche de cabra para poder identificar únicamente a SCN ya que a pesar de que la banda 16s amplifica utilizando como testigo ADN de *S. xylosus* ATCC 700404 en las 30 muestras en las que se corrió la prueba no se obtuvo ningún caso donde solo se detectara a los SCN, esto nos indica que probablemente al estar en la misma muestra tanto *S. aureus* como los

SCN, se amplifica la misma banda de la región 16s, además de detectar a los genes específicos para *S.aureus*.

## CONCLUSIONES

1. Los géneros bacterianos aislados con mayor frecuencia en leche de cabras obtenida bajo las condiciones del estudio fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativo, seguido de *S.uberis* y *S. aureus*.
2. A pesar de que los SCN son considerados como patógenos menores, es necesario realizar estudios sobre los factores de virulencia que poseen para provocar mastitis en ganado lechero.
3. De acuerdo al análisis estadístico, no existen diferencias entre los dos principales géneros bacterianos aislados en los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo; únicamente *S. aureus* esta asociado al sistema intensivo de producción,
4. Es necesario documentar la relación que existe entre el CCS y las infecciones intramamarias en cabras ya que resulta inapropiado utilizar los mismos parámetros utilizados en bovinos.
5. El uso de iniciadores previamente publicados fueron de gran utilidad para estandarizar la PCR múltiplex pero también se dio el caso en donde el uso de iniciadores publicados no fueron de utilidad para la PCR individual y la PCR múltiplex.
6. La PCR múltiplex podría disminuir el tiempo de diagnóstico hasta en 6 horas.
7. La PCR múltiplex para el diagnóstico de mastitis causada por SCN y *Staphylococcus aureus* fue capaz de detectar a patógenos bacterianos que no fueron detectados en el aislamiento bacteriológico.

## REFERENCIAS

1. SAGARPA. Acta de la sexta sesión ordinaria, 2004, del consejo mexicano para el desarrollo rural sustentable. Disponible en [URL: http://www.sagarpa.gob.mx/](http://www.sagarpa.gob.mx/).
2. SAGARPA. Especies Ganaderas. Disponible en [URL: http://www.sagarpa.com.mx](http://www.sagarpa.com.mx)
3. FAO. Agricultural Statistics FAO, Rome, Italy. 2005. Disponible en URL: [URL: http://www.fao.org](http://www.fao.org)
4. Palma GJ. Factores que influyen en la producción lechera de un hato caprino en semiárido mexicano. (Tesis de doctorado) México: Universidad de Colima, 1995.
5. Buxadé C. Zootecnia. Bases de Producción Animal. Tomo IX Producción caprina. Ed. Mundi-Prensa. España, 1998.
6. Arbiza AS. Producción de Caprinos. AGT EDITOR, S.A. México. 2003.
7. Shearer JK, Harris B. Mastitis in Dairy Goats. University of Florida, IFAS Extensión. June 2003.
8. Ndegwa EN. Risk factors associated with subclinical subacute mastitis in kenyan dairy goats. Isr J Vet Med 2001; 56: 4-8.
9. Min B, Tomita G, Hart S. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats milk. J Dairy Res 2007; 74: 204-210.
10. Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res 2003; 34: 689-716.

11. Ruiz GE. Mastitis Caprina: Estudio Recapitulativo. (Tesis de Licenciatura) México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1989.
12. Clavijo AM. Meléndez B. Efecto del sistema de explotación sobre la aparición de mastitis caprina en dos fincas del estado Falcón, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos. *Zoot Trop* 2002; 20: 383-395.
13. Concha BC. Mastitis Bovina: Nuevos Aspectos de Diagnóstico, Tratamiento y Control. Disponible en URL: <http://agronomia.uchile.cl>
14. Amezcua MA. Prevalencia de mastitis subclínica en hatos caprinos en la zona central del bajío. (Tesis de licenciatura) México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM 1981.
15. Hermans K, Devriese LA, Haesebrouk F. *Staphylococcus*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3<sup>rd</sup> Ed. USA: Blackwell Publishing, 2004.
16. Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol* 2009; 134: 3-8.
17. Watanabe S, Ito T, Sasaki T, Li S, Uchiyama I, Kishii K *et al*. Genetic diversity of staphylocoagulase gene (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2009; 4: e5714.
18. Boden M, Flock JI. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1989; 57: 2358-2363.
19. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length

- polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J Clin microbial 1998; 36: 1083-1089.
20. Klodzinska E, Szumski M, Hryniewicz K, Dziubakiewicz K, Jackowski M, Buszewski B. Differentiation of *Staphylococcus aureus* strains by CE, zeta potential and coagulase gene polymorphism. Electrophoresis 2009; 30: 3086-3091.
21. Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, Pepe O, Coppola S. Diversity of *staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a pcr-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* and *S. Schleiferi* subsp. *coagulans*) J Clin Microbiol 2010; 48: 192-201.
22. Foster G, Ross HM, Hutson RA, Collins MD. *Staphylococcus lutrae* sp. Nov. a new coagulase-positive species isolated from otters. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 724-726.
23. Devriese LA, Vancanney M, Baele M, Vaneechoutee E, De Graef, Snauwaert C et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol 2005; 55, 1569–1573.
24. Eidhin DN, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesion of *Staphylococcus aureus*. Mol microbial 1998; 30: 245-257.

25. Josefsson E, Higgins Jm Foster TJ, Tarkowski A. Fibrinogen binding sites P336 and Y338 of clumping factor A are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. Plos ONE 2008; 3: e2206.
26. Siboo IA, Cheung AL, Bayer AS, Sullman PM. Clumping factor A meditates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. Infect Immun 2001; 69: 3120-3127.
27. Vliegheer S, Opsomer G, Vanrolleghem A, Devriese L, Sampimom O. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. Vet Microbiol 2004; 101: 215-221.
28. Vliegheer S, Laevens H, Devriese L, Opsomer G, Leroy J, Baekema H, de Kruif A. Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. Vet Microbiol 2003; 92: 245-252.
29. Taponen S, Pyörälä. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet Microbiol 2009; 134: 29-36.
30. Zhang S, Maddox C. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. Infect Immun 2000; 68: 1102-1108.
31. Sato H, Hirose K, Terauchi R, Moromizato I, Kurokawa S, Maehara N. Purification and characterization of a novel *Staphylococcus chromogenes* exfoliative toxin. J Vet Med 2004; 51: 116-122.

32. Park J, Lawrence F, Seo K, McGuire M, Park Y. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet Microbiol* 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2010.06.021.
33. Mosbath H, Sayari A, Mejdoub H, Dhouib H, Gargouri Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *BBA* 2005; 1723: 282-291.
34. Odierno L, Calvinho L, Traverssa P, Lasagno M, Bogni C, Reinoso E. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in argentinan dairy herds. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3886-3890.
35. Kyozaire JK. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *J S Afr Vet Ass* 2005; 76: 69-73.
36. Little CL, Louvois J. Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' milk on retail sale in England and Wales. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 403-408.
37. Sordillo L, Streicher K. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 135-144.
38. Paape MJ, Capuco AV. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *J Anim Sci* 1997; 75: 556-565.
39. Sordillo LM, Shafer-Weaver, De Rosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1851-1865.
40. Figueroa MLG. Cuenta de células somáticas en leche de cabra mediante las pruebas diagnósticas: Prueba de California, Wisconsin, cuenta

microscópica y contador infrarrojo. (Tesis de licenciatura) México (D.F)  
México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2008.

41. Luengo C, Sánchez A, Corrales J, Fernandez C, Contreras A. Influence of intramammary infection and non-infection factor son somatic cell counts in Dairy goats. *J Dairy Res* 2004; 71: 169-174.
42. Poutrel B, Lerondelle C. Cell content of goat milk: California Mastitis Test, Coulter Counter and Fossomatic for predicting half infection. *J Dairy Sci* 1983; 66: 2575-2579.
43. El test de California para el diagnóstico de la mastitis. Disponible en URL: <http://www.capraispana.com/enfermedades/mastitis/california.htm>
44. Phuektes P, Mansell D, Browning F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1140-1148.
45. Gillespie BE, Oliver SP. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 2005; 88: 3510-3518.
46. Méndez AS, Pérez RE. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infec Microbiol Clin* 2004; 22: 183-192.
47. Markoulatos P, Siafakas N, Mocany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 47-51.
48. Elnifro EM, Ashshi MA, Cooper JR, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 559-560.

49. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4<sup>th</sup> Edition, Charles C Thomas Publisher, EUA, 1984.
50. Johnson WM, Tyler SD. PCR detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus*. In Applications Bacterial Pathogens. 294-299.
51. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smelter MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection, J Clin Microbiol 2001; 39: 3332-3338.
52. Khan IU, Hassan AA, Abdulmawjood A, Lämmler C, Wolter W, Zschöck M. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J Vet Sci 2003; 4: 213-223.
53. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni *et al.* Improved method for rapid extraction of mastitis pathogens directly from milk. J Dairy Sci 2006; 89: 168-169
54. Daniel WW. Bases para el análisis de las Ciencias de la Salud, Limusa, México, D.F.; 2002, 4ta edición.
55. Contreras A, Corrales JC, Sánchez A, Sierra D. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. J dairy Sci 1997; 80: 2815-2819.
56. Hall SM, Rycroft AN. Causative organisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the UK. Vet Rec 2007; 160: 19-22.

57. Hunter AC. Microflora and somatic cell content of goat milk. *Vet Rec* 1984; 114: 318-320.
58. Foschino R, Invernizzi A, Barucco R, Stradiotto K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *J Dairy Res* 2002; 69: 213-225.
59. Bonilla CS, Rosas MS, Hernández AL, Díaz AE, Villa GR, Hernández ZJS. Agentes etiológicos involucrados en la mastitis subclínica en cabras lecheras. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Buiatria; 2003 Villahermosa (Tabasco) México.
60. Leitner G, Merin U, Lavi Y, Egber A, Silanikove N. Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *J Dairy Res* 2007; 74: 186-193.
61. Omega R, Deighton M, Capstick J, Gerraty N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet Microbiol* 1999; 66: 275-284.
62. Haenlin GF. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Rumin Res* 2002; 45: 163-178.
63. Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood, Lämmler. Inter and intraspecies variations of the 16s-23s rDNA intergenic spacer region of various streptococcal species. *System Appl Microbiol* 2003; 26: 97-103.
64. Jayarao BM, Doré JE, Baumbach GA, Matthews KR, Oliver SP. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by

Polimerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism  
Analysis of 16S Ribosomal DNA. J Clin microbial 1991; 29: 2774-2778.

65. Korman R. Coagulase-negative mutants of *Staphylococcus aureus*: genetic  
studies. J Bacteriol 1963; 86: 363-369.

**CUADRO 1. ESQUEMA GENERAL PARA LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.**

TINCIÓN DE GRAM DE LAS COLONIAS REPRESENTATIVAS	PRUEBAS PRIMARIAS	RESULTADO PRUEBA PRIMARIA	GÉNERO	PRUEBAS COMPLEMENTARIAS
COCOS GRAM POSITIVOS	Catalasa	Positivo	<i>Staphylococcus</i> spp <i>Micrococcus</i> spp	Oxidación-fermentación, coagulasa
		Negativo	<i>Streptococcus</i> spp	CAMP-esculina
BACILOS GRAM POSITIVOS	Formación de esporas	Negativo	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> <i>Corynebacterium</i> spp	Catalasa
BACILOS GRAM NEGATIVOS	Oxidasa	Negativo	Enterobacterias	TSI, SIM, urea, citrato

**Cuadro 2. SECUENCIA DE LOS INICIADORES UTILIZADOS PARA CADA GEN A DETECTAR.**

<b>GEN</b>	<b>FORWARD (5´ - 3´)</b>	<b>REVERSE (5´ - 3´)</b>	<b>pb</b>
16s <i>Staphylococcus</i> spp	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG	CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG	791
<i>clfA</i> <i>S. aureus</i>	GCAAATCCAGCACAAACAGGAAACGA	CTTGATCTCCAGCCATAATTGGTGG	638
<i>coa</i> <i>S. aureus</i>	CCTGTACCAGCATCTCTATATTTAA	CAAAGCAGATGCGATAGTAAC	1200
16s-23s ARNr <i>S. uberis</i>	TAAGGAACACGTTGGTTAAG	TTCCAGTCCTTAGACCTTCT	330
<i>skc</i> <i>S. uberis</i>	GGGAATATTTGGTTGTGCTACTC	GGCAAATAAAAGCCGTCG	300

**Cuadro 3. NÚMERO TOTAL DE MUESTRAS OBTENIDAS POR GRANJA Y SISTEMA DE PRODUCCIÓN EN LOS DIFERENTES DÍAS DE LACTACIÓN**

SITIO	SISTEMA	ANIMALES	15	60	105	150	195	240	TOTAL	PORCENTAJE
CEIEPAA	Intensivo	17	30	34	34	27	28	28	181	37.40%
	Semi-intensivo	17	34	20	0	34	0	23	111	22.93%
GRANJA DEL CARMEN	Intensivo	11	22	22	0	20	20	20	102	21.07%
	Semi-intensivo	16	18	18	0	20	0	20	90	18.60%
<b>TOTAL</b>			<b>116</b>	<b>94</b>	<b>34</b>	<b>101</b>	<b>48</b>	<b>91</b>	<b>484</b>	<b>100%</b>

**Cuadro 4. NÚMERO DE MUESTRAS CON Y SIN CRECIMIENTO BACTERIANO POR GRANJA Y SISTEMA DE PRODUCCIÓN**

GRANJA	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
CEIEPAA INTENSIVO	27	154	181
CEIEPAA SEMI-INTENSIVO	6	105	111
GC INTENSIVO	37	65	102
GC SEMI-INTENSIVO	20	70	90
<b>TOTAL</b>	<b>90</b>	<b>394</b>	<b>484</b>

**Cuadro 5. PORCENTAJE DE GÉNEROS BACTERIANOS AISLADOS POR GRANJA Y SISTEMA DE PRODUCCIÓN.**

<b>GÉNERO</b>	<b>CEIEPAA INTENSIVO</b>	<b>CEIEPAA SEMI-INTENSIVO</b>	<b>GC INTENSIVO</b>	<b>GC SEMI-INTENSIVO</b>	<b>TOTAL</b>	<b>%</b>
<i>SCN</i>	22	2	21	17	62	63.92
<i>S. uberis</i>	3	0	5	2	10	10.31
<i>S. aureus</i>	3	0	2	0	5	5.15
<i>S. intermedius</i>	0	0	4	0	4	4.12
<i>Micrococcus spp</i>	0	1	3	0	4	4.12
<i>Lactobacillus spp</i>	0	1	2	0	3	3.09
<i>Escherichia coli</i>	0	2	0	0	2	2.06
<i>Aerococcus spp</i>	2	0	0	0	2	2.06
<i>Enterobacter spp</i>	0	1	1	0	2	2.06
<i>Pseudomonas spp</i>	1	0	0	0	1	1.03
<i>A. pyogenes</i>	0	0	0	1	1	1.03
<i>Klebsiella spp</i>	0	0	1	0	1	1.03
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>7</b>	<b>39</b>	<b>20</b>	<b>97</b>	<b>100</b>

**Cuadro 6. ESPECIES DE *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVO AISLADOS EN MUESTRAS DE LECHE.**

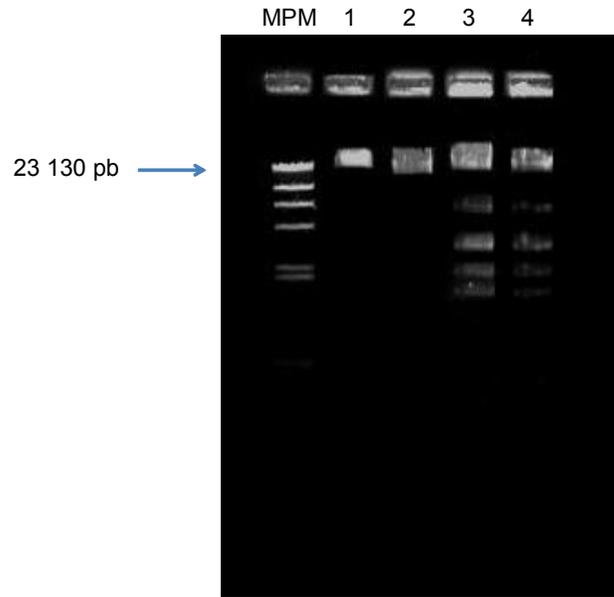
<b>GÉNERO</b>	<b>CEIEPAA INTENSIVO</b>	<b>CEIEPAA SEMI-INTENSIVO</b>	<b>GC INTENSIVO</b>	<b>GC SEMI-INTENSIVO</b>	<b>TOTAL</b>	<b>%</b>
<i>S. chromogenes</i>	6	0	15	9	30	48.39
<i>S. simulans</i>	7	0	0	7	14	22.58
<i>S. xylosus</i>	7	2	3	1	13	20.97
<i>S. sciuri</i>	0	0	2	0	2	3.23
<i>S. haemolyticus</i>	1	0	0	0	1	1.61
<i>S. caprae</i>	1	0	0	0	1	1.61
<i>S. epidermidis</i>	0	0	1	0	1	1.61
<b>TOTAL</b>	<b>22</b>	<b>2</b>	<b>21</b>	<b>17</b>	<b>62</b>	<b>100</b>

**CUADRO 7: TOTAL DE MUESTRAS CON MASTITIS SUBCLÍNICA**

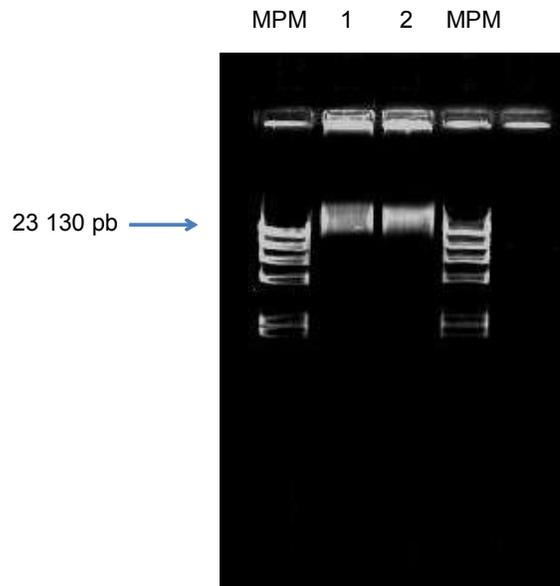
<b>TIPO DE MUESTRAS</b>	<b>CEIEPAA INTENSIVO</b>	<b>CEIEPAA SEMI-INTENSIVO</b>	<b>GC INTENSIVO</b>	<b>GC SEMI-INTENSIVO</b>	<b>TOTAL</b>
MUESTRAS POSITIVAS A CALIFORNIA GRADO 2 SIN CRECIMIENTO BACTERIANO	10	4	0	0	14
MUESTRAS CON CRECIMIENTO CONSECUTIVO	14	0	25	12	51
<b>TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>4</b>	<b>25</b>	<b>12</b>	<b>65</b>

**Cuadro 8. RESULTADOS DE LA PCR MULTIPLEX**

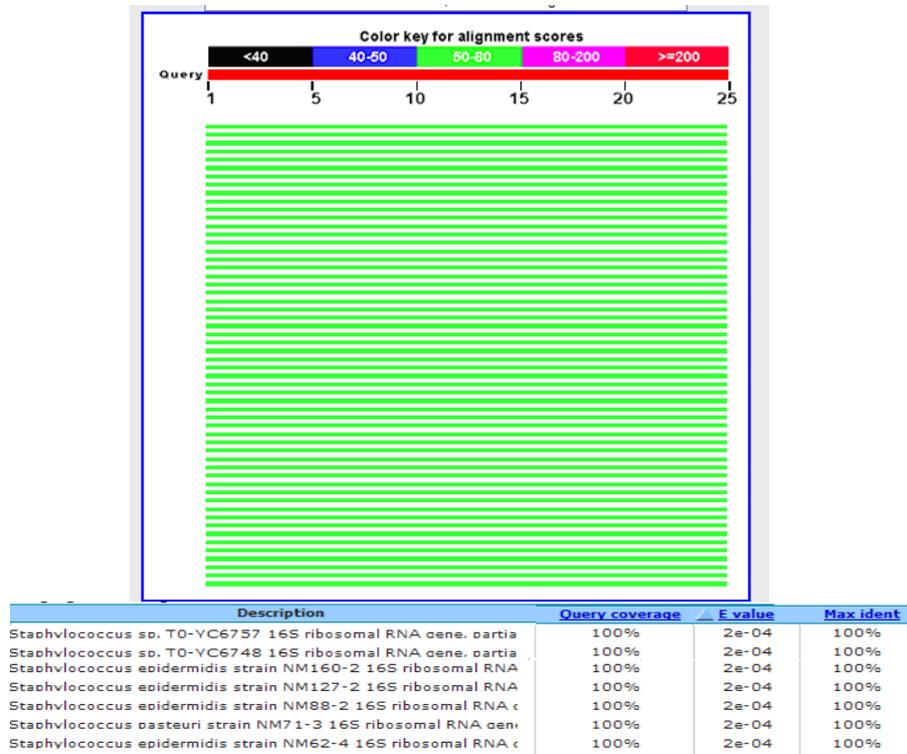
NÚMERO DE MUESTRA	BACTERIOLOGIA	BANDAS ESPERADAS	BANDAS OBTENIDAS
1	<i>S. aureus</i>	3	3
2	<i>S. aureus</i>	3	3
3	<i>S. aureus</i>	3	3
4	<i>S. simulans</i>	1	3
5	<i>S. simulans</i>	1	3
6	<i>S. simulans</i>	1	3
7	<i>S. simulans</i>	1	3
8	<i>S.simulans, E. aerogenes</i>	1	3
9	<i>S. chromogenes</i>	1	3
10	<i>S. simulans, S. xylosus</i>	1	3
11	<i>E. aerogenes</i>	0	3
12	<i>Bacillus, E. aerogenes, S. simulans</i>	1	2
13	Negativo	0	2
14	<i>Bacillus</i>	0	2
15	<i>S. chromogenes</i>	1	1
16	<i>S. uberis</i>	0	0
17	<i>S. xylosus</i>	1	0
18	<i>S. simulans</i>	1	0
19	<i>E. aerogenes</i>	0	0
20	Negativo	0	0
21	Negativo	0	0
22	Negativo	0	0
23	Negativo	0	0
24	Negativo	0	0
25	Negativo	0	0
26	Negativo	0	0
27	Negativo	0	0
28	Negativo	0	0
29	Negativo	0	0
30	Negativo	0	0



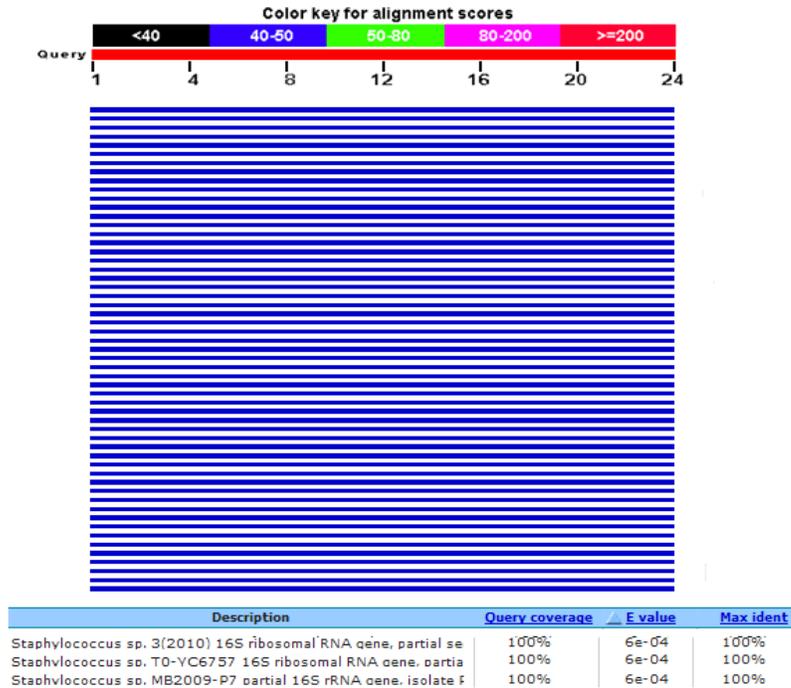
**Figura 1.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM = marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III. 1 y 2 ADN de *S. aureus* ATCC 29737, 3 y 4 ADN de *S. xylosus* ATCC 700404, extraído por el método de fenol-cloroformo.



**Figura 2.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM = marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III, 1 y 2 ADN de *S. uberis* ATCC 13386, extraído por el método de fenol-cloroformo.



**Figura 3.** Homología del iniciador 16s-Forward para *Staphylococcus* spp. mediante el BLAST del NCBI.



**Figura 4.** Homología del iniciador 16s-Reverse para *Staphylococcus* spp. mediante el BLAST del NCBI.

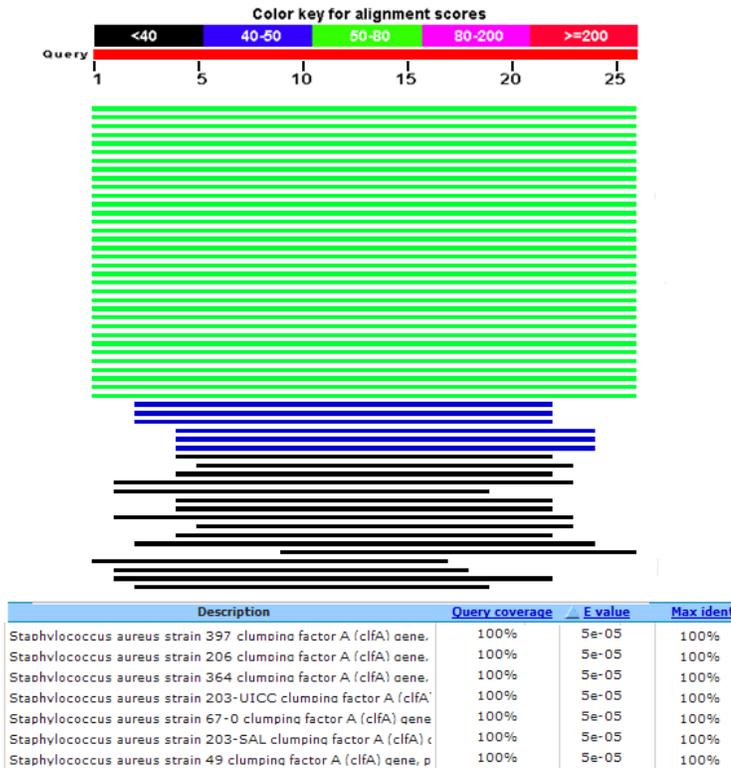


Figura 5. Homología del iniciador *clfA*-Forward para *S. aureus* mediante el BLAST del NCBI.

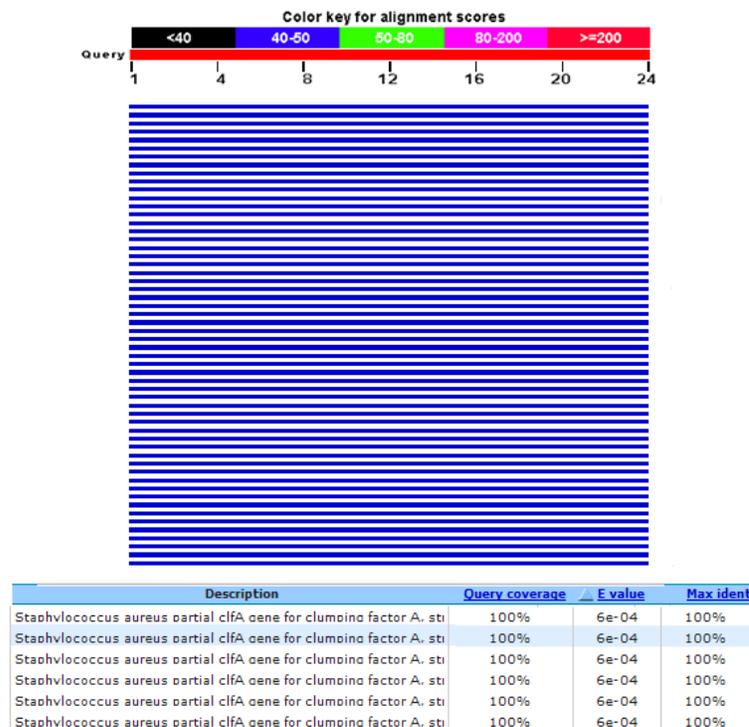
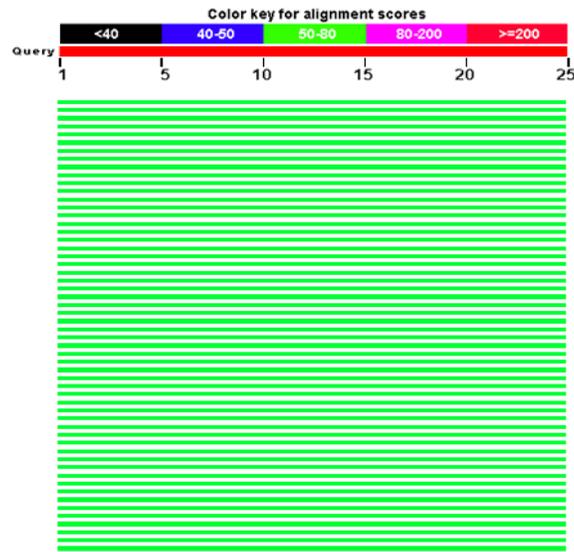
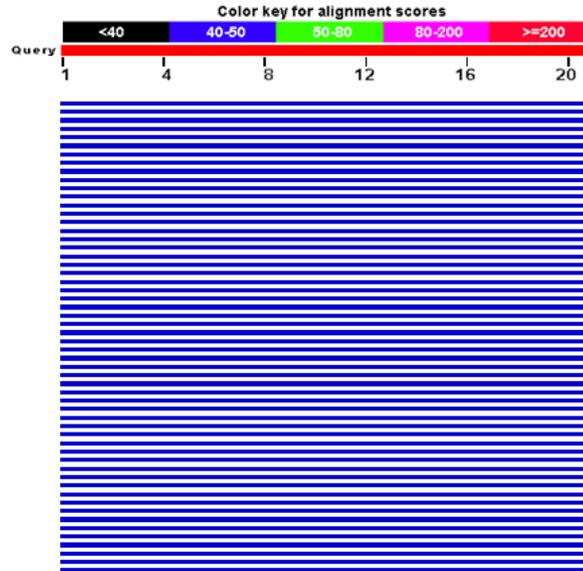


Figura 6. Homología del iniciador *clfA*-Reverse para *S. aureus* mediante el BLAST del NCBI.



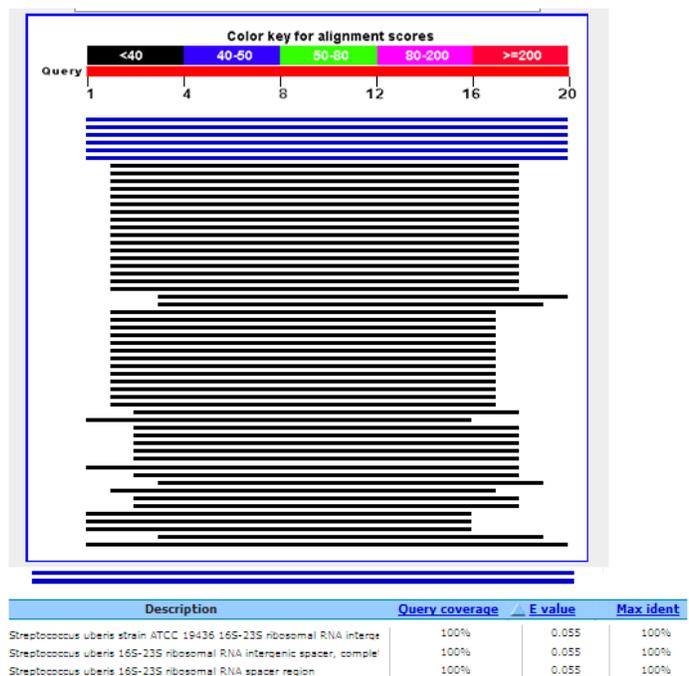
Description	Query coverage	E value	Max ident
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	2e-04	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	2e-04	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	2e-04	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	2e-04	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	2e-04	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	2e-04	100%

**Figura 7.** Homología del iniciador *coa* -Forward para *S. aureus* mediante el BLAST del NCBI.

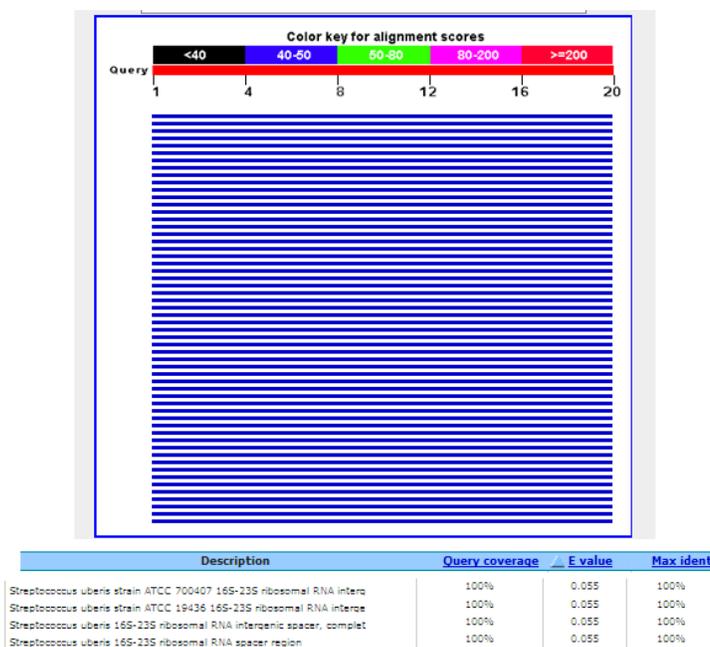


Description	Query coverage	E value	Max ident
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	0.021	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	0.021	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	0.021	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	0.021	100%
Staphylococcus aureus coa gene for staphylocoagulase precursor, complete	100%	0.021	100%

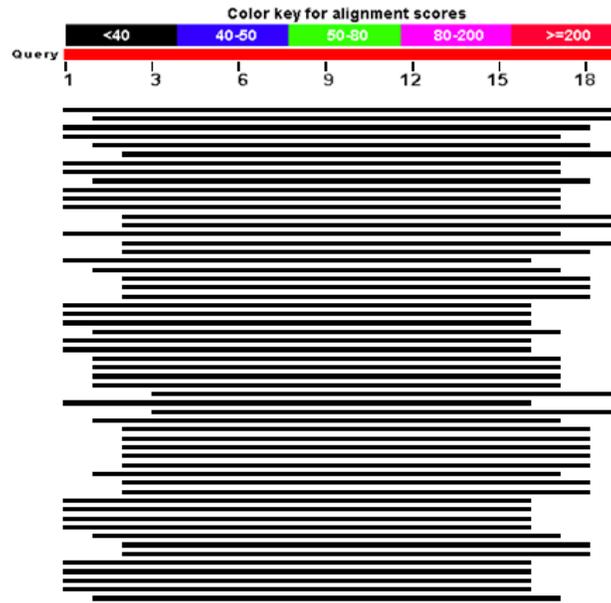
**Figura 8.** Homología del iniciador *coa*-Reverse para *S. aureus* mediante el BLAST del NCBI.



**Figura 9.** Homología del iniciador 16s-23s ARNr Forward para *S. uberis* mediante el BLAST del NCBI.

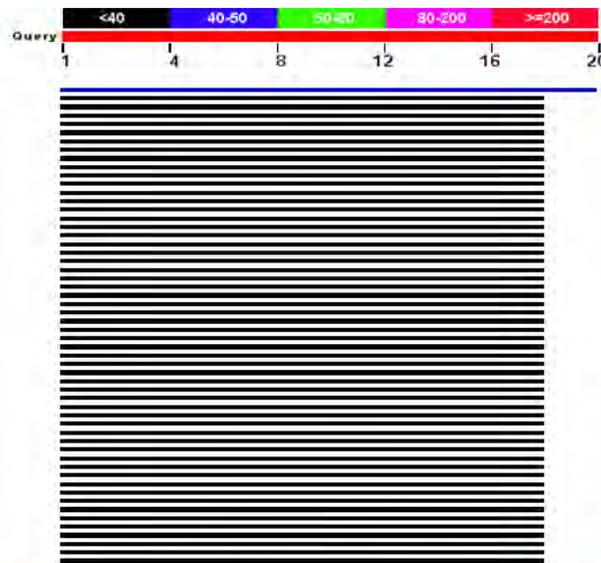


**Figura 10.** Homología del iniciador 16s-23s ARNr Reverse para *S.uberis* mediante el BLAST del NCBI.



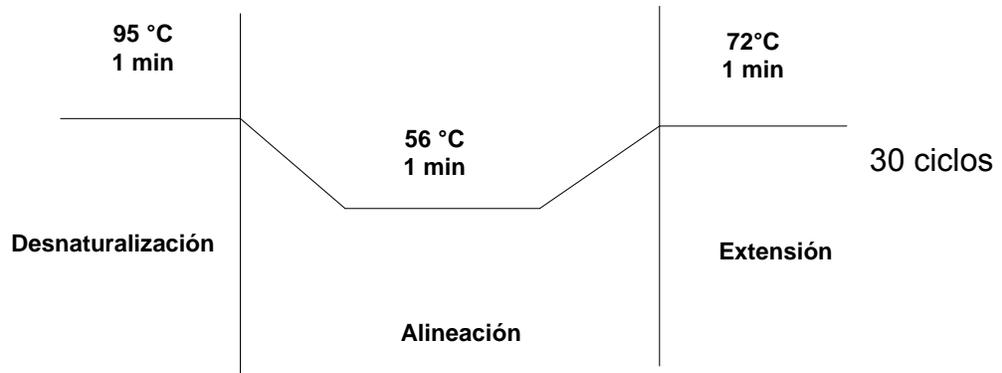
Description	Query coverage	E value	Max ident
Streptococcus uberis skc gene	100%	0.22	100%
Streptococcus uberis 0140J complete genome	94%	0.85	100%

**Figura 11.** Homología del iniciador *skc* -Forward para *S.uberis* mediante el BLAST del NCBI.

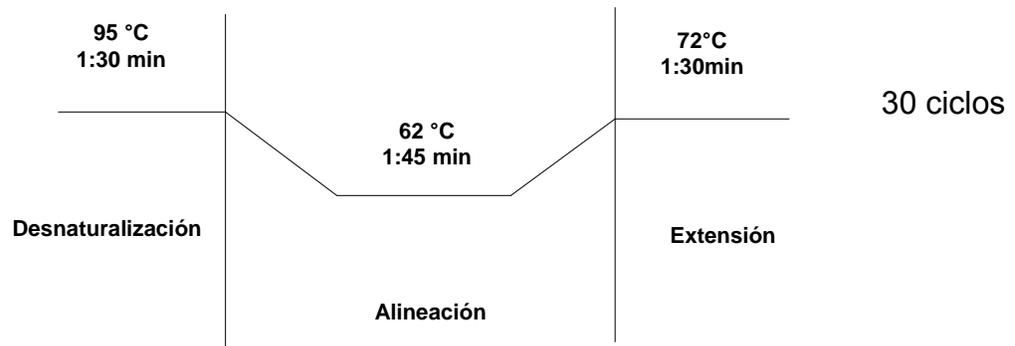


Description	Query coverage	E value	Max ident
Streptococcus uberis skc gene	100%	0.055	100%

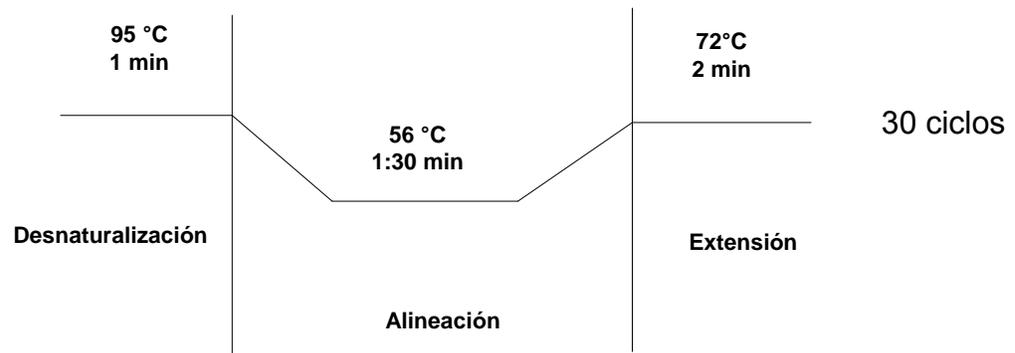
**Figura 12.** Homología del iniciador *skc*-Reverse para *S.uberis* mediante el BLAST del NCBI.



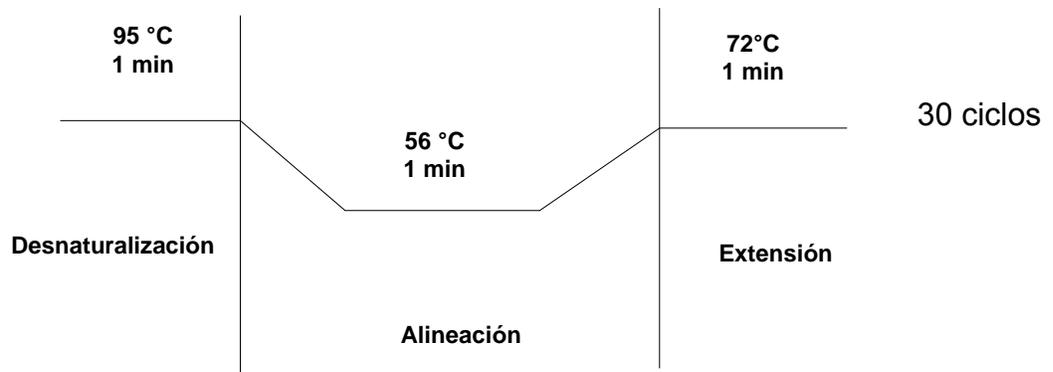
**Figura 13.** Constantes de la PCR de la región 16s ARNr de *Staphylococcus aureus*.



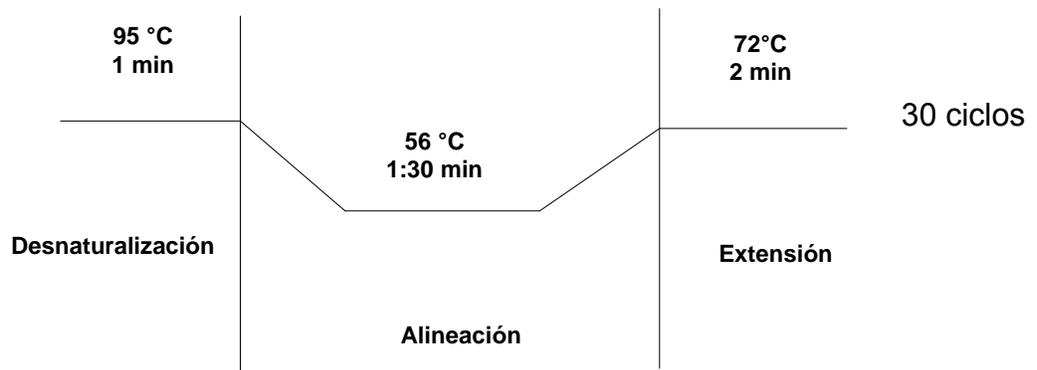
**Figura 14.** Constantes de la PCR del gen *clfA* de *Staphylococcus aureus*.



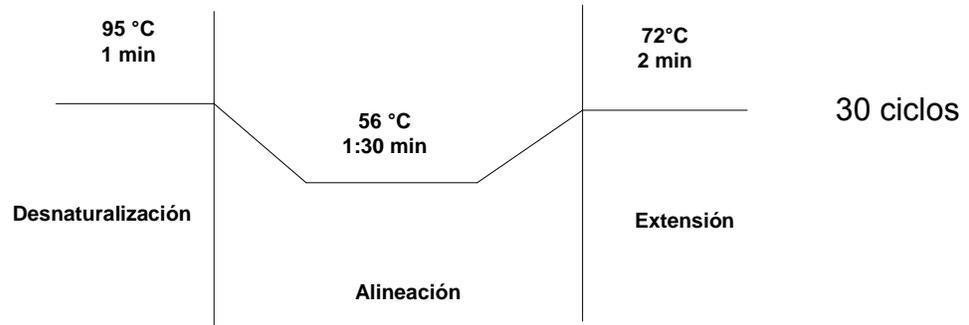
**Figura 15.** Constantes de la PCR del gen *coa* de *Staphylococcus aureus*.



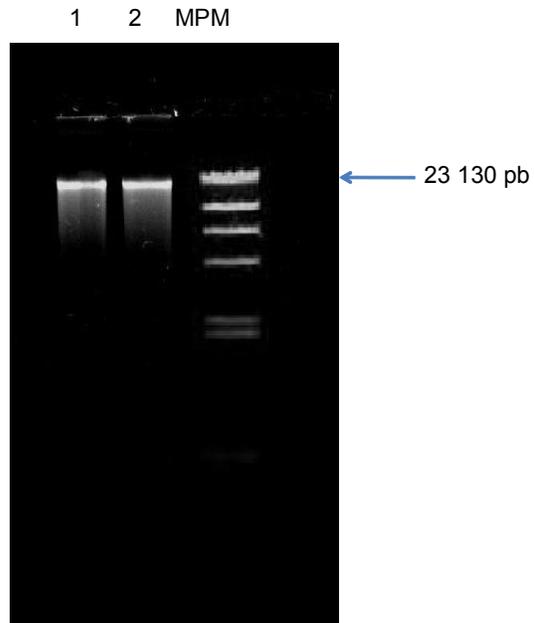
**Figura 16.** Constantes de la PCR del espacio intergénico 16s-23s ARNr de *Streptococcus uberis*.



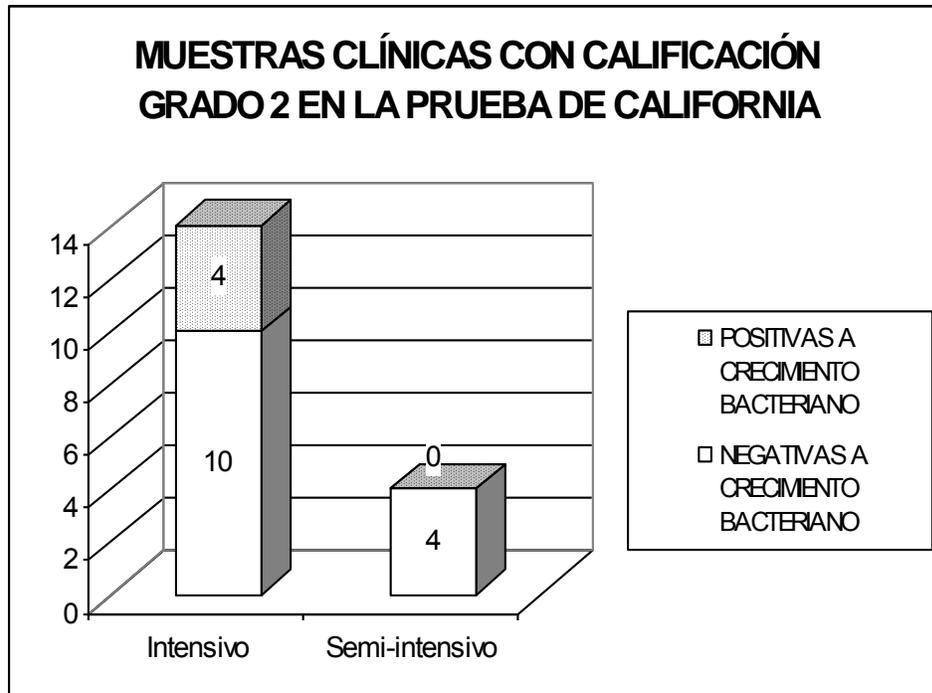
**Figura 17.** Constantes de la PCR del gen *skc* de *Streptococcus uberis*.



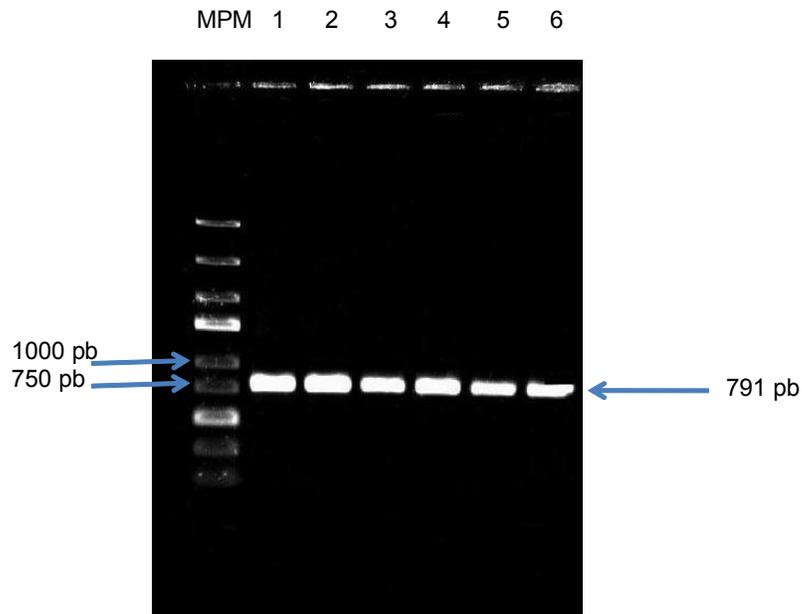
**Figura 18.** Constantes de la PCR múltiplex.



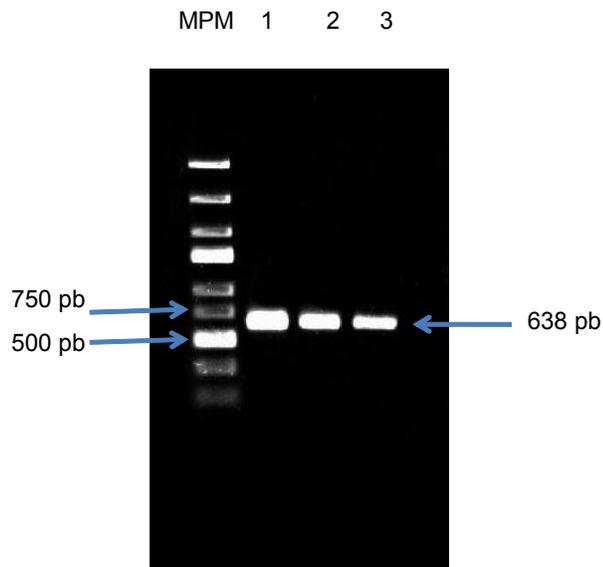
**Figura 19.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra: 1 y 2 ADN de leche mamitosa extraído según el protocolo de Cremosesi *et al* con modificaciones, MPM = marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III.



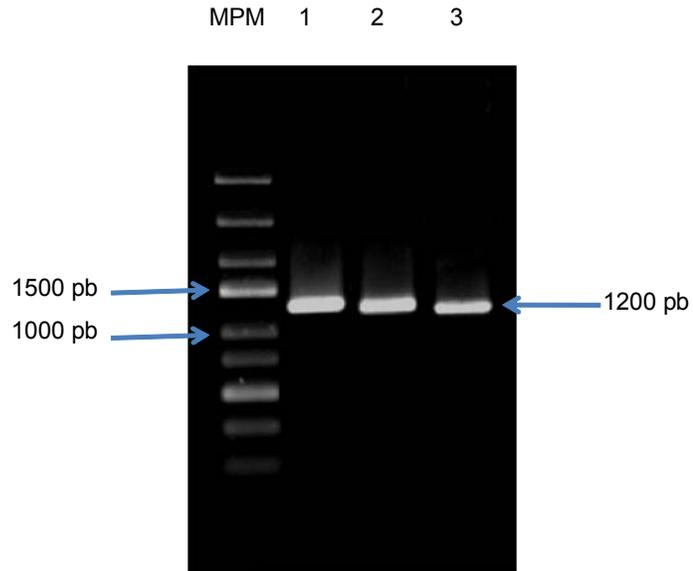
**Figura 20.** Animales positivos a mastitis subclínica por la prueba de California en el CEIEPAA.



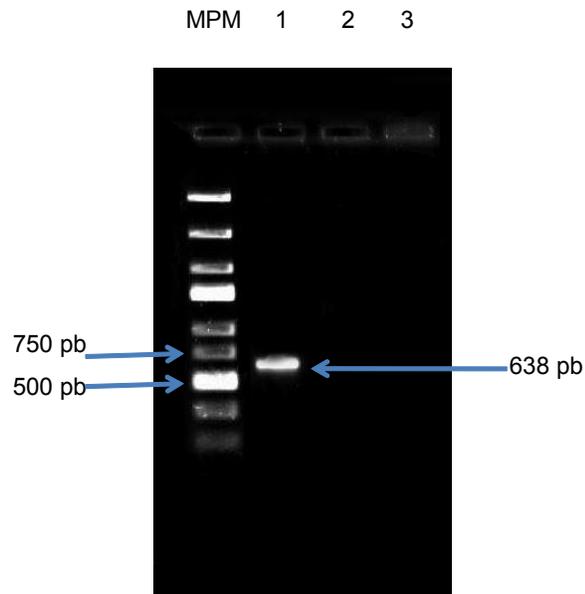
**Figura 21.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1-3 = PCR región 16s de *Staphylococcus* spp para *S. aureus* ATCC 29737 concentración 100, 10 y 1 ng/μl de ADN respectivamente, 4-6= PCR región 16s de *Staphylococcus* spp para *S. xylosus* ATCC 700404 concentración 100, 10 y 1 ng/μl de ADN respectivamente.



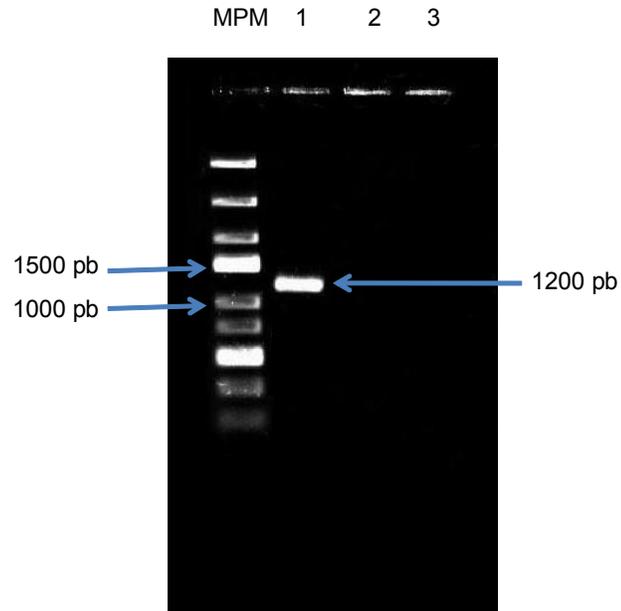
**Figura 22.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1-3= PCR gen *clfA* de *S. aureus* ATCC 29737 concentración 100,10 y 1 ng/μl de ADN respectivamente.



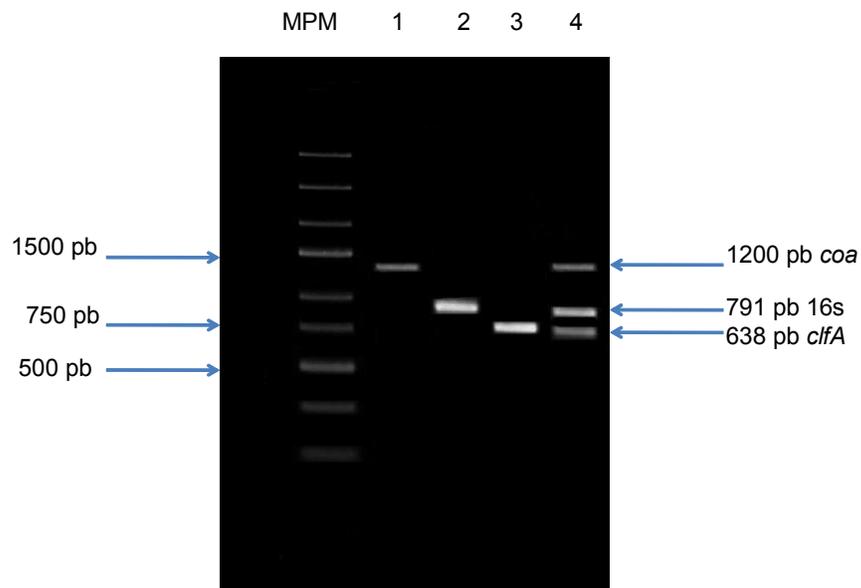
**Figura 23.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra: MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1-3= PCR gen *coa* *S. aureus* ATCC 29737 concentración 100,10 y 1 ng/μl de ADN respectivamente.



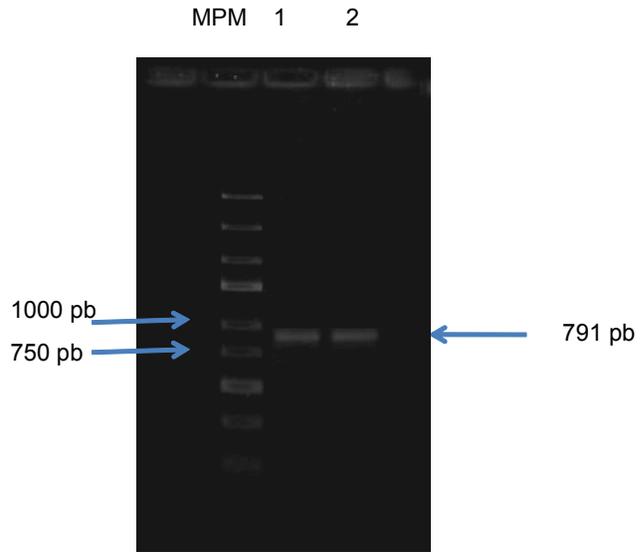
**Figura 24.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR gen *clfA*, MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1= *S. aureus* ATCC 29737, 2= *S. xylosus* ATCC 700404, 3= *S. uberis* ATCC 13386. Concentración ADN 100 ng/μl.



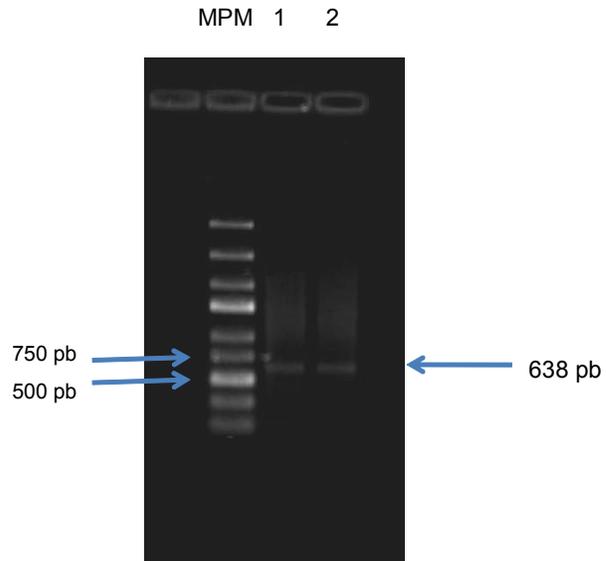
**Figura 25.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR gen *coa*. MPM: marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1=*S. aureus* ATCC 29737, 2= *S. xylosus* ATCC 700404, 3= *S. uberis* ATCC 13386. Concentración ADN 100 ng/μl.



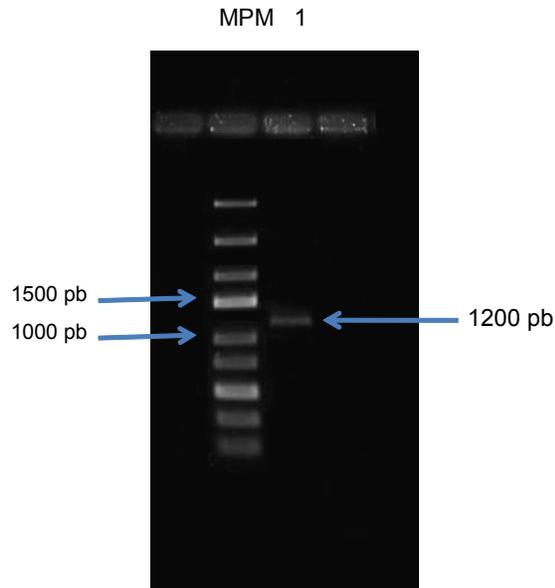
**Figura 26.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR Múltiplex para *S. aureus* y SCN. MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler, 1= gen *coa*, 2= región 16s *Staphylococcus* spp, 3= gen *clfA*. 4= Productos de la PCR múltiplex a partir de ADN extraído de *S. aureus* ATCC 29737.



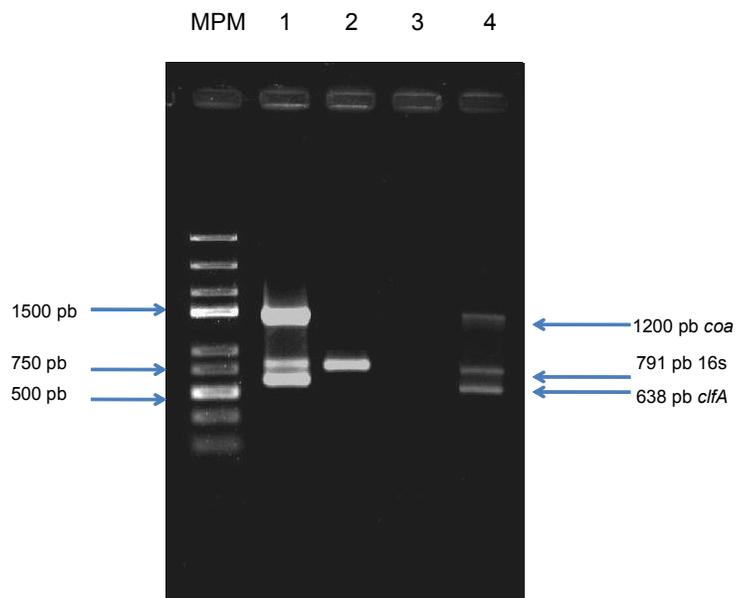
**Figura 27.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR región 16s *Staphylococcus* spp. MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1 y 2= Producto de PCR a partir de ADN extraído de leche mamitosa de cabra.



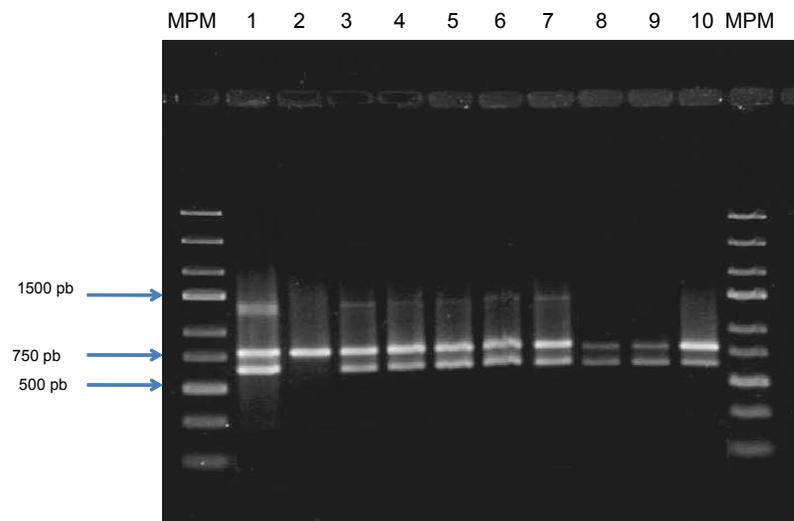
**Figura 28.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR gen *c/fA*. MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1 y 2= Producto de PCR a partir de ADN extraído de leche mamitosa de cabra.



**Figura 29.** Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR gen *coa*. MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1= Producto de PCR a partir de ADN extraído de leche mamitosa de cabra.



**Figura 30.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR Múltiplex para *S. aureus* y SCN. MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1= Control positivo con ADN de *S. aureus* ATCC 29737, 2= Control positivo con ADN de *S. xylosus* ATCC 700404, 3= Control negativo, 4= PCR múltiplex con ADN de leche mamitosa de cabra.



**Figura 31.** Fotografía de un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se muestra PCR Múltiplex para *S. aureus* y SCN.  
 MPM= marcador de peso molecular Gene Ruler Express, 1= Control positivo con ADN de *S. aureus* ATCC 29737, 2= Control positivo con ADN de *S. xylosus* ATCC 700404, 3-10= PCR multiplex con ADN de leche mamitosa de cabra.