

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Identificación de *Staphylococcus* spp en leche de
cabras en tres establos lecheros de los municipios
de Matamoros, y Viesca en el Estado de Coahuila**

POR

CRISTINA TOLENTINO CASTRO

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TITULO DE**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2011

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

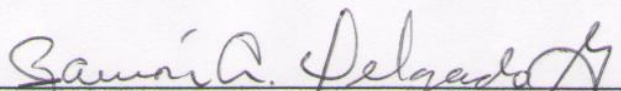
UNIDAD LAGUNA

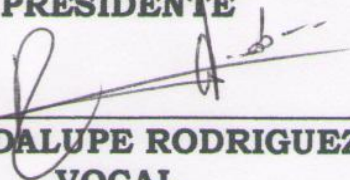
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Identificación de *Staphylococcus* spp en leche de cabras
en tres establos lecheros de los municipios de Matamoros,
y Viesca en el estado de Coahuila**

TESIS APROBADO POR EL H. JURADO EXAMINADOR


M.C.V. RAMON ALFREDO DELGADO GONZALEZ
PRESIDENTE


M.V.Z. JOSE GUADALUPE RODRIGUEZ MARTINEZ
VOCAL


M.V.Z. M.C. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO
VOCAL


M.V.Z. FRANCISCO JAVIER PASTOR LOPEZ
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2011

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**Identificación de *Staphylococcus* spp en leche de
cabras en tres establos lecheros de los municipios
de Matamoros, y Viesca en el estado de Coahuila**

ASESOR PRINCIPAL

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

**COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL**

M.V. Z RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO

**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2011

DEDICATORIAS

Adiós que me ha dado la vida, salud, fortaleza, por ser mi refugio en momentos difíciles por haber puesto personas buenas que me han brindado su apoyo a lo largo de este trayecto de mi vida gracias señor por darme la oportunidad de formarme como profesionista.

A mis padres: Censorino y María de la Paz por su amor, cariño, dedicación comprensión, por ese gran ejemplo de enseñanza y por esa perseverancia en convertirme en una persona de bien, por apoyo incondicional que me han brindado en todo momento que aunque a veces les he fallado nunca dejaron de confiar en mí. Gracias mama por ser esa persona tan noble, sencilla, maravillosa que eres.

A mi hermano: Erasto por brindarme siempre su apoyo incondicional, el gran ejemplo a seguir, tener una palabra de aliento e impulsarme siempre a salir adelante a pesar que te falle ahí estuviste apoyándome, gracias por confiar en mí , quererme tanto, darme la confianza de poder pedirte algo y por esa calidad humana tan grande que tienes.

A mi hijo: José Eliel por ser mi inspiración, fortaleza e impulso para seguir adelante, por ser mi luz en los momentos que no hayo la salida me haces nunca rendirme, a ti hijo te dedico todo lo que haga en la vida gracias hijo por a ver llegado a mi vida.

José Alberto Hernández gracias a dios por a verte puesto en mi camino por qué me apoyaste a pesar de tu juventud te quedaste ami lado hasta que te fue posible por quererme, enseñarme amar, ver diferente la vida, por esa paciencia que me tuviste, ser tan generoso y enseñarme a descubrir la fortaleza que hay en mí nunca rendirme. Gracias mi flaco.

A mis hermanas: Vicenta, María Magdalena, María Isabel y Gabriela por su apoyo y comprensión.

Mis amigos: Yiraldy, Rive, Chávelo, Citlali, Picho, Vero, Víctor, Rosendo, Abue Caty, Toño y Francisco, por hacerme compañía en estos 5 años compartiendo alegrías tristezas.

AGRADECIMIENTOS

A Sigma alimentos y al INIFAP por el apoyo y financiamiento de esta tesis mediante el proyecto “Innovación, diseño y desarrollo de derivados de lácteos de valor agregado, a través de nuevos procesos biotecnológicos con alto grado de innovación que brinde ventajas competitivas sustentables en la cadena productiva de ganado caprino”, así como a los caprinocultores Eusebio Guerrero, Ladislado Medina, Hipólito Medina, Gonzalo Zarate.

I.B.Q. Luis Maconetzin Isidro Requejo: compartirme sus conocimientos, dedicación y tiempo para lograr realizar el trabajo experimental en el área de campo y laboratorio.

M.C. Francisco Javier Pastor López por a verme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo por su apoyo y colaboración para poder realizar este trabajo y lograr finalizarlo.

I.B.Q. Brenda luna por su colaboración, compartiendo sus conocimientos para poder llevar a cabo cada una de las actividades realizadas en el laboratorio, Ana, Itzel por su constante apoyo en las actividades en el laboratorio.

M.C.V. Ramón Alfredo delgado Gonzales por a verme ayudado de llevar a cabo este trabajo y lograr poder concluirlo mis más sinceros agradecimiento y mi respeto por ser un excelente profesor.

A cada uno de mis maestros por compartirme sus conocimientos y ayudarme a mi formación profesional en estos cinco años.

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna por darme el privilegio de pertenecer a ella y lograr mi formación profesional.

Alma Terra Mater gracias por todo

RESUMEN

La mastitis causada por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una de las infecciones más importantes que afecta tanto la calidad como la cantidad de producción de leche, causa infecciones intramamarias en el ganado lechero en todo el mundo. Vive dentro y fuera de la ubre, en la piel del pezón y puede causar tanto mastitis clínica como subclínica. Por tal motivo, la finalidad de este trabajo de investigación fue determinar la frecuencia de *Staphylococcus* spp, en leche de cabras en tres establos lechero de los municipios de Matamoros y Viesca en el estado de Coahuila. Se analizaron un total de 348 muestras de leche de cabra obtenidas por ordeño manual y proveniente de tres productores diferentes. Las muestras fueron sembradas en medio Agar Baird Parker enriquecido con telurito y yema de huevo el cual es un medio específico para *Staphylococcus* spp. Se realizó un conteo de 917 UFC. Se seleccionaron 121 colonias características típicas de *S. aureus*, se les realizaron pruebas para su confirmación, tinción de Gram, catalasa y coagulasa. Los resultados obtenidos con la tinción de Gram fueron 88 (72.72%) positivas, 65 (53.71%) catalasa positivas, y no hubo coagulasa positivas. Los resultados sugieren que no hay *Staphylococcus aureus* en problemas de mastitis en estos establos.

Palabras clave: *Staphylococcus*, mastitis, leche de cabra, tinción de Gram, prueba de catalasa, prueba de coagulasa.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
1. Historia	2
2. Taxonomía	2
3. Etiología	2
4. Epidemiología	5
5. Patogenia	6
6. Diagnóstico	7
7. Profilaxis	8
8. Tratamiento	9
III. JUSTIFICACIÓN	9
IV. HIPÓTESIS	9
V. OBJETIVOS	10
1. Objetivo general	10
2. Objetivo específico	10
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	10
1. Lugar y área de trabajo	10
2. Material y reactivos	10
3. Toma de muestra	11
4. Procesamiento de las muestras en Agar Baird Parker	11
5. Pruebas para la confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
A. Frotis del cultivo	12
B. Tinción Gram	13
C. Prueba de coagulasa	13
D. Prueba de catalasa	13
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14

VIII.	CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	19
IX.	LITERATURA CITADA	20
X.	ANEXOS	24

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i> .	3

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conteo total de <i>Staphylococcus</i> spp en recipientes de almacenamiento de tres hatos lecheros de cabras.	15
Figura 2. Porcentaje de <i>Staphylococcus</i> spp en leche de recipiente de almacenamieto de tres hatos lecheros de cabras.	16
Figura 3. Conteo total de <i>Staphylococcus</i> spp en leche de toma directa de tres hatos lecheros de cabras.	16
Figura 4. Porcentaje de <i>Staphylococcus</i> spp en leche de toma directa de tres hatos lecheros de cabras.	17
Figura 5. Resultado de pruebas de los aislamientos de <i>Staphylococcus</i> spp con tinción de Gram y las pruebas de catalasa y coagulasa.	18

I. INTRODUCCIÓN

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es uno de los más importantes agentes etiológicos causante de mastitis contagiosa en cabras, vacas y ovejas. La especie aislada con mayor frecuencia en casos clínicos y subclínicos y es de manera consistente una de las cuatro causas principales de infecciones en enfermería. La mastitis causada por *S. aureus* es una de las infecciones más importantes que afecta tanto la calidad como la cantidad de producción de leche. Es el patógeno más significativo que causa infecciones intramamarias en el ganado lechero en todo el mundo. Vive dentro y fuera de la ubre, en la piel del pezón y puede causar tanto mastitis clínica como subclínica es responsable del 30 al 40 de todas las infecciones (Ortega, 2010).

Hasta la fecha se han caracterizado diferentes especies y subespecies de estafilococos que se dividen, en función de la capacidad de coagular el plasma, en estafilococos coagulasa positivos (ECP) y estafilococos coagulasa negativos (ECN). De todos los estafilococos identificados, *S. aureus* es considerado el principal responsable de mamitis clínicas. Los ECN han sido considerados como patógenos menores, pues se asocian a cuadros de mamitis más leves (Luque *et al.*, 2009). Los agentes etiológicos causantes de mastitis caprina son numerosos, con diferente poder patógeno y diferentes mecanismos de penetración a la ubre, en función de su hábitat (Ortega, 2010).

Se pueden dividir en tres grupos de microorganismos; contagiosos como *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *Mycoplasma* spp, *Streptococcus agalactiae*, *S. disgalactiae*, *S. uberis*, ambientales en estos se destaca la presencia, principalmente del *Staphylococcus* spp y coliformes, y otros bacilos Gram negativos, además de los oportunistas (Ayala, 2009; López, 2007).

De acuerdo a estos antecedentes la finalidad de la presente investigación es la identificación de *S. aureus* en leche de cabras de tres hatos caprinos de la Comarca Lagunera.

II. ANTECEDENTES

1. Historia

El término *Staphylococcus* viene del griego *staphyle*= racimo y *kokkos*=granos, denominación inicialmente otorgada por Ogston hacia 1880 aunque tanto Koch como Pasteur lo habían también observado (Fueyo, 2009). Koch en 1878 fue el primero en describir estafilococos en pus de humano. En 1880 Luis Pasteur los cultivó en medio líquido, en 1882 Sir William Ogston demostró su patogenicidad en ratón y cobayo, en 1884 se produjo el primer intento taxonómico por parte de Rosenbach, quien describió dos especies: *S. aureus*, así denominada por el pigmento amarillo-dorado de sus colonias, y *S. aureus*, que formaba colonias de color blanco –yesoso. En 1930 Juleanelle introdujo la primera clasificación basada en las características antigénicas del género y en 1942 Fisk desarrolló un método de tipificación por bacteriófagos. Pero no fue sino hasta fines de la década del 60 y principios de la 70 que los trabajos de Pulverer comenzaron a mostrar el carácter de patógeno oportunista de los ECN, y finalmente en la década de los 70's, los múltiples trabajos de Wesley, Kloos y Scherifer dieron un vuelco definitivo en esta materia y pusieron orden en la compleja taxonomía de ese grupo, al describir las numerosas especies que aun hoy reconocemos (Aranibar, 2009; Fueyo, 2005).

2. Taxonomía

Al menos 30 especies de estafilococos han sido reconocidas por el análisis bioquímico y, en particular, por hidrolización ADN-ADN. Once de ellos pueden ser aislados comensales y también tienen un mayor potencial patógeno, dentro de los cuales se encuentran *S.aureus* y *S. epidermitis*.

3. Etiología

Staphylococcus tienen forma de cocos, de tamaño de 0,8-1 µm de diámetro, y una presentación característica de agrupaciones irregulares semejantes a racimos de uvas debido a su capacidad para dividirse en tres planos. Son bacterias aerobias o anaerobias facultativas y son siempre inmóviles (Fueyo, 2005). El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de estas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas; no tienen otros hábitats importantes excepto cuando están involucrados en infecciones (Velázquez *et al.*, 2005). La especie tipo, *S. aureus* o “estafilococo dorado”, tiene todas las características típicas del género: anaerobio facultativo (Fueyo, 2005), pero crece mejor en condiciones aerobias (Bustos, 2006).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*.

Dominio	Bacteria
Reino	Procaryotae
Sección	Firmibacteria(firmicutes)
Clase	Bacilli
Orden	Bacillares
Familia	VIII <i>Staphylococcaeae</i>
Genero	<i>Staphylococcus o micrococcus</i>
Especie	<i>S.aureus</i> .

(Aranibar, 2009)

Los mesófilos crecen en medios químicamente definidos, los cuales contienen glucosa, sales, aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico, es capaz de fermentar la glucosa y también el manitol con producción de ácido, y tolera condiciones ambientales muy variables. Puede crecer a cualquier temperatura entre 6 y 46 °C, con el óptimo en 30 y 37 °C. en cuanto el pH se desarrolla en valores de 4.0 y 9.8 con el óptimo a la neutralidad es igualmente tolerante con respecto a la sal, resistiendo concentraciones de hasta un 20% de NaCl, siendo ésta una propiedad utilizada para crear condiciones selectivas en medios de cultivo para su aislamiento y propagación. Este carácter permite un crecimiento en

alimentos con muy baja actividad de agua desde 0.99 hasta 0.83 y un valor óptimo de 0.94, es bastante resistente a la desecación, congelación y el calor aunque no tanto como las endosporas de las bacterias esporulada (Fueyo, 2005).

El color amarillo clásico de las colonias de *S. aureus* se debe a la producción de carotenoides (Ovidio *et al.*, 2006); sin embargo, se presentan frecuentemente variantes no pigmentadas en muchas cepas, el microorganismo produce catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre (Bustos *et al.*, 2006).

Tolera altas concentraciones de cloruro de sodio. Se destruye fácilmente por altas temperaturas y por casi todos los agentes desinfectantes, por lo cual la presencia de esta bacteria en alimentos procesados o en equipos indica generalmente higiene deficiente o contaminación post proceso por causa humana (Ortega, 2010).

El crecimiento de *S. aureus* en los alimentos presenta un riesgo en salud pública debido a que algunas cepas producen enterotoxinas termoestables (A, B, C1, C2, C3, D y E), las cuales causan intoxicación alimentaria de alta incidencia. La pared celular del *S. aureus* está compuesta por polisacáridos de membrana (fundamentalmente péptido glicano asociado a ácido teitoico) y proteínas estructurales. El *S. aureus* secreta una gran cantidad de enzimas, como lipasa, estereasa, desoxirribonucleasa, estafiloquinasa, hialuronidasa y la fosfolipasa (Ortega, 2010).

Los *Staphylococcus*, según produzcan o no la enzima coagulasa, se clasifican en ECP y ENC. Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de los estafilococos, se considera que los ECP son patógenos y los ENC no lo son. En el grupo de los estafilococos coagulasa positivos se incluyen al *S. intermedius*, *S. hyicus*, y *S. aureus*. Estas especies producen procesos patológicos en los animales. En el grupo ENC están, *S.*

caprae, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. chromogenes* y *S. simulans* (Ortega, 2010).

4. Epidemiología

La mastitis suponen uno de los mayores problemas sanitarios y económicos que afectan el sector lechero ovino y caprino uno de los principales agentes etiológicos implicados en el género *Staphylococcus*, responsable del 60-80% de los casos de mastitis en pequeños rumiantes, siendo el *S. aureus* una de las especies más frecuentes aisladas (Fernández *et al.*, 2003). En la lechería caprina las mastitis afectan la cantidad y calidad de la leche. La incidencia de mastitis subclínicas oscila entre el 5 y el 50% del rebaño (Ortega, 2010). Siendo *Staphylococcus* es el género más frecuente. En el caso de mastitis clínicas los estudios muestran una incidencia anual menor al 5% y que *S. aureus* (nocivo para el ser humano) es el agente causal más frecuente (20-57%), aunque también SCN han sido aislados en un 11 a 52% de los casos de mostrando su efecto nocivo para los pequeños rumiantes. También se registran brotes epizooticos causados principalmente por *S. aureus*. El *S. aureus* es una bacteria patógena ampliamente investigada en relación con enfermedades de animales y de humanos. En estos causa intoxicación alimentaria choque tóxico y una variedad de infecciones piógenas en animales constituye la principal causa de mastitis; en vacas, borregas y cabras es causante, en el ámbito mundial, de fuertes pérdidas económicas (Herrera *et al.*, 2005).

La legislación limita la comercialización de la leche de oveja, cabra y vaca con *S. aureus* (RD 1679/94). Especialmente agudos resultan los brotes en explotaciones de ordeño mecánico en las que desajusta alguno de los parámetros de la ordeñadora y existen portadores de *S. aureus*. Es un germen ubicuo, capaz de contaminar diferentes superficies y se aísla fácilmente de la piel y mucosas de animales sanos, incluyendo a los humanos (Contreras *et al.*, 2002). La incidencia de mamitis clínicas en pequeños rumiantes suele ser menor al 5% al año, aunque en un pequeño porcentaje de explotaciones puede

ser superior (30-50%), siendo las infecciones intramamarias persistentes una de las principales causas de sacrificio de ovejas y cabras. Los estafilococos son los principales agentes implicados en mamitis de pequeños rumiantes, tanto en formas clínicas como subclínicas, siendo los propios animales los reservorios de estos microorganismos a nivel de la glándula mamaria, piel y canal del pezón (Luque *et al.*, 2009). El contagio se produce durante la fase de lactación, siendo el ordeño el principal punto crítico; además los propios corderos y cabritos “*glotones*” que se alimentan de diferentes madres Pueden contribuir a la diseminación de los agentes responsables de mamitis en una granja (Contreras *et al.*, 2002; Luque *et al.*, 2009).

5. Patogenia

El *S. aureus*, puede producir una amplia gama de toxinas y enzimas extracelulares, de las cuales depende su virulencia y que puede contribuir a la patogénesis de la mastitis (Ortega, 2010). Su habitat natural en la piel y en las membranas mucosas de los mamíferos es capaz de vivir en el interior de las células como los macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y las células epiteliales (Ovidio *et al.*, 2006). Es un organismo bastante resistente capaz de vivir fuera de la glándula mamaria en sitios como en los paños para secar las ubres, en manos del ordeñador y en la piel de los pezones. A pesar de los mecanismos de defensa adecuados y la terapéutica antimicrobiana, este microorganismo tiene la capacidad de colonizar el epitelio y el canal del pezón, se puede adherir y a las células epiteliales de la glándula mamaria. Se une específicamente a las proteínas de la matriz extracelular, fibronectina y el colágeno, que pueden ayudar a las células epiteliales a introducir al microorganismo protegiéndolo frente a los factores bactericidas exógenos y endógenos. La toxina beta por su parte, lesiona las células epiteliales secretoras mamarias, aumentan los efectos de la toxina alfa, incrementa la adherencia de *S. aureus* a las células epiteliales mamarias, y aumenta la proliferación del microorganismo, la máquina, las toallas o las manos del ordeñador transmiten la bacteria de una glándula infectada a una sana. Mediante la eliminación del tejido, especialmente la del epitelio alveolar, se

presenta una proliferación más o menos fuerte del tejido de la ubre, de esta forma se hacen nódulos y nodulitos, los cuales contiene bacterias vivas de *S. aureus*, estas pueden posteriormente salir de esas células y el cuarto afectado empieza nuevamente a eliminar bacterias, por lo que representa un peligro para los cuartos sanos no afectados. La glándula mamaria infectada de las cabras en lactación es el reservorio y la fuente principal de este microorganismo (Ortega, 2010).

S. aureus, es considerado el patógeno más importante causante de mastitis en la mayoría de los rebaños caprinos (Contreras *et al* 2002; Lucas, 2010). La mastitis gangrenosa en cabras es una condición clínica severa del proceso inflamatorio adentro glándulas mamarias. Ocurre en las primeras semanas de la lactancia, en uno o ambos lados de las glándulas y se caracteriza por fiebre, anorexia, disnea y toxemia. Inicialmente, la ubre está caliente, dolorosa y ocurre hinchazón del lado afectado, con la leche acuosa, conteniendo secreción purulenta y/o con sangre. La evolución del proceso se caracteriza por presentar la ubre con coloración oscura (azul-negruczo o azul-verdoso), fría, con una línea de demarcación del tejido afectado, desarrollo de abscesos y con pus en el drenaje. El curso clínico fatal se caracteriza por presentar una mala condición corporal, neumonía, septicemia y/o toxemia. Generalmente, la mastitis gangrenosa en cabras se asocia a *S. aureus* (Ribeiro *et al.*, 2007).

La elevada persistencia de la mastitis por *S. aureus* está relacionada con la capacidad de producción de exopolisacarido que forman una barrera protectora que limitan tanto la eficacia de la respuesta inmunitaria como de la quimioterapia. Lo mejor que se le puede hacer con un animal que haya superado una mastitis gangrenosa es eliminarlo del rebaño pues será un riesgo sanitario tanto para los consumidores, como para el resto de los animales del rebaño (Contreras *et al.*, 2001a; Contreras *et al.*, 2001b).

6. Diagnóstico

El diagnóstico de las mastitis clínicas se basa en la observación de las alteraciones de la glándula mamaria y secreción láctea, pero en el caso de las mastitis subclínicas resulta más complicado. Diferentes autores aconsejan realizar el recuento de células somáticas y/o el aislamiento de bacterias patógenas de la leche. El recuento de células somáticas permite determinar el estado sanitario y evaluar las medidas de control aplicadas en una explotación con antecedentes de mastitis. Por su parte, el aislamiento de los agentes responsables es también un requisito necesario para poder aplicar medidas de control eficaces (Luque *et al.*, 2009)

7. Profilaxis

La inmunización con vacunas comerciales o autovacunas de los rebaños con antecedentes, resulta una eficaz medida de control, la eliminación de los animales crónicamente afectados es la principal medida de control a implantar en los rebaños afectados. El orden en que los animales se dirigen a la sala de ordeño, repercute directamente en la salud mamaria del animal y por consiguiente, en la calidad de la leche que producen. El movimiento de los animales debe de ser tranquilo y sin provocar estrés, además de la limpieza de ubres y desinfección de pezones previo al ordeño (presellado), si se efectúa de manera correcta disminuye las nuevas infecciones hasta en un 50%. El despunte de los primeros dos o tres chorros de leche se efectúa con la finalidad de inspeccionar el aspecto de la secreción láctea y detectar las mastitis subclínicas en los primeros estadios de ésta. El sellado de pezones es importante debido a la extracción de la leche, ya que el esfínter permanece abierto durante un tiempo variable, lo cual lo deja expuesto a la entrada de microorganismos por lo que es indispensable el uso de soluciones que funcionen como sellador. El contagio en el ordeño es principalmente ocasionado a través de las pezoneras, es por ello, que la desinfección de las pezoneras debe ser esencial entre un animal y otro, pudiéndose efectuar de varias maneras, según las posibilidades y características de cada explotación (Ayala, 2009).

El control de las mastitis se basa en la aplicación de tratamientos antimicrobianos, que deben ser seleccionados atendiendo a los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* realizadas en laboratorios de diagnóstico frente a los microorganismos responsables, ya que un uso indiscriminado puede originar un incremento en la resistencia bacteriana, y además se ha relacionado con un aumento de las mastitis producidas por hongos y *Pseudomonas*. Antes de aplicar un tratamiento antimicrobiano, se debe tener en cuenta el tipo de mastitis, clínica o subclínica (Luque, 2009).

8. Tratamiento

El tratamiento implica drogas antimicrobianas y antiinflamatorias asociadas a la terapia fluidos, cirugía, deshidratación de la glándula descenso del tejido necrosado. *S. aureus* es susceptible a ampicilina, enrofloxaxina y gentamicina. El tratamiento más utilizado es la ampicilina (Ribeiro *et al.*, 2007). El tratamiento con antibióticos no es del todo efectivo, menos de un 15% de los animales infectados por *S. aureus* responde a la terapia con antibióticos. Esto se debe a la mala penetración de la droga a la glándula mamaria, lo cual ocasiona que un porcentaje importante de bacterias sobreviva en las células huéspedes y produzca infecciones recurrentes postratamiento. También se pueden utilizar antibióticos β -lactámicos como la penicilina y las cefalosporinas (Olivio *et al.*, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

La Comarca Lagunera esta en el primer lugar a nivel nacional en la producción de leche de cabra al alcanzar más de 80 millones de litros al año, por lo que es importante conocer los agentes microbianos que pudieran interferir con la producción de leche, como el *Staphilococcus aureus*, principal causante de mastitis clínica en cabras. De acuerdo a estos antecedentes y considerando que no hay estudios de los agentes causales de mastitis caprina, la finalidad de la presente investigación es conocer la flora patógena que afecta la ubre en cabras de la Región.

IV. HIPÓTESIS

La leche de cabras de tres establos lecheros de los municipios de Viesca y Matamoros en el Estado de Coahuila, presentan aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar la frecuencia de *Staphylococcus* spp en leche de cabras de tres establos lecheros caprinos de los municipios de Viesca y Matamoros, Coahuila.

2. Objetivo específico

Identificar los aislamientos de *Staphylococcus* mediante la tinción de Gram y las pruebas de catalasa y coagulasa en leche de cabra.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Lugar y área de trabajo

El trabajo se realizó en tres establos lecheros de cabras (Hatos 1, 2 y 3) en los municipios de Matamoros y Viesca en el estado de Coahuila. Las muestras de leche se analizaron en el laboratorio de Inocuidad Alimentaria y Valor Agregado del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias campo experimental Laguna en Matamoros, Coahuila.

2. Material y reactivos

Para la toma de muestras se utilizaron frascos de 100 ml estériles, asa de Digralsky, cajas petri, asa microbiológica punta redonda, autoclave, esterilizadora, probetas de 50 mL, micropipetas de 100 y 1000 μ L, puntillas, matraz Erlenmeyer, mechero de gas, guantes de látex, cubrebocas, tubos de ensayo de 5 a 7 mL, gradillas, varillas de vidrio estériles, suero de bovino, solución salina, medio de cultivo de Agar Baird Parker con yema de huevo y telurito, caldo de infusión cerebro corazón, reactivo para la prueba de California.

3. Toma de muestra

Se muestreo dos veces al mes en cada hato lechero durante cuatro meses, se tomaron 15 muestras de leche cruda por establo en cada ocasión; se seleccionaron las muestras positivas (grados 2 a 4) con la Prueba de California. Las muestras se tomaron directas de la ubre por ordeño manual y de cada recipiente de almacenamiento en frascos estériles de 100 mL. Se analizaron un total de 349 muestras de leches. Todas las muestras fueron transportadas en refrigeración y se analizaron en menos de 3 horas después de su adquisición.

4. Procesamiento de las muestras en Agar Baird Parker

- a. Se realizaron diluciones decimales hasta 10%.
- b. Utilizando diferentes pipetas de 1 mL para cada dilución, se depositaron 0.1 mL de las diluciones sobre la superficie de las placas de Agar Baird Parker (Anexo 1).
- c. Se distribuyó el inóculo sobre la superficie del agar con varillas de vidrio estériles dobladas en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.
- d. Se mantuvieron las placas en su posición hasta que el inóculo fue adsorbido totalmente por el agar.
- e. Se invirtieron las placas y se incubaron de 24 a 48 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- f. Después de 24 horas se seleccionaron las placas que mostraron de 20 a 200 colonias aisladas; se contaron y marcaron todas aquellas que

aparecieron negras y brillantes con o sin un ligero borde blanco y rodeadas por una zona clara en el fondo del medio opaco.

- g. Se incubaron las placas 24 horas más y se incluyeron en el cómputo las colonias nuevas que reunieron las características ya señaladas.
- h. Se seleccionaron las cajas que contuvieron entre 100 a 150 colonias típicas y se sembraron el número de colonias, cada una en dos tubos con caldo de infusión cerebro corazón (uno para la prueba de coagulasa y otro para la de catalasa), y se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.
- i. A las cepas seleccionadas se les realizaron frotis, se tiñeron con la técnica de Gram y se realizaron las pruebas de catalasa y coagulasa (NOM-115-SSA1-1994).

5. Pruebas para la confirmación de *Staphylococcus aureus*

A. Frotis del cultivo

- a. Se tomó cuidadosamente la caja de cultivo bacteriano con las manos cubiertas con guantes como forma de evitar contacto directo con el germen cultivado.
- b. Con el asa bacteriológica esterilizada (por flameo), se tomó una pequeña muestra del cultivo y se depositó sobre una gota de agua esterilizada en un portaobjetos limpio y debidamente rotulado y se distribuyó homogéneamente por el portaobjetos sin dispersarlo mucho o dejarlo muy compacto para luego proceder al proceso de fijación.
- c. Inmediatamente se distribuyó el contenido del asa bacteriológica, la misma que se procedió a esterilizar nuevamente previo a su empaquetamiento y almacenaje.
- d. Para fijar la muestra al portaobjetos se procedió al proceso de flameo que consistió en tener un mechero de gas encendido y pasar el portaobjetos a 2 cm de distancia de la flama de manera ondulante hasta que el contenido líquido estuviera casi seco, luego se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente como factor de seguridad para la

fijación se volvió a pasar por el mechero por tres ocasiones sin dejar que se quemara el contenido en ningún momento.

B. Tinción de Gram

- a. Se tomó portaobjetos fijado con la muestra del cultivo y se procedió a cubrirla completamente con cristal violeta por un minuto, luego se eliminó el exceso con abundante agua.
- b. Con el portaobjetos escurrido se procedió a llenarlo con solución de Lugol completamente por encima de la muestra fijada por un minuto y luego se eliminó el exceso con abundante agua.
- c. Se procedió entonces a cubrir el portaobjetos con alcohol-acetona por 10 segundos para lavar después con abundante agua.
- d. Por último al portaobjetos con la muestra se le añadió suficiente tinción de Safranina por un minuto para entonces proceder a lavar el exceso de la tinción.
- e. El portaobjetos teñido se procedió a secar y a observar con el microscopio de luz visible.

C. Prueba de coagulasa

1. Se agregaron 0.2 mL del cultivo del caldo de infusión cerebro corazón, 0.2 mL de suero de bovino diluido (v/v) con solución estéril de cloruro de sodio al 0.15 molar.
2. Se incubaron en baño de agua a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se observaron para la formación de coágulo en intervalos de 1 hora, hasta cumplir 6 horas, si no hubo formación de coágulo se observó a las 24 horas.
3. Se consideró la prueba positiva si había formación de coágulo (NOM-115-SSA1-1994)

D. Prueba de catalasa

1. Se determinó la presencia de la enzima catalasa. Esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno que se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares.
2. Con un asa se recogió una colonia de un cultivo puro de 24 horas y se colocó sobre un portaobjetos.
3. Se agregó una gota de H₂O₂ al 30%.
4. Se observó la formación inmediata de burbujas.
5. Una prueba positiva correspondió a la formación de burbujas bien visibles, es decir, formación de O₂ (NOM-115-SSA1-1994).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se realizaron contando las unidades formadoras de colonias (UFC) totales, y seleccionando posteriormente aquellas que tenían las características típicas de *S. aureus*, negras con un halo blanco alrededor, y se confirmaron con la tinción de Gram y las pruebas de catalasa y coagulasa.

Se obtuvieron los siguientes resultados de *Staphylococcus* spp en leche de los recipientes de almacenamiento; 179 (31.07%) UFC en el Hato 1, 127 (22.04%) UFC en el Hato 2 y 270 (46.87) UFC en el Hato 3, dando un total de 576 UFC de *Staphylococcus* spp. En la leche de toma directa, los resultados de *Staphylococcus* spp fueron, 192 (56.30%) UFC en el Hato 1, 96 (28.15%) UFC en el Hato 2, y 53 (15.54%) UFC en el hato 3, dando un total de 341 UFC de *Staphylococcus* spp.

De las 917 UFC (576 en recipientes de almacenamiento; 341 en toma directa), se seleccionaron 121 muestras con características típicas de *S. aureus*. De éstas se obtuvieron 88 (72.72%) cultivos de bacterias cocos Gram positivos, 65 (53.71%) fueron catalasa positivos, y no se encontraron positivos a coagulasa. Con estos resultados se puede inferir que tanto en recipientes de almacenamiento como en toma directa no se encontraron *Staphylococcus aureus*.

Se realizó un estudio bacteriológico alterno en un laboratorio regional donde se identificaron aislamientos de *Staphylococcus intermedius*, *Proteus vulgaris*, y *Staphylococcus hycus*, sin embargo no se logró aislar *S. aureus*.

Estudios realizados por Ayala (2009) en España muestran los porcentajes de las bacterias que suelen ser causantes de mastitis subclínica en cabras; *Staphylococcus* coagulasa-negativo (44%), *Enterobacterias* (20.4%), *S. aureus* (11.5%), *Micrococcus* spp (9.7%), *Mycoplasma* spp (2.8%) y *Bacillus* spp (1.9%) (Ayala., 2009). A diferencia del presente trabajo, *S. aureus* está presente en leche de cabras con mastitis.

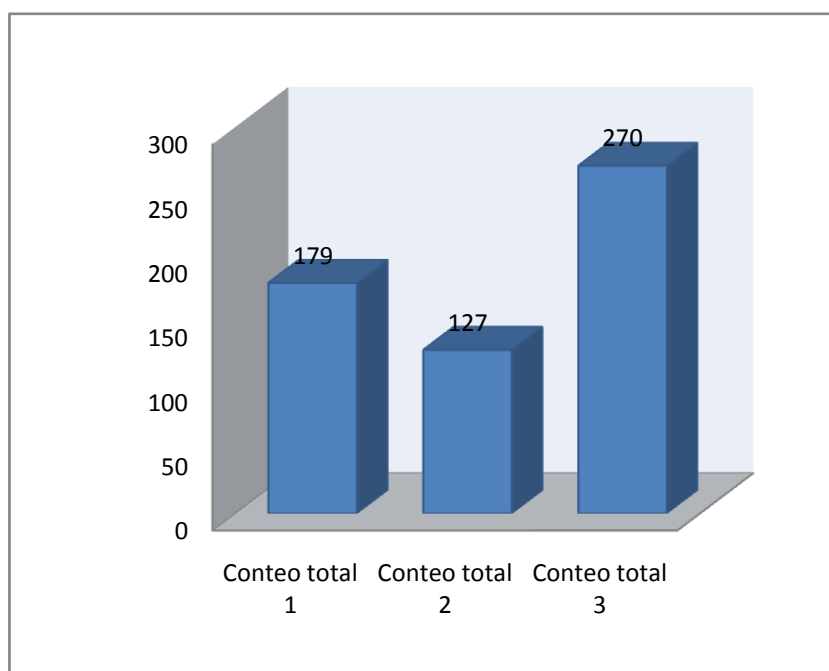


Figura 1. Conteo total de *Staphylococcus* spp en recipientes de almacenamiento de tres hatos lecheros de cabras.

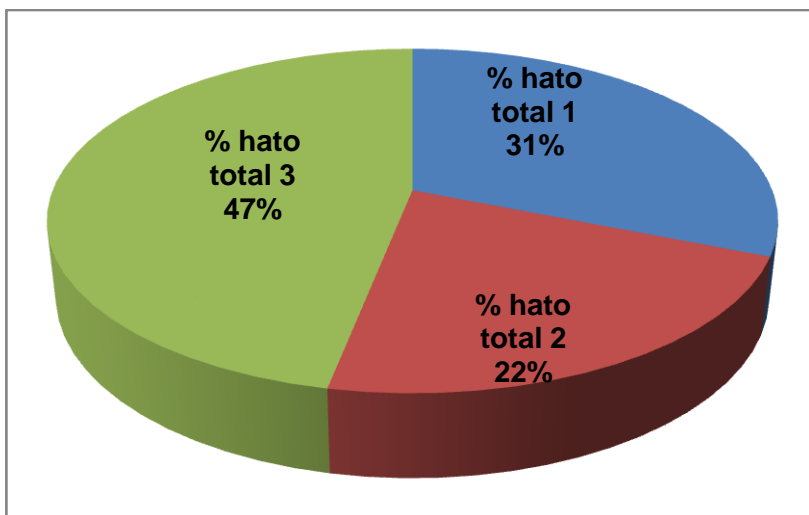


Figura 2. Porcentaje de *Staphylococcus* spp en leche de recipiente de almacenamiento de tres hatos lecheros de cabras.

También Fernández *et al.* (2003), mencionan que en la mastitis que afecta al sector lechero ovino y caprino uno de los principales agentes etiológicos implicados es el género *Staphylococcus*, responsable del 60-80% de los casos de mastitis en pequeños rumiantes, siendo el *S. aureus* una de las especies más frecuentemente aislada (Fernández *et al.*, 2003).

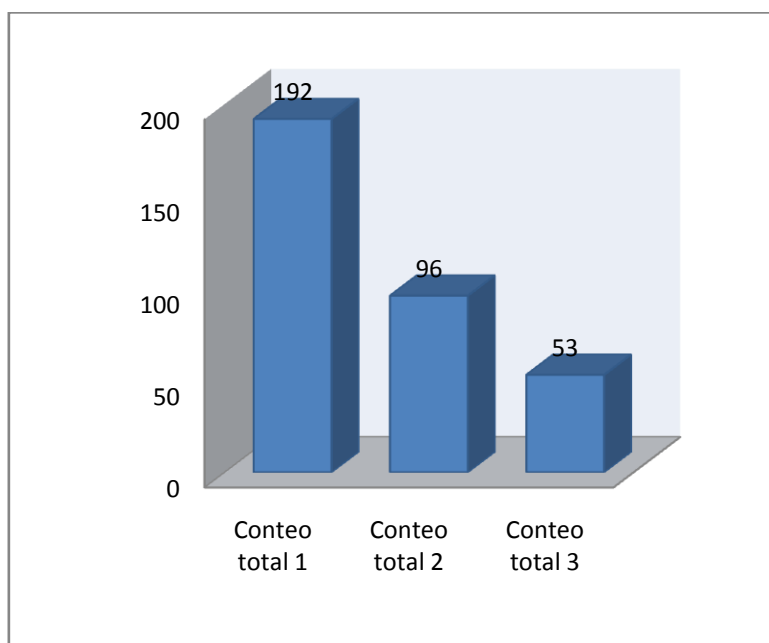


Figura 3. Conteo total de *Staphylococcus* spp en leche de toma directa de tres hatos lecheros de cabras.

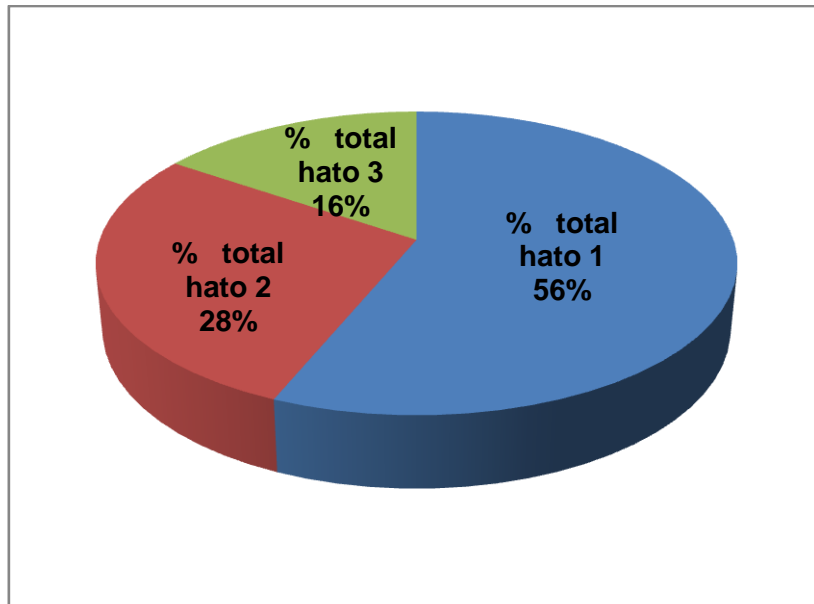


Figura 4. Porcentaje de *Staphylococcus* spp en leche de toma directa de tres hatos lecheros de cabras.

Sin embargo, *S. aureus* es un patógeno poco prevalente y con escasa capacidad para transmitirse entre cabras puesto que en los rebaños en los que está presente apenas suele haber unos pocos animales infectados, a excepción hecha de brotes debido a los desajustes en la ordeña u otras circunstancias excepcionales (Contreras *et al.*, 2001).

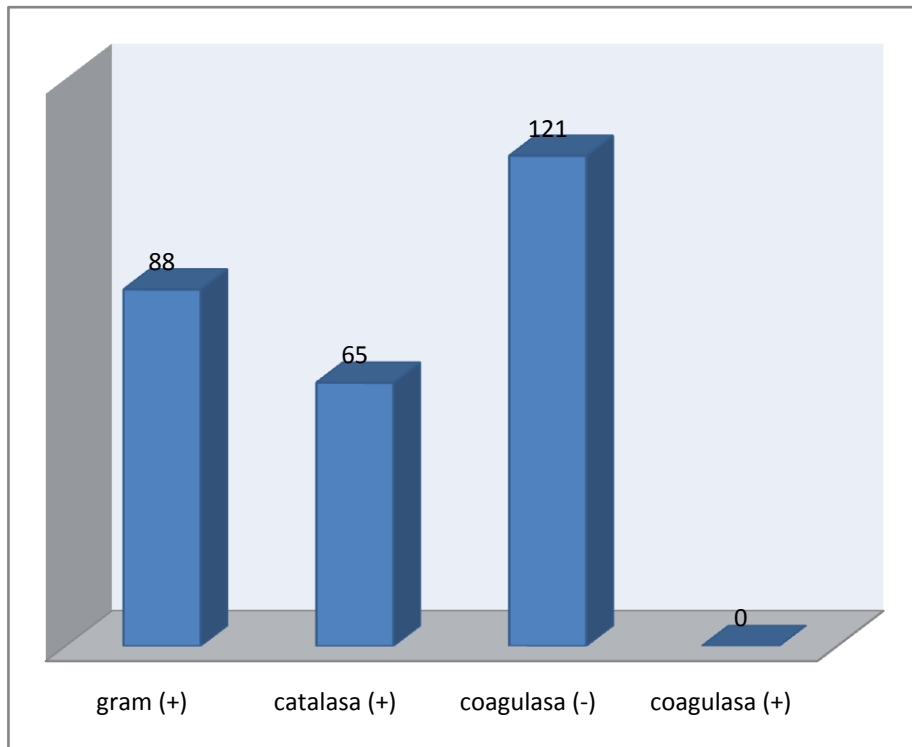


Figura 5. Resultado de pruebas de los aislamientos de *Staphylococcus* spp con tinción de Gram y las pruebas de catalasa y coagulasa.

El aumento de células somáticas se debe a procesos fisiológicos de varios orígenes (Galván, 2010) como la raza, edad, tiempo de lactancia, número de lactancias, época del año, factores de mal manejo, climáticos, frecuencia y horas de ordeño y tamaño del hato (Salmerón, 2006), así como infecciones clínicas y subclínicas, por lo que se puede decir que la mastitis tiene un impacto tan certero en el conteo celular somático, y por lo tanto la determinación del conteo celular es un medio auxiliar para juzgar el estado de salud de la ubre y no para diagnosticar con seguridad la presencia de mastitis a partir del aumento del número de células somáticas (Galván, 2010).

VIII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

En el estudio bacteriológico realizado en leche de cabras con mastitis de tres hatos lecheros de los municipios de Viesca y Matamoros, Coahuila no se encontraron aislamientos de *Staphilococcus aureus*.

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico de *Staphylococcus aureus*, tinción de Gram, y pruebas de catalasa y coagulasa son suficientes para descartar que la bacteria no estuvo presente en las leches analizadas.

Se recomienda realizar estudios en otras regiones de la Comarca Lagunera y analizar mediante otras técnicas las especies de bacterias involucradas en la mastitis de cabras lecheras.

IX. LITERATURA CITADA

- Aranibar V.L.G. 2009. Identificación y perfil de resistencia de estafilococos coagulasa negativos (ECN) remitidos al laboratorio nacional de referencia de bacteriología clínica (Tesis de licenciatura). Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímicas.
- Araya V., Gallo L., Quesada C., Chaves C. y Arias M.L. 2008. Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuida en el área Metropolitana de San José, Costa Rica. Arch. Lat. Nutrición. 58(2):182-186.
- Ayala M.C.A. 2009. Determinación de las bacterias más frecuentes causantes de mastitis subclínicas y sensibilidad ante antibióticos en cabras criollas del municipio de Santa Apolonia, Chimaltenango, Guatemala (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Bazán R., Cervantes E., Salas G. y Segura C.J.C. 2009. Prevalencia de mastitis subclínica en cabras lecheras en Michoacán, México. Revista Científica. 19(4): 334-338.
- Bustos-Martínez, J.A., Hamdan-Partida, A. y Gutiérrez-Cárdenas, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: La reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed. 17:287-305.
- Contreras A., Luengo R.C., Sánchez L.A. y Corrales J.C. 2002. Mastitis caprina y sus programas de control. Rev. Mundo Ganadero: 48-53.
- Contreras A., Luengo C., Sánchez L.A. y Corrales J.C. (2001). Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control. Epidemiología y Enfermedades Infecciosas. <http://www.seoc.eu/actas.php?jornada=26&cantidad=3>
- Contreras, A.; Luengo, C; Extramiana, A.B.; Sánchez L.A.: Marco, J.C.2011. Prevalencia de microorganismos patógenos contagiosos en leche de tanque de rebaños caprinos de la región de Murcia y presencia de inhibidores antimicrobianos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

- Fernández G.J.F. 2003. Caracterización molecular de aislados de *Staphylococcus aureus* de mastitis ovinas y caprinas. Rev. Patología Sanidad. 264-267.
- Fueyo M.J.M. 2005. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relacionados con tipos genéticos. (Tesis de doctorado). Universidad de Oviedo Departamento de Biología funcional área de Microbiología.
- Galván D.L. 2010. Impacto de la mastitis caprina en el conteo de células somáticas. (Tesis de licenciatura) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- García A. U., Rivero J., González P., Valero-Leal K., Izquierdo P., García A. y Colmenares C. 2009. Calidad bacteriológica de la leche cruda de cabra producida en la parroquia Faría, municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. Rev. Fac. Agron.26: 59-77.
- Gómez G.A. 2006. *Staphylococcus*: las ramificaciones de un racimo. Asociación colombiana de infectología.10 (3):157-159.
- Herrera S.D., Armenteros A. M., Álvarez L .J. 2005 .Detección de *Staphylococcus* spp en leche entera empleando el Sistema Diramic (Detection of *Staphylococcus* spp in whole milk using the Diramic system). Rev. REDVET 6 (5):1-6.
- López C. E. 2007. Determinación Higiénica Sanitaria de la Leche de Cabra en la Región de Ecuandureo Michoacán. Morelia, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Luque I., Huerta B., León J., Caro M., Quiroz S. y Astorga R. J. 2009. Mamitis por estafilococos en pequeños rumiantes: estudio de prevalencia y sensibilidad antimicrobiana. Rev. Producción animal 257: 29-38.
- Mattar S., Cuevas M., Aldana O., Sussman O. y Arango I. 1998. Estudio microbiológico de los *Staphylococcus* coagulasa negativos productores de biocapa mucoide.

- Norma Oficial Mexicana (NOM-115-SSA1-1994). Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- Ortega C.L. 2010. Etiología de la mastitis caprina. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Ovidio C. F., Rojas P.P. y Rodríguez L. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para Combatir la mastitis. Rev. Agro-Ciencia 22(1): 49-58
- Ribeiro M.G., Lara G.H.B., Bicudo S.D., Souza A.V.G., Salerno T., Siqueira A.K. y Geraldo J.S. 2007. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. Rev. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59 (3):810-812.
- Sayed A.E., Jorge A., Lammler C., Jager S., Zschock M., Wolter W. y Castañeda V.H. 2006. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. Rev. Vet. Mex. 37(2): 165-179.
- Suárez V. H. Mastitis en ovejas y cabras lecheras, su diagnóstico y control. 2011. INTA EEA Salta, 4403, Cerrillos, Salta. <http://es.scribd.com/doc/55754541/Mast-It-Is>
- Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, Unidad Torreón. 2004. Prácticas de laboratorio, microbiología sanitaria. Prácticas de laboratorio de microbiología sanitaria. pag. 15-24.
- Velázquez M. M. E. (2005). surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* metilresistente. Rev. Salud pública de México. 47. (005): 381-387.
- Zambrano W.J. y Sánchez J. 1998. Estudio comparativo de los sistemas de ordeño manual y mecánico en el desarrollo de mastitis caprina. Rev. Aroa. 1: 62-74.

- Calvinho F.L .1999. El control de mastitis causada por *Staphylococcus aureus* a través de segregación. *Rev. Chacra & Campo Moderno*. 828: 10-11.
- Salmerón A.R.S.2006. Utilización de la Planta de Anamú (*Petiveria alliacea*), en el tratamiento de la mastitis caprina (tesis de licenciatura). Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.

X. ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento de la elaboración del medio Agar Baird Parker enriquecido con Telurito y yema de huevo.



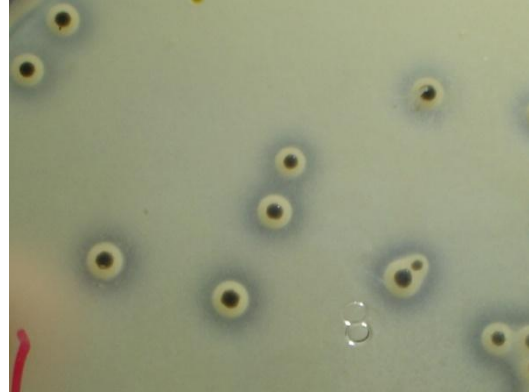
Anexo 2. Procedimiento de siembra de leche en medio Agar Baird Parker para el crecimiento de *Staphylococcus* spp.



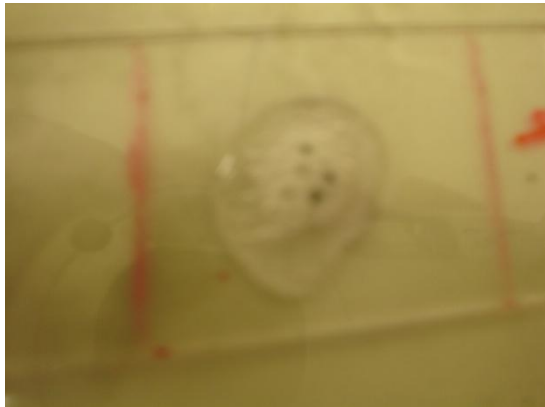
Anexo 3. Muestras de leche, tinción de Gram y pruebas de coagulasa y catalasa.



Muestras de leche



Colonias de *Staphylococcus* spp



Prueba de catalasa



Tinción de Gram