

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**MASTITIS BOVINA: APLICACIÓN DE UNA BACTERINA AUTÓGENA Y
EVALUACIÓN DE SU EFICACIA PROTECTORA EN UN ESTABLO
LECHERO DE BAJA CALIFORNIA**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

MVZ. GERARDO FELIPE GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

AGOSTO 2015

COMITÉ ASESOR

Mastitis bovina: aplicación de una bacterina autógena y evaluación de su eficacia protectora en un establo lechero de Baja California. Tesis presentada por el MVZ. Gerardo Felipe García como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias veterinarias.

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto.
DIRECTOR

Dr. Gilberto López Valencia
ASESOR

Dra. Sawako Oshima Hori
ASESORA

Dr. José Carloman Herrera Ramírez
ASESOR

Mexicali, Baja California., México

Agosto de 2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi director de tesis Gerardo Medina Basulto por aceptarme como su tutorado, por su apoyo incondicional, por brindarme un poco de su sabiduría y orientarme durante la realización de este proyecto.

A mis asesores de tesis por ayudarme y apoyarme en todo lo que necesité.

A todos mis compañeros de posgrado que de alguna manera me ayudaron o me apoyaron en la realización de este proyecto, ya que sin su apoyo hubiera sido más difícil llevarlo a cabo.

A CONACYT por su apoyo económico durante mi formación.

Por último, a la 17ava convocatoria interna de proyectos de investigación que financió este proyecto.

DEDICATORIA

Se la dedico a las personas más importantes en mi vida, mis padres, Estela García y Rosalio Felipe. Ya que ellos siempre me han apoyado en todas las metas y decisiones que he tomado en la vida y sin importar nada sé que cuento con ellos siempre. Gracias papas.

RESUMEN

Se evaluó la eficacia de una bacterina autógena como herramienta en el control de mastitis bovina en 66 vacas. Se cultivó leche de una vaca en producción que presentaba mastitis clínica, de la cual se aisló *Staphylococcus aureus*, a partir de este aislado se fabricó la bacterina autógena, se aplicaron 4 dosis de 2 ml por vía intramuscular, 1ra dosis, refuerzo a los 15 días, posteriormente a los 6 meses y finalmente un refuerzo anual, estas fueron aplicadas a 31 vacas en periodo de seco y vaquillas próximas a parir, el resto se tomó como grupo control. Se realizaron muestreos mensuales los primeros cuatro meses y posteriormente fueron bimestrales hasta completar un año de muestreos, se cultivaron las muestras de leche que salieron positivas a la prueba de california de grado II en adelante, obteniendo una incidencia acumulada (IA) del 40.40% en el grupo control vs vacunado 29.92%, donde se observó una reducción de la IA en el grupo vacunado del 25.9% ($p = 0.04$) Se aislaron los microorganismos más abundantes en el cultivo y se obtuvo la tasa de incidencia de estos, *Staphylococcus aureus*, tuvo una incidencia mayor en grupo control (7.07%, $p = 0.01$) vs vacunado (1.45%). A su vez se registró la producción promedio de leche mensual y anual, la cual fue superior en los animales vacunados produciendo en promedio anual por vaca (20.82 lts, $p < 0.05$) vs control (18.74 lts). La bacterina autógena demostró ser efectiva en el control de mastitis subclínica causada por *Staphylococcus aureus*, además de ayudar a mejorar la producción láctea.

ABSTRACT

The effectiveness of an autogenous bacterin as a tool in controlling bovine mastitis in 66 cows was evaluated. *S. aureus* was isolated from a cow in milk production phase, from this isolated autogenous bacterin was manufactured. Four doses of 2 ml were applied intramuscularly, 1st dose booster at 15 days, then at 6 months and finally an annual booster, these were applied to 31 cows in dry period and calving heifers coming, the rest was taken as control group. Samples were collected monthly and the first four months and bimonthly the rest of the year in study, milk samples were positive to the California test Grade II, obtaining a cumulative incidence (AI) of 40.40% in control group vs. vaccinated 29.92%, where a reduction in the vaccinated group IA of 25.9% ($p = 0.04$) was observed the most abundant microorganisms were isolated in culture and the incidence rate of these, *Staphylococcus aureus* was obtained, He had a higher incidence in the control group (7.07%, $p = 0.01$) vs vaccinated (1.45%). In turn, the average monthly and yearly production of milk, which was higher in vaccinated animals (20.82 liters, $p < 0.05$) vs. control (18.74 liters) was recorded. Autogenous bacterin was effective in controlling subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, besides helping to improve milk production.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	4
Clasificación de Mastitis Bovina	4
<i>Mastitis clínica</i>	5
Etiología.....	5
Patogénesis.....	6
Diagnóstico de mastitis.....	8
<i>Prueba de California para Mastitis (CMT)</i>	8
Prevencción y Control.....	11
Respuesta inmune de la glándula mamaria.....	12
Mecanismos genéticos de resistencia bacteriana	14
Perdidas económicas por mastitis bovina.....	15
Uso de la vacunación para el control de mastitis bovina causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Evaluación de vacunas contra <i>Staphylococcus aureus</i>	18
OBJETIVO	20
Objetivos específicos.....	20
HIPÓTESIS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Ubicación y área de estudio	22
Duración del estudio.....	22
Tipo de estudio	22

Criterio de inclusión	22
Preparación de la Bacterina Autógena	23
<i>Obtención de la cepa de Staphylococcus aureus</i>	23
Aplicación de la bacterina	25
Recolección de muestras	25
Cultivo y aislamiento de la muestras	26
Identificación de los aislados: Tinción Gram, hemólisis y prueba de catalasa.	26
Almacenamiento de los aislados bacterianos.....	27
Extracción de ADN bacteriano.....	27
<i>Preparación del ADN bacteriano de Staphylococcus spp.</i>	27
<i>Preparación de ADN bacteriano de Gram negativas</i>	28
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
<i>Amplificación por PCR</i> :.....	29
<i>Detección de productos de PCR</i>	30
<i>PCR punto final multiplex para identificar Staphylococcus chromogenes, S. epidermidis, S. sciuri, S. haemolyticus, S. simulans y E. coli.</i>	30
Análisis de datos	31
RESULTADOS.....	33
Graficas de los resultados obtenidos en el grupo control y grupo vacunado.	36
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	41
LITERATURA CITADA	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Lectura e interpretación del CMT y su equivalencia con el RCS.....	9
Cuadro 2. Secuencias, especificidades y contenido de G+C de los oligonucleótidos.	29
Cuadro 3. Nombramiento, secuencias y temperatura de alineación de los oligonucleótidos, tamaño de los productos amplificados y los genes en que se basaron.....	31
Cuadro 4. Comparación anual de variables evaluadas en los dos grupos.	34
Cuadro 5. Comparación anual del CMT+ por grupos de edad.....	34
Cuadro 6. Comparación anual del aislamiento de <i>S. aureus</i> y <i>S. chromogenes</i> por grupos de edad.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del desarrollo de mastitis en una ubre infectada (Viguiet, 2009).....	8
Figura 2. Comportamiento de mastitis subclínica mensual en grupo control y grupo vacunado durante el periodo evaluado (junio 2014 a mayo 2015) expresado en porcentaje (%)......	36
Figura 3. Comportamiento de aislamiento de <i>S. aureus</i> mensual en grupo control y grupo vacunado durante el periodo evaluado (junio 2014 a mayo 2015) expresado en porcentaje (%)......	36
Figura 4. Resultados anuales del CMT, aislamiento de <i>S. aureus</i> , <i>S. chromogenes</i> y producción de leche en grupo control y grupo vacunado durante el periodo evaluado (2014-2015) expresado en (%) para CMT, aislamiento de <i>S. aureus</i> y aislamiento de <i>S. chromogenes</i> . Para producción de leche esta expresado en litros promedio anual por vaca.	37

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, que produce alteraciones físicas y químicas en la leche, aumento del número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos y la posible pérdida de la funcionalidad de la glándula. Esta reacción inflamatoria ocurre como consecuencia de la respuesta de los tejidos a lesiones traumáticas, sustancias irritantes o presencia de agentes infecciosos y sus toxinas que han logrado colonizar el tejido secretor (Calderón et al., 2008).

Uno de los microorganismos más importantes en la mastitis infecciosa es *Staphylococcus aureus*, su importancia radica en que no es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar también en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores, en las camas y en los equipos de ordeño, por lo tanto las prácticas de manejo inadecuadas hacen que este agente etiológico alcance el conducto del pezón y de ahí desencadene una reacción inflamatoria. El género *Staphylococcus* comprende 36 especies, la mayoría de estas especies son coagulasa negativos, con excepción de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *S. intermedius* y *S. hyicus* (Calderón et al., 2008).

La mastitis subclínica cuya frecuencia es de 20 a 50 veces superior a la mastitis clínica, es el principal problema de todo el complejo patológico que representa la mastitis. Se ha reportado que entre el 70% y 80% de las pérdidas de la producción de leche son debidas a mastitis subclínicas (Bedolla, 2008).

La presencia de la enfermedad arroja pérdidas económicas de aproximadamente \$35 millones de dólares anual (Welleberg, 2002), pero esto representa sólo del 20 al 30% de la mastitis clínica la otra parte está representada por la mastitis subclínica (Bedolla, 2008).

Con base a la problemática planteada anteriormente, surge la necesidad de crear otras alternativas para controlar la mastitis en ganado lechero y con ello mejorar la calidad y la producción de leche (U.P. Pereira et al., 2011).

La vacunación contra mastitis ha sido y es extensamente estudiado, pero los resultados de su uso no han sido muy alentadores. Entre los principales obstáculos por lo cual la vacunación no se considera aún como un método efectivo contra mastitis se encuentra el amplio rango de microorganismos que causan mastitis, la escasez relativa de componentes de respuesta inmune (fagocitos, linfocitos, complemento e inmunoglobulinas en la leche), los efectos inhibitorios de la grasa láctea y la caseína sobre la eficiencia de los neutrófilos mamarios, la basta área superficial del epitelio secretor en la glándula que requiere vigilancia inmunológica, entre otros; además de estos obstáculos la eficiencia de la vacunación puede verse afectada por la falta de un conocimiento completo de los factores de virulencia y de los factores específicos de inmunidad; así como la falta de adecuados esquemas de vacunación (Gamarra et al., 2001).

Una de las alternativas se basa en la elaboración de una bacterina creada a partir de microorganismos aislados en un establo lechero de baja

california, con la finalidad de proveer una mayor protección a las vacas que se les aplique esta bacterina, a diferencia de las bacterinas o vacunas comerciales que no son específicas de cada hato lechero.

La elaboración de una nueva bacterina representa un gran reto ya que las que están actualmente en el mercado no confieren una protección total contra la mastitis, la desventaja de éstas es por no ser específicas para un hato determinado. Por lo tanto, una bacterina autógena elaborada a partir de microorganismos aislados del mismo hato lechero, tiene más probabilidad de proveer una inmunidad específica contra dichos microorganismos aislados y al ser genotipificados, poder así crear bacterinas especie-específico para saber exactamente ante que cepa de *S. aureus* nos estamos enfrentando en cada establo.

ANTECEDENTES

Clasificación de Mastitis Bovina

La mastitis bovina puede clasificarse de acuerdo al grado de la inflamación y a las lesiones locales e implicaciones sistémicas en la vaca en “Mastitis Subclínica” y “Mastitis Clínica” (Fernández et al., 2012).

Mastitis subclínica

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación a un conteo elevado de células somáticas en leche, ésta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento. Este tipo de mastitis no presenta cambios visibles en la leche o ubre. La reducción en el rendimiento de leche es casi imperceptible, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias. Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero, ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas no sólo por la reducción de la producción, también por los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche que determinan su calidad . En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador. Para identificar estos casos de mastitis se requiere de técnicas de laboratorio

como la medición del conteo de células somáticas y el cultivo bacteriológico (Fernández et al., 2012).

Mastitis clínica

La mastitis clínica es definida como una anormalidad en la glándula mamaria de la vaca o la leche, que puede ser fácilmente observada. Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento de la misma, la leche puede presentar una apariencia anormal y, en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias están presentes en la leche, lo que reduce el rendimiento y la calidad considerablemente. En los casos en que la inflamación de la ubre es acompañada de signos clínicos es diagnosticada entonces como mastitis clínica. La mastitis clínica puede presentarse de forma aguda y se caracteriza por su aparición súbita. En la forma crónica, se presenta una infección de larga duración, con leche de apariencia anormal y/o cambios al realizar la palpación del tejido de la ubre (Fernández et al., 2012).

Etiología

Los microorganismos causantes de mastitis pueden ser agrupados en 3 categorías:

- Los que causan mastitis contagiosa (principalmente *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp*).

- Patógenos comunes del entorno ambiental en el que viven las vacas (entre los cuales encontramos coliformes, estreptococos ambientales y estafilococos coagulasa negativos).
- Patógenos no comunes del medio ambiente como (*Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, levaduras, *Nocardia asteroides*, el alga incolora *Prototheca spp*, y muchos más).

Los ordeñadores juegan un papel muy importante en los factores que favorecen la presencia de mastitis en el hato lechero:

- a) los casos de mastitis aumentan si el equipo de ordeño no está funcionando correctamente.
- b) si no se lleva de manera adecuada el proceso de la ordeña, en cuanto a higiene y desinfección de los cuartos mamarios y el mantenimiento de las maquinas, esto favorece que aumenten los casos de mastitis.
- c) otro punto muy importante es que el hato debe ser supervisado por un médico veterinario el cual se asegure del buen funcionamiento de este, en cuanto al diagnóstico, manejo y tratamiento de las enfermedades que se presenten en el hato. (Hans, 2001).

Patogénesis

La velocidad, el carácter y la intensidad de los síntomas clínicos así como la duración y terminación de la inflamación de la ubre está determinada por:

- La patogenicidad y virulencia del agente causal.

- Los mecanismos de defensa de la vaca.
- El nivel funcional de la glándula mamaria.
- Eventualmente la efectividad de un tratamiento.

La entrada y penetración de una cepa patógena en la glándula se inicia a través del conducto galactóforo, de ahí pasa a la cisterna de la glándula y se dirige a los conductos lácteos para llegar a los espacios alveolares. Esa vía de infección galactogena es la más importante para casi todos los agentes patógenos de la mastitis, como se muestra en la figura 1. Los siguientes factores disminuyen la resistencia natural de la ubre:

- Daños en los pezones. Si el canal del pezón es lesionado, literalmente se abre la puerta a la invasión de patógenos. Este canal puede lesionarse debido a: Heridas en los pezones (por manejo deficiente). Una ordeña muy brusca (fallas en la máquina de ordeña).
- Elevada presencia de microorganismos, es decir que haya una gran cantidad de bacterias en el medio donde se encuentran. Las concentraciones ambientales elevadas de bacterias hacen que el mecanismo de defensa de la ubre se debilite. Este problema puede ser debido a, un ambiente muy antihigiénico en el establo, una higiene deficiente en la ordeña, pisos y superficies (las bacterias se reproducen mejor en los medios húmedos y cálidos). Deficiencias en la alimentación, las vacas débiles son presa fácil de una infección en la ubre

- Factores estresantes, cualquier tipo de estrés puede ser dañino a la larga y lesionar el sistema inmune de la vaca. Algunos factores estresantes pueden ser: sobrepoblación de vacas en el establo, cambiar frecuentemente el personal, deficiencias en el manejo de las pezuñas, o presencia de otras enfermedades aunque estas no dañen directamente a la ubre, se puede debilitar el mecanismo de defensa contra patógenos que provocan mastitis (Wolter et al., 2002).

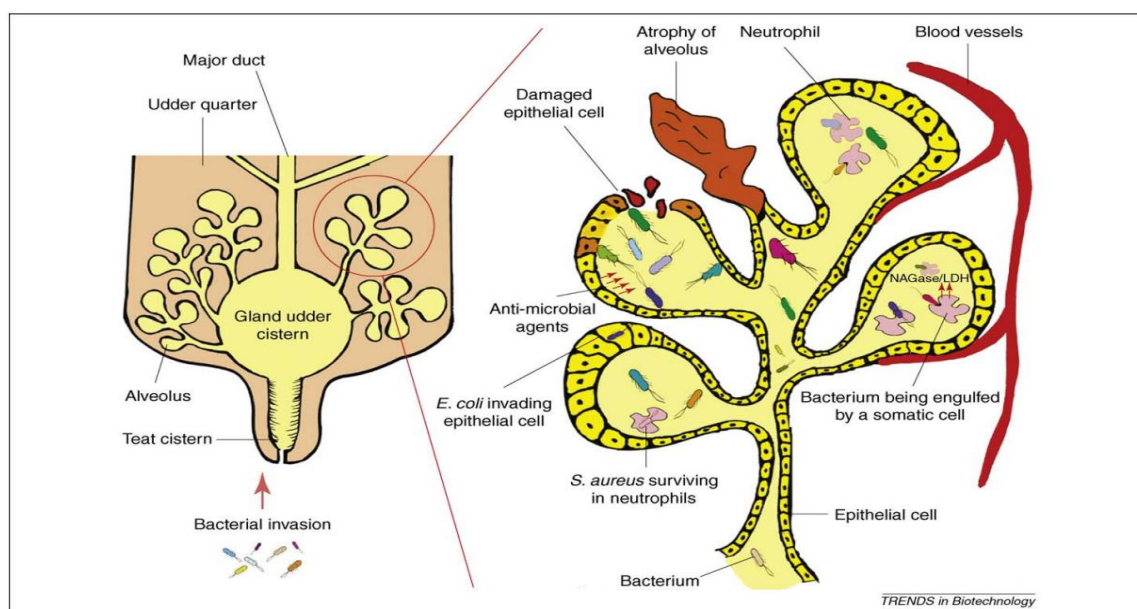


Figura 1. Representación esquemática del desarrollo de mastitis en una ubre infectada (Viguer, 2009).

Diagnóstico de mastitis

Prueba de California para Mastitis (CMT)

La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel

de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Bedolla et al., 2007).

Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar grosso modo el recuento de células somáticas en leche como se muestra en la figura 2. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso.

Cuadro 1. Lectura e interpretación del CMT y su equivalencia con el RCS.

Resultados CMT	Reacción	Equivalencia del RCS/mL	Porcentaje de neutrófilos	Interpretación
Negativo	La mezcla no presenta precipitado y/o gel	0 – 200.000	0- 25	Cuarto mamario sano
Traza	Se forma una traza de precipitado que desaparece pronto	150.000 – 500.000	30 – 40	Posible infección dependiendo del número de cuartos mamarios
1 +	Hay precipitado pero no se forma gel	400.000 – 1.500.000	40 – 60	Mastitis subclínica
2 +	El precipitado se vuelve gel y se concentra en el centro de la raqueta	800.000 – 5.000.000	60 – 70	Mastitis subclínica
3 +	Se forma un gel que se adhiere al fondo de la raqueta	> 5.000.000	70 - 80	Mastitis subclínica

(Kivaria, 2007).

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California para Mastitis

1. Se desecha la leche del preordeño.
2. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta.
3. Se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche.

4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo (púrpura de bromocresol).
5. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación. Antes de continuar con la vaca siguiente se debe enjuagar la placa (Bedolla et al., 2007).

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases: negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo se solidifican.

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilauril sulfonato de sodio (púrpura de bromocresol), causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación. Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto por separado.

La Prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%. La mastitis clínica aguda da resultados negativos, debido a la destrucción de los leucocitos por las toxinas provenientes de los microorganismos presentes (Bedolla et al., 2007).

Prevención y Control

El método para prevenir o disminuir los casos de mastitis empiezan con:

- Higiene en las prácticas de ordeño, es decir cuando la vaca ingrese a la sala de ordeño debe ir limpia y seca de la ubre y pezones.
- No debe usarse exceso de agua en la limpieza.
- Los paños y esponjas comunes deben erradicarse y sustituirse por toallas desechables individuales para cada cuarto.
- Las manos del ordeñador deben mantenerse limpias y secas.
- Desinfectar las pezoneras entre vacas.
- Sellado o desinfección de pezones post-ordeño. Debe aplicarse inmediatamente después de finalizado el ordeño, preferiblemente por inmersión de los pezones, en productos iodados, hipoclorito de sodio o clorhexidina.
- Terapia de vaca seca. La mejor opción es aplicar el tratamiento a todos los cuartos y animales, pues se garantiza el tratamiento de todas las infecciones presentes y se previenen las infecciones durante el período seco temprano. La terapia selectiva sólo a las vacas con mastitis clínica o reacciones inflamatorias en su última lactancia o CMT positivo al momento del secado es menos costosa, pero no se atacan todas las infecciones presentes y no se evitan las nuevas infecciones en el período seco temprano. Las infecciones causadas por *S. agalactiae* suelen ser fácilmente eliminadas, así como también las infecciones recientes por *S. aureus*. En cambio, las infecciones crónicas causadas

por *S. aureus*, así como las que afectan a más de un cuarto, difícilmente son eliminadas. Es importante aplicar el tratamiento luego de la limpieza y cuidadosa desinfección de los pezones.

- Adecuado funcionamiento del equipo de ordeño. El adecuado funcionamiento del equipo de ordeño evita los escurrimientos, las fluctuaciones de vacío y las pulsaciones irregulares, que pueden inducir lesiones en los pezones que posteriormente se infectan, o permitir remanentes de leche en la ubre.
- Descartar animales crónicamente infectados. Es una buena medida, especialmente cuando se trata de vacas crónicamente infectadas con *S.aureus*. Disminuye la prevalencia de mastitis y, más importante, elimina la principal fuente de infección para las vacas sanas.
- Segregación u ordenamiento de los animales. Ordenar los animales según su estatus infeccioso o inflamatorio, para ordeñar en último lugar los animales infectados, reduce la exposición de los pezones a los patógenos contagiosos.
- Dietas. Los animales deben recibir dietas que suplan las necesidades de Vitamina E, Selenio y Cobre; los aspectos dietéticos son particularmente importantes para las vacas en descanso y para las que van a su primer parto (Scaramelli et al., 2005).

Respuesta inmune de la glándula mamaria

El papel que cumplen los neutrófilos en la defensa de la glándula mamaria contra las agresiones por patógenos causantes de mastitis, es

definitivo para mantener su integridad y funcionalidad. Sin embargo, otros mecanismos, como los relacionados con la respuesta inmune periférica también contribuyen a mantener una adecuada respuesta. Recientemente se ha señalado que la respuesta de la glándula mamaria se ve favorecida por la presencia de proteínas presentes en la mayoría de las bacterias que ayudan a su reconocimiento (Patrón molecular asociado al patógeno, PAMP) y que se unen a los receptores de reconocimiento de los patógenos (PRR) (Ceballos, 2012).

Dentro de estos últimos receptores se encuentra una clase especial que son los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés), que son el enlace crítico entre el reconocimiento del patógeno y el inicio de la respuesta inmunitaria, caracterizada por la liberación de citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias. A su vez, la liberación de macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales se encargan de eliminar en forma activa los patógenos. Siendo la anterior una forma de respuesta inmunitaria muy eficiente, algunas veces los patógenos alcanzan a sobrevivir a ella, siendo necesaria la activación de la respuesta inmune adaptativa o adquirida (Ceballos, 2012).

Este tipo de respuesta es rápida, eficiente y más específica que la inmunidad innata, involucrando memoria inmunológica constituyendo la base de la vacunación como estrategia para la prevención y control de mastitis. Aunque la glándula mamaria posee eficientes mecanismos para defenderse de la agresión bacteriana. La formación de biopelículas por parte de algunos patógenos que colonizan la glándula mamaria, como *S. aureus*, constituye un

mecanismo de supervivencia desarrollado por las bacterias para perpetuar la infección en el huésped. Esta estructura le permite a la bacteria evadir los mecanismos de defensa del huésped e incrementar la resistencia al uso de antibióticos (Prenafeta et al., 2010).

El mecanismo de defensa humoral está conformado por las inmunoglobulinas (Ig), estas actúan independientemente o en conjunto con leucocitos en la glándula mamaria inhibiendo el crecimiento bacteriano. Cuatro isotipos de inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgA y IgM, han sido detectados en las secreciones mamarias. La función principal de las inmunoglobulinas es la opsonización de microorganismos para la ingestión rápida por los neutrófilos y macrófagos, e inhibir la adherencia bacteriana a las superficies epiteliales (Gamarra et al., 2001).

Mecanismos genéticos de resistencia bacteriana

Las bacterias son resistentes a los antibióticos debido a la expresión de diferentes mecanismos de resistencia. Estos mecanismos se pueden agrupar en cuatro:

1. Modificación química o hidrólisis del antibiótico mediante la adenilación, acetilación, fosforilación o hidrólisis (esta última por β -lactamasas).
2. Modificación del sitio blanco de la bacteria debido a mutaciones espontáneas ocurridas en los genes que codifican al blanco de

acción del antibiótico, como la ARN polimerasa, el ARN ribosomal 16S, las PBP y la ADN girasa.

3. Modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana debido a la sustitución de las proteínas de membrana externa (porinas) al modificar su calibre o polaridad interna.
4. Expulsión del antibiótico debido a la sobreproducción de bombas de flujo que impide el acceso del antibiótico al sitio blanco en la bacteria (Garza et al., 2009).

Perdidas económicas por mastitis bovina.

Las pérdidas económicas causadas por mastitis se estiman de la siguiente manera: a).- Valor de la producción láctea pérdida: 70%; b).- Valor de las vacas perdidas por eliminación prematura: 14%; c).- Valor de la leche degradada o desechada: 7%; d).- Tratamientos y gastos veterinarios: 8%. En estos datos se observa claramente que las mayores pérdidas resultan de la reducción en la producción de leche debido a la mastitis subclínica (Bedolla, 2008)

La presencia de la enfermedad arroja pérdidas económicas de aproximadamente \$35 millones de dólares anuales (Welleberg, 2002). Representando la mastitis clínica entre el 20 y 30% del total, y el restante se debe a la mastitis subclínica que representan entre el 70% y el 80% (Bedolla, 2008).

La mastitis en México está altamente diseminada como en muchos otros países del mundo. De acuerdo con investigaciones y la literatura al respecto, la mastitis subclínica casi alcanza el 50% en los hatos lecheros de México. (Bedolla, 2008).

Uso de la vacunación para el control de mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus*

El desarrollo de vacunas como herramienta para la prevención y control de la mastitis bovina, puede ser una forma eficaz de control de las infecciones causadas por *S. aureus*, siempre que el producto desarrollado esté dirigido no solamente a estimular las defensas contra la bacteria, sino contra sus mecanismos de protección, como la formación de biopelículas. Las vacunas que poseen antígenos contra la estructura de polisacáridos que forman la biopelícula, tienen un efecto benéfico en la producción de anticuerpos contra *S. aureus* (Brady et al., 2011).

Se ha reportado que la combinación de la vacunación con una terapia antibiótica incrementa la tasa de curación en infecciones causadas por esta bacteria. Recientemente, una vacuna para mastitis bovina que combina la acción antigénica contra los polisacáridos formadores de biopelículas y la bacterina contra *S. aureus* ha demostrado su efecto benéfico en la prevención de la multiplicación de la infección en vacas de primer parto infectadas experimentalmente con *S. aureus*. Lo que se observó en este grupo de animales fue un menor recuento bacteriano, sugiriendo que la vacuna puede

limitar el crecimiento bacteriano acortando la duración de la infección (Prenafeta et al., 2010).

Otros estudios reportan la eficacia de la vacunación contra mastitis antes del parto al utilizar un producto elaborado a partir de una cepa de *S. aureus* que expresa una alta antigenicidad asociada con biopelículas (Startvac®. Laboratorios Hipra, Amer, España). Los resultados de ambos estudios indican una menor severidad en los casos clínicos de mastitis causadas por *S. aureus*, sin que se haya observado un efecto negativo sobre la producción de leche en las vacas infectadas. Igualmente, se observó un menor número de casos de nuevas infecciones en los hatos vacunados y una duración menor de las infecciones por *S. aureus* (Ceballos, 2012).

Entre los principales obstáculos por lo cual la vacunación no se considera aún como un método efectivo contra mastitis se encuentra el amplio rango de microorganismos que causan mastitis, la escasez relativa de componentes de la respuesta inmune (fagocitos, linfocitos, complemento e inmunoglobulinas en la leche), los efectos inhibitorios de la grasa láctea y la caseína sobre la eficiencia de los neutrófilos mamarios, la vasta área superficial del epitelio secretor en la glándula que requiere vigilancia inmunológica, entre otros; además de estos obstáculos la eficiencia de la vacunación puede verse afectada por la falta de un conocimiento completo de los factores de virulencia y de los factores específicos de inmunidad; así como la falta de adecuados esquemas de vacunación (Gamarra et al., 2001).

Evaluación de vacunas contra *Staphylococcus aureus*.

Mata y colaboradores (2002), evaluaron la efectividad de una vacuna contra mastitis por *S. aureus* y *S. agalactiae* en vacas lecheras. En su estudio reportan que utilizaron un total de 62 vaquillas próximas a parir de las cuales descartaron 6 animales durante la evaluación por causas ajenas al estudio. De las vacas que quedaron se asignaron 28 animales a cada grupo, en el vacunado se aplicó, una vacuna de manera subcutánea la cual contenía *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus sp.* El esquema de vacunación fue: 1ª dosis: 40 días preparto y 2ª dosis: 7 días preparto. Al evaluar los resultados obtuvieron que hubo una tasa de incidencia menor de infecciones por *S. aureus* en el grupo vacunado del 2.34% ($p = 0.03$) con respecto al grupo control que fue del 5.14% y en cuanto a la tasa de incidencia de *S. agalactiae* en el grupo vacunado fue de 3.04% ($p = 0.02$) vs grupo control 6.54%. Midieron producción de leche en ambos grupos y obtuvieron que no hubo diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los resultados. Al final del estudio concluyeron que la vacuna utilizada en el ensayo fue efectiva en reducir la tasa de incidencia de infecciones subclínicas a *S. aureus* en un 45,5 % y a *S. agalactiae* en un 46,5 %, sin efectos sobre la producción de leche durante los primeros cuatro meses de lactancia.

Sepúlveda y colaboradores (2010), realizaron un estudio para evaluar una vacuna autógena como herramienta para el control de la Mastitis durante la lactancia en vacas Holstein. En estudio lo llevaron a cabo en 52 vacas en producción. Se cultivó leche de los animales seleccionados y de los

microorganismos ambientales aislados se preparó una autovacuna polivalente de células muertas con pseudocápsula, se aplicaron 2 dosis de 5 ml cada una con intervalo de 15 días a 26 animales, el resto de ellos fue un grupo control, los animales tenían características similares. Se contaron las células somáticas por mililitro de leche (CCS / ml) cada tercer día desde la primera aplicación de vacuna hasta completar 30 días, el grupo vacunado mantuvo una media geométrica con menor número de células somáticas por mililitro (272,952) que el grupo control (326,098); se obtuvo una reducción del 16.2% ($p= 0.01$). Luego se midieron células somáticas cada mes durante 6 meses y el grupo tratamiento presentó una reducción de 23% ($p = 0.02$) con respecto al grupo control (252,000 y 328,500 ccs/ml respectivamente). También se observó en animales vacunados una reducción de la incidencia de mastitis subclínica de 16.9% y clínica de 35.3% ($p= 0.01$ y $p= 0.1$). A su vez se registró la producción promedio de leche de 0 a 30 días pos tratamiento, la cual fue superior en los animales vacunados por 0.6 L (2.7%, $p = 0.04$), de 15 días a 4 meses pos tratamiento 1.9 L (7.3%, $p < 0.05$) y de 15 días a 6 meses pos tratamiento de 1.1 L (4.3%, $p < 0.05$). Al final de su estudio concluyeron que las vacunas autógenas demostraron ser efectivas para control de mastitis subclínica y clínica además de ayudar a mejorar la producción láctea.

OBJETIVO

El objetivo de esta investigación fue evaluar la eficacia protectora y parámetros productivos posterior a la aplicación de una bacterina autógena en un establo lechero de Baja California.

Objetivos específicos

- Aislamiento de patógenos en establo lechero.
- Elaboración de bacterina
- Aplicación de bacterina en vacas que están en periodo seco y vaquillas próximas a parir.
- Evaluación de bacterina en vacas en producción.
 - ✓ CMT
 - ✓ Aislamiento bacteriano
 - ✓ Producción de leche

HIPÓTESIS

La aplicación de una bacterina autógena contra mastitis bovina en un establo lechero, provocará la disminución de la prevalencia de mastitis y el incremento de los parámetros productivos del hato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y área de estudio

El presente estudio de investigación se realizó en un establo lechero en el Municipio de Mexicali, Baja California, México, el clima en esta región es seco y puede alcanzar temperaturas de hasta 50°C. En el establo se llevan a cabo dos ordeñas de manera mecánica. Para el estudio experimental se utilizaron un total de 66 vacas las cuales estaban conformadas por vaquillas próximas a parir, vacas en el periodo de seco y vacas en lactancia, las cuales se tomaron como grupo control, posteriormente las vacas del grupo vacunado estuvieron en lactación y fueron muestreadas.

Duración del estudio

El estudio se llevó a cabo durante un año, de junio 2014 a mayo 2015 , en el cual se evaluó la eficacia protectora de la bacterina en base a los resultados que nos arrojaron las diferentes pruebas como: CMT, aislamiento bacteriano, genotipificación de las cepas aisladas y producción de leche.

Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental de tipo longitudinal, prospectivo.

Criterio de inclusión

Se incluyeron todas las vacas que se encontraban en el periodo de seco y las vaquillas que estaban próximas a parir, en total se tomaron 66 vacas para

llevar a cabo el estudio experimental. De estas vacas 31 pertenecen al grupo vacunado y el resto (35) que estaban en el área de producción se tomaron como grupo control.

Preparación de la Bacterina Autógena

Obtención de la cepa de Staphylococcus aureus.

Previamente a la preparación de la bacterina autógena, se aisló, se identificó y se genotipificó la cepa de *S. aureus* presente en el establo (cepa 87), de acuerdo al procedimiento y técnicas descritas previamente (Palacios, 2014).

- Se cultivaron 5 ml de *Staphylococcus aureus* cepa 87 en caldo de cultivo, el caldo utilizado fue Todd Hewitt, se incubó a 35°C por 24 horas.
- Una vez crecidas las cepas, se pasaron 5 ml a 50 ml de caldo de cultivo, se volvió a incubar por 24 horas a 35°C.
- Ya que hubo crecimiento bacteriano se pasaron 25 ml y 25 ml a 500 ml de caldo de cultivo (250 ml y 250 ml) se incubó a 35°C por 16-24 horas dependiendo del crecimiento bacteriano que se necesite (en este caso fueron 16 horas).
- Posteriormente se vaciaron los 500 ml de cultivo en tubos falcón de 50 ml (se utilizaron 10 tubos) se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos.
- Se rescató la pastilla (se vació el sobrenadante).
- Se agregaron 10 ml de PBS a cada pastilla (tubo) y se mezcló mediante vortex para homogeneizar y vaciar todo en un matraz estéril.
- De la mezcla del matraz se tomaron 200 µl para hacer diluciones:

- Se tomaron 100 μ l de bacteria sin diluir.
 1. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS
 2. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS
 3. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS
 4. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS
 5. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS
 6. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS
 7. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS
 8. 100 μ l bacteria + 900 μ l PBS

De cada una de las diluciones se tomaron 100 μ l para sembrar en cajas con agar y contar las colonias y 100 μ l serian para pasar a la otra dilución y los 800 μ l restantes se usaron para leer en el espectrofotómetro.

- La mezcla del matraz se calentó en baño maría a 65°C durante 2 horas (agregar 500 μ l de formaldehído al 100%).
- Después de las 2 horas se agregó 1 ml de hidróxido de aluminio (plus gel). Ya preparado (2.5 ml de hidróxido de aluminio + 17.5 ml de agua destilada) Por cada 100 ml de bacterina totales se agregó 1ml de hidróxido de aluminio.
- Se dejó enfriar y se tomaron 100 μ l para sembrar en caja y observar que no existiera crecimiento bacteriano.
- Se almaceno a 4°C
- Dependiendo del crecimiento bacteriano de las diluciones, será la cantidad de PBS que se agregara para que la cantidad de ufc sea de

1×10^9 por mililitro. Esto nos dará el volumen total de bacterina para que pueda ser aplicada de acuerdo al protocolo señalado (Rentería, 1985).

Aplicación de la bacterina

Se aplicó 1 ml de la bacterina en la región de la grupa, el seguimiento que se le dio fue el siguiente: segundo refuerzo a los 15 días después de aplicar el primero, posteriormente se aplicó el tercer refuerzo a los 6 meses y finalmente se aplicó el cuarto refuerzo al año después de la primera aplicación de la bacterina.

Recolección de muestras

El periodo en el cual se llevaron a cabo los muestreos fue del 8 de junio del 2014 al 8 de mayo del 2015, los primeros cuatro muestreos fueron mensuales y los siguientes cuatro muestreos fueron bimestrales. Las muestras de leche se tomaron siguiendo la metodología del Consejo Nacional de la Mastitis (NCM, 2010) de los Estados Unidos.

Una vez realizada la prueba de mastitis (CMT), e identificando los cuartos que salieron positivos en un grado II o mayor al CMT, se prosiguió a la toma de muestra de leche de la siguiente forma:

Se tomaron 5 ml de leche en tubos estériles con tapa de rosca, previa limpieza, secado de la ubre y desinfección del pezón con torundas o papeles desechables individuales impregnados de cloruro de benzalconio al 0.1%, usando varias torundas por pezón, hasta que la última no presentó suciedad. Se eliminaron de 1 a 3 chorros de leche del pezón a muestrear para eliminar leche contaminada que está en la punta del pezón, se evitó tener contacto con

otras partes del animal. Una vez tomada la muestra e identificada, se guardó sobre hielo para su transporte al laboratorio.

Cultivo y aislamiento de las muestras

La metodología que se llevó a cabo para el cultivo de las muestras de leche fue de la siguiente manera, se tomaron 100µl de leche por muestra y se depositaron en agar sangre base Columbia con 5% de sangre bovina en toda la superficie de la caja usando un hisopo estéril. Se incubaron entre 24 y 48 horas a 35°C para observar el crecimiento bacteriano. Sólo se seleccionaron los microorganismos que presentaron al menos 10 colonias en cada caja de Petri (1000 UFC/ml de leche) (García et al., 2014).

Identificación de los aislados: Tinción Gram, hemólisis y prueba de catalasa.

Se realizó la técnica de tinción Gram en todas las cepas aisladas, para determinar su morfología, agrupación y poder clasificarlos como Gram positivos o Gram negativos.

Se observó el tipo de hemólisis y se elaboró la prueba de catalasa, la cual consiste en tomar una pequeña parte de una colonia pura de un cultivo de 18 a 24 horas con una aguja de inoculación y colocar sobre un portaobjetos de vidrio limpio, posteriormente se le agregó una gota de H₂O₂ (peróxido de hidrogeno) al 3% sobre la colonia en el portaobjetos, finalmente se observó la producción inmediata de burbujeo si el patógeno era positivo o se clasificó como negativo en caso de no haber cambios (Huchin, 2009).

Almacenamiento de los aislados bacterianos

Todas las bacterias aisladas fueron sembradas en caldo de cultivo Todd Hewitt durante 24 horas a 35°C, posterior a su crecimiento se tomaron 857 µl de caldo y 143 µl de glicerol al 70% (10% final) y se almacenaron en tubos eppendorf por triplicado a -80 °C para su posterior utilización.

Extracción de ADN bacteriano

A todos los aislados se les extrajo ADN utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen®) con el protocolo para bacterias Gram positivas o Gram negativas, ya que la leche posee agentes que inhiben la reacción de PCR y las bacterias, principalmente Gram positivas no se lisan fácilmente. El protocolo para extraer ADN de bacterias Gram positivas fue modificado para extraer ADN de bacterias del género *Staphylococcus* como lo sugiere el fabricante, ya que se tuvo que agregar lisostafina la cual es necesaria para lisar la pared celular. A continuación se describen las modificaciones.

Preparación del ADN bacteriano de Staphylococcus spp.

De cada aislado de *Staphylococcus spp.*, se tomaron de 1 - 4 colonias para ser colocadas en 5 ml de caldo de cultivo Todd Hewitt y se incubaron con agitación (170 rpm) durante 24 horas a 35°C, se tomó solo 1 ml de este cultivo y fue centrifugado a 5000 X g (7500 rpm) durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante para obtener solamente la pastilla. A ésta se le agregaron 100µl del buffer lisis enzimática (20 mM Tris-Cl- pH 8.0, 1.2% Triton X-100, 2 mM sodium EDTA, lisozima 20mg/ml), más 5µl de lisostafina (Sigma L7386®) para incubar con agitación por una hora a 37°C. Después se le agregaron 105µl de

agua grado molecular más 10µl de proteinasa K (Qiagen Inc.) se mezcló por 15seg y se agregaron 200µl del buffer AL sin etanol. Después de este paso se siguió con el protocolo original del paquete comercial, excepto en el paso donde se centrifuga el buffer AW2, en el que se repitió la centrifugación y se dejó abierto el tubo a temperatura ambiente por 3 min, finalmente se resuspendió el ADN en 150µl de agua grado molecular.

Preparación de ADN bacteriano de Gram negativas

Para extraer el ADN de estas bacterias, se tomó de 1 - 4 colonias y se inoculó en 5 ml de caldo Todd Hewitt para cada una de las muestras, se incubaron con agitación (170 rpm) durante 24 horas a 35°C, se tomó 1 ml de cada cultivo y fueron centrifugados a 5000 X g (7500 rpm) durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, para obtener solamente la pastilla. Se continuó con el protocolo de extracción para Gram negativas del paquete comercial ya mencionado, excepto en los pasos antes anotados al final de la preparación del ADN bacteriano de *Staphylococcus spp.* Una vez obtenido el ADN de los aislados, se almacenaron a -20°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la identificación y confirmación de que efectivamente se trata de este patógeno utilizando los oligonucleótidos y la técnica propuestos por Riffon y colaboradores (2001). Técnica en la cual se amplifican los genes 16S y 23S dando un fragmento de 1318 pares de bases, en el cuadro 2, se muestran las características de cada oligonucleótido utilizado.

Cuadro 2. Secuencias, especificidades y contenido de G+C de los oligonucleótidos.

Oligos	Especificidad	Secuencias (5'-3')	Contenido G+C (%)
Sau 327	<i>S. aureus</i>	GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA	45
Sau 1645	<i>S. aureus</i>	CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT	45

Riffon, 2001.

De acuerdo a lo publicado por Riffon y colaboradores (2001), esta técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

Amplificación por PCR:

Se utilizó el termociclador iCycler (BIO-RAD). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25µl. La mezcla consistió en agregar 10.5 µl de agua grado molecular, 12.5 µl de Master mix (PCR Mix), 0.5 µl de oligonucleótidos (un par de oligos) y 1 µl de ADN templado extraído. Esta mezcla se agregó a un tubo de microcentrifuga de 0.2 ml. Esta mezcla se agregó a un tubo de microcentrifuga de 0.2 ml. Una pre etapa de la PCR se realizó a 94°C durante dos min, seguido de 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 45 s, alineación a 64°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 2 min. Después del último ciclo la mezcla se mantuvo a 72°C por 10 min para completar la reacción.

Detección de productos de PCR

Se analizaron 10µl del producto amplificado por electroforesis en un gel de agarosa 1.5% con 0.5 µg de bromuro de etidio/ ml. Los productos se corrieron en TAE 1X (4.8gr Tris, 11.4ml ácido acético glacial, 0.37gr EDTA, para un volumen final de un 1 litro de agua desionizada) a 100 V por 45min. El marcador de peso molecular de 100 pb y de 1 kb (Promega Inc.), se corrieron al mismo tiempo. El gel se visualizó y se fotografió en un sistema de foto documentación (UVP Inc.).

PCR punto final multiplex para identificar Staphylococcus chromogenes, S. epidermidis, S. sciuri, S. haemolyticus, S. simulans y E. coli.

Se realizó la identificación y confirmación de que efectivamente se trata de estos patógenos utilizando los oligonucleótidos y la técnica propuestos por Shome y colaboradores (2011). En esta técnica se utilizaron dos tubos por muestra, ya que cada tubo contiene un juego diferente de oligonucleótidos, en el cuadro 3 se muestran las características de éstos.

Cuadro 3. Nombramiento, secuencias y temperatura de alineación de los oligonucleótidos, tamaño de los productos amplificados y los genes en que se basaron.

Organisms	Gene Bank accession no.	Gene	Primer designation	Oligonucleotide primer 5'-3'	Location within gene	Amplicon size (bp)
<i>E. coli</i>	FJ546461	<i>phoA</i>	ECPF*	GGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTG	433-456	468
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	AJ343945	<i>sodA</i>	ECPR	CAGGGTTGGTACACTGTCATTACG	900-877	222
			SCHS1R	CATTATTTACAACGAGCCATGC	355-334	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	EU652775	<i>sodA</i>	SHS1F*	CAAATTAATTTGTCAGTTGAGG	63-85	214
			SHS1R	AGAGCCCCATTGTTCTTTGA	276-257	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CP000029	<i>rdr</i>	SERF*	AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG	400 016-400 039	130
			SERR	TCGATACCATCAAAAAGTTGG	400 145-400 125	
<i>Staphylococcus sciuri</i>	EU659914	<i>gap</i>	SSCGF*	GATTCGCGTAAACGGTAGAG	122-142	306
			SSCGR	CATCATTTAATACTTTAGCCATTG	427-404	
<i>Staphylococcus simulans</i>	DQ321698	<i>gap</i>	SSMF*	AGCTTCGTTTACTTCTTCGATTGT	171-194	472
			SSMR	AAAAGCACAAAGCTCACATTGAC	642-621	

Primers: SAS2: ECP: *E. coli*; SCHS1: *Staph. chromogenes*; SER: *Staph. epidermidis*; SHS1: *Staph. haemolyticus*; SSCG: *Staph. sciuri*; SSM: *Staph. simulans*.

*This study.

†Dmitriev *et al.* (2006).

Shome *et al.*, 2011

Amplificación por PCR: Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25µl en el termociclador iCycler (BioRad Inc.). La mezcla constó de 7.5 µl de agua grado molecular, 12.5 µl de Master Mix (PCR Mix), 0.5 µl de oligonucleótidos (3 pares de oligos) con las siguientes concentraciones óptimas: SER 0.5 µmol/l, SHS1 0.45 µmol/l, SSM 0.55µmol/l para el primer tubo de reacción y SCHS1 0.5µmol/l, SSCG 0.45µmol/l, ECP 0.45µmol/l para el segundo tubo de reacción y 2 µl de ADN templado extraído. Se llevó a cabo un ciclo a 94°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 s; 60°C por 30 s, 72°C por 45 s y después un ciclo a 72°C por 10 min.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos en los dos grupos evaluados se analizaron con el estadístico Chi cuadrada, para determinar la incidencia de mastitis subclínica, infecciones subclínicas por determinados patógenos y para evaluar la

producción de leche se utilizó el estadístico de prueba Z para diferenciación de medias de ambos grupos.

RESULTADOS

Durante el estudio se fueron descartando animales por diversas causas, como: vacas caídas enfermas, por baja o nula producción de leche, problemas de patas, por carcinoma ocular, problemas reproductivos, vacas que nunca quedaron gestantes durante el periodo evaluado y solo una del grupo control se fue a rastro por mastitis clínica la cual presentaba daños físicos (ulceras, sangre) en las ubres. Quedando conformado los grupos de la siguiente manera: en el grupo control al final del estudio quedaron 27 vacas y el grupo vacunado quedo con 22 vacas, formando un total de 49 unidades experimentales.

Los parámetros evaluados se midieron en las vacas que estaban en producción durante cada mes evaluado, siendo así que en el grupo control se mantuvo una media de 24 vacas en producción durante el tiempo que duro el estudio. Y para el grupo vacunado se mantuvo una media de 17 vacas en producción. El resto de animales de ambos grupos estuvo en periodo de seco en diferentes meses durante el estudio experimental.

A continuación como se muestra en los cuadros 4, 5, y 6. Podemos observar los resultados anuales expresados en porcentaje y litros para la producción de leche, de todas las variables evaluadas tanto en el grupo control como en el grupo vacunado.

Cuadro 4. Comparación anual de variables evaluadas en los dos grupos.

VARIABLES EVALUADAS	INCIDENCIA ACUMULADA EN %, GRUPO CONTROL	INCIDENCIA ACUMULADA EN %, GRUPO VACUNADO
CMT + ANUAL/VACAS	40.40%	29.92%
CMT + ANUAL/CUARTOS	19.06%	12.77%
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> EN VACAS	7.07%	1.45%
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> POR CUARTOS	3.91%	0.91%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> EN VACAS	8.08%	11.67%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> POR CUARTOS	2.14%	3.28%
PRODUCCION DE LECHE PROMEDIO AÑO/VACA	18.74 LTS	20.82%

Cuadro 5. Comparación anual del CMT+ por grupos de edad.

VARIABLES EVALUADAS	INCIDENCIA ACUMULADA EN %, GRUPO CONTROL	INCIDENCIA ACUMULADA EN %, GRUPO VACUNADO
CMT + (4-5 AÑOS) VACAS	25.51%	30.55%
CMT + (4-5 AÑOS) CUARTOS	13.52%	11.80%
CMT + (6-7 AÑOS) VACAS	40.98%	51.35%
CMT + (6-7 AÑOS) CUARTOS	15.16%	27.02%
CMT + (8-9 AÑOS) VACAS	71.79%	29.41%
CMT + (8-9 AÑOS) CUARTOS	35.89%	10.29%

Cuadro 6. Comparación anual del aislamiento de *S. aureus* y *S. chromogenes* por grupos de edad.

VARIABLES EVALUADAS ANUALES	INCIDENCIA ACUMULADA EN %, GRUPO CONTROL	INCIDENCIA ACUMULADA EN %, GRUPO VACUNADO
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> (4-5 AÑOS) VACAS	0%	2.77%
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> (4-5 AÑOS) POR CUARTOS	0%	2.77%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> (4-5 AÑOS) VACAS	10.20%	5.55%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> (4-5 AÑOS) POR CUARTOS	2.80%	2.08%
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> (6-7 AÑOS) VACAS	0%	0%
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> (6-7 AÑOS) POR CUARTOS	0%	0%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> (6-7 AÑOS) VACAS	1.63%	21.62%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> (6-7 AÑOS) POR CUARTOS	0.40%	6.08%
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> (8-9 AÑOS) VACAS	35.89%	5.88%
AISLAMIENTO DE <i>S. aureus</i> (8-9 AÑOS) POR CUARTOS	19.87%	1.47%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> (8-9 AÑOS) VACAS	12.82%	17.64%
AISLAMIENTO DE <i>S. chromogenes</i> (8-9 AÑOS) POR CUARTOS	3.20%	4.41%

Graficas de los resultados obtenidos en el grupo control y grupo vacunado.

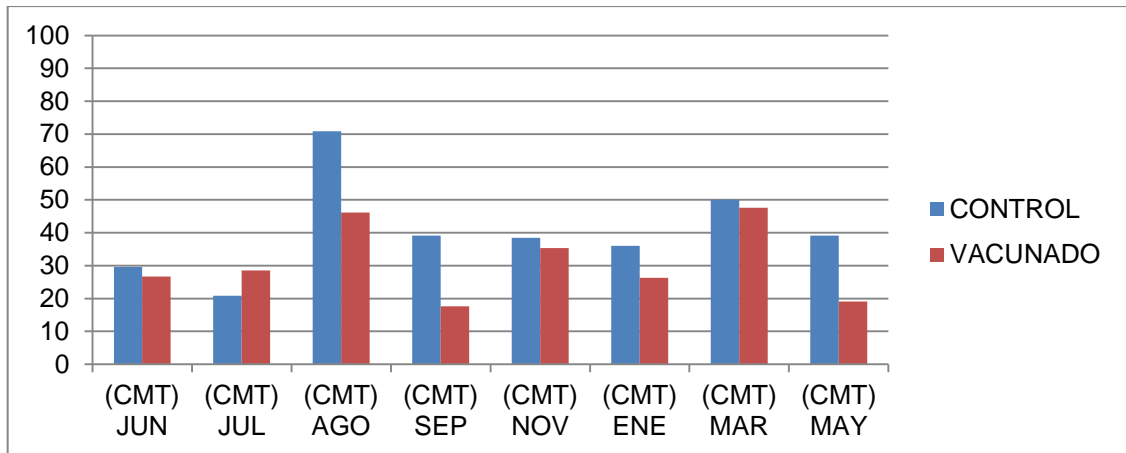


Figura 2. Comportamiento de mastitis subclínica mensual en grupo control y grupo vacunado durante el periodo evaluado (junio 2014 a mayo 2015) expresado en porcentaje (%).

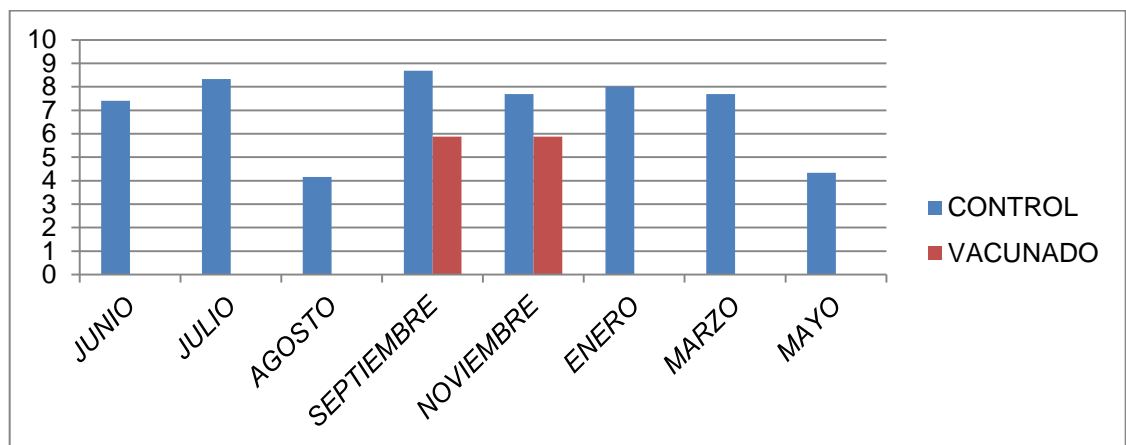


Figura 3. Comportamiento de aislamiento de *S. aureus* mensual en grupo control y grupo vacunado durante el periodo evaluado (junio 2014 a mayo 2015) expresado en porcentaje (%).

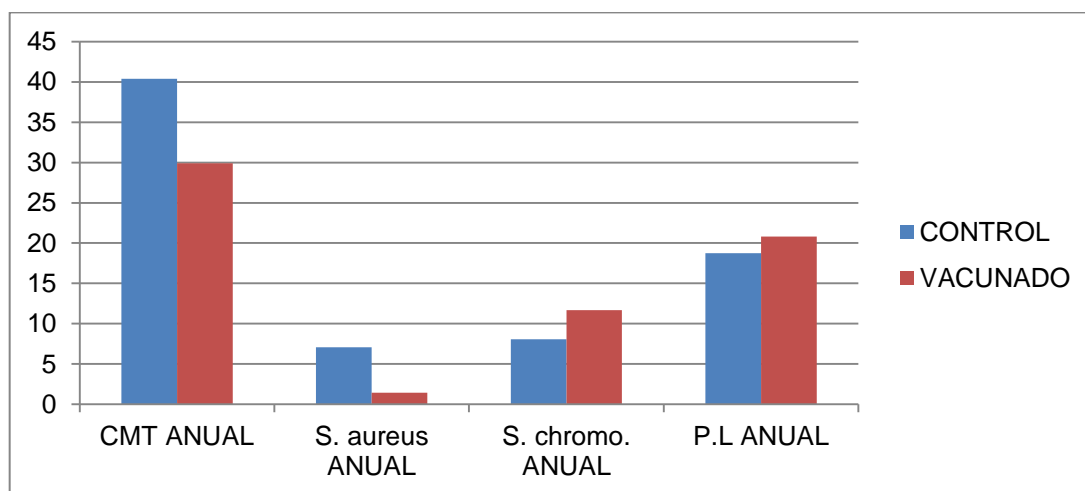


Figura 4. Resultados anuales del CMT, aislamiento de *S. aureus*, *S. chromogenes* y producción de leche en grupo control y grupo vacunado durante el periodo evaluado (2014-2015) expresado en (%) para CMT, aislamiento de *S. aureus* y aislamiento de *S. chromogenes*. Para producción de leche esta expresado en litros promedio anual por vaca.

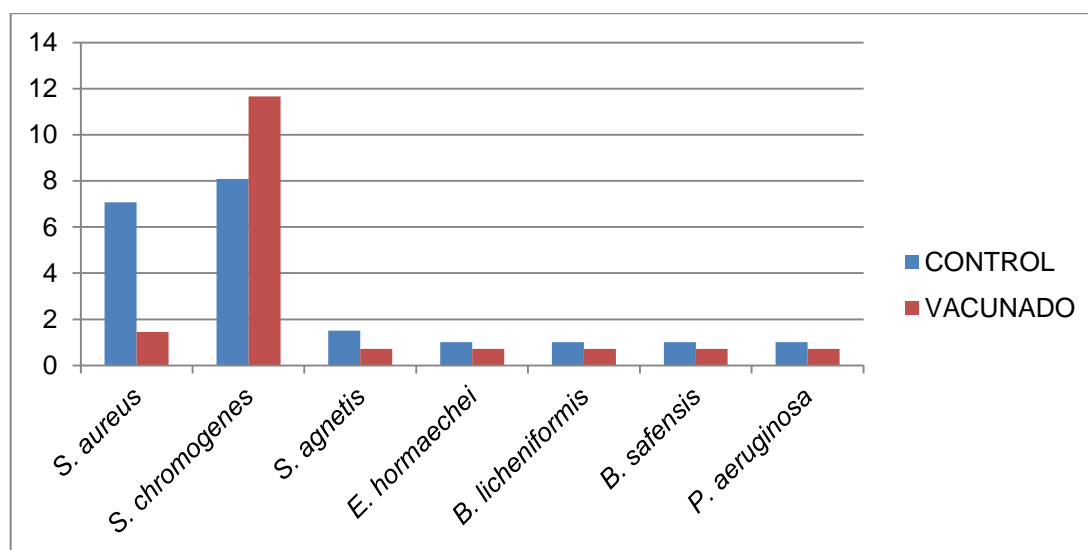


Figura 5. Comportamiento de aislamiento bacteriano anual en grupo control y grupo vacunado durante el periodo evaluado (junio 2014 a mayo 2015) expresado en porcentaje (%).

DISCUSIÓN

Al evaluar los resultados de ambos grupos se obtuvo que si hay diferencia estadísticamente significativa en las variables evaluadas, la incidencia acumulada de mastitis subclínica presentó una disminución en el grupo vacunado de 25.9% ($p < 0.05$) con respecto al grupo control.

Sepúlveda y colaboradores (2010), realizaron un estudio similar donde probaron la eficacia de una vacuna autógena para el control de mastitis durante la lactancia en vacas Holstein, en sus resultados reportan una reducción en la incidencia de mastitis subclínica del 16.9% ($p < 0.01$). Al comparar los resultados de ellos con los nuestros podemos observar que difieren un poco, esto pudo deberse a que ellos aplicaron la autovacuna en vacas en producción y la nuestra fue aplicada en vacas secas y vaquillas próximas a parir, las cuales estaban libres de infecciones. En cuanto a la incidencia de infecciones subclínicas causadas por *S. aureus* hubo una reducción significativa en el grupo vacunado del 79.5 % ($p = 0.01$) vs grupo control.

Mata y colaboradores (2002), llevaron a cabo un estudio similar donde evaluaron la efectividad de una vacuna contra mastitis por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en vacas lecheras, ellos reportan en sus resultados una reducción en la incidencia de mastitis subclínica por *S. aureus* del 45.5% ($p = 0.03$).

Si comparamos este resultado con el nuestro, podemos observar que hay una diferencia, ambos estudios fueron muy similares en cuanto a criterios de inclusión, en lo difieren un poco fue en el tiempo que llevaron a cabo la

evaluación de aislamientos bacterianos y medición de parámetros productivos siendo así que ellos evaluaron todo durante cuatro meses y en nuestro caso fue durante un año tiempo en el cual pudimos rebabar más información para nuestro estudio.

Se obtuvo la incidencia de mastitis por infecciones subclínicas a causa de *S. chromogenes*, el cual reemergió dándonos un porcentaje mayor en el grupo vacunando (11.67%, $p = 0.27$) vs grupo control (8.08%), aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa, pero si en cuanto a porcentaje, la causa se pudo deber a que al disminuir la presencia de *S. aureus*, *S. chromogenes* tuvo el camino libre para colonizar deliberadamente la glándula mamaria de las vacas en las cuales bajaron las infecciones por *S. aureus*.

La aplicación de la bacteria autógena en el grupo vacunado, tuvo un impacto positivo en cuanto a la producción de leche promedio anual por vaca, siendo así que en el grupo vacunado se registró una producción láctea significativamente mayor (20.82 lts, $p < 0.05$) respecto al grupo control (18.74 lts).

También se llevó a cabo una comparación de parámetros por rangos de edad, en los dos grupos evaluados, arrojando diferencias estadísticamente significativas en los siguientes parámetros: la incidencia de mastitis fue mayor en las vacas de 8-9 años del grupo control (71.79%, $p = 0.003$) vs grupo vacunado (29.41%), la incidencia de *S. aureus* fue mayor en las vacas de 8-9 años del grupo control (35.89%, $p = 0.01$) vs grupo vacunado (5.88%), la producción de leche fue mayor en las vacas de 8-9 años del grupo vacunado (25.33 lts, $p < 0.05$) vs grupo control (20.69 lts).

Los resultados obtenidos nos indican que la aplicación de la bacterina autógena, tiene efectos positivos en la reducción de la incidencia de mastitis subclínica, reducción en la incidencia de mastitis subclínica causada por *S. aureus* y además mejoro la producción de leche en el grupo vacunado.

CONCLUSIÓN

La aplicación de una bacterina autógena, ayudó a disminuir la incidencia de mastitis subclínica y provocó una disminución de casos con aislamiento de *Staphylococcus aureus* en el grupo vacunado, sin embargo, hubo un aumento en la incidencia de *Staphylococcus chromogenes*, como era de esperarse, ya que la bacterina se elaboró a partir de *S. aureus*, por lo tanto se esperaba que no protegiera contra otras bacterias. No obstante, a pesar de esto, sí logró mejorar los parámetros productivos, es decir hubo un aumento estadísticamente significativo en la producción de leche en el grupo vacunado con respecto al grupo control. Después de concluir este estudio, nos dimos cuenta que existe la necesidad de realizar otros estudios experimentales donde se pueda elaborar una bacterina que contenga las principales bacterias que estén causando mastitis en el hato que se desee evaluar, con la finalidad de proveer una inmunidad más amplia contra diferentes patógenos causantes de mastitis. Aunado a esto se requiere de un adecuado manejo de ordeña, higiene, administración adecuada de antibióticos y buen mantenimiento de la sala de ordeña, lo cual aunado a la aplicación de bacterinas autógenas, ayudará en el control y disminución de los efectos de la mastitis en los establos lecheros.

LITERATURA CITADA

- Bedolla CC, Castañeda VH, Wolter W. 2007. REDVET. Métodos de detección de la mastitis bovina. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504 Volumen VIII Número 9. 7-9.
- Bedolla, Ponce de León. 2008. REDVET. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 Volumen IX Número 4. 10-16.
- Bou, G, A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto y S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29(8):601-608.
- Brady, R. A., G. A. O'May, J. G. Leid, M. L. Prior, J. W. Costerton, and M. E. Shirtliff. 2011. Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Inf and Immu* 79:1797-1803.
- Ceballos, Márquez Alejandro. 2012. Respuesta inmune y vacunación contra mastitis. Grupo de Investigación en Biotecnología Agraria Departamento de Producción Agropecuaria Universidad de Caldas Manizales, Colombia. 1- 4.

- Calderón Alfonso, Rodríguez C Virginia. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el antiplano cundiboyacense Colombia. Rev colomb de cien pecu. 583-584.
- Fernández Bolaños, Omar Fernando¹, Trujillo Graffe, José Eduardo¹, Peña Cabrera, John Jaiver¹, Cerquera Gallego, Jefferson¹ y Granja Salcedo, Yury Tatiana². 2012. Mastitis Bovina: Generalidades y Métodos de Diagnóstico. Revista Veterinaria REDVET 13(11). 1-11.
- Gamarra, Giselle Del C. Gamarra, Segundo. Salazar, Ivonne. 2001. Evaluación de una bacterina para la prevención de mastitis en vacas en lactación. Universidad Nacional Agraria la Molina Repositorio Institucional. 1-15.
- García, Zapata S. López, Zapata M. Durando, Cartagena C. 2014. Cultivo y aislamiento de Bacterias. Universidad de Antioquia. 2-10.
- Garza Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. 2009. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Salud Publica México; 51 supl 3:S439-S446.
- Hans Andresen S. 2001. Mastitis prevención y control. Rev Inv Vet Perú 2001; 12(2): 55-64.
- Huchin, C. C. 2009. Instructivo para el procesamiento de muestras del área de Microbiología. Universidad Autónoma de Yucatán. I-FQUI-LAC-07

- Kivaira, F., J. Noordhuizen y M. Nielen. 2007. Interpretation of California mastitis test scores using *Staphylococcus aureus* culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dares Salaam region of Tanzania. *Prev. Vet. Medicine*. 78: 274-285.
- Mata, H.T.; Corbellini, C.N.; Pechin, G.H.; Larrea, A.T.; Otrosky, R.N.; Meglia, G.E. 2002. Evaluación de la Efectividad de una Vacuna contra Mastitis por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en Vacas Lecheras. CV. FCV. U.N.L.Pam. 1-10.
- Negoro, E., H. Iwasaki, K. Tai, S. Ikegaya, K. Takagi, S. Kishi, T. Yamauchi, A. Yoshida, Y. Urasaki, M. Shimadzu y T. Ueda. 2013. Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. Elsevier. *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 17, Issue 4. 271-276.
- Palacios, T, Javier. 2014. Caracterización Genética de aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de casos de mastitis en establos lecheros de Baja California. Tesis. UABC, Baja California.
- Prenafeta, Antoni. March, Richard. Foix, Antoni. Isidre. Casals. Llorenç Costa, 2010. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. 208-217.

- Riffon R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, y J. Lagacé. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2584-2589.
- Rentería Evangelista Tomas B., Romo Zerafin Fernando. 1985. Preparación y utilización de una Bacterina Autógena de *Staphylococcus aureus* y evaluación de la eficacia en el control de la mastitis bovina. Tesis. UABC, Baja California.
- Scaramelli, A. y y González, Z. 2005. Prevención y control de mastitis bovina. Manual de Ganadería doble propósito. Venezuela. 335-336.
- Sepúlveda Aceves Juan, Sepúlveda Reséndiz Rubén, Arias Aida, González Daniel, González Villegas Abraham, 2010. Evaluación de vacunas autógenas como herramienta para el control de la Mastitis durante la lactancia en vacas Holstein. *Nova Scientia*, vol. 2. 1-15.
- Shome, B.R., S.D. Mitra, M. Bhuvana, N. Krithiga, D. Velu, R. Shome, S. Isloor, S. B. Barbuddhe y H. Rahman. 2011. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology*.
- U.P Pereira, D.G.S. Oliveira, L.R. Mesquita, G.M. Costa, L.J. Pereira, 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. 117-124.

Velasco Z., y Y, Maza. 2002. Bacterias de Interés Veterinario. Med Vet; vol. 19 (1):
1.11.

Viguiet, C, A. Sushrut, N, Gilmartin, K. Welbeck y R, O'Kennedy. 2009. Mastitis
Detection: current trends and future perspectives. Cel Press. doi: 10.1016.

W. Wolter, Castañeda V.H., Kloppert B., y Zschoeck M. 2002. La mastitis bovina.
Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara.
18-19.

Wellenberg, G. J., Van Der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. 2002. Viral
infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology, Article 2361,
2-21.