

Identificación molecular y frecuencia de patógenos aislados de mastitis bovina en establos de la Península de Baja California, México

Molecular identification and frequency of isolated pathogens from bovine mastitis in dairy herds from Baja California Peninsula, Mexico



Jennifer Brisuela Raygosa^a

Javier Palacios Torres^a,

Gilberto López Valencia^a,

Sawako Hori-Oshima^a,

José Carlomán Herrera Ramírez^a,

Lourdes Carolina Pujol Manríquez^a,

Carlos Eliud Angulo Valadez^b,

Tomás Benjamín Rentería Evangelista^a,

Gerardo Enrique Medina Basulto^{a*}

^a Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Tel: +52 (686)-563-69-06, Ext.131. Km. 3.5 carretera a San Felipe S/N. Fracc. Laguna Campestre. 21386. Baja California, México.

^b Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México.

*Autor de correspondencia: gerardom@uabc.edu.mx

● **Resumen:**

La mastitis bovina es una enfermedad de alto impacto económico para la industria lechera, y algunos de los agentes etiológicos que la provocan también son de interés en el ámbito de salud pública. El objetivo de este estudio fue identificar las especies bacterianas aisladas de casos de mastitis bovina, provenientes de siete establos lecheros ubicados en la Península de Baja California. Se tomaron 316 muestras de leche de igual número de cuartos, pertenecientes a 186 vacas en producción que a la prueba de California tuvieron reacción positiva. Se obtuvieron 182 aislados bacterianos de 163 cuartos pertenecientes a 106 vacas y se identificaron por PCR y secuenciación, dando un total de 20 especies diferentes. Además, se obtuvieron las frecuencias relativas, siendo los agentes causales más frecuentes: *Staphylococcus aureus* (58.8 %), *Streptococcus agalactiae* (13.2 %), *Staphylococcus chromogenes* (8.8 %), *Escherichia coli* (2.2 %) y *Streptococcus uberis* (2.2 %). El 6.13 % (10/163) de los cuartos con aislamiento presentaron infección mixta, siendo la combinación más frecuente *S. aureus* con *S. agalactiae* 30 % (3/10). Estos resultados indican una alta frecuencia y diversidad de patógenos de carácter contagioso y ambiental que provocan mastitis en ganado lechero en la región de estudio, siendo algunos de importancia para la salud pública. Los resultados observados, muestran que las causas de la mastitis son diversas, por lo que es indispensable mejorar las medidas de control y prevención, pero también establecer el diagnóstico de rutina para lograr controlar la mastitis.

● **Palabras clave:** Mastitis bovina, Identificación molecular, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

● **Abstract:**

Bovine mastitis is a disease of high economic impact for the dairy industry and some of the etiological agents that cause it are also of interest in the field of public health. The purpose of study was to identify the bacterial causes of bovine mastitis from seven dairy farms located in the Baja California Peninsula. A total of 316 milk samples were collected from the same number of quarters belonging to 186 cows in production that tested positive for California Mastitis test. It was obtained 182 bacterial isolates from 163 quarters belonging to 106 cows and were identified by PCR, giving a total of 20 different species. Isolates were identified using specific oligonucleotides for the major mastitis pathogens and with universal oligonucleotides for the 16S ribosomal DNA gene with subsequent sequencing for those that did not amplify with the specific oligonucleotides and relative frequencies were obtained. The most frequent causal agents were: *Staphylococcus aureus* (58.8 %), *Streptococcus agalactiae* (13.2 %), *Staphylococcus chromogenes* (8.8 %), *Escherichia coli* (2.2 %) and *Streptococcus uberis* (2.2 %). A mixed infection was found in 6.13 % (10/163) of the quarters, being the most frequent combination *S. aureus* plus *S. agalactiae* 30 %

(3/10). These results indicate a high frequency and diversity of contagious and environmental pathogens causing mastitis in dairy cattle in the region of study, being some of importance for public health. The results show that the causes of mastitis are diverse, so it is essential to improve control and prevention measures, but also to establish a routine diagnosis to control mastitis.

● **Key words:** Bovine mastitis, Molecular identification, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.

Recibido: 13/02/2017

Aceptado: 09/11/2017

❖ Introducción ❖

La mastitis bovina es una inflamación de uno o varios cuartos mamarios que se debe con mayor frecuencia a una infección intramamaria (IIM)⁽¹⁾. La severidad de la inflamación se puede clasificar como subclínica o clínica. La mastitis subclínica es difícil de detectar debido a la ausencia de cualquier signo visible, pero tiene un alto impacto económico⁽²⁾. El costo de esta enfermedad se ha estimado hasta en 320 dólares por vaca por lactación, siendo aproximadamente el 70 % de estas pérdidas por la reducción en la producción de leche⁽³⁾. Un método eficaz en campo para detectar mastitis subclínica en un establo es la prueba de California para mastitis (CMT) basada en la cantidad de células somáticas presentes en la leche⁽⁴⁾.

Se han identificado más de 135 especies de bacterias causantes de mastitis⁽⁵⁾, las cuales se clasifican como microorganismos contagiosos y ambientales de acuerdo a su reservorio primario y al modo de transmisión⁽⁶⁾. Los patógenos contagiosos incluyen *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis* y *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN)⁽⁷⁾. Los patógenos contagiosos sobreviven en la ubre de la vaca, donde la leche es la principal fuente de infección primaria para las vacas sanas, y ocurre durante la ordeña⁽⁸⁾. Los patógenos ambientales se encuentran comúnmente en los corrales y bebederos e incluyen especies como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Streptococcus* spp., entre otras. La combinación de alta humedad y materia fecal

incrementa el riesgo de exposición de la ubre a patógenos ambientales⁽¹⁾. Al identificar la especie que está provocando esta condición, se puede deducir y reducir la fuente de infección, diseñar programas de prevención y control, y orientar una estrategia terapéutica. Por otra parte, la leche y los productos lácteos elaborados con leche proveniente de vacas con mastitis, pueden provocar enfermedades en los seres humanos que los consumen⁽⁹⁾; de hecho, algunas especies bacterianas aisladas de vacas con mastitis se consideran zoonóticas, tales como *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Leptospira* spp., *Mycobacterium bovis*, *Trueperella pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis*⁽¹⁰⁾ y *Pasteurella multocida*⁽¹¹⁾.

En Baja California (BC) existe una población de 43,300 bovinos de leche con una producción de 158 millones de litros anuales, en tanto en Baja California Sur (BCS) existen 14,200 bovinos de leche con una producción de 42 millones de litros anuales⁽¹²⁾; sin embargo, no se han realizado investigaciones documentadas sobre los agentes que provocan mastitis bovina, a pesar de su importancia nacional en la producción de leche y el hecho de que la prevalencia de mastitis es relativamente alta⁽¹³⁾. Considerando todo lo anterior, en el presente trabajo se identificaron las especies bacterianas aisladas de vacas en producción con mastitis, mediante técnicas moleculares, y se determinó su frecuencia relativa en siete establos lecheros participantes, ubicados en las principales zonas productoras de la Península de Baja California, México.

❖ Material y Métodos ❖

● Ubicación del estudio ●

Se muestrearon siete establos lecheros tecnificados representativos de las principales regiones productoras de leche; cuatro del estado de Baja California y tres del estado de BCS (Figura 1), los cuales se identificaron con la letra A hasta la letra G (A-D, Baja California; E-G, Baja California Sur), con un total de 1,302 vacas en lactación (Cuadro 1).

Figura 1: Distribución de los establos muestreados en la zona de estudio



*Los círculos con contorno en puntos indican las principales cuencas lecheras de la península, los círculos con contorno continuo representan los establos muestreados.

Cuadro 1: Identificación de establos, número de animales en lactación y su procedencia

Establo	Vacas en producción	Municipio	Estado
A	46	Mexicali	Baja California
B	600	Mexicali	Baja California
C	371	Ensenada	Baja California
D	218	Tecate	Baja California
E	24	Comondú	Baja California Sur
F	10	Comondú	Baja California Sur
G	33	La Paz	Baja California Sur

● Criterio de inclusión y recolección de muestras ●

Se tomaron muestras de leche siguiendo la metodología del Consejo Nacional de Mastitis de los Estados Unidos⁽¹⁴⁾ de los cuartos afectados de todas las vacas en producción que tuvieron grado 2 o mayor a la prueba de California (CMT) utilizando el reactivo Mastitest® (México).

● Cuestionario sobre prácticas de ordeña ●

Se recabó información relevante de cada establo mediante la aplicación de un cuestionario, con énfasis en el protocolo de ordeña que incluyó: uso de guantes, cambio de toallas de papel o tela por cuarto, pre-sello, post-sello y secuencia de ordeña.

● Análisis bacteriológico ●

Se cultivó 0.1 ml de cada muestra de leche en cajas de Petri agar Columbia con sangre de bovino al 5% y se incubó a 35 °C por 24 a 48 h⁽¹⁾. La muestra con al menos 10 UFC (unidades formadoras de colonia) con una misma morfología se consideró cultivo positivo a IIM⁽¹⁵⁾, la muestra con distintas especies bacterianas con al menos 10 UFC cada una, se consideró IIM mixta, y la muestra que tuviera menos de 10 UFC se consideró cultivo negativo⁽¹⁾. Para determinar diferencias entre los aislados se consideró morfología colonial, tipo de hemólisis, tinción Gram y prueba de catalasa⁽¹⁶⁾. Finalmente, los aislados obtenidos se cultivaron en 5 ml de caldo Todd Hewitt e incubados a 35 °C por 12 h a 200 rpm, y se hicieron tres alícuotas de 1 ml con glicerol al 10% para su almacenamiento a -80 °C y posterior identificación molecular.

● Análisis estadístico ●

De acuerdo a los datos obtenidos, se utilizó el software Statistix 9®, incluyendo la estimación de Ji cuadrada de Pearson para establecer la asociación entre las proporciones de muestras de leche que tuvieron cultivo positivo entre los dos estados y entre establos, además, se calculó la magnitud de asociación (odds ratio, OR) con un intervalo de confianza de 95% estableciendo un valor de $P < 0.05$ para indicar significancia estadística.

● Extracción de ADN ●

Se extrajo ADN utilizando el juego de reactivos DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®, USA). Se realizó la extracción como recomienda el proveedor, adicionando 5 µl de lisostafina de *S. staphylolyticus* 1 mg/ml para lisar bacterias del género *Staphylococcus* y 10 µl de mutanolisina de *Streptomyces globisporus* ATCC 21553 a 1,000 U/ml para lisar bacterias del género *Streptococcus*. Una vez obtenido el ADN se revisó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría A260nm/A280nm (Genesys 10uv Thermo Spectronic, MA USA) y se almacenó a -20 °C.

● Identificación molecular ●

Se realizó PCR a los aislados obtenidos siguiendo dos metodologías; en la primera se identificaron *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus*

parauberis y *Streptococcus uberis*, mediante la técnica de PCR punto final y en la segunda se identificaron *E. coli*, y cinco SCN: *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. sciuri* y *S. simulans*, mediante la técnica de PCR Multiplex también en tiempo final. En ambos casos, se utilizaron protocolos previamente publicados por otros autores y sin modificaciones^(17,18). Por último, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5% en buffer TAE 1X (Ph 8.0; 0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA), teñidos con 0.5 µg de bromuro de etidio/ml y corridos a 120 V por 1 h. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, EUA.) y el gel se visualizó y fotografió en un sistema de fotodocumentación (UVP, ALE.).

A los aislados que no pudieron identificarse por las pruebas de PCR mencionadas, se les realizó PCR punto final del gen ribosomal 16S, de acuerdo a Negoro *et al*⁽¹⁹⁾ y se mandaron a secuenciar utilizando esos mismos oligonucleótidos mediante el método de secuenciación de ciclo (terminación de cadena dideoxi/secuenciación de ciclo), en un equipo ABI 3730XL (Quimera, Biolabs, México). Las secuencias obtenidas se introdujeron en la base de datos online GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en el programa BLAST[®] para compararlas con las secuencias depositadas y determinar la especie, el criterio fue que la secuencia tuviera un mínimo de 98.5 % de identidad en comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia, como ya fue descrito⁽²⁰⁾.

❖ Resultados ❖

Se colectaron 316 muestras de leche de 186 vacas con mastitis subclínica. Se aislaron bacterias en el 51.5 % (163/316) de las muestras, correspondientes a 106 animales (Cuadro 2). Se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de las muestras de leche que tuvieron cultivo positivo en Baja California (130/270) y BCS. (33/46), presentándose 2.7 veces más probabilidad de que una muestra tomada en BCS tenga cultivo positivo, que una muestra tomada de establos en Baja California ($P=0.003$, IC 95%, 1.3-5.4). A nivel establo, el establo G, tiene 20 veces más probabilidad de que una muestra de leche tenga cultivo positivo con respecto al tomado como referencia.

Cuadro 2: Frecuencia y magnitud de asociación (OR) entre las muestras que presentaron aislamiento, tomando como referencia el establo con menor proporción de aislamientos

Establo	Muestras CMT+ (n)	Muestras con aislamiento	Muestras sin aislamiento	OR	95% IC	P
A	27	13	14	2.8	1.1-6.7	0.02
B	46	23	23	3.0	1.4-6.2	0.002
C	104	26	78	Referencia		
D	93	68	25	8.2	4.3-15.4	0
E	6	2	4	1.5	0.2-8.67	1
F	17	11	6	5.5	1.8-16.3	0.001
G	23	20	3	20	5.5-72.8	0
Total	316	163 (51.5%)	153 (48.5%)			

CMT= prueba de California para mastitis.

Durante el proceso de ordeña, ninguno de los establos cumplía completamente con buenas prácticas de ordeña para evitar infecciones intramamarias; sin embargo, por lo menos cumplían con alguna de ellas. Así, se observó, que por ejemplo el establo D, cumplía con la mayoría de las buenas prácticas analizadas en el estudio, sin embargo la proporción de aislados por muestra positiva a mastitis fue alta. En el establo C, se observó una baja proporción de aislados, aún a pesar que no llevaban a cabo todas las buenas prácticas durante la ordeña; aunque se llevaba una secuencia al ordeñar, dejando a las vacas enfermas a lo último, lo que sugiere que el ordeñar las vacas con mastitis al final, puede ser un factor importante para evitar la diseminación de la enfermedad. Los establos E, F y G, llevaban a cabo pocas actividades para evitar la diseminación de la mastitis, observándose en los establos F y G una alta proporción de aislamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Protocolo de ordeña por establo

Actividad	A	B	C	D	E	F	G
Uso de guantes	+	-	+	+	-	-	-
Cambio de toallas de papel o tela	-	+	-	+	-	-	-
Pre-sello	+	-	-	+	+	+	-
Post-sello	+	+	+	+	-	-	-
Secuencia de ordeña	-	-	+	-	-	-	+

Las especies aisladas más frecuentes fueron: *S. aureus* 59 % (107/182), *S. agalactiae* 13 % (24/182), *S. chromogenes* 9 % (16/182), *E. coli* 2 % y *S. uberis* 2 % (4/182) (Cuadro 4).

Cuadro 4: Especies identificadas y su frecuencia relativa

Especies	Numero de aislados (%)
<i>S. aureus</i> *	107 (58.8)
<i>S. agalactiae</i> *	24 (13.2)
<i>S. chromogenes</i> *	16 (8.8)
<i>E. coli</i>	4 (2.2)
<i>S. uberis</i>	4 (2.2)
<i>S. saprophyticus</i> *	3 (1.6)
<i>S. dysgalactiae</i>	3 (1.6)
<i>Streptococcus suis</i>	3 (1.6)
<i>P. multocida</i>	3 (1.6)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (1.6)
<i>Proteus vulgaris</i>	2 (1.1)
<i>Bacillus cereus</i>	2 (1.1)
<i>S. agnetis</i> *	1 (0.5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (0.5)
<i>Enterobacter hormaechei</i>	1 (0.5)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (0.5)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (0.5)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (0.5)
<i>Bacillus licheniformis</i>	1 (0.5)
<i>Bacillus altitudinis</i>	1 (0.5)
Total de aislados	182 (100)

*Especies contagiosas

El 83 % de los aislados (151/182) fueron clasificados como especies contagiosas, en tanto el resto fueron especies ambientales (Cuadro 5). De la misma manera, el 91.2 % de los aislados fueron bacterias Gram positivas y el resto Gram negativas.

Cuadro 5: Frecuencia relativa de las especies contagiosas y ambientales aisladas por establo (%)

Establo Especies	A	B	C	D	E	F	G	Total
Contagiosas	11 (68.75)	17 (74.0)	24 (85.7)	68 (90.65)	1 (50.0)	9 (64.3)	21 (87.5)	150 (83.0)
Ambientales	5 (31.25)	6 (26.0)	4 (14.3)	7 (9.35)	1 (50.0)	5 (35.7)	3 (12.5)	30 (17.0)

Del total de cuartos con cultivo positivo, el 6.1 % (10/163) presentaron una infección mixta. Las combinaciones más frecuentes fueron *S. aureus* con *S. agalactiae* (30 %) y *S. aureus* con *S. chromogenes* (20 %). El 70 % de las infecciones mixtas fueron provocadas por combinaciones entre agentes contagiosos.

❖ Discusión ❖

En el presente trabajo se obtuvo cultivo positivo en el 51.5 % de las muestras, en tanto, en un estudio realizado en Egipto⁽⁵⁾, se obtuvieron aislados en el 96 % de sus muestras; la discrepancia en estos datos, además de las condiciones medioambientales, se puede deber a que en el trabajo mencionado se pre-incubaron las muestras hasta por 24 h a 37 °C y no se utilizó un criterio para considerar un cultivo positivo, lo que pudo predisponer al elevado porcentaje de aislamiento que tuvieron por muestra. Una razón por la cual en el presente estudio solo se obtuvo aislamiento bacteriológico en el 51.5 % de las muestras, pudo ser que en los casos de cultivos negativos, la mastitis fue provocada por microorganismos no cultivables mediante los métodos de rutina aquí utilizados (p. ej. *Mycoplasma* spp, *Mycobacterium bovis*, *Leptospira* spp. y *Brucella* spp.), o debido a causas no infecciosas, tales como traumatismo, altas temperaturas o estrés en los animales.

En los establos muestreados en Baja California Sur se encontró que existe más riesgo de que una muestra positiva a CMT tenga cultivo positivo con respecto a los establos muestreados en Baja California, lo cual se puede deber a las medidas deficientes en el protocolo de ordeña en dichos establos, o a una mayor frecuencia de bacterias no cultivables en los establos muestreados en el estado de Baja California.

Todas las especies identificadas en el presente estudio, excepto *S. suis* y *Enterobacter hormaechei*, se han aislado de casos de mastitis en investigaciones realizadas en otras partes del mundo y, en algunos casos los resultados han sido muy similares; así por ejemplo en un estudio realizado en Suecia en establos pequeños y tecnificados⁽²¹⁾, del 31 % de los cuartos se aisló *S. aureus*, seguido por SCN con 27 %, *S. dysgalactiae* 15 %, *S. uberis* 14 % y *E. coli* 4.8 %. En otro estudio⁽⁵⁾, los cuatro agentes principales fueron los mismos, sólo que *E. coli* fue el agente más frecuente con 25.5 %, seguido de *S. aureus* con 14.8 % y SCN y *S. agalactiae*, ambos con 12.7 %; el 15 % de las muestras provenían de vacas con mastitis clínica donde generalmente las bacterias coliformes son las principales causales. En un estudio realizado en establos familiares de Guanajuato, México⁽²²⁾, también se identificaron especies bacterianas aisladas de mastitis mediante secuenciación del gen 16S rDNA, de 11 muestras de leche, de ellas, cinco muestras presentaron SCN, dos muestras presentaron *Streptococcus* spp. y una *S. aureus*, mostrando resultados muy similares a los del presente trabajo.

En los establos muestreados en Baja California Sur, se encontró que no post-sellaban, lo que pudo favorecer una alta incidencia de agentes ambientales con respecto a los establos muestreados en Baja California, lo cual concuerda con lo encontrado en un estudio realizado en Guerrero, México⁽²³⁾, en donde el 97.5 % de los aislados fueron Enterobacterias, presentando los establos malas condiciones de higiene tanto en los corrales como en el protocolo de ordeña, ya que no pre-sellaban, post-sellaban, ni secaban pezones.

En el establo D, fue muy alta la proporción de *S. aureus*, aun llevando buenas prácticas de ordeña; sin embargo, no contaban con un protocolo en el que se contemplara primero ordeñar a las vacas sanas y después a las enfermas, lo que pudo provocar la diseminación de la enfermedad por el equipo o material utilizados. El establo A, de donde se aisló *S. suis* en dos animales, se encuentra ubicado a 30 m de un área de producción porcina, lo que sugiere que algún trabajador o material pudo haber actuado como diseminador. Al igual que *S. suis*, las demás especies que pueden provocar enfermedades en humanos transmitidas por ingestión de leche contaminada^(24,25,26) que se aislaron en este estudio fueron: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *P. mirabilis* y *Enterobacter hormaechei*.

En el presente estudio se observó una baja frecuencia de infecciones mixtas (6.1 %), siendo *S. aureus* con *S. agalactiae* la más común (30 %). En un estudio similar⁽⁵⁾, se observaron infecciones mixtas en un 35.8 % de los cuartos con aislamiento, donde la combinación más común fue *S. aureus* con *E. coli* (18 %). En ambos estudios las dos especies aisladas más frecuentes, presentaron la mayoría de las combinaciones implicadas en las infecciones mixtas.

❖ Conclusiones e implicaciones ❖

El presente trabajo es el primer reporte en Baja California, en el cual se hayan aislado e identificado, agentes etiológicos por medio de técnicas moleculares a partir de muestras de leche de vacas con mastitis, lo cual permitió la identificación de 20 especies bacterianas, 12 de las cuales no habían sido reportadas en México. Nueve de las especies identificadas son consideradas zoonóticas, lo cual representa un riesgo para el personal que está en contacto directo con los animales o que consume leche y subproductos no pasteurizados en la región. En general, las prácticas durante la ordeña fueron deficientes en los establos participantes, lo cual se vio reflejado en una alta diversidad y proporción de casos de mastitis debidas a agentes contagiosos, por lo que es importante su implementación y la identificación de agentes etiológicos, para llevar a cabo las medidas de control y prevención acordes al tipo de agente presente en cada caso, y así disminuir la incidencia de esta enfermedad.

❖ Agradecimientos ❖

A los productores de los establos muestreados por su participación y accesibilidad, A CONACyT por el apoyo a becarios de posgrado, a las Convocatorias internas de investigación de la UABC y al apoyo técnico de parte de Gerardo Felipe, Fernanda Bermúdez, Elizama Ponce, Tomás Cárdenas y José Luis Rodríguez.

● Literatura citada

1. Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J Dairy Sci* 2007;90(12):5798-5813.
2. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol* 2009;27(8):486-493.

3. Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J Anim Sci* 2008;86(1):57-65.
4. Lam TJ, Olde R, Sampimon OC, Smith H. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Irish Vet J* 2009;62(Suppl 1):34-39.
5. Sayed HR, Salama SS, Soliman TR. Bacteriological evaluation of present situation of mastitis in dairy cows. *Global Veterinaria* 2014;13(5):690-695.
6. Ruegg PL. Managing mastitis and producing quality milk. In: Wiley-Blackwell. *Dairy production medicine*. 1st ed. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Inc; 2011:207-232.
7. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. 1ª ed. Zaragoza, España: Acribia; 2002.
8. Valero-Leal K, Valbuena E, Chacón F, Olivares Y, Castro G, Briñez W. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. *Rev Cientif FCV-LUZ* 2010;20(5):498-505.
9. Sztachañska M, Barański W, Janowski T, Pogorzelska J, Zduńczyk S. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Pol J Vet Sci* 2016;19(1):119-124.
10. McDaniel CJ, Cardwell DM, Moeller RB, Gray GC. Humans and cattle: A review of bovine zoonoses. *Vector-Borne Zoonot* 2014;14(1):1-19.
11. Kotton CN, Weinberg AN. Zoonoses. In: Mandell D, *et al.* *Principles and practice of infectious diseases*. 7th ed. London, England: Churchill Livingstone; 2010.
12. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Población ganadera bovino leche 2013. México. 2016.
13. Palacios TJ, Brisuela RJ, Oshima S, López VG, Herrera RJC, Rentería ETB, *et al.* Identificación y perfil de resistencia a antibióticos de *S. aureus* en casos de mastitis bovina en establos lecheros de la Península de Baja California. Reunión internacional sobre producción de carne y leche en climas cálidos. 2016:320-323.
14. Oliver SP, Gonzalez RN, Hogan JS, Jayarao BM, Owens WE. *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality*. 4th ed. Wisconsin, USA: National Mastitis Council Inc; 2004.
15. Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima BM, Båge R. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod* 2014;(46):99-105.

16. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª. ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana; 2003.
17. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39(7):2584-2589.
18. Shome BR, Das-Mitra S, Bhuvana M, Krithiga N, Velu D, Shome R, *et al.* Multiplex pcr assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *J Appl Microbiol* 2011;(111):1349-1356.
19. Negoro E, Iwasaki H, Tai K, Ikegaya S, Takagi K, Kishi S, *et al.* Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. *Int J Infect Dis* 2012;(17):e271-e276.
20. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infec Micr Cl* 2011;29(8):601-608.
21. Persson Y, Nyman AJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scan* 2011;(53):36.
22. León-Galván MF, Barboza-Corona JE, Lechuga-Arana AA, Valencia-Posadas M, Aguayo DD, Cedillo-Pelaez C, *et al.* Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herd of central Mexico. *Biomed Res Int* 2015;(2015):615153.
23. Olivares-Pérez J, Kholif AE, Rojas-Hernández S, Elghandour YMMM, Salem MAZ, Zaragoza BA. Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. *Trop Anim Health Pro* 2015;(47):1497-1504.
24. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Estimates of Foodborne Illness in the United States. USA. 2011.
25. Dhanashekar R, Akkinipalli S, Nellutla A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *GERMS* 2012;2(3):101-9.
26. Jackson EE, Flores JP, Fernández-Escarín E. Reevaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J Food Prot* 2015;78(6):1191-1196.