

Principales géneros bacterianos aislados de leche de cabra en dos granjas del municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México

Most frequent bacteria isolated from goats milk in two farms located in Tequisquiapan, Querétaro, México

Rocío Angélica Ruiz Romero^a, Roberto Arnulfo Cervantes Olivares^a, Andrés Ernesto Ducoing Watty^b, Laura Hernández Andrade^c, Daniel Martínez Gómez^d

RESUMEN

El término "mastitis" se utiliza para referirse a la inflamación de la glándula mamaria. A pesar de las pérdidas económicas que produce en cabras lecheras, existe escasa información relativa al estado epidemiológico de la misma en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue identificar bacterias presentes en leche cruda de cabras clínicamente sanas, obtenida en sistemas de producción intensivo y semi-intensivo por métodos microbiológicos tradicionales. Se trabajaron con 28 animales en sistema de producción intensiva y 33 animales en sistema de producción semi-intensiva, provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) perteneciente a la FMVZ-UNAM y la granja del Carmen, ambas ubicadas en Tequisquiapan, Querétaro, México. De cada una de las cabras se obtuvieron muestras de ambas glándulas, se realizaron muestreos cada 45 días junto con la prueba de California de las cabras seleccionadas hasta los 240 días de lactación. Se recibieron un total de 484 muestras para análisis bacteriológico tradicional, 90 muestras (18.6 %) presentaron crecimiento bacteriano, de las cuales se recuperaron 97 aislados. Los géneros bacterianos aislados con mayor frecuencia fueron *Staphylococcus coagulasa Negativo* (SCN) 62/97 (63.9 %), *Streptococcus uberis* 10/97 (10.3 %) y *Staphylococcus aureus* 5/97 (5.1 %). De acuerdo al análisis estadístico, no existen diferencias entre los dos principales géneros bacterianos aislados en ambos sistemas de producción.

PALABRAS CLAVE: Mastitis, Cabras, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The inflammation of the udder is known as mastitis and despite the economic impact that it causes in goats, very scarce information exist about this problem in Mexico. The aim of this study was to identify bacteria in raw milk from clinically healthy goats in intensive and semi-intensive production systems, through traditional microbiological methods. Twenty eight (28) animals from intensive production system and 33 animals from a semi-intensive production system were sampled from the Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA-FMVZ-UNAM) and Granja del Carmen both located in Tequisquiapan, Querétaro, México. The samples were obtained from both glands of each goat. The sampling was made to the selected goats every 45 d along the California mastitis test until 240 lactation days. A total of 484 samples were obtained for the traditional bacteriological analysis, 90 samples (18.60 %) were positive to bacterial growth of which 97 isolates were recovered. The most frequently bacteria isolated were coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN) 62/97 (63.92 %), *Streptococcus uberis* 10/97 (10.31 %) and *Staphylococcus aureus* 5/97 (5.15 %). According to the statistical analysis, there are no differences between the two main bacterial genus isolated in intensive and semi-intensive production systems.

KEY WORDS: Mastitis, Goats, Coagulase-negative Staphylococci, *Staphylococcus aureus*.

Recibido el 3 de marzo de 2011. Aceptado el 18 de octubre de 2011.

^a Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad No. 3000, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP 04510, México, D.F. raco@servidor.unam.mx. Correspondencia al segundo autor.

^b Departamento de Producción Animal: Rumiantes. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

^c Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

^d Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) número IN218708.

La cabra es una de las especies que formó parte de las primeras comunidades en la vida de los humanos, desde los inicios de nuestra civilización. Para el año 2007 la población de cabras a nivel mundial se estimó en 850 millones de cabezas, de las cuales el 5 % se encuentra en América Latina, y de éstas aproximadamente 9.5 millones están en México⁽¹⁾. México produce el 42.8 % del total de la leche de cabra en el continente Americano con 155 millones de litros registrados durante el año 2005, que con respecto a la producción de leche de vaca, representan el 1.6 %^(2,3).

Existe una cantidad importante de elementos que modifican la producción de leche de cabra, los cuales pueden estar interrelacionados, siendo difícil determinar la influencia individual que pueden ejercer cada uno de ellos por separado, pero pueden dividirse en genéticos, ambientales, nutricionales y sanitarios^(4,5).

Dentro de los factores ambientales, la "mastitis" (término general que se utiliza para referirse a la inflamación de la glándula mamaria) ocasiona una disminución de la producción de leche, y ésta se caracteriza por cambios físicos, químicos y bacteriológicos en la leche y cambios patológicos en la ubre^(5,6).

Existen varios factores de riesgo que influyen en el tipo y frecuencia de aislamiento de los microorganismos causantes de mastitis, como son: higiene en la ordeña, fase de lactación, ubicación geográfica, manejo, etapa de lactación y condiciones climatológicas^(7,8,9).

La mastitis puede ser clasificada según la gravedad de las lesiones o intensidad de la reacción inflamatoria en clínica y subclínica⁽¹⁰⁾. La mastitis clínica muestra signos y se caracteriza por cambios en la glándula, que puede aumentar de tamaño, y alteraciones en la leche que puede contener grumos, coágulos y cambios de color⁽⁶⁾. La mastitis subclínica puede no mostrar signos visibles de enfermedad y la leche es aparentemente normal. Este tipo de mastitis sólo puede ser detectada midiendo el contenido celular de la leche (CCS)^(6,11).

The goat is an animal that was part of the first communities in the human's lives since the dawn of our civilization. In 2007, the worldwide goat population was estimated at 850 million animals, of which 5 % are in Latin America, and of these about 9.5 million are in Mexico⁽¹⁾. Mexico produces 42.8 % of goat milk in America with 155 million liters reported in 2005 which represents 1.6 % respect to the cow's milk production^(2,3).

There are important elements that modify the goat milk production, making difficult to determine the individual influence of each element, but they can be divided into genetic, environmental, nutritional and healthy issues^(4,5).

Among the environmental factors, "mastitis" (general term used to refer to inflammation of the mammary gland) causes decreased in milk production, and this is characterized by physical, chemical and bacteriological changes in milk, and pathological changes in udder^(5,6).

There are several risk factors that influence the type and frequency of isolation of mastitis-causing organisms, such as milking hygiene, location, management, lactation stage and weather conditions^(7,8,9).

Mastitis can be classified according to the intensity of the inflammatory reaction in clinical and subclinical⁽¹⁰⁾. Clinical mastitis shows signs and is characterized by changes in the gland like increased size, and milk may contain lumps, clots and color changes⁽⁶⁾. Subclinical mastitis may not show visible signs of disease and milk is apparently normal. This type of mastitis can be detected only by measuring the somatic cell content of milk (SCC)^(6,11).

Subclinical presentation is important, because it usually precedes the clinical form, it is a disease of long duration, and difficult to detect; it also reduces milk production, affects the milk quality, and it is a reservoir of microorganisms that can lead to infection of other animals in the herd⁽⁶⁾.

La presentación subclínica es importante, debido a que usualmente precede a la forma clínica, es de larga duración, es difícil de detectar, reduce la producción láctea, afecta la calidad de la leche, constituye un reservorio de microorganismos que pueden llevar a la infección de otros animales del rebaño⁽⁶⁾.

Existe una gran cantidad de agentes causales y factores predisponentes implicados en la mastitis caprina. Entre los agentes etiológicos se incluyen bacterias, micoplasmas, levaduras y hongos filamentosos⁽⁷⁾. Las bacterias causantes de mastitis, pueden dividirse en dos grandes grupos: 1) patógenos mamarios en los cuales se incluyen a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. 2) patógenos medio-ambientales entre los que se encuentran bacterias Gram negativas y otras especies de estreptococos^(8,12).

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

El muestreo se realizó abarcando todo un periodo de lactación; las muestras de leche se obtuvieron de dos granjas, la primera fue el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) ubicado en Tequisquiapan, Querétaro, México, esta explotación pertenece a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM); se trabaja con un sistema intensivo pero fundamentalmente con un sistema de doble propósito, orientado a la producción de leche con las razas especializadas Alpino Francés, Toggenburg y Saanen; la alimentación se basa en el pastoreo y complementación estratégica dependiendo del

There are causative agents and predisposing factors involved in goats' mastitis. Among the causative agents, it can be included bacteria, mycoplasmas, yeasts and filamentous fungi⁽⁷⁾. Mastitis-causing bacteria can be divided into two groups: 1) Mastitis pathogens including *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. 2) Environmental pathogens like Gram negative bacteria and other species of streptococci^(8,12).

Despite the economic loss that mastitis causes in dairy goats in Mexico, there is little information on the epidemiological status in our country; this study aims to establish the bacterial groups present in milk of goats with clinical and subclinical mastitis, and whether there are genus differences in milk bacterial isolates according to intensive or semi-intensive production systems.

Sampling was carried out covering a whole period of lactation; milk samples were collected from two farms; the first was the Center for Teaching Research and Extension in Animal Production Altiplano (CEIEPAA) located in Tequisquiapan, Queretaro, Mexico, this farm belongs to the College of Veterinary Medicine of the National Autonomous University of Mexico (UNAM-FMVZ) working with an intensive system but mainly with a dual purpose-oriented milk production with specialized breeds French Alpine, Toggenburg and Saanen; feeding is based on grazing and strategic supplementation depending on the state's productive flock. Seventeen (17) goats belonging to the intensive production system and 17 goats belonging to the semi-intensive production system were selected.

The second farm called "Granja del Carmen" is also in Tequisquiapan, and with the same breeds in intensive and mixed production systems. Eleven (11) goats were selected from the intensive production system and 16 goats from the semi-intensive production system (Table 1).

All goats were clinically healthy at the time of sampling, had 1 to 5 calving and good body

estado productivo del rebaño. Se seleccionaron 17 cabras pertenecientes al sistema de producción intensivo y 17 cabras pertenecientes al sistema de producción semi-intensivo.

La segunda granja llamada "Granja del Carmen" también se encuentra en Tequisquiapan, y con las mismas razas, en un sistema de producción intensivo y mixto. Se seleccionaron 11 cabras del sistema de producción intensivo y 16 cabras del sistema de producción semi-intensivo (Cuadro 1).

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

De cada una de las cabras se obtuvieron muestras de los dos medios. Al parto, fueron separadas de sus cabritos y se les extrajo mediante ordeño manual la secreción de las glándulas mamarias. A partir del día 15 post-parto se realizaron muestreos cada 45 días junto con la prueba de California, hasta los 240 días de lactación en las hembras que lograron tal persistencia. La muestra de 30 ml se depositó en frascos estériles y herméticos, previa desinfección con torunda y alcohol al 70% y la extracción manual de los tres primeros chorros de leche de cada una de las glándulas; las muestras fueron congeladas a -20 °C para su traslado al Departamento de Microbiología e

condition. Milking was done mechanically twice a day.

Samples were obtained from the two glands of each goat. Goats were separated from their kids at birth and were hand-milked by extracting the secretion of the mammary glands. From d 15 post-partum samples were taken every 45 d along with California Mastitis Test (CMT), to 240 d of lactation in females who achieved such milk persistence. The 30 ml sample was deposited in sterile, airtight vials, previous disinfection with swab and 70 % alcohol and manual removal of the first three squirts of milk from each of the glands. Samples were frozen at -20 °C and transferred to the Department of Microbiology and Immunology at the UNAM and were subsequently thawed for culture, isolation and bacterial identification.

Samples were thawed gradually being placed at 4 °C for 24 h; after this time the samples were stirred in vortex (MS2 Ika Minishaker) to homogenize and release bacteria that could be found trapped in fat globules. In order to identify mesophilic facultative, 30 µl of the sample were placed in a blood agar plate and McConkey agar in the first groove for the primer-culture; both plates were incubated at 37 °C for 24 h under aerobic conditions, and if no growth observed were again incubated for 48 h to discard bacterial growth.

Cultures were examined to determine the macroscopic morphology of developed colonies,

Cuadro 1. Número total de muestras obtenidas por granja y sistema de producción en los diferentes días de lactación

Table 1. Total number of samples taken by farm and production system in the different days of lactation

Farm	System	Animals	Days of lactation						Total	Percentage
			15	60	105	150	195	240		
CEIEPAA	Intensive	17	30	34	34	27	28	28	181	37.40
	Semi-intensive	17	34	20	0	34	0	23	111	22.93
Granja del Carmen	Intensive	11	22	22	0	20	20	20	102	21.07
	Semi-intensive	16	18	18	0	20	0	20	90	18.60
Total			116	94	34	101	48	91	484	100.00

Inmunología de la UNAM, y posteriormente fueron descongeladas para realizar el cultivo, aislamiento e identificación bacteriana.

Las muestras se descongelaron gradualmente colocándose a 4 °C durante 24 h; transcurrido este tiempo las muestras se agitaron en vórtex (MS2 Minishaker Ika) para homogenizarla y liberar las bacterias que pudieran encontrarse atrapadas en los glóbulos de grasa. Con el fin de identificar únicamente bacterias mesofílicas facultativas, se colocaron 30 µl de la muestra en una placa de agar sangre y agar McConkey en la primera estria para realizar el primocultivo; ambas placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis, y en caso de no observar crecimiento se incubaron durante 48 h más hasta descartar crecimiento bacteriano.

Los cultivos fueron examinados para determinar la morfología macroscópica de las colonias desarrolladas y su número relativo de acuerdo al número de cuadrantes del agar en donde se observó crecimiento bacteriano. A partir de las colonias representativas se realizó un frotis fijo teñido con Gram para guiar la identificación bioquímica recomendada por Carter *et al*(13). En cuanto a los cocos Gram positivo catalasa positivo se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para identificarlos como *Staphylococcus* spp o *Micrococcus* spp; en el caso de pertenecer al género *Staphylococcus*

and their relative number depending on the number of quadrants of the agar where bacterial growth was observed. Representative colonies were stained with Gram to guide the biochemical identification recommended by Carter *et al*(13). Gram positive catalase positive cocci, were identified as *Staphylococcus* spp or *Micrococcus* spp; in the case of belonging to the genus *Staphylococcus*, coagulase test tube was performed for identifying them as coagulase-positive *Staphylococcus* (*S. aureus* or *S. intermedius*) or coagulase-negative *Staphylococcus*. In the case of Gram positive catalase negative cocci, they were identified as *Streptococcus* and with the Christie, Atkins and Munch-Petersen (CAMP) - esculin test specie were determined (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* or *S. uberis*), Gram positive bacilli, catalase negative were identified as *Arcanobacterium pyogenes* and finally the bacilli oxidase-negative Gram negative were identified as enterobacteria following the recommended biochemical tests (Table 2).

Each isolate was identified by genus and in some cases even to the species level; isolates were grown in pure culture again in trypticase soy agar or blood agar according to the nutritional requirements of each bacterium, to keep them in sterile vials with 1 ml of skim milk with 20 % glycerol and store at -20 °C.

For identification of the coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN) API Staph system (V4.1)

Cuadro 2. Esquema general para la identificación bacteriana

Table 2. General scheme for bacterial identification

Gram stain of the representative colonies	Primary tests	Results	Genus	Supplementary tests
Gram-positive coccus	Catalase	Positive	<i>Staphylococcus</i> spp <i>Micrococcus</i> spp	Oxidation-fermentation, coagulase
		Negative	<i>Streptococcus</i> spp	CAMP-esculine
Gram-positive bacillus	Spore formation	Negative	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> <i>Corynebacterium</i> spp	Catalase
Gram-negative bacillus	Oxidase	Negative	Enterobacterium	TSI, SIM, urea, citrate

se realizó la prueba de coagulasa en tubo para identificarlos como *Staphylococcus* coagulasa positivo (*S. aureus* o *S. intermedius*) o *Staphylococcus* coagulasa negativo. En el caso de los cocos Gram positivo catalasa negativo se identificaron como *Streptococcus* y con la prueba de Christie, Atkins y Munch-Petersen (CAMP) - esculina se llegó a la especie (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* o *S. uberis*); los bacilos Gram positivo, catalasa negativo fueron identificados como *Arcanobacterium pyogenes* y por último los bacilos Gram negativo oxidasa negativo fueron identificados como enterobacterias con las pruebas bioquímicas recomendadas (Cuadro 2).

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

Para realizar la identificación de los *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) se utilizó el sistema API Staph (V4.1) de laboratorios Biomérieux siguiendo las instrucciones del fabricante; cada galería se incubó 24 h a 37 °C y mediante la clave numérica obtenida de cada aislado se llevó a cabo la identificación de la especie desde el sitio web del fabricante (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>).

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa JMP versión 8.0 (SAS Institute Inc.) para Windows, por medio de Ji cuadrada o en su caso prueba exacta de Fisher y análisis de regresión logística.

Se obtuvieron un total de 484 muestras de leche de cabra para su análisis bacteriológico, en el caso del CEIEPAA sistema intensivo, se obtuvieron 181/484 (37.4 %) muestras, y en el sistema semi-intensivo se obtuvieron 111

Cuadro 3. Número de muestras con y sin crecimiento bacteriano por granja y sistema de producción

Table 3. Number of samples with and without bacterial growth by farm and production system

Farm	Positive	Negative	Total
CEIEPAA Intensive	27	154	181
CEIEPAA Semi-intensive	6	105	111
GC Intensive	37	65	102
GC Semi-intensive	20	70	90
Total	90	394	484

from Biomérieux laboratory was used following the manufacturer's instructions; each gallery was incubated 24 h at 37 °C and by numerical code obtained from each isolate the species were identified from the manufacturer's website (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>).

The results were analyzed using the JMP version 8.0 (SAS Institute Inc.) for Windows, using Chi square where appropriate Fisher's exact test and logistic regression analysis.

A total of 484 goat milk samples for bacteriological analysis was obtained, 181 samples from the CEIEPAA intensive system (37.4 %), and 111 from the semi-intensive system (22.9 %). In the case of Granja del Carmen in intensive system, 102 samples (21.0 %) were obtained and 90 (18.6 %) in the semi-intensive system (Table 3).

A total of 90/484 samples (18.6 %) showed bacterial growth, of which 97 isolates were recovered. In the case of CEIEPAA intensive system, samples that grew were 27/181 (14.9 %) and in the semi-intensive system were 6/111 (5.4 %). As for Farm Carmen 37/102 (36.2 %) samples of milk in the intensive system and 20/90 (22.2 %) of the samples in the semi-intensive system were positive for bacterial growth (Table 4).

The main bacterial genera most frequently found were coagulase negative *Staphylococcus* (SCN)

Cuadro 4. Porcentaje de géneros bacterianos aislados por granja y sistema de producción

Table 4. Percentage of bacterial isolates by farm and production system

Genus	CEIEPAA		GC		Total	%
	Intensive	Semi-intensive	Intensive	Semi-intensive		
SCN	22	2	21	17	62	63.92
<i>S. uberis</i>	3	0	5	2	10	10.31
<i>S. aureus</i>	3	0	2	0	5	5.15
<i>S. intermedius</i>	0	0	4	0	4	4.12
<i>Micrococcus</i> spp	0	1	3	0	4	4.12
<i>Lactobacillus</i> spp	0	1	2	0	3	3.09
<i>Escherichia coli</i>	0	2	0	0	2	2.06
<i>Aerococcus</i> spp	2	0	0	0	2	2.06
<i>Enterobacter</i> spp	0	1	1	0	2	2.06
<i>Pseudomonas</i> spp	1	0	0	0	1	1.03
<i>A. pyogenes</i>	0	0	0	1	1	1.03
<i>Klebsiella</i> spp	0	0	1	0	1	1.03
Total	31	7	39	20	97	100.00

GC= Granja del Carmen.

(22.9 %). Para el caso de la Granja del Carmen en sistema intensivo se obtuvieron 102 muestras (21.0 %) y 90 (18.6 %) en el sistema semi-intensivo (Cuadro 3).

Un total de 90/484 muestras (18.6 %) presentaron crecimiento bacteriano, de las cuales se recuperaron 97 aislados. En el caso del CEIEPAA sistema intensivo las muestras que presentaron crecimiento fueron 27/181 (14.9 %) y en el sistema semi-intensivo las muestras con crecimiento fueron 6/111 (5.4 %). En cuanto a la Granja del Carmen 37/102 (36.2 %) muestras de leche en sistema intensivo y 20/90 (22.2 %) muestras de leche en sistema semi-intensivo fueron positivas a crecimiento bacteriano (Table 4).

Los principales géneros bacterianos que se encontraron con mayor frecuencia fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) 62/97 (63.9 %), *Streptococcus uberis* 10/97 (10.3 %) y *Staphylococcus aureus* 5/97 (5.1 %).

De los 62 aislados identificados como SCN, las especies que se presentaron fueron: *Staphylococcus. chromogenes* 30/62 (48.3 %),

62/97 (63.9 %), *Streptococcus uberis* 10/97 (10.3 %) and *Staphylococcus aureus* 5/97 (5.1 %).

Of the 62 isolates identified as SCN, species that were present were: *Staphylococcus chromogenes* 30/62 (48.3 %), *Staphylococcus simulans* 14/62 (22.5 %), *Staphylococcus xylosus* 13/62 (20.9 %), *Staphylococcus sciuri* 2/62 (3.2 %), *Staphylococcus haemolyticus* 1/62 (1.6 %), *Staphylococcus caprae* 1/62 (1.6 %) and *Staphylococcus epidermidis* 1/62 (1.6 %) (Table 5).

The results of the CMT only were obtained from the CEIEPAA goats in both production systems; in the case of samples of the intensive system 14/181 (7.7 %) were positive for subclinical mastitis (CMT grade 2) and only 4/14 (28.5 %) had bacterial growth (*S. xylosus* 2/4, 50 %, *S. simulans* 1/4, 25 % and *S. uberis* 1/4, 25 %). Samples of the semi-intensive system, 4/111 (3.6 %) were positive for subclinical mastitis, and there was no bacterial growth in any of these samples.

According to the bacterial growth obtained, goats considered positive to subclinical mastitis

Cuadro 5. Especies de *Staphylococcus* coagulasa negativo aislados en muestras de lecheTable 5. Species of coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from samples of milk

Genus	CEIEPAA	CEIEPAA	GC	GC	Total	%
	Intensive	Semi-intensive	Intensive	Semi-intensive		
<i>S. chromogenes</i>	6	0	15	9	30	48.39
<i>S. simulans</i>	7	0	0	7	14	22.58
<i>S. xylosus</i>	7	2	3	1	13	20.97
<i>S. sciuri</i>	0	0	2	0	2	3.23
<i>S. haemolyticus</i>	1	0	0	0	1	1.61
<i>S. caprae</i>	1	0	0	0	1	1.61
<i>S. epidermidis</i>	0	0	1	0	1	1.61
Total	22	2	21	17	62	100.00

GC= Granja del Carmen.

Staphylococcus simulans 14/62 (22.5 %), *Staphylococcus xylosus* 13/62 (20.9 %), *Staphylococcus sciuri* 2/62 (3.2 %), *Staphylococcus haemolyticus* 1/62 (1.6 %), *Staphylococcus caprae* 1/62 (1.6 %) y *Staphylococcus epidermidis* 1/62 (1.6 %) (Table 5).

Únicamente se lograron obtener los resultados de la prueba de California de las muestras de leche de las cabras pertenecientes al CEIEPAA en ambos sistemas de producción, en el caso de las muestras del sistema intensivo, 14/181 (7.7 %) fueron positivas a mastitis subclínica (California grado 2) y solamente 4/14 (28.5 %) presentaron crecimiento bacteriano (*S. xylosus* 2/4 – 50 %, *S. simulans* 1/4 - 25 % y *S. uberis* 1/4 – 25 %) en cuanto a las muestras del sistema semi-intensivo, 4/111 (3.6 %) fueron positivas a mastitis subclínica y no se obtuvo crecimiento bacteriano en ninguna de esas muestras.

De acuerdo al crecimiento bacteriano que se obtuvo, las cabras consideradas como positivas a mastitis subclínica fueron aquellas con una calificación grado 2 en la prueba de California (CMT) independientemente del crecimiento bacteriano, y aquellas que presentaron crecimiento del mismo género en dos o más muestreos consecutivos, de acuerdo a lo reportado por Min *et al* y Contreras *et al*^(7,13)

were those with a rating grade 2 in CMT, independently of bacterial growth, and those that grew the same kind in two or more samples consecutive, as reported by Min *et al* and Contreras *et al*^(7,13). In the CEIEPAA, in the intensive system 14/181 (7.7 %) consecutive samples showed bacterial growth and in the semi-intensive system no consecutive growth was found. In Granja del Carmen in the intensive system 25/102 (24.5 %) samples and semi-intensive system 12/90 (13.3 %), samples showed bacterial growth in a row. So a total of 65/484 samples (13.4 %) were positive for subclinical mastitis, no samples were obtained from animals with clinical mastitis (Table 6).

According to the results obtained by the Fisher test, there was a significant association between bacterial isolates and the farm of samples origin, as in the 60, and 195 d of lactation there was an increase in the frequency of bacterial isolates on Granja del Carmen ($P<0.05$). Association was observed between the bacterial isolates obtained and the production system, because at 15, 60 and 240 d postpartum frequency of bacterial isolates obtained were higher in the intensive production system, in both farms ($P<0.05$).

The chi-square test results observed in regard to the criterion of positive California test grade 2

En el CEIEPAA, en el sistema intensivo 14/181 (7.7 %) muestras presentaron crecimiento bacteriano consecutivo, en el sistema semi-intensivo no hubo crecimiento consecutivo de ninguna muestra. En cuanto a la granja del Carmen en el sistema intensivo 25/102 (24.5 %) muestras y en el sistema semi-intensivo 12/90 (13.3 %) muestras presentaron crecimiento bacteriano consecutivo. Por lo que un total de 65/484 muestras (13.4 %) fueron positivas a mastitis subclínica, no se obtuvieron muestras de animales con mastitis clínica (Cuadro 6).

En cuanto a los resultados obtenidos por la prueba de Fisher, se observó una asociación significativa entre los aislamientos bacterianos y la granja de procedencia, ya que en los 60 y 195 días de lactación se encontró un incremento en las frecuencias de aislados bacterianos en la granja del Carmen ($P<0.05$). Se observó asociación entre los aislamientos bacterianos obtenidos y el sistema de producción, ya que a los 15, 60 y 240 días post-parto las frecuencias de aislamientos bacterianos obtenidos fueron mayores en el sistema de producción intensivo de ambas granjas ($P<0.05$).

En la prueba de Ji cuadrada los resultados observados en cuanto al criterio de positividad a grado 2 de la prueba de California realizada en el CEIEPAA se encontró evidencia significativa de asociación con el sistema de producción a los 15 y 60 días post-parto ($P<0.05$), ya que se observó un incremento en la frecuencia de

conducted in CEIEPAA, found significant evidence of association with the production system at 15 and 60 d postpartum ($P<0.05$) and an increase in the frequency of positive samples was observed. No association between any kind of SCN and *S. uberis* with the production system ($P>0.05$) was found, but the frequency between *S.intermedius* and *S. aureus* was greater with the intensive system ($P<0.05$). A significant evidence of association between *S.chromogenes*, *S.uberis* and *S. intermedius* in Granja del Carmen were found as there were isolated more frequently ($P<0.05$).

The results observed in the logistic regression model shows that in the isolates, significant effects were found among the system and lactation period between 60 and 105 ($P<0.01$), 105 and 150 ($P<0.01$) and between 150 and 195 d postpartum ($P<0.01$).

In order to meet the bacterial genus associated with goat mastitis, microbiological analysis was performed on all samples obtained from the two farms in both production systems, where the most frequently bacterial genus isolated were coagulase-negative *Staphylococcus*, *Streptococcus uberis* and followed by *Staphylococcus aureus*. According to studies conducted in different European countries like Spain, France, Italy, England and Scotland the SCN are the main causative agents of clinical and subclinical mastitis, followed by *S. aureus*, being *S. uberis* secondary pathogen; however, *S. uberis* is a pathogen that can be isolated

Cuadro 6. Total de muestras con mastitis subclínica

Table 6. Total of samples with subclinical mastitis

	CEIEPAA Intensive	CEIEPAA Semi-intensive	GC Intensive	GC Semi-intensive	Total
Positive samples to California grade 2 without bacterial growth	10	4	0	0	14
Samples with consecutive growth	14	0	25	12	51
Total	24	4	25	12	65

GC= Granja del Carmen.

muestras positivas. No se encontró asociación entre ninguna especie de SCN y *S. uberis* con el sistema de producción ($P>0.05$), solamente se encontró que la frecuencia entre *S. aureus* y *S. intermedius* fue mayor con el sistema intensivo ($P<0.05$). Se encontró evidencia significativa de asociación entre *S. chromogenes*, *S. uberis* y *S. intermedius* con la granja del Carmen ya que en ésta se aislaron con mayor frecuencia ($P<0.05$).

En los resultados observados en el modelo de regresión logística se observa que en los aislamientos obtenidos hubo efecto significativo del sistema y periodo de lactación entre los 60 y 105 ($P<0.01$), 105 y 150 ($P<0.01$) y entre los 150 y 195 días post-parto ($P<0.01$).

Con el fin de conocer los géneros bacterianos asociados a la mastitis caprina, se realizó el análisis microbiológico de todas las muestras obtenidas de las dos granjas en los dos sistemas de producción, y los aislados con mayor frecuencia fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativo, seguido de *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus*. De acuerdo a estudios realizados en diferentes países de Europa como España, Francia, Italia, Inglaterra y Escocia los SCN son los principales agentes causales de la mastitis clínica y subclínica, seguidos de *S. aureus*, siendo *S. uberis* patógeno secundario; sin embargo, *S. uberis* es un patógeno que se puede aislar de piel de la glándula mamaria y de otros sitios anatómicos, así como también de pisos y cama. Posiblemente existen diferencias en el porcentaje de aislamientos entre los resultados de este estudio y los resultados de otros países de Europa, ya que en muchas ocasiones no llegan hasta el nivel de especie al realizar la identificación bacteriana⁽¹³⁻¹⁹⁾.

En los resultados obtenidos en estudios realizados en México por Amezcua et al⁽²⁰⁾ en 1981, los microorganismos aislados con mayor frecuencia en 565 cabras lecheras ordeñadas mecánicamente localizadas en Guanajuato, fueron *S. aureus* (32.6 %), *S. epidermidis* (32.6 %)

from skin of the mammary gland and other anatomical sites, as well as floor and bed. Possibly there are differences in the percentage of isolates between the results of this study and the results of other European countries, because in many cases, they do not perform bacterial identification to reach the level of species⁽¹³⁻¹⁹⁾.

The results obtained in studies in Mexico, by Amezcua et al⁽²⁰⁾ in 1981, the most frequently isolated microorganisms in 565 mechanically milked dairy goats located in Guanajuato, were *S. aureus* (32.6 %), *S. epidermidis* (32.6 %) and *Micrococcus* spp (30.4 %), the remaining 4.4 % corresponded to *S. uberis*, *S. dysgalactiae* and *E. coli*. In a study, at Puebla with 113 goats with subclinical mastitis was determined that the frequencies associated with this condition were: *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. aureus* and fewer *Alcaligenes faecalis*, *Mannheimia haemolytica* *Acinetobacter* spp, *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp⁽²¹⁾.

Figueroa et al⁽²²⁾ analyzed 118 samples of goats milked mechanically, where 64.5 % (76 samples) were positive for subclinical mastitis; of these, 76 samples were negative 81.5 % and 18.5 % were positive, isolating only *Staphylococcus* spp. So *Staphylococcus* spp is also the main genus involved in mastitis, in goats in our country, whether SCN or coagulase-positive (SCP) like *S. aureus*; this difference may be due to environmental and production system, as there are reports that mastitis caused by *S. aureus* is most common when mechanical milking is used⁽¹⁴⁾.

In this study, the SCN species most frequently found were *S. chromogenes*, *S. xylosus* and *S. simulans*, consistent with studies conducted in Spain⁽¹³⁾. However, in France SCN species were *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* and *S. chromogenes*⁽¹⁶⁾, in Italy *S. caprae* have been the only species associated with mastitis⁽¹⁹⁾. In Africa, the species causing mastitis are *S. epidermidis* and *S. simulans*⁽²³⁾ while in Asia (Israel) are *S. simulans*, *S. caprae*, *S.* and *S.*

y *Micrococcus* spp (30.4 %), el 4.4 % restante correspondió a *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y *E. coli*. En un estudio realizado en Puebla con 113 cabras con mastitis subclínica se determinó que las frecuencias asociadas a esta condición eran: *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. aureus*, y en menor cantidad *Alcaligenes faecalis*, *Mannheimia haemolytica*, *Acinetobacter* spp, *Bacillus* spp, *Corynebacterium* spp⁽²¹⁾.

Figuroa *et al*⁽²²⁾ analizaron 118 muestras de leche de cabras ordeñadas de forma mecánica, donde el 64.5 % (76 muestras) resultaron positivas a mastitis subclínica; de estas 76 muestras el 81.5 % resultaron negativas y el 18.5 % resultaron positivas aislando únicamente a *Staphylococcus* spp. Por lo que el género *Staphylococcus* también es el principal género involucrado en mastitis en cabras en nuestro país, ya sean SCN o cogulasa-positivos (SCP) como *S. aureus*; esta diferencia posiblemente se deba al medio ambiente y al sistema de producción, ya que existen reportes que indican que las mastitis causadas por *S. aureus* se presentan más comúnmente al utilizar equipo de ordeño mecánico⁽¹⁴⁾.

En este estudio las especies de SCN que se aislaron con mayor frecuencia fueron *S. chromogenes*, *S. xylosus* y *S. simulans*, lo que concuerda con estudios realizados en España⁽¹³⁾. Sin embargo, en Francia las especies de SCN causantes de mastitis son *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. xylosus* y *S. chromogenes*⁽¹⁶⁾, al igual que en Italia en donde *S. caprae* ha sido la única especie relacionada con mastitis⁽¹⁹⁾. En el continente africano las especies causantes de mastitis que han sido aisladas son *S. epidermidis* y *S. simulans*⁽²³⁾ mientras que en el continente asiático (Israel) son *S. simulans*, *S. caprae*, *S. chromogenes* y *S. xylosus*⁽²⁴⁾. Esta variedad en las especies de SCN pueden deberse al sistema empleado para la identificación de especies, ya que se menciona que las pruebas bioquímicas tradicionales no son de gran utilidad para llegar hasta el nivel de especie, siendo preferible utilizar sistemas comerciales de identificación que proporcionan resultados más confiables⁽²⁵⁾.

xylosus chromogenes⁽²⁴⁾. This variety in the SCN species may be due to the system used for species identification, because it is mentioned that the traditional biochemical tests are not very useful to get to the species level, it is preferably to use commercial identification systems that provide more reliable results⁽²⁵⁾.

In cattle, the main specie that causes mastitis is *Staphylococcus aureus*, however, in goats, infections caused by *S. aureus* are secondary pathogens, being the SCN the major causative agents of clinical and subclinical mastitis^(14,17); but in this work mastitis caused by *S. aureus* ranks third after the SCN and *S. uberis*, which may be due to the biosecurity measures on farms where sampling was performed, since the transmission of this agent may occur when there is poor hygiene during milking, where animals with chronic infection act as the main reservoir of this agent⁽²⁶⁾.

According to the California test, in the intensive production system of CEIEPAA there was found a higher percentage of subclinical mastitis based on a score of 2 (> 2 million cells/ml). Without the California test, results from Granja del Carmen, it was impossible to compare the two production systems; despite this, the percentage of mastitis observed in the intensive system, is consistent with studies in Venezuela, where they found 87 % of subclinical mastitis in the intensive system and 44.4 % in the semi-intensive. Similarly to Kyozaire *et al*⁽²⁷⁾ in the city of Pretoria in Africa who found a 43.3 and 36.7 % in intensive and semi-intensive systems respectively, since they found the largest number of bacteria in milking machines in the intensive system, which indicates that management influences the appearance of mastitis, because the more intensive the production system and biosecurity measures have not been fulfilled, the incidence and prevalence of this disease will increase^(11,27).

It is possible that the cause of finding the milk samples positive for subclinical CMT, but negative to bacterial growth, are due to variations which come to raise the somatic cell

Las mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* ocupan el primer lugar en bovinos, sin embargo, en cabras ocupan el segundo lugar, siendo los SCN los principales agentes causantes de mastitis clínica y subclínica^(14,17); sin embargo, en este trabajo la mastitis causada por *S. aureus* ocupa el tercer lugar después de los SCN y *S. uberis*, lo que puede deberse a las medidas de bioseguridad que existen en las granjas en donde se realizaron los muestreos, ya que la transmisión de este agente puede ocurrir cuando existe poca higiene durante el ordeño, en donde los animales con una infección crónica actúan como el principal reservorio de este agente⁽²⁶⁾.

De acuerdo a la prueba de California, en el sistema de producción intensivo del CEIEPAA se encontró un mayor porcentaje de mastitis subclínica en comparación con el sistema semi-intensivo de producción basándose en una calificación de 2 (> 2 millones células/ml). Sin embargo, al no contar con los resultados de la prueba de California de la Granja del Carmen, fue imposible de comparar el porcentaje de mastitis observada en dicha granja en sus dos sistemas de producción; a pesar de esto, el porcentaje de mastitis observada en el sistema intensivo, concuerda con estudios realizados en Venezuela, en donde se encontró un 87 % de mastitis subclínica en el sistema intensivo y 44.4 % en el sistema semi-intensivo de igual forma, Kyozaire et al⁽²⁷⁾ en la ciudad de Pretoria en África encontraron un 43.3 % y un 36.7 % en los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo respectivamente, ya que en las máquinas ordeñadoras del sistema intensivo encontraron el mayor número de bacterias, lo que indica que el manejo influye en la aparición de mastitis, pues cuanto más intensivo sea el sistema de producción y no se cumplan las medidas de bioseguridad, la incidencia y prevalencia de esta enfermedad aumentará^(11,27).

Es posible que la causa de las muestras de leche positivas a mastitis subclínica por la prueba de California, pero negativas a crecimiento bacteriano, se deba a variaciones

content (SCC) without the presence of bacterial agents, or that the amount of bacteria in the milk at the time of sampling is not sufficient to grow in culture media, without ruling out the toughest bacteria that grow in the media used in this study, or the presence of other etiological agents as filamentous fungi, yeast or virus^(11,27).

Although SCC is used as a monitor udder health and milk quality in dairy cattle industry in several countries⁽²⁸⁾, several non-pathological factors influence levels of these cells; in addition, neutrophils predominate in the goat milk at a higher level than in cow's milk under normal conditions. In histopathological studies of goats' udders with a high content of SCC, there has been normal histology, so that goats can have a normally high SCC⁽²⁸⁾.

Estrus also increases the level of SCC, but there are not enough studies in goats. Milk samples obtained before, during and after milking differ significantly in SCC⁽²⁸⁾, so different scales have been proposed for classifying the state of health of the udder on the basis of SCC, since unlike cattle there are no official standards for goat's milk SCC, the predictive value of infection in the udder is variable. In this study, bacterial isolates were obtained in only four positive samples California test grade 2 in the intensive system of CEIEPAA; so bacterial isolation in two or more consecutive samples was more helpful to know the presence of intramammary infections.

The number of bacterial isolates obtained was higher in the intensive system of both farms only at 15 and 60 d post-partum, i.e. at the start of lactation, consistent with other work⁽⁸⁾ where the highest incidence of subclinical mastitis was found at the beginning of milking, i.e. in the first third of lactation. As for the bacterial genus isolated in samples from both systems, it was found that only *S. aureus* is associated with the intensive one, indicating that milking machines could serve as a reservoir of this agent and as Kyozaire et al⁽²⁷⁾ it was

que llegan a elevar este contenido celular somático (CCS) sin que exista la presencia de agentes bacterianos, o bien que la cantidad de bacterias presentes en la leche al momento del muestreo no sea suficiente para lograr el crecimiento en los medios de cultivo, sin descartar la presencia de bacterias más exigentes que no se desarrollan en los medios utilizados en este estudio, o bien la presencia de otros agentes etiológicos como hongos filamentosos, levaduriformes o virus.

A pesar de que el contenido celular somático (CCS) es utilizado como monitor de la salud de la ubre y calidad de la leche en la industria en varios países⁽²⁸⁾, existen varios factores no patológicos que influyen en los niveles de estas células, además de que los neutrófilos predominan en la leche de cabra en un nivel más alto que la leche de vaca bajo condiciones normales. En estudios histopatológicos de ubres de cabras con un alto contenido de CCS, se ha observado una histología normal, por lo que las cabras pueden presentar un alto conteo de CCS de manera normal⁽²⁸⁾.

El estro también aumenta el nivel del CCS, pero aún no existen estudios definitivos en cabras. Las muestras de leche obtenidas antes, durante y después del ordeño difieren significativamente en el conteo de CCS⁽²⁸⁾, por lo que se han propuesto distintas escalas para clasificar el estado sanitario de las ubres en base al CCS, ya que a diferencia del ganado vacuno no hay un estándar oficial para el CCS en leche de cabras, por lo que el valor predictivo de las infecciones en la ubre es muy variable. En este estudio únicamente se obtuvieron aislamientos bacterianos de cuatro muestras positivas a grado dos en la prueba de California en el sistema intensivo de producción del CEIEPAA, por lo que el aislamiento bacteriano consecutivo en dos o más muestras fue de mayor ayuda para conocer la presencia de infecciones intramamarias.

La cantidad de aislamientos bacterianos que se obtuvieron, fue mayor en el sistema intensivo

not found differences in the bacterial spectrum between production systems.

With these results, we conclude that the bacterial genera most frequently isolated in goat milk were coagulase-negative *Staphylococcus*, followed by *S.uberis* and *S. aureus*. Although the SCN are considered minor pathogens, it is necessary to investigate the virulence factors they possess, to cause mastitis in dairy cattle. According to statistical analysis, there were no differences between the two major bacterial genera isolated in intensive and semi-intensive production systems; only *S. aureus* was associated with the intensive production system. It is necessary to document the relationship between SCC and intramammary infections in goats, as it is inappropriate to use the same parameters used in cattle.

End of english version

de ambas granjas únicamente a los 15 y 60 días post-parto, es decir, al inicio de la lactación, lo que concuerda con otro trabajo⁽⁸⁾ en donde la mayor incidencia de mastitis subclínica la encontraron al inicio del ordeño mecánico, es decir, en el primer tercio de la lactación. En cuanto a los géneros bacterianos aislados de ambos sistemas de producción, únicamente se encontró que *S. aureus* está asociado al sistema intensivo, lo que indica que las máquinas ordeñadoras podrían servir como reservorio de este agente y al igual que Kyozaire *et al*⁽²⁷⁾ no se encontraron diferencias en el espectro bacteriano entre sistemas de producción.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que los géneros bacterianos aislados con mayor frecuencia en leche de cabras fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativo, seguido de *S. uberis* y *S. aureus*, A pesar de que los SCN son considerados como patógenos menores, es necesario realizar estudios sobre los factores de virulencia que poseen, para provocar mastitis en ganado lechero. De acuerdo al análisis

estadístico, no existen diferencias entre los dos principales géneros bacterianos aislados en los sistemas de producción intensivo y semi-intensivo; únicamente *S. aureus* esta asociado al sistema intensivo de producción. Es necesario documentar la relación que existe entre el CCS y las infecciones intramamarias en cabras, ya que resulta inapropiado utilizar los mismos parámetros utilizados en bovinos.

LITERATURA CITADA

1. SAGARPA. Acta de la sexta sesión ordinaria, 2004, del consejo mexicano para el desarrollo rural sustentable [en línea]. <http://www.sagarpa.gob.mx>.
2. SAGARPA. Especies Ganaderas. [en línea]. <http://www.sagarpa.com.mx>. Consultado 12 Jun 2009.
3. FAO. Agricultural Statistics FAO, Rome, Italy. 2005. [en línea]. <http://www.fao.org>. Consultado 12 Jun 2009.
4. Palma GJ. Factores que influyen en la producción lechera de un hato caprino en semiárido mexicano [tesis doctorado]. México: Universidad de Colima; 1995.
5. Buxadé C. Zootecnia. Bases de Producción Animal. Tomo IX Producción caprina. España: Ed. Mundi-Prensa; 1998.
6. Ndegwa EN. Risk factors associated with subclinical subacute mastitis in kenyan dairy goats. *Isr J Vet Med* 2001;56(1): 4-8.
7. Min B, Tomita G, Hart S. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats milk. *J Dairy Res* 2007;74:204-210.
8. Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* 2003;34:689-716.
9. Concha BC. Mastitis bovina: Nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control. [en línea]. <http://agronomia.uchile.cl>. Consultado 15 Jul 2010.
10. Ruiz GE. Mastitis caprina: Estudio recapitulativo [tesis licenciatura]. México DF; Universidad Nacional Autónoma de México; 1989.
11. Clavijo AM, Meléndez B. Efecto del sistema de explotación sobre la aparición de mastitis caprina en dos fincas del estado Falcón, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos. *Zoot Trop* 2002;20:383-395.
12. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4th ed. EUA: Charles C Thomas Publisher; 1984.
13. Contreras A, Corrales JC, Sánchez A, Sierra D. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *J Dairy Sci* 1997;80:2815-2819.
14. Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* 2003;34:689-716.
15. Luengo C, Sánchez A, Corrales J, Fernandez C, Contreras A. Influence of intramammary infection and non-infection factor son somatic cell counts in Dairy goats. *J Dairy Res* 2004;71:169-174.
16. Poutrel B, Lerondelle C. Cell content of goat milk: California Mastitis Test, Coulter Counter and Fossomatic for predicting half infection. *J Dairy Sci* 1983;66:2575-2579.
17. Hall SM, Rycroft AN. Causative organisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infectons in milking goats in the UK. *Vet Rec* 2007;160:19-22.
18. Hunter AC. Microflora and somatic cell content of goat milk. *Vet Rec* 1984;114:318-320.
19. Foschino R, Invernizzi A, Barucco R, Stradiotto K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *J Dairy Res* 2002;69:213-225.
20. Amezcua MA. Prevalencia de mastitis subclínica en hatos caprinos en la zona central del bajo [tesis licenciatura]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 1981.
21. Bonilla CS, Rosas MS, Hernández AL, Díaz AE, Villa GR, Hernández ZJS. Agentes etiológicos involucrados en la mastitis subclínica en cabras lecheras [resumen]. Congreso Nacional de Buiatría; Villahermosa, Tabasco México. 2003:48.
22. Figueroa MLG. Cuenta de células somáticas en leche de cabra mediante las pruebas diagnósticas: Prueba de California, Wisconsin, cuenta microscópica y contador infrarrojo [tesis licenciatura] México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 2008.
23. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *J Clin microbial* 1998;36:1083-1089.
24. Leitner G, Merin U, Lavi Y, Egber A, Silanikove N. Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. *J Dairy Res* 2007;74:186-193.
25. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4th ed. EUA: Charles C Thomas Publisher; 1984.
26. Omega R, Deighton M, Capstick J, Gerraty N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet Microbiol* 1999;66:275-284.
27. Kyozaire JK. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *J S Afr Vet Ass* 2005;76:69-73.
28. Haenlin GF. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Rumin Res* 2002;45:163-178.