

**FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* EN
LECHE CRUDA DE TANQUES Y CANTINAS PARA COMERCIALIZACIÓN EN
EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ**



Mg. (c) ALIX EUGENIA DALLOS BÁEZ

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAestrÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUNJA

2016

**FENOTIFICACIÓN Y GENOTIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* EN LECHE
CRUDA DE TANQUES Y CANTINAS PARA COMERCIALIZACIÓN EN EL
DEPARTAMENTO DE BOYACÁ**



Mg. (c) ALIX EUGENIA DALLOS BÁEZ

DIRECTOR TESIS: Ph. D. ROY JOSÉ ANDRADE BECERRA

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUNJA

2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Según el acta de sustentación No. _____ para ALIX EUGENIA DALLOS BAEZ, fue aprobada y calificada esta tesis de maestría como _____ con nota aprobatoria de _____ () por la Escuela de Posgrados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

GABRIEL PATARROYO MORENO

Decano Facultad de Ciencias

JOVANNY ARLES GOMEZ CASTAÑO

Director Escuela de Posgrados

CLAUDIA PATRICIA JAIMES BERNAL

Jurado calificador

LEOPOLDO ARRIETA VIOLET

Jurado calificador

RUTH MARIBEL FORERO CASTRO

Coordinador académico Maestría en
Ciencias Biológicas

ROY JOSE ANDRADE BECERRA

Director

ALIX EUGENIA DALLOS BAEZ

Tesista

Maestría en Ciencias Biológicas

*A todas las personas que se esfuerzan
cada día por vivir en un mundo mejor...*

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación GIDIMEVETZ y sus líderes por su permanente apoyo y asesoría durante el desarrollo del proyecto.

Al grupo GEBIMOL, líderes y jóvenes investigadores Cindy Katherin Huertas y Wilmer Yobany Gutiérrez Bernal.

A mi compañera y colega María Inés Torres Caicedo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	13
1. MICROBIOTA EN LECHE COMERCIALIZADAS Y MÉTODOS DE ESTUDIO ...	17
1.1 Estudios sobre microbiota de la leche cruda	17
1.2 Normas para la comercialización de la leche	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 Muestreo de Cantinas y/o Tanques de almacenamiento	38
2.2 Análisis Microbiológico	40
2.3 Análisis Molecular: perfiles de Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD) de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> aisladas de muestras de tanques de almacenamiento y cantinas de hatos y centros de acopio del departamento de Boyacá ...	42
3. FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Streptococcus agalactiae</i> EN LECHE CRUDA DE TANQUES Y CANTINAS PARA COMERCIALIZACIÓN EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ	45
3.1 Caracterización de la microbiota láctea	46
3.2 Caracterización de los perfiles de Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD) de cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> aisladas de muestras de tanques de almacenamiento y cantinas de hatos y centros de acopio del departamento de Boyacá ...	52
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
6. RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Condiciones óptimas de amplificación. Mezcla de reacción	42
Tabla 2. Condiciones óptimas de amplificación para RAPD	43
Tabla 3. Frecuencias de las cepas aisladas	46
Tabla 4. Matriz binaria	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Registro fotográfico de muestreos en centros de acopio y cantinas	39
Figura 2. Procedimiento microbiológico	41
Figura 3. Evidencia análisis molecular	44
Figura 4. Prevalencia de grampositivos aislados en el estudio	49
Figura 5. Prevalencia de gramnegativos aislados en el estudio.	50
Figura 6. Perfiles de amplificación RAPD-PCR. Cepas cantina. CON 10N de (MONTAJE. 17.07.2014. PROTOCOLO GEBIMOL)	53
Figura 7. RAPD-PCR. Cepas cantina. CON 10N MONTAJE. 18.07.2014. PROTOCOLO GEBIMOL	54
Figura 8. RAPD-PCR. Cepas cantina. CON 19N. MONTAJE. 11.08.2014. PROTOCOLO GEBIMOL	55
Figura 9. Perfiles de amplificación RAPD-PCR. Cepas cantina. CON 19N. MONTAJE. 06.08.2014. PROTOCOLO GEBIMOL	56
Figura 10. Montaje de Cepas control	56
Figura 11. Dendograma, cepas de <i>Streptococcus agalactiae</i> aisladas de muestras de leche provenientes de cantinas, tanques y centros de acopio del departamento de Boyacá	58

RESUMEN

El Departamento de Boyacá tiene una importante fuente socioeconómica en la producción láctea, son múltiples los acopios presentes en la zona lo que supone estudios que muestren el estado y desarrollo de dicha producción, la comercialización y los canales de la misma son determinantes para el producto de calidad. En estos estudios se debe involucrar la calidad microbiológica que refleja las buenas prácticas de manejo de la producción al caracterizar los diferentes tipos de flora: saprofita, láctica y patógena, así como al identificar clúster de bacterias patógenas que supone la infección subclínica en los hatos de donde proviene la leche integrada a cantinas y tanques. Se presenta un estudio descriptivo en donde se identificó la microbiota presente en los asilamientos de 347 muestras de centros de acopio y cantinas de hatos de zonas productoras de leche del departamento de Boyacá: Paipa, Duitama, Firavitoba, Sotaquirá, Chiquinquirá, Toca, Miraflores y Tuta; identificando el 63,1% (n=219) de aislamientos (cultivos) positivos y 36,9% (n=128) negativos. De los aislamientos 157 correspondieron a géneros de grampositivos, 95 de gramnegativos y 22 a otros microorganismos, todos asociados a flora láctica, saprofita y patógena; prevalencias importantes reportaron *Staphylococcus epidermidis* (16.9%), *Streptococcus agalactiae* (7.3%) y *Escherichia coli* (8.7%). De otra parte la caracterización molecular de las cepas de *S. agalactiae* mediante PCR-RAPD mostró cuatro clusters: Duitama – Tanguavita, Duitama – Chiquinquirá, Toca - Tanguavita – Miraflores y Tanguavita – Chiquinquirá. Estos resultados identifican algunas deficiencias en el canal productor desde factores relacionados con el ordeño, la manipulación de cantinas, tanques y transporte entre otros; por la evidencia molecular y el estudio de similitud filogenética se observó el tránsito de cepas de *S. agalactiae* en las diferentes zonas de producción. El estudio sugiere continuar con las caracterizaciones de los patógenos para confirmar su potencial riesgo en la transmisión de enfermedades, valoración de la calidad de leches y derivados, evaluación de los sistemas de comercialización, intervención en puntos críticos e innovación en estrategias para las buenas prácticas de producción agroalimentaria.

Palabras clave: Boyacá, Fenotipificación, Genotipificación, *Streptococcus agalactiae*.

INTRODUCCIÓN

Las perspectivas científicas que involucran investigaciones acerca de los factores más relevantes que inciden en las posturas de inocuidad alimentaria, valor nutricional y calidad microbiológica de los alimentos, pretenden otorgar un lineamiento que contribuya a la solución de problemáticas relacionadas con las condiciones alimentarias de la humanidad. Será hoy y siempre un tema complejo que vale la pena indagar y explorar con evidencia científica, para que se generen estrategias de sostenibilidad alimentaria para las generaciones próximas.

El presente trabajo académico investigativo pretende mostrar los hallazgos microbiológicos en muestras de leche cruda para comercialización en varias regiones del departamento. Teniendo en cuenta que las características microbiológicas se relacionan con la actividad de producción, los resultados se muestran como un indicador directo de la calidad microbiológica e indirecta de dicha actividad.

Este estudio es de tipo descriptivo transversal y muestra un análisis de la información fenotípica y genotípica del *S. agalactiae*, que se encontró en leches recolectadas en tanques y cantinas procedentes de hatos localizados en diferentes provincias del departamento de Boyacá. El universo está conformado por los tanques para pasteurización y cantinas para comercialización de leche cruda en el espacio geográfico señalado.

Para el aporte de elementos significativos al estudio, Magariños (2000) afirma que la leche es el único material producido por la naturaleza para funcionar exclusivamente como fuente de alimento, por esto su aceptación universal se fundamenta en lo que ésta representa como fuente nutritiva y en su uso extensivo para la producción de un sinnúmero de derivados, condición que no es superada por ningún otro alimento. Si bien es cierto que no son incuestionables las cualidades nutritivas de la leche y los productos lácteos, también es cierto que desde su síntesis en la glándula mamaria hasta su llegada al consumidor, estas cualidades están sometidas a un gran número de riesgos que deterioran su calidad original (Calvinho, 2010; Molineri et al., 2012; Rodríguez, 2008).

Uno de los factores que inciden en la contaminación del producto es la manipulación durante el manejo en el hato, en el ordeño, en el transporte y elaboración de productos, proceso donde la leche pasa por varios operarios y está en contacto con muchos implementos, elementos y materiales, que pueden desencadenar contaminación por patógenos provenientes del humano y del ambiente, afectando al ganado lechero y provocando en él impactos nocivos que van desde leves, hasta infecciones como mastitis clínicas o subclínicas que procuran el paso a la leche de un gran número de estreptococos (Magariños, 2000; Duarte *et al.*, 2004), entre ellos *S. agalactiae* responsable de alteraciones patológicas localizadas en la mama de los bovinos y de cambios no deseados en la composición de la leche (Cepero, *et al.*, 2000; Gallegos y Moncada, 2011).

El sector agroindustrial considera a la mastitis como una enfermedad presente y prevalente en el país y en el contexto regional (Ministerio de Agricultura, 2010; FEDEGÁN, 2009). Un estudio adelantado en el altiplano Cundiboyacense describe en detalle la producción lechera, concluyendo que existen diferencias en el manejo de los hatos, y en general en toda esta actividad económica. Se percibe deficiencias en el seguimiento y control de las buenas prácticas de manejo pecuario (Calderón y Rodríguez, 2008; Calderón, *et al.*, 2011), factores que favorecen la presencia de mastitis, por lo que se hace necesario definir mejores estrategias para la prevención y control de enfermedades desde el hato con el propósito de mejorar la productividad y el bienestar animal. El control de la mastitis se hace para equilibrar las pérdidas económicas y garantizar la calidad del producto que va a ser consumido.

La pasteurización es el proceso más frecuentemente utilizado para la destrucción de la flora patógena de la leche pero algunas veces no es aplicado, lo que ocasiona que enzimas microbianas de carácter proteolítico y lipolítico alteren las propiedades organolépticas y físico-químicas, influyendo de manera negativa sobre la calidad nutricional del producto, trayendo como consecuencia daño a la salud pública y detrimento a la economía de cualquier país. (Magariños, 2000; Rodríguez, 2006; Wellenberg, *et al.*, 2002).

Calderón y colaboradores (2011) sostienen que un impacto económico y social importante de una glándula mamaria infectada representan una pérdida de 725-770 Kg de leche por cuarto afectado en una lactancia, reduciendo la producción láctea hasta en un 12%; de otra parte se refieren pérdidas originadas por la disminución en la producción, la calidad del producto, la pérdida de los animales y los gastos de la atención medica veterinaria (Bedolla y Castañeda, 2003; Rodríguez, 2006).

Debido a la extensión y gravedad de los problemas que provoca esta enfermedad del ganado lechero, tanto en el orden de la salud como en el económico y partiendo de que las pocas investigaciones realizadas en las cuencas lecheras (Ramírez et al., 2001; Rodríguez, 2006; Calderón y Rodríguez, 2008; Calderón et al., 2011; Trujillo et al., 2011) y más específicamente en Boyacá están enfocadas a la prevalencia de la enfermedad en las mamas de los bovinos (Ramírez, et al., 2001) y no en los tanques y cantinas para comercialización; nace la necesidad de investigar la presencia de *S. agalactiae* en leches crudas de tanques para pasteurización y cantinas para comercialización del departamento de Boyacá, ya que el cultivo microbiológico de éstas se utiliza como un método de proyección para la búsqueda de agentes patógenos.

El objetivo de la investigación está relacionado con la caracterización de polimorfismos de cepas de *S. agalactiae* mediante la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), aisladas de leches de tanques y cantinas de diferentes zonas del departamento y con la caracterización de la flora microbiana de estas leches.

En el primer capítulo se dimensiona la importancia de los referentes teórico-metodológicos del objeto de estudio: fenotipificación, genotipificación y prevalencia del *S. agalactiae* en leche.

El segundo capítulo aborda el tema relacionado con las políticas públicas que en el escenario de la comercialización e higiene en la manipulación y procesamiento del producto alimenticio de la leche, se estipulan para Colombia y el altiplano cundiboyacense.

Estas políticas se establecen como parámetros legales en los que el INVIMA y los entes territoriales que fiscalizan y estructuran los planes de desarrollo nacionales, departamentales y locales reconocen la importancia de formular una política de seguridad alimentaria y nutricional como una de las estrategias para lograr la garantía de los derechos fundamentales, económicos y sociales; el fortalecimiento del capital humano, de las condiciones regionales de desarrollo y paz, de la institucionalidad del Estado y la reducción de la pobreza. (Plan Nacional de Desarrollo 2006-2010). Así, prevé acciones estratégicas enmarcadas en la promoción y manejo social del riesgo (MSR)¹.

El tercer capítulo presenta los resultados de la fenotipificación y genotipificación de los aislados microbianos, establece la flora predominante y muestra el análisis filogenético de las cepas de *S. agalactiae* aisladas de muestras de leche de cantinas y tanques.

El cuarto capítulo expone las conclusiones del estudio, los aportes para la posteridad e interrogantes generados a lo largo del mismo.

¹Política nacional de seguridad alimentaria y nutricional (PSAN). Consejo Nacional de Política Económica Social República de Colombia Departamento Nacional de Planeación. Documento CONPES Social. Ministerio de la Protección Social, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 2008

1. MICROBIOTA EN LECHE COMERCIALIZADAS Y MÉTODOS DE ESTUDIO

1.1 Estudios sobre microbiota de la leche cruda

En las dinámicas actuales de mercadeo, la calidad de la leche cruda es fundamental para la participación en los mercados nacionales e internacionales; uno de los problemas que afectan la competitividad del sector lácteo no es solo la falta de análisis y evaluación microbiológica, sino las malas prácticas de higiene realizadas durante la rutina de ordeño (Moreno et al., 2007), que conllevan a un aumento de microorganismos contaminantes y en consecuencia a la proliferación de los mismos en las glándulas mamarias de las vacas presentando mastitis, enfermedad reconocida como la más costosa en los hatos lecheros (Rodríguez, 2006; Correa y Marín, 2002; Faría et al., 2005) y por ende la disminución en la calidad de la leche producida (Rojas y Ramírez, 2009; Street, 2003).

La leche, por sus características físico-químicas y nutricionales es un medio favorable para la multiplicación de microorganismos patógenos y puede convertirse en un vehículo para la transmisión de enfermedades al hombre (ICMSF, 2004). La especie *S. agalactiae* uno de los causantes de mastitis, puede llegar a la leche a través de la glándula mamaria, siendo eliminado en la misma, independiente de si el animal está o no mostrando signos de enfermedad durante el ordeño (Rodríguez, 2006; National Mastitis Council, 1999). La mastitis bovina puede clasificarse en subclínica y clínica; la mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche (Gallegos y Moncada, 2011; Cepero et al., 2000), su presencia no se detectada rápidamente ya que no presentan cambios visibles en la ubre o en la leche por lo que no son reconocidos por el ordeñador; esto hace necesarias técnicas de campo y de laboratorio mencionadas para su reconocimiento (Ariznabarreta et al., 2002). De otra parte la mastitis clínica es definida como una anomalía dada por la inflamación en la glándula mamaria de la vaca y/o apariencia anormal de la leche, que puede ser fácilmente observada, se puede presentar de forma aguda y se caracteriza por su aparición súbita. En la forma crónica, se presenta una infección de larga duración (Tollersrud et al., 2000).

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura (2010) en Colombia la agroindustria va desde la producción de leche cruda en fincas, los procesos de pasteurización y la producción de leches ácidas y quesos. Esta producción se concentra en cuatro regiones: Atlántica, Occidental, Central y Pacífica; con el predominio de importantes cuencas lecheras de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, y Cesar que en conjunto representan el 52.2% de la producción nacional. La leche líquida presenta mayor frecuencia de consumo con otros derivados lácteos constituyéndose como alimento esencial e insustituible para el ser humano debido a sus componentes nutricionales (FEDEGÁN, 2009).

En la mayoría de los estudios que se realizan en el país se describen perfiles epidemiológicos en determinadas regiones, reportándose además, mastitis con cultivos bacterianos negativos por lo que podría presumirse etiologías infecciosas no convencionales, exigentes o que requieren de métodos especiales de diagnóstico, por lo que se hace necesario contribuir con la aplicación de tecnologías actuales como los métodos moleculares, ejemplo: la PCR que facilitan y agiliza la identificación de patógenos (Meyer et al., 1991) como los estreptococos de origen bovino (Schlegel et al., 2003; Elías et al., 2011; François et al., 2001) permitiendo la amplificación de secuencias específicas de la especie, para el caso de *S. agalactiae* la región intergénica 16S ARNr, el gen 16S ARNr (Baele et al., 2001, Elías et al.; 2011) el gen 23S ARNr (Kawata et al., 2004) y el espacio intergénico entre los últimos dos genes (Phuektes et al., 2001).

En Colombia la industria lechera es un segmento grande y dinámico de la economía pecuaria ocupando el puesto 21 como productor de leche a nivel mundial y el cuarto en América Latina. De acuerdo con Salazar 2013, de los 6452 millones de litros de leche que produce Colombia, el 10% se procesa en finca, el 8% es destinado para autoconsumo, el 45% para acopio formal y el 37% para el sector informal. El porcentaje de leche destinado para autoconsumo se utiliza para derivados artesanales o se distribuye cruda en todo el país, constituyéndose como esencial en la dieta humana, por su riqueza en proteína de alto valor biológico, el aporte de energía y la contribución de minerales osteotróficos como el calcio (FEDEGÁN, 2009). Sin embargo, la leche cruda por su alto contenido de agua y nutrientes, también puede ser un medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos contaminantes

saprotíficos y patógenos, como *Streptococcus* y *Staphylococcus*, entre otros (Cepero, et al., 2000); estas características hacen que presente un riesgo potencial para la salud de la población expuesta al consumo de leche contaminada con agentes patógenos o sus toxinas. La detección de *S. agalactiae* en leches se relaciona directamente con la infección bacteriana causante de la mastitis subclínica bovina, impactando negativamente la producción y bienestar animal y la calidad de la leche (Ramírez et al., 2001; Cepero et al., 2000). De acuerdo con lo anterior se determinó la presencia y posterior aislamiento del patógeno *S. agalactiae* a partir de leches crudas de tanques y cantinas para comercialización, en zonas productoras del departamento de Boyacá; para el cumplimiento de este propósito fue necesario integrar métodos de detección microbiológica y molecular como herramientas eficaces para el diagnóstico y la investigación epidemiológica de este género (François et al., 2001). Dentro de los métodos de microbiología convencional se utilizó el cultivo primario en medios selectivos para flora saprófita y patógena en ambientes, aerobio y microaerófilo, diferentes subcultivos, técnicas de coloración compuesta (Wolter et al., 2004; Schlegel et al., 2003; Elías et al., 2011; Rojo et al., 2008; Facklam y J. A., 1991) y pruebas confirmatorias en medios diferenciales. En cuanto a los procedimientos moleculares, se usó la técnica de PCR mediante la aplicación de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para lograr la amplificación de fragmentos de ADN al azar de los aislamientos obtenidos (Schlegel, et al., 2003; Elías, et al., 2011; François et al., 2001). El proyecto se desarrolló durante veinticuatro meses con el auspicio del grupo GIDIMEVETZ.

La alta especificidad del diagnóstico molecular se basa en el uso de secuencias de ADN específicas de especie para la detección de bacterias, por lo que la secuencia de ARN 16S, que comúnmente está presente como múltiples copias y segmentos altamente conservados, es muy útil para este fin. El presente trabajo investigativo evalúa la prevalencia de *S. agalactiae* en un recuento total de bacterias provenientes de leches crudas de tanques para pasteurización y cantinas para comercialización mediante el uso de RAPD para la detección de la bacteria como una prueba de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad; con miras a la investigación epidemiológica de éste género relevante en mastitis subclínica. Estos avances metodológicos deben ser fortalecidos en el país y la región, ya que los reportes de detección de microorganismos en tanques y cantinas evidencian la cadena de transmisión, la

baja calidad del producto y el potencial riesgo que se deriva de la producción de leche cruda como alimento básico; entonces, cualquier mejora que se haga en la industria agroalimentaria tiene un fuerte impacto en la salud de la población, no solo desde la óptica de la nutrición sino desde el punto de vista sanitario y socioeconómico (ICMSF, 2004).

Por otra parte, la tecnología molecular utilizada en este estudio contribuye a posibilitar su aplicación en investigaciones posteriores para aumentar la especificidad en los resultados, y sobre todo optimizar el tiempo de acción y reacción ante la presencia de *S. agalactiae* en leches de la región evitando el desarrollo de mastitis subclínica en hatos productivos y contribuyendo al fortalecimiento económico del sector lechero en Boyacá.

Los antecedentes primarios para el estudio de la leche, dimensionan que en Colombia de acuerdo con FEDEGAN (2009) existe alrededor de 400.000 ganaderos que se dedican a la producción de leche, la mayoría de ellos pequeños productores en el Altiplano Cundiboyacense y el Suroriente Antioqueño. Este sistema es responsable del 52.2% de la producción total y se caracteriza por la explotación de razas especializadas. El Ministerio de Protección Social en el decreto 616 de 2006 afirma que “la leche es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior” por lo cual constituye un alimento universal siendo la única materia proporcionada por la naturaleza para servir exclusivamente como fuente de alimentación y se considera una fuente de proteína de alto valor (Magariños, 2000).

Desde la producción hasta el consumidor, la leche puede verse afectada por factores que cambian su calidad original, ya que puede ser un medio de cultivo nutritivo tanto para microorganismos benéficos como para numerosas bacterias destructoras y patógenas (Cepero, et al; 2000), probablemente las fuentes de contaminación más significativas sean los equipos y utensilios utilizados para su obtención y recolección, así como las superficies que entran en contacto con la leche, incluidas las manos de los ordeñadores y demás operarios (Moreno et al., 2007, Ramírez, et al., 2011). Por su parte Elmoslemany (2010), analizó la asociación entre la calidad de leches crudas de tanque y sus prácticas de gestión en las explotaciones agrícolas,

manifestando que la mala preparación de la ubre para el ordeño, la limpieza manual de los tanques y el uso de un tipo de detergente facilitan la proliferación de bacterias patógenas en la leche y la disminución en la calidad de la misma. (Elmoslemany, et al, 2010)

Después del *Staphylococcus aureus*, los estreptococos se consideran el segundo grupo de importancia responsable de la mastitis y el *S. agalactiae* se identifica dentro de las especies más frecuentes implicadas en las afecciones de la glándula mamaria en bovinos (Las Heras et al., 2002; Shome et al., 2012). Los estreptococos son organismos catalasa negativa, que frecuentemente son aislados de la glándula mamaria bovina y de tanques de leche cruda, crece en cadenas en leche y en medios líquidos. El patógeno *S. agalactiae* puede sobrevivir por largos períodos de tiempo en las glándulas mamarias de los bovinos (Martínez, et al., 2000; Dinsmore, 2002), es considerado una de las mayores causas de infecciones intramamarias en América del Norte (Poyart et al., 2001) y mundialmente se reconoce como el principal agente contagioso que ocasiona la mastitis subclínica bovina, ocasionando un impacto substancial en la calidad y cantidad de la leche producida (Estuningsih et al., 2002; Martínez, et al., 2000; Duarte, et al., 2004).

A nivel mundial se han realizado diversos estudios sobre los patógenos en leche cruda de tanque y su consumo; en Pennsylvania (Jayarao et al., 2006) se encuestaron 16 condados encontrándose que de los 248 productores de leche, el 42,3% de ellos consumían la leche cruda y el 68,5% restante eran conscientes de los patógenos transmitidos por los alimentos en la leche cruda. Los productores lecheros que vivían en su granjas tienen casi 3 veces más probabilidades de consumir leche cruda en comparación con los que vivían en otros lugares. En la segunda parte del estudio, se identificaron otros agentes patógenos, *Salmonella* (6%), *Listeria monocytogenes* (2.8%) y *Escherichia coli* (2.4%). Sin embargo, Wolter (2004), aisló *Streptococcus agalactiae* de personas que consumieron leche cruda de manera más frecuente que las que consumían leche pasteurizada.

La prevalencia de infección por *Streptococcus agalactiae* es variable y depende de la adopción individual de medidas para el control y prevención de la infección especialmente la contagiosa. Keefe (2000), llevo a cabo un estudio en Canadá evaluando muestras de tanques

de 452 rebaños de bovinos en dos periodos diferentes y encontró que la prevalencia fue del 17.7% y 13.1% respectivamente. Este estudio se llevó a cabo en diciembre de 1992 y en junio de 1994 Tenhagen 2006 y colaboradores evaluaron las muestras de tanques de leche provenientes de 80 hatos alemanes, presentándose como resultado la presencia de *Streptococcus agalactiae* en 29% de ellos (Keefe, et al., 2000).

Estudios realizados en Canadá reportan la prevalencia de mastitis contagiosa en cantinas de 258 hatos lecheros, a través de métodos rutinarios de laboratorio y el recuento de células somáticas (RCS). Se determinó la prevalencia de *Staphylococcus aureus* (74%), *Streptococcus agalactiae* (1,6%), y *Mycoplasma spp* (1,9%), estableciendo la baja incidencia de *Streptococcus agalactiae* en leches crudas de cantinas (Richard et al., 2006).

En el estado de Ohio en los EEUU, se evaluaron tanques de leche tomados de 51 rebaños lecheros de manera individual, es decir cada muestra por tanque equivale a todas las vacas de ordeño de cada rebaño; el 35% (17 rebaños) tenían una o más vacas positivas para *Streptococcus agalactiae* y el 69% (34 rebaño) tuvo una o más vacas positivas para el *estafilococo* coagulosa positivo. Uno de los resultados del muestreo estándar individual de la vaca estimó el 23.5% de sensibilidad para *Streptococcus agalactiae* en una sola muestra de leche y 35,3% para un solo tanque. Con base en estos resultados parece que un tanque único o filtro de muestra de leche tiene una sensibilidad relativamente baja para *S. agalactiae*, por lo que estas pruebas de detección demuestran la escasa presencia de este patógeno en la leche de los bovinos (Bartlett, et al., 1991). En el estado de Nueva York, se estudió la contribución de los estreptococos a la calidad microbiana de la leche cruda, para ello se recolectaron muestras de leche provenientes de tanques de 48 granjas lecheras y realizaron análisis cualitativo y cuantitativo de la carga bacteriana de bacterias, estreptococos, estafilococos y gramnegativos totales. Los estreptococos representaron el 69% del total de la muestra, identificándose *Streptococcus uberis* (81%), *Aerococcus viridans* (50%) y *Streptococcus agalactiae* (31%) como los de mayor frecuencia en muestras de tanque (Zadoks et al., 2004).

Un estudio realizado en India se basó en la investigación de las características de la ocurrencia y la virulencia de los estreptococos de la leche bovina y en evaluar la

epidemiología molecular mediante PCR utilizando secuencias multilocus y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). De un total de 209 muestras de leche bovina se aislaron 30 *Streptococcus spp* de solo 29 muestras de leche. Con PCR específico de la especie y del gen 16S del rRNA se identificaron 17 aislados de *Streptococcus agalactiae* que mostraron un tipo nuevo de secuencia (ST), ST-483 siendo un solo variante locus del subgrupo fundador ST-310. Teniendo en cuenta que todos los aislados pertenecen a nuevos tipos de secuencias, su importancia epidemiológica en el contexto global no se pudo determinar, sin embargo, la evidencia sugiere que éstos patógenos han evolucionado por las condiciones de la India y esta investigación podría ser útil para la comprensión del papel de estos patógenos en la mastitis subclínica bovina y la implementación de estrategias de control eficaces para ese país (Shome et al., 2012).

Meiri-Bendek y colaboradores (2002) afirman que la mastitis bovina causada por *S. agalactiae* es principalmente subclínica y sólo se puede diagnosticar en el laboratorio, por lo cual desarrollaron PCR basado en el método para la detección específica y sensible de la bacteria en la leche cruda. La especificidad de la reacción de PCR se basa en secuencias únicas del ADN de *S. agalactiae* dentro de la subunidad 16S de los genes ARNr. Como controles positivos se utilizaron dos pares de secuencias de estreptococos cebadores generales, que hibridan con las áreas conservadas en el gen de la subunidad 16S ARNr, y los cebadores, que hibridan con secuencias dentro de ADN mitocondrial bovino. El método de obtención de muestras incluyó enriquecimiento selectivo de *Streptococcus agalactiae* en la muestra de leche, seguido de extracción de ADN usando un procedimiento rápido y simple desarrollado para este propósito, y la reacción de PCR específica con controles apropiados. El método permite la detección de una bacteria en 1 ml de leche cruda, por lo que puede ser incorporado como parte de la investigación rutinaria de leches recogidas de tanques para la localización temprana de vacas infectadas.

Elías junto con su grupo de trabajo (2011) tomaron muestras de leche cruda provenientes de las cantinas de 247 granjas lecheras, realizaron microbiología convencional, Recuento de células somáticas y PCR dirigida a genes 16S ARNr. Se identificó la presencia de *Streptococcus agalactiae* en la leche de las cantinas por ambos métodos: la bacteria fue

identificada en 98/247 de las muestras por el método microbiológico y a través de PCR en 110/247 muestras, lo que sugiere que la PCR permite detectar la mastitis contagiosa por *S. agalactiae* con mayor seguridad.

En Cuba (Armenteros et al; 2002) reportan que de 12274 cuartos analizados (3069 animales), el 18.02% estaban afectados por mastitis crónica, 3.02% mostraron mastitis clínica y el 45.1% mastitis subclínica. Dentro de los microorganismos más frecuentes en las leches se encontró a *Streptococcus agalactiae* con una prevalencia del 8.3%. El elevado porcentaje de cuartos afectados por mastitis se debió a que el 51.8% de los equipos de ordeño no cumplían con los parámetros y el 58.9% de las unidades violaban la correcta rutina de ordeño.

En Chile Herrera (2001), realizó un muestreo de leches provenientes de vacas con mastitis clínica y subclínica, determinando que la frecuencia relativa del *S. agalactiae* fue del 4.1%. También comparó dos cepas de *S. agalactiae*: una de origen bovino y otra de origen humano, mediante la técnica de amplificación por PCR de los espaciadores intergénicos 16S-23S, con los partidores Sp1 y Sp2 y la técnica de RAPD, empleando el partidador P6b, determinando que éstas son idénticas entre sí, pero sus patrones de banda difieren totalmente al de las cepas de origen humano, por lo que se sugiere que las cepas de *S. agalactiae* aisladas de bovinos y cepas aisladas de humanos no poseen un origen común o están lejanamente emparentadas, por lo cual esta infección no debe ser considerada una zoonosis.

En Argentina (François et al., 2001) de los 30 aislamientos obtenidos de 169 muestras de leche, se identificaron bioquímica y serológicamente *S. agalactiae* (22 aislamientos), *Streptococcus dysgalactiae* (6 aislamientos) y *Streptococcus uberis* (2 aislamientos). El análisis genotípico por RAPD mostró 4 cepas distintas en la población de *S. agalactiae*, 6 en *S. dysgalactiae* y 2 en *S. uberis*. Cada uno de los cuatro rodeos analizados se mostró colonizado por una única cepa de *S. agalactiae*, mientras que cepas diferentes de *S. dysgalactiae* coexistieron en un rodeo. Se identificó un fragmento de ADN común a todos los aislamientos de *S. agalactiae* estudiados, ausente en las otras especies. Estos resultados indican que las metodologías empleadas constituyen una herramienta eficaz para el diagnóstico y la investigación epidemiológica de estreptococos en ganado bovino.

En Venezuela, (Faria et al., 2005) confirman la presencia del *S. agalactiae* en la mayoría de los animales ordeñados en forma mecánica en contraste con los animales ordeñados de manera manual en donde fue más frecuente la presencia de *Staphylococcus coagulasa* negativa y *Corynebacterium bovis*. En cuanto al conteo de las células somáticas (CCS) realizado fue más elevado en leche de animales ordeñados a máquina, presentando para ambos ordeños los géneros *Streptococcus spp* y *Bacillus spp*, afirman que este es un indicador para conocer la salud de la ubre, así como la calidad de la leche, y un alto número de ellas en la leche causa un incremento en la actividad proteolítica y puede reducir la producción, además de alterar la distribución de las fracciones de proteína, decrecen los niveles de caseína y lactosa; las células somáticas contienen lisozimas que incrementan la actividad proteolítica de las enzimas, como las catepsinas. Igualmente la actividad de la plasmina que degrada la caseína en la leche y causa reducción en la producción de queso y cambios en la funcionalidad de las proteínas en la coagulación de la leche. En este estudio se concluyó que las máquinas de ordeño favorecían la invasión bacteriana a los cuartos provocando la inflamación de la glándula mamaria de los bovinos y se sugirió continuar con estudios en otras fincas para buscar si el sistema de ordeño está asociado a este tipo de mastitis.

A nivel nacional en el departamento de Córdoba se evaluaron mediante la prueba California para Mastitis (CMT) 4.260 cuartos pertenecientes a 1065 vacas de 15 fincas de ganado de doble propósito, de los cuartos que mostraron casos de mastitis subclínicos y clínicos, se tomó una muestra de leche para aislar los microorganismos involucrados en la mastitis bovina. Reportándose un 11.30% de los cuartos positivos para mastitis subclínica. El 92.21% de los aislamientos involucro microorganismos infecciosos. *Staphylococcus aureus* mostró una prevalencia del 87.56%, *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) (0.3%) y *S. agalactiae* (2.10%) (Calderón, et al., 2011).

En el oriente Antioqueño (Trujillo et al., 2011) se evaluaron los cuartos de 290 vacas pertenecientes a 7 fincas de ganado lechero. Con el fin de determinar la prevalencia de mastitis mediante la realización de CMT, RCS, cultivos y antibiogramas, se encontró que la prevalencia de mastitis subclínica por cuarto fue del 19.9% (228 cuartos) y 0.95% (11 cuartos)

presentaron mastitis clínica. El promedio del RCS para todos los cuartos fue de 1.105.733 cel/ml. La bacteria *S. dysgalactiae* fue la más común (29.5%), seguida de *Staphylococcus aureus* (10.3%).

En Rionegro, Antioquia Rojas y Ramírez (2009) caracterizaron los productores mediante encuestas. Se realizó diagnóstico individualizado de la calidad sanitaria de la leche mediante las pruebas de: reductasa y cultivo bacteriano, además se hizo prueba de mastitis con CMT. La mayoría de los productores presentaron un conteo inferior a 200.000 UFC/ml de leche, el 23% un conteo no superior a 500.000 UFC/ml, el 17% un conteo superior a 500.000 UFC/ml y el 52% de los productores tenían vacas con mastitis. Su análisis estadístico indicó que las principales causas de contaminación de la leche fueron: el recipiente de transporte, la falta de despunte y la falta de pos-sellado; concluyéndose que el manejo inapropiado de la leche puede atribuirse a la falta de acompañamiento técnico y capacitación sobre tratamiento higiénico de este producto.

Rodríguez (2006) realizó la caracterización de la mastitis en 10 hatos representativos en la Sabana de Bogotá, valiéndose de diferentes pruebas de campo (manejo del hato) y de laboratorio (CMT), cultivos bacteriológicos en medios Agar sangre, Agar Mac Conkey, Agar Sabouraud, y cuando el ordeño se realiza de manera mecánica 61,2%, con una incidencia del 30% para mastitis subclínica y de 4,7 % para mastitis clínica. En relación a los microorganismos aislados, se encontró como especie dominante el *S. agalactiae* en ordeño manual y *Staphylococcus aureus* en ordeño mecánico, evidenciando disminución en la producción de leche.

Finalmente, Calderón y Rodríguez (2008) realizaron un estudio en el altiplano Cundiboyacense en donde evaluaron 40 fincas especializadas en la producción de leche, de las cuales se tomaron muestras de leche para aislar microorganismos involucrados en la mastitis bovina, el 34.40% de los cuartos fueron positivos y el 49.01% de los aislamientos fueron infecciosos, dentro de los cuales se aisló *S. agalactiae* en el 6.84% de las muestras como agente principalmente contagioso. Coincidiendo con Cruz et al., 2007 que a través de un estudio realizado en la región del Valle del Tundama (Duitama) mediante muestreos de leche

en ordeños mecánicos y manuales, estableció que el 91% y 93.8% respectivamente de los aislamientos, se debieron a microorganismos contagiosos.

Por su parte Moreno et al., (2007) realizaron la caracterización de la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda en la cuenca del Alto Chicamocha en el mismo departamento, mediante pruebas convencionales de laboratorio en donde se evaluaron los RCS, Mesófilos, *Staphylococcus*, Coliformes, *Listeria* en láminas de petrifilm 3M® y se realizó además la prueba de *Brucella* (Prueba de anillo en leche) en 34 hatos registrados en la Federación de Ganaderos de Boyacá, en dos épocas del año. Los resultados arrojaron diferencias estadísticas entre las épocas de muestreo y los recuentos, siendo las épocas lluviosas en donde las vacas se exponen más a contaminación ambiental y por lo tanto los recuentos de *Mesófilos* y células somáticas aumentaron considerablemente. Adicionalmente las actividades relacionadas con la rutina de ordeño no son las más adecuadas, lo que ocasiona la proliferación de microorganismos en la glándula mamaria de las vacas causando la mastitis y por ende la disminución en la calidad de la leche producida.

La mayoría de estos estudios coinciden en afirmar que la mastitis subclínica por microorganismos contagiosos continua siendo una problemática en sistemas especializados en la producción de leche a nivel mundial y nacional y el uso de la técnica de PCR es una herramienta promisoría para la identificación del *S. agalactiae* en leches crudas de origen bovino.

El patógeno *agalactiae* es una bacteria Gram positiva, pertenece al grupo B de los estreptococos, se localiza en la glándula mamaria donde puede sobrevivir durante un tiempo, generalmente es persistente y tiene baja tasa de curación espontánea y se presenta también en humanos, caprinos y peces (Berridge et al., 2001, Duarte, et al., 2004; Lindel et al., 2005); su transmisión puede ocurrir en el momento del ordeño por prácticas como el uso compartido de toallas para lavar y secar las ubres, por medio de las manos contaminadas de los ordeñadores o por el uso de pezoneras no desinfectadas entre vacas en los ordeños mecánicos (Philpot citado por Calderón y Rodríguez, 2008).

Para la identificación de la microbiota láctea y específicamente del *Streptococcus spp* se sigue el procedimiento microbiológico convencional de las muestras de estudio, el cultivo de leche de tanque tiene su base en datos científicos limitados ya que generalmente los estudios son de tipo descriptivo o se encuentran asociados a la importancia económica que esta producción representa. Sin embargo, estos cultivos se utilizan como un método de tamizaje y proveen principalmente dos tipos de información: (1) presencia o ausencia de un grupo bacteriano determinado e (2) identificación de grupos de organismos patógenos prevalentes, lo que permite obtener información tanto acerca de las condiciones sanitarias de los tanques y cantinas como de las condiciones de ordeño y el manejo de la leche por parte de los operarios (Calvinho, 2010; Molineri, et al., 2012). Tanto en centros de acopio como en las plantas procesadoras, generalmente se determinan indicadores microbiológicos y anualitos que evidencien su calidad organoléptica y físico química (Elías, et al., 2011).

La bacteria *S. agalactiae* puede estar presente en las leches crudas recolectadas de tanques para pasteurización y cantinas para comercialización; se detecta mediante el aislamiento microbiológico y el uso de la técnica de PCR.

El estreptococo del grupo (EGB²) se puede encontrar, como comensal, en el aparato digestivo, urinario y genital hasta en un 30% de los adultos, incluyendo la mujer embarazada (Barcaite, Bartusevicius, Tameliene, Kliucinskas, Maleckiene y Nadisauskiene, 2014). Se han publicado tasas de colonización por EGB en la embarazada entre un 4 y 36%, aunque la mayoría de estudios indican cifras sobre un 20%. Encontrándose grandes variaciones entre países e incluso entre regiones de un mismo país. Esta variación en los datos publicados puede deberse a diferentes métodos de estudio y a diferencias en las poblaciones estudiadas (Rodríguez, et al., 2004).

² El Estreptococo de Grupo B (EGB) es una bacteria que se encuentra de forma natural en el sistema digestivo y el canal de parto de 1 de cada 4 embarazadas. Esas mujeres “portan” o “están colonizadas por” el EGB. No obstante, el EGB puede aparecer y desaparecer en cualquier momento, por lo cual cada embarazo puede ser diferente. Los bebés pueden ser infectados por el EGB antes del nacimiento y hasta los 6 meses de edad debido a sus sistemas inmunitarios subdesarrollados.

El EGB provoca más comúnmente infección en la sangre (sepsis), el líquido y las membranas del cerebro (meningitis), y los pulmones (neumonía). Este puede causar abortos, que los bebés nazcan muertos o que los bebés mueran después del nacimiento. Algunos sobrevivientes de infecciones por EGB tienen impedimentos permanentes como ceguera, sordera, retraso mental y parálisis cerebral. *Definición de Estreptococo Grupo B.*(s.f.)

Las técnicas de Biología Molecular como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permiten la identificación de los agentes independientemente de su viabilidad (François et al., 2001). Para identificar *Streptococcus agalactiae* de origen bovino se han utilizado varias técnicas de PCR con las que se amplifican las secuencias específicas tales como la región intergénica 16S ARNr y determinación de genes, su especificidad se basa en el uso de secuencias de ADN específicas de cada especie para la detección bacteriana, siendo el método más práctico y fiable para identificación en el momento (Yang y Rothman, 2004; Elías et al., 2011; Shome et al., 2012.).

La genotipificación es el procedimiento mediante el cual se obtiene el genotipo (huella de ADN o perfil genético) de un organismo. Estas técnicas moleculares utilizan el ADN de un organismo, el cual es el material hereditario de los seres vivos, que se encuentra en todas las células nucleadas y normalmente se mantiene conservado durante toda la vida. Su análisis permite conocer el material genético que un individuo ha heredado de sus padres biológicos.

Para este tipo de pruebas se utilizan segmentos del ADN que han sido denominados microsatélites, los cuales pueden presentar varias formas llamadas alelos. Para cada microsatélite, cada animal tiene dos alelos, uno heredado del padre y otro de la madre, es así como la determinación de los alelos ubicados en los microsatélites presentes en el ADN de un individuo, permite obtener una combinación particular que se denomina genotipo (perfil genético) del ejemplar en cuestión (Novoa M., 2014). Para el presente trabajo investigativo las muestras se relacionan en el estudio de caso, capítulo III.

El procedimiento en el laboratorio para realizar la genotipificación (aplicación de la PCR) se puede dividir en 3 pasos. 1. Se realiza la extracción de ADN de cualquier célula con núcleo mediante un proceso químico. Este ADN pasa a un procedimiento el cual realiza millones de copias de los alelos, para que puedan ser detectados posteriormente. Luego pasa a la POS-PCR, para acondicionar las muestras. 2. Visualización de los alelos, en esta fase las muestras son llevadas a equipos denominados analizadores genéticos; estos permiten visualizar los alelos que fueron detectados y amplificados en la PCR anterior. 3. Finalmente el profesional capacitado en técnicas de biología molecular que pasa a ser testigo de la prueba y

realiza el seguimiento de la muestra dentro del laboratorio, mediante software especializado y parámetros internacionales asigna el nombre de cada uno de los alelos a la muestra proveniente de un animal determinado (Tallaje alélico) (Bernal, 2011).

El perfil genético o genotipo permite realizar, con una alta confiabilidad, el seguimiento y trazabilidad molecular de una cepa bacteriana, la importancia del empleo de esta herramienta científica permite además:

- Garantizar la identidad de la cepa
- Establecer la similitud filogenética de clones

Los RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies. Los RAPDs se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases (pb) a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido y por inserción o delación de los fragmentos en estos sitios (Williams, et al., 1990). Estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular (Whitkus et al., 1994; Backeljau et al., 1995), por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta, asumiendo equilibrio de Hardy Weinberg (Aagaard et al., 1998). Los RAPDs son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada conceptos expuestos por Otero, et al.(1997) y Parker, et al., (1998) (Rentaría, et al, 2007).

Dado el gran polimorfismo que detectan una de sus mejores aplicaciones es la identificación genética de individuos, que incluye casos de clones, híbridos somáticos y mutantes. Entre las principales ventajas de los RAPDs está que amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos que los RFLPs e isoenzimas, (Williams, et al., 1990; Lynch y Milligan, 1994; Otero, et al., 1997; Russell, et al., 1997; Parker, et al., 1998 citados en Rentaría, 2007); es una técnica

relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que puede ser examinado es ilimitado y no requiere sondas radiactivas (Reiter et al., 1992; Whitkus et al. 1994 citados en Rentarúa, 2007). Sin embargo los problemas prácticos detectados con los RAPDs son la presencia de bandas “erróneas” (artefactos), la reproducibilidad de los resultados y la migración de bandas. Asimismo, muchos de los alelos raros presentes en las poblaciones estudiadas con RAPDs no son detectados o pueden ser mal interpretados (Zhivotovsky, 1999 citados en Rentarúa, 2007). Por otro lado, como los loci son dominantes, los RAPDs dan menos información genética por locus que los marcadores codominantes. Al analizar los datos obtenidos con RAPDs se deben tener en cuenta dos supuestos: 1) cada uno de los marcadores representa un locus mendeliano en el cual el marcador visible, el alelo dominante, está en equilibrio de Hardy -Weinberg con un alelo recesivo y 2) los alelos marcados para diferentes loci no migran a la misma posición en el gel (Lynch y Milligan, 1994 citado en Rentarúa, 2007).

Dentro de las grandes estadísticas de muestreo en la aplicación molecular de los RAPDs, también se analizan los marcadores moleculares, que son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés (Rentarúa, 2007).

1.2 Normas para la comercialización de la leche

Decreto Nacional 539 de 2014. Que regula todas las actividades que puedan generar factores de riesgo por el consumo de alimentos, y se aplicarán a todas las fábricas y establecimientos donde se procesan los alimentos; los equipos y utensilios y el personal manipulador de alimentos; a todas las actividades de fabricación, procesamiento preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de alimentos en el territorio nacional; a los alimentos y materias primas para alimentos que se fabriquen, envasen, expendan, exporten o importen, para el consumo humano; a las actividades de vigilancia y control que ejerzan las autoridades sanitarias sobre la fabricación, procesamiento,

preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución, importación, exportación y comercialización de alimentos; sobre los alimentos y materias primas para alimentos.

Artículo 2º.- Definiciones

Alimento. Todo producto natural o artificial, elaborado o no, que ingerido aporta al organismo humano los nutrientes y la energía necesarios para el desarrollo de los procesos biológicos. Quedan incluidas en la presente definición las bebidas no alcohólicas, y aquellas sustancias con que se sazonan algunos comestibles y que se conocen con el nombre genérico de especia.

Alimento contaminado. Alimento que contiene agentes y/o sustancias extrañas de cualquier naturaleza en cantidades superiores a las permitidas en las normas nacionales, o en su defecto en normas reconocidas internacionalmente.

Alimento de mayor riesgo en salud pública. Alimento que, en razón a sus características de composición especialmente en sus contenidos de nutrientes, A la actividad acuosa y pH, favorece el crecimiento microbiano y por consiguiente, cualquier deficiencia en su proceso, manipulación, conservación, transporte, distribución y comercialización, puede ocasionar trastornos a la salud del consumidor.

Alimento falsificado. Alimento falsificado es aquel que:
Se le designe o expendan con nombre o calificativo distinto al que le corresponde; su envase, rótulo o etiqueta contenga diseño o declaración ambigua, falsa o que pueda inducir o producir engaño o confusión respecto de su composición intrínseca y uso, y

No proceda de sus verdaderos fabricantes o que tenga la apariencia de caracteres generales de un producto legítimo, protegido o no por marca registrada, y que se denomine como este, sin serlo.

Alimento perecedero. El alimento, que en razón de su composición, características fisicoquímicas y biológicas, pueda experimentar alteración de diversa naturaleza en un tiempo

determinado y que, por lo tanto, exige condiciones especiales de proceso, conservación, almacenamiento, transporte y expendio.

Buenas prácticas de manufactura. Son los principios básicos y prácticas generales de higiene en la manipulación, preparación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte y distribución de alimentos para consumo humano, con el objeto de garantizar que los productos se fabriquen en condiciones sanitarias adecuadas y se disminuyan los riesgos inherentes a la producción.

Biotechnología de tercera generación. Es la rama de la ciencia basada en la manipulación de la información genética de las células para la obtención de alimentos.

Certificado de inspección sanitaria. Es el documento que expide la autoridad sanitaria competente para los alimentos o materias primas importadas o de exportación, en el cual se hace constar su aptitud para el consumo humano.

Desinfección – descontaminación. Es el tratamiento fisicoquímico o biológico aplicado a las superficies limpias en contacto con el alimento con el fin de destruir las células vegetativas de los microorganismos que pueden ocasionar riesgos para la salud pública y reducir sustancialmente el número de otros microorganismos indeseables, sin que dicho tratamiento afecte adversamente la calidad e inocuidad del alimento.

Diseño sanitario. Es el conjunto de características que deben reunir las edificaciones, equipos, utensilios e instalaciones de los establecimientos dedicados a la fabricación, procesamiento, preparación, almacenamiento, transporte, y expendio con el fin de evitar riesgos en la calidad e inocuidad de los alimentos.

Embarque. En la calidad de materia prima o alimento que se transporta en cada vehículo en los diferentes medios de transporte, sea que, como tal, constituya un lote o cargamento o forme parte de otro.

Higiene de los alimentos. Son el conjunto de medidas preventivas necesarias para garantizar la seguridad, limpieza y calidad de los alimentos en cualquier etapa de su manejo.

Infestación: Es la presencia y multiplicación de plagas que pueden contaminar o deteriorar los alimentos y/o materias primas.

Manipulador de alimentos. Es toda persona que interviene directamente y, aunque sea en forma ocasional, en actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte y expendio de alimentos.

Proceso tecnológico. Es la secuencia de etapas u operaciones que se aplican a las materias primas y demás ingredientes para obtener un alimento. Esta definición incluye la operación de envasado y embalaje del producto terminado.

Vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. Es el conjunto de actividades que permite la recolección de información permanente y continua; tabulación de esta misma, su análisis e interpretación; la toma de medidas conducentes a prevenir y controlar las enfermedades transmitidas por alimentos y los factores de riesgo relacionados con las mismas, además de la divulgación y evaluación del sistema.

Artículo 3°.- Alimentos de Mayor Riesgo en Salud Pública. Para efectos del presente decreto se consideran alimentos de mayor riesgo en salud pública los siguientes:

Carne, productos cárnicos y sus preparados, leche y derivados lácteos, productos de la pesca y sus derivados, productos preparados a base de huevo, Alimentos de baja acidez empacados en envases sellados herméticamente ($\text{pH} > 4.5$), alimentos o comidas preparados de origen animal listos para el consumo, agua envasada.

Artículo 5°.- Leche. La producción, procesamiento, almacenamiento, transporte, envase, rotulación, expendio y demás aspectos relacionados con la leche se regirán por la *Ley 9 de 1979* y los *Decretos reglamentarios 2437 de 1983, 2473 de 1987* y los demás que lo modifiquen, sustituyan o adicionen.

Decreto 1880 de 2011

En el que se especifica que el Gobierno Nacional mediante el Decreto 616 de 2006, expidió el reglamento técnico que señala los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendi, importe o exporte en el país.

Que dentro de los peligros que se pueden encontrar en la leche cruda, se destacan los biológicos y químicos; los cuales dependen en gran parte de una inadecuada manipulación e inapropiadas prácticas de manufactura, de ordeño y ganaderas, entre otras. Que los peligros inherentes a la leche cruda pueden ser identificados a través del perfil sanitario y ser mitigados por acciones, planes o programas generados a partir del diagnóstico realizado en las zonas o territorios donde este producto sea comercializado. Que con el propósito de proteger la salud de la población es necesario establecer una normativa que facilite las condiciones sanitarias que garanticen la higiene y calidad de la leche cruda, los requisitos que deben cumplir los responsables de su comercialización y los mecanismos de inspección y control a seguir por parte de las autoridades sanitarias competentes.

De los requisitos para la producción primaria

Artículo 4°. Requisitos para la obtención de leche en la producción primaria. Los predios que provean leche cruda, con destino a su comercialización para consumo humano directo, deben cumplir con los requisitos establecidos en el Capítulo 11 del Decreto 616 de 2006 y en las normas que lo modifiquen, adicionen o sustituyan.

Artículo 5°. Requisitos de hatos, predios o fincas productoras de leche cruda para consumo humano directo. Los hatos, predios o fincas que provean leche con destino a su comercialización para consumo humano directo, deben cumplir con los siguientes requisitos:

1. Estar registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, de acuerdo a lo establecido en el Artículo 4 del Decreto 616 de 2006 y el Artículo 2 de la Resolución 1779 de

1998 expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA y, en las normas que los modifiquen, adicionen o sustituyan.

2. Estar inscritos en los programas para certificación de los predios como libres de brucelosis y tuberculosis animal de acuerdo a la normativa que para este efecto expida el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA

3. Estar libre de brucelosis y tuberculosis animal de conformidad con la reglamentación que para el efecto expida el Instituto Colombiano Agropecuario -ICA. De acuerdo con la prevalencia de brucelosis y tuberculosis animal identificada en el país por el ICA, esa entidad establecerá los plazos obligatorios para que los predios que provean a comercializadores de leche cruda se certifiquen como fincas libres de brucelosis y tuberculosis animal,

4. Dar cumplimiento a los requisitos para la obtención de leche en la producción primaria establecidos en el Capítulo 11 del Decreto 616 del 2006 y en las normas que lo modifiquen, adicionen o sustituyan.

De las características físicas químicas y microbiológicas de la leche cruda para consumo humano directo.

Artículo 6°. Características físico químicas de la leche cruda para consumo humano directo. La leche cruda para consumo humano directo debe cumplir con las características físico químicas establecidas en el Artículo 16 del Decreto 616 de 2006 y en las normas que lo modifiquen, adicionen o sustituyan. Adicionalmente, debe cumplir con las siguientes características:

1. La leche líquida proveniente de animales bovinos debe tener como mínimo 2.9% de proteína.
2. Debe estar libre de adulterantes, neutralizantes y conservantes.
3. Los niveles de sustancias tales como contaminantes químicos (metales pesados, residuos de medicamentos veterinarios, plaguicidas, entre otros) y toxinas, se deben regir por

normas oficiales o en su defecto las normas internacionales del Codex Alimentarius (FAO-OMS).

Del perfil sanitario

Artículo 13. Autorización para comercialización de leche cruda para consumo humano directo. Los Gobernadores y Alcaldes autorizarán o no la comercialización de leche cruda para consumo humano directo de acuerdo con el perfil sanitario elaborado por las autoridades sanitarias competentes.

Artículo 14. Transitorio. Comercialización de leche cruda para consumo humano directo. Mientras el Ministerio de la Protección Social o la entidad que haga sus veces, establece los lineamientos técnicos y se elabora el perfil sanitario por parte de las autoridades sanitarias competentes, se permitirá la comercialización de leche cruda en el territorio nacional. En todo caso, los comercializadores ambulantes y de expendio de leche cruda para consumo humano directo deben cumplir con los requisitos señalados en el presente decreto³.

³Ministerio de la Protección Social (2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presenta la metodología que se siguió para responder a los objetivos:

- Determinar la flora microbiana presente en leche cruda recolectada de tanques para pasteurización y cantinas para comercialización en el departamento de Boyacá.

- Caracterizar por métodos microbiológicos cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de leche cruda recolectada de tanques para pasteurización y cantinas para comercialización en el departamento de Boyacá.

- Caracterizar los perfiles RAPD (polimorfismo de DNA amplificado al azar) de las cepas *Streptococcus agalactiae* aisladas de leche cruda recolectada de tanques para pasteurización y cantinas para comercialización en el departamento de Boyacá.

- Establecer la relación de las cepas aisladas mediante la determinación de coeficientes de similitud.

El trabajo se desarrolló en el marco de una alianza de investigación entre los grupos de Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ) y el grupo de investigación en Genética y Biología Molecular (GEBIMOL) de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y grupo de Investigación del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Boyacá.

2.1 Muestreo de Cantinas y/o Tanques de almacenamiento

Durante el periodo comprendido entre noviembre de 2012 y enero de 2014 se recolectaron muestras provenientes de cantinas y tanques de almacenamiento, siguiendo el protocolo estandarizado, las muestras fueron transportadas en refrigeración hasta el laboratorio de microbiología. En el muestreo se recolectaron 347 muestras de centros de acopio y hatos de zonas productoras de leche del departamento de Boyacá: Paipa, Duitama,

Firavitoba, Sotaquirá, Chiquinquirá, Toca, Miraflores y Tuta; a las muestras se les realizó cultivo para gérmenes comunes (mesófilos) en los laboratorios de Microbiología de Laboratorio ServiLac y en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Boyacá.

Figura 1. Registro fotográfico de muestreos en centros de acopio y cantinas

	
Tanque de acopio	Inspección del muestreo
	
Muestreo	Inspección del muestreo
	
Cantinas en hato	Cantinas en plataforma

Toma de Muestras

Se tomaron 100 ml de leche en frascos de vidrio estériles de 250 ml de capacidad, debidamente rotulados, después de homogenizar los tanques de carga y las cantinas.

Transporte de las muestras

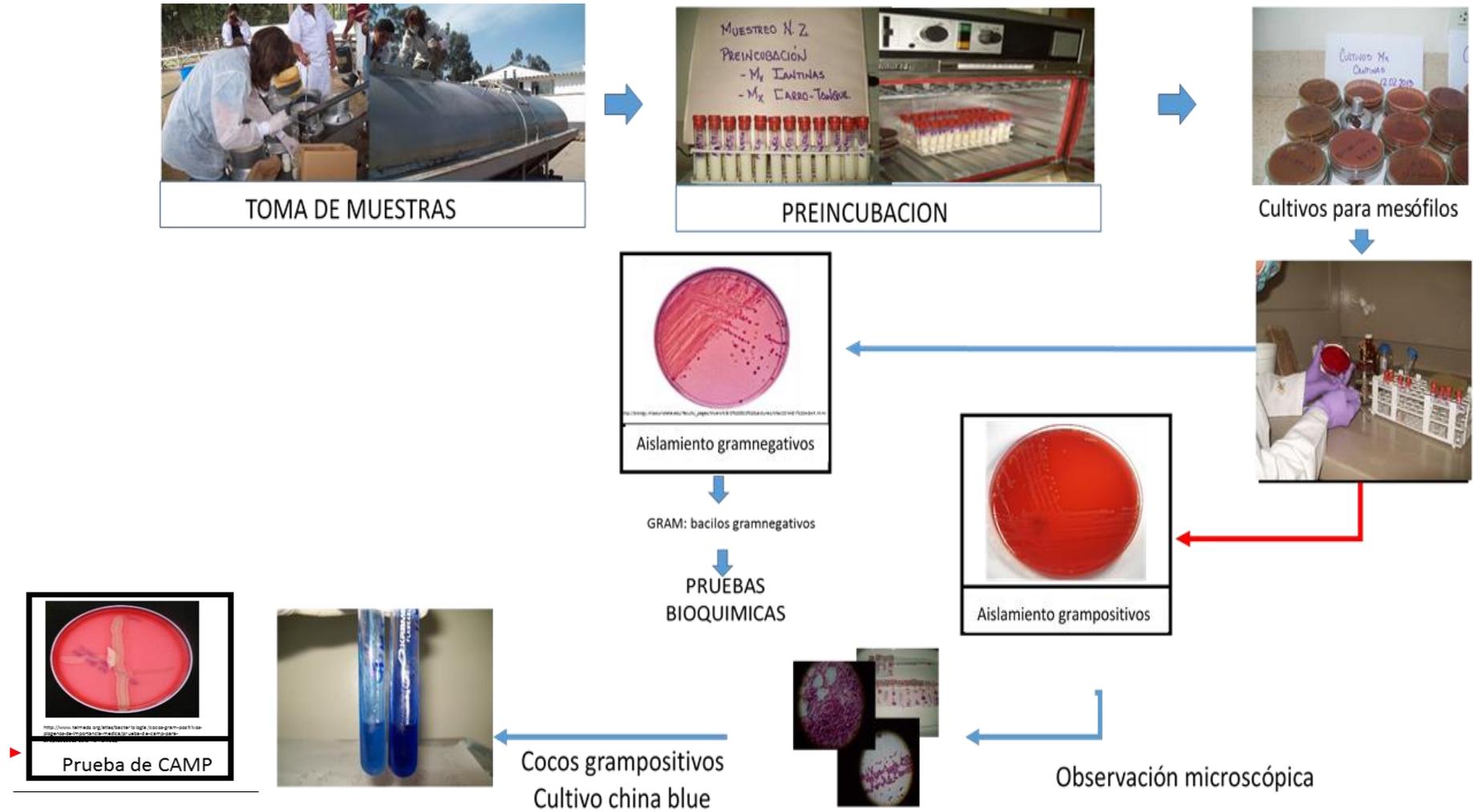
Los frascos se almacenaron en orden en cajas isotérmicas con hielo y pilas de congelación, conservando una temperatura estable de 4°C según resolución 3416 del 2006 de la OMS y la guía para transporte de mercancías peligrosas por carretera (ADR).

2.2 Análisis Microbiológico

Se realizó pre-incubación de las muestras a 37°C por 24 horas, las muestras fueron homogenizadas y se realizó el aislamiento primario en medio de agar chocolate (atmosfera: microaerofílica 10% CO₂), agar sangre y agar MacConkey (atmosfera: aerobia), se incuban 48 horas a 37°C., posteriormente al tiempo de incubación se hizo lectura de las características macroscópicas de las colonias aisladas y microscópicas de frotis indirectos por medio de Gram. Se aplicaron pruebas bioquímicas para diferenciación de grampositivos y gramnegativas, y por último se sembraron en medios diferenciales las colonias cuyo Gram corresponda a gérmenes gramnegativos.

Para la identificación de *S. agalactiae* se tomaron las colonias con las características macroscópicas descritas para este género y cuyo frotis mostro cocos grampositivos en agrupación de cadena, se sembraron en medio Cloruro de sodio al 6,5%, en agar hipurato de sodio, china blue, se realizó la prueba de CAMP (monofosfato de adenosina cíclico) y se sometieron a pruebas bioquímicas de carbohidratos (Inulina, lactosa, rafinosa, salicina, y trehalosa) y alcoholes (Sorbitol y Manitol). Se utilizó como control la cepa de *S. agalactiae* ATCC 12386. En la figura 2 se observa el procedimiento microbiológico.

Figura 2. Procedimiento microbiológico



Fuente: Estudio.

2.3 Análisis Molecular: perfiles de Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD) de cepas *Streptococcus agalactiae* aisladas de muestras de tanques de almacenamiento y cantinas de hatos y centros de acopio del departamento de Boyacá

Para la caracterización genotípica de las cepas se aplicó el protocolo estandarizado por Huertas C. (2013) del grupo de Investigación en Genética y Biología Molecular (GEBIMOL), Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia - UPTC; las cepas se incubaron en medio líquido Infusión Cerebro Corazón BHI – Oxoid; durante 48 horas a 37°C, la extracción se realizó en fase logarítmica. Para la extracción del ADN de las cepas de *S. agalactiae* se utilizó el kit de extracción Wizard de Promega con Lisozima 10 mg/ml Roche, todo el material genético extraído fue conservado a una temperatura de -4 a -20 °C. La concentración de ADN se cuantificó mediante el espectrofotómetro ThermoGenesys 10V a una longitud de onda de 260nm. Para la amplificación de los perfiles RAPDs se aplicó el protocolo de 40 ciclos, en un volumen de reacción de 25 µl estandarizado por Huertas C. y Gutiérrez W. del grupo GEBIMOL modificado de Limansky (2001). Las condiciones óptimas de amplificación se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones óptimas de amplificación. Mezcla de reacción

REACTIVO		CONCENTRACIÓN FINAL PARA UNA REACCIÓN	VOLUMEN PARA UNA REACCIÓN
Go Taq Hot Start Green Master Mix	Taq Polimerasa	1x	12.5µl
	Buffer		
	dNTPs		
	MgCl ₂		
MgCl ₂	3.5mM	1.5 µl	
Iniciadores 10N o 19	3.7mM	4.6 µl	
DNA	—	5µl	
Agua libre de nucleasas	NA	1.4µl	
VOLUMEN FINAL DE REACCION			25µl

Fuente: Reactivos y concentraciones para protocolo de amplificación aleatoria de ADN polimórfico de ADN para *S. agalactiae*. GEBIMOL-UPTC

Se utilizaron los iniciadores 10N IDT ref. 93534134, secuencia 5' TNGYNGGRTC 3' y 19N IDT ref. 93534134, secuencia 5' GGTCGACYTTNGYNGGRTC 3' propuestos por François, S., A. Limansky et al. (2001). Las mezclas de reacción se procesaron en el termociclador con las siguientes condiciones de amplificación establecidas por Huertas C.-GEBIMOL-UPTC, modificado de François, Limansky, et al. (2001). Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de temperatura óptima para protocolo de amplificación para RAPD

Etapas	T° (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	
Desnaturalización	93	1	40
Hibridación	36	1.5	
Extensión	72	2	
Extensión Final	72	10	

Fuente: Protocolo de 40 ciclos para amplificación aleatoria de ADN polimórfico para obtención de perfiles de ADN *S. agalactiae*. GEBIMOL-UPTC.

Los productos de amplificación, se llevaron a electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer de corrido TBE 1X, el ADN fue teñido con bromuro de etidio y los gels fueron visualizados mediante fotodocumentador de rayos UV modelo DIGI DOC II SYSTEM y las bandas comparadas con un marcador de peso molecular de 50-2,000 pb (BioLine Reagents Ltda). Se construyeron matrices binarias de cada ensayo 1: presencia de banda y 0: ausencia de banda estas matrices binarias se procesaron en el software NTSYS.pc ver. 2.02 que estima similaridad genética con el coeficiente de DICE, cuya fórmula es:

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

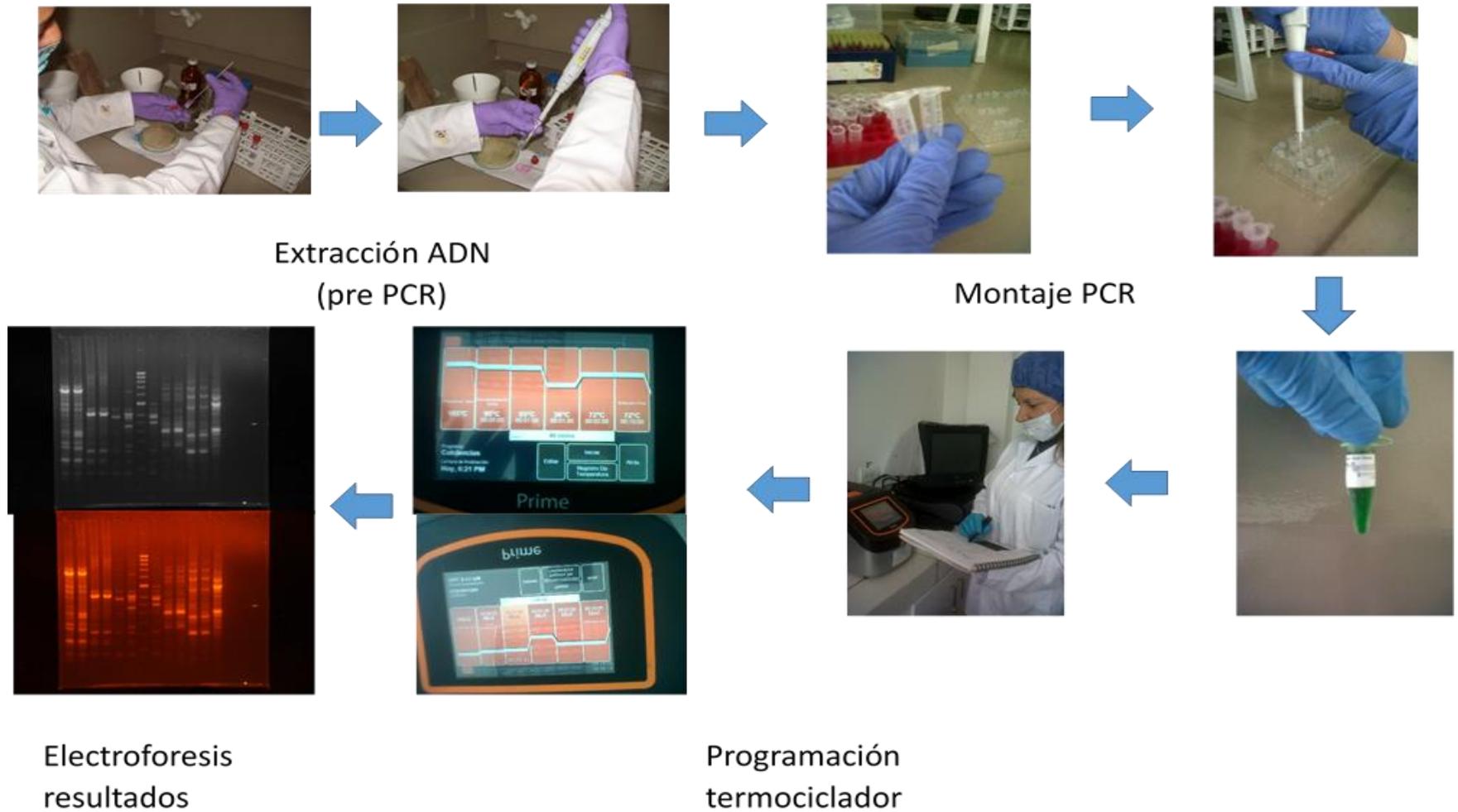
En donde S_{ij} : similaridad entre el individuo i y j

a: número de bandas compartidas por los individuos i y j

b: número de bandas presentes en i pero ausente en j

c: número de bandas presentes en j pero ausente en i

Figura 3. Evidencia análisis molecular



Fuente: Estudio.

Las matrices de similaridad se construyen con el programa NTSYS el cual utiliza el subprograma Simqual y el coeficiente de DICE (1945). Los coeficientes de similaridad se introducen a su vez en el subprograma SAHN para generar dendogramas usando el método de agrupamiento de medias aritméticas no ponderadas UPGMA que utiliza un algoritmo de agrupamiento con el que se construye árboles ultramétricos (hojas equidistantes de la raíz), en el que se asume la teoría del reloj molecular.

3. FENOTIPIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE *Streptococcus agalactiae* EN LECHE CRUDA DE TANQUES Y CANTINAS PARA COMERCIALIZACIÓN EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ

3.1 Caracterización de la microbiota láctea

De las 347 muestras el 63,1% (n=219) reportaron aislamientos positivos y 36,9% (n=128) fueron negativos. De los aislamientos se obtuvieron 157 aislamientos de grampositivos, 95 de gramnegativos, 2 aislamientos del género *Nocardia* y 21 de *Candida sp.* microorganismos provenientes de flora láctica, saprofita y patógena. En la tabla 1 se muestra la distribución de cada grupo bacteriano en los 219 cultivos positivos y el porcentaje correspondiente en relación con el grupo bacteriano y en el total de muestras analizadas.

La caracterización de la microbiota láctea en leches de cantina y tanques de acopio se reportado desde los años 70 (Farnsworth, 1993), su propósito es tamizar y reducir el número de análisis individuales (Lucas, 2011), buscando además el potencial riesgo de múltiples fuentes de contaminación y exposición a las deficientes prácticas de manejo del producto a comercializar, igualmente esta microbiota se relaciona con las condiciones de cantinas y tanques de almacenamiento, evalúa indirectamente la higienización de estas superficies.

Tabla 3. Frecuencias de las cepas aisladas

Microorganismo	Tipo flora	Frecuencia de aislamiento n=	% de prevalencia en el grupo bacteriano	% de prevalencia en el presente estudio
Grampositivos				
<i>Staphylococcus aureus</i>	Patógena	1	0,6	0,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Transitoria	37	23,6	16,9
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Saprofita	5	3,2	2,3
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Patógeno	16	10,2	7,3
<i>Streptococcus uberis</i>	Saprofita	9	5,7	4,1
<i>Streptococcus bovis</i>	Saprofita	14	8,9	6,4
<i>Streptococcus brevis</i>	Saprofita	1	0,6	0,5
<i>Micrococcus roseus</i>	Saprofita	26	16,6	11,9
<i>Sarcina sp.</i>	Saprofita	1	0,6	0,5
<i>Tetragenococcus</i>	Saprofita	8	5,1	3,7
<i>Streptolactobacillus</i>	Saprofita	9	5,7	4,1

<i>Sporolactobacillus</i>	Saprofita	20	12,7	9,1
<i>Corynebacterium bovis</i>	Saprofita	10	6,4	4,6

Gramnegativos				
Microorganismo	Tipo flora	Frecuencia de aislamiento n=	% de prevalencia en el grupo bacteriano	% de prevalencia en el presente estudio
<i>Kluyvera ascorbata</i>	Patógena	5	6,8	2,3
<i>Yersinia kristensenis</i>	Saprofita	3	4,1	1,4
<i>Yersinia intermedia</i>	Saprofita	8	10,8	3,7
<i>Achromobacter sp.</i>	Saprofita	6	8,1	2,7
<i>Klebsiella planticola</i>	patógena	10	13,5	4,6
<i>Escherichia coli</i>	Saprofita	19	25,7	8,7
<i>Escherichia fergusonii</i>	Saprofita	1	1,4	0,5
<i>Acinetobacter Calcoaceticus</i>	Patógena	3	4,1	1,4
<i>Cedesea neteri</i>	Patógena	4	5,4	1,8
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Saprofita	7	9,5	3,2
<i>Citrobacter sp.</i>	Saprofita	1	1,4	0,5
<i>Providencia alcalifaciens</i>	Patógena	2	2,7	0,9
<i>Pseudomona sp.</i>	Patógena	2	2,7	0,9
<i>Propionibacterium</i>	Transitoria	3	4,1	1,4
Otros géneros				
<i>Candida sp.</i>	Patógena	21		9,6
<i>Nocardia sp.</i>	Patógena	2		0,9

Fuente: Estudio.

Los resultados de la caracterización de la microbiota de las leches en estudio arrojaron presencia de diferentes consorcios conformados por microorganismos de flora: transitoria como *Staphylococcus epidermidis*, *Sporolactobacillus*, *Klebsiella planticola*; Saprofítica como: *Micrococcus roseus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenis*, *Escherichia coli* y patógena como *Klebsiella planticola*, *Kluyvera ascorbata*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus aureus*, ***Streptococcus agalactiae***, y *Escherichia fergusonii*. Estos hallazgos evidencian que la leche de cantina y de tanque de acopio presenta flora proveniente de la mala higienización de cantinas, procesos no higiénicos en el ordeño, posible contaminación durante el transporte, tiempo prolongado de transporte que permiten el crecimiento exponencial de la microbiota. Los consorcios aislados muestran

coincidencia con otros estudios que miden la microbiota en leche de ganado vacuno (Quigley, 2013) y las comercializadas de otro origen como en leche de ovinos, (Garnica, 2013; Álvarez, 2014), se observa el aislamiento de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e indicadores como la *Escherichia coli*.

De estos aislamientos los géneros *Streptolactobacillus* y *Sporolactobacillus* refiere importancia ambiental y regulación de las prácticas en el entorno productivo (Benvenuto, 2014), además de identificar en el presente estudio la necesidad de tener adecuados procesos térmicos y control de calidad teniendo en cuenta la ocurrencia ubicua y resistencia al estrés térmico de estos géneros bacterianos.

Se reportan diferentes estudios que permiten evaluar la calidad higiénica de la leche relacionados con las condiciones de producción y de manejo de la leche dentro de la cadena productiva, los resultados del presente tienen similitud en el hallazgo de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* indicadores como *Escherichia coli* (Gómez et al, 2013; Ortiz, 2014); la vigilancia de la calidad microbiológica también sugiere que se realice monitoreo mediante la determinación de recuentos de microorganismos mesófilos medidos que caracterizan dicha calidad de acuerdo con la norma nacional (Arias, 2010; Vásquez, 2012; Calderón, 2012)

En el grupo de los grampositivos la mayor prevalencia corresponde a *Staphylococcus epidermidis* con un 23,6% (n=37), bacteria relacionada como flora normal de mucosas tanto en el animal como en el humano; cepas de origen ambiental como el *Micrococcus roseus* con el 16,6% (n=26), *Sporolactobacillus* con 12,7% (n=20). La prevalencia del patógeno *Streptococcus agalactiae* fue del 10,2% (n=16) confirmando que las leches de acopio en cantinas y tanques reciben producción de hatos con mastitis subclínica, posiblemente asociada a un deficiente control del ordeño y atención al bienestar animal. (Figura 4).

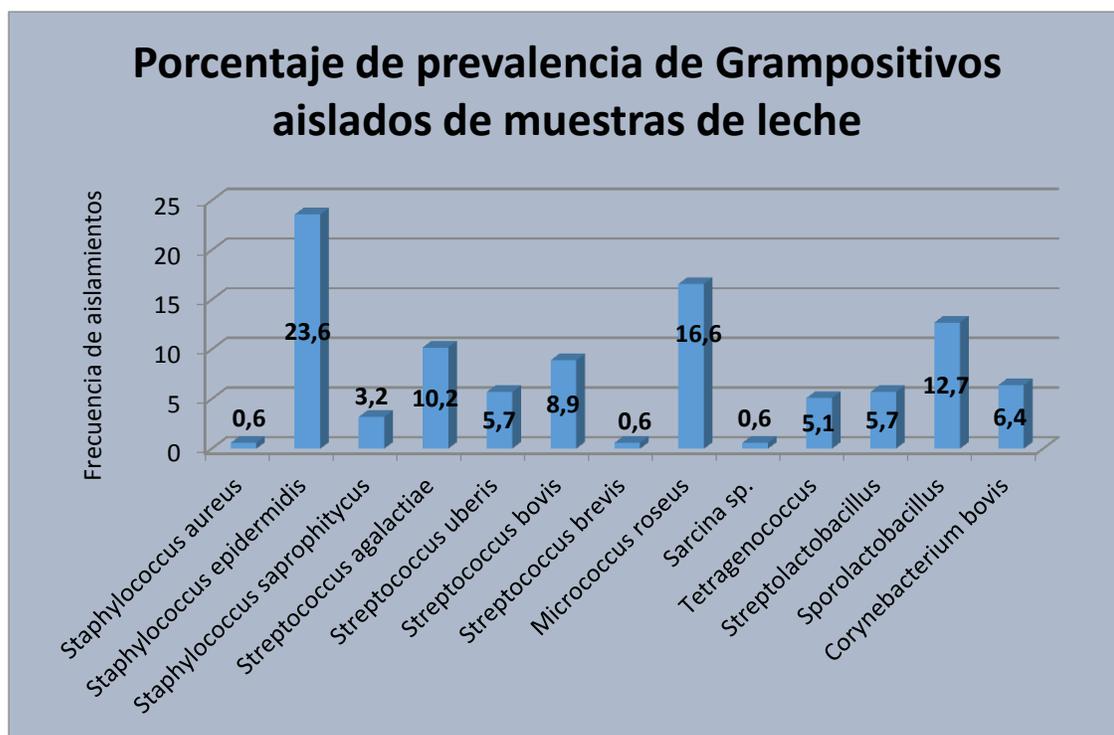


Figura 4. Prevalencia de grampositivos aislados en el estudio. Fuente: Estudio.

La prevalencia de *Staphylococcus epidermidis* sugiere que la mayor fuente de microorganismos presentes en las muestra estudiadas proviene de contaminación antropogénica por deficiencia de aplicación de las buenas prácticas de manipulación, coincide este resultado con la prevalencia en segundo lugar de *Micrococcus roseus*, cuyo nicho especial es la piel de humanos y animales y reservorios de aguas, lo que presupone no solamente que existe la acción antropogénica sino que cabe la posibilidad de que haya agregados de agua contaminada con estos gérmenes o la calidad del agua usada para la higienización de las cantinas no es potable, siendo el agua un vehículo importante de carga bacteriana (Estevéz, 2011)

De los microorganismos aislados los patógenos relacionados a continuación refieren el acopio de leche provenientes de vacas infectadas, la presencia de *Staphylococcus aureus* sugiere, que el producto ha sido manipulado por portadores asintomáticos, el dato de prevalencia es inferior en el grupo y puede puntualizar el origen de esta contaminación y de la región de donde procede la leche, sin embargo con la determinación de las toxinas de la cepa no se puede asegurar que la cepa sea toxigénica; para prevalencias más altas se recomienda

hacer la determinación de las toxinas para confirmar la patogenicidad de las cepas y poder retirar de esta función a los manipuladores portadores (Valero, 2012). Igualmente la presencia de este patógeno hace necesario la evaluación de las cantinas y tanques dada la posibilidad de presentar biofilms bacterianos (Lee, 2014)

La prevalencia en el total de los aislamientos del estudio reporta 7,3% para el *Streptococcus agalactiae*, un porcentaje considerable toda vez que el destino inmediato de estas leches puede ser para consumo humano directo o para control de calidad de las plantas productoras de leche ultrapasteurizada y derivados, se espera entonces que estas leches no sean aceptadas en las plantas productoras, lo que deriva en pérdidas para los productores y para quienes dentro de la cadena son responsables del acopio de múltiples hatos, en Colombia el estudio en el departamento de Caldas mostró una prevalencia de 53,3% dato muy superior al presente (Velasco-Bolaños, 2014), otro estudio en Argentina reporta una prevalencia inferior de 5,3% (Neder, 2014). La identificación de este patógeno en leches de tanques es interpretado como un método indirecto de detección de mastitis subclínica en los hatos (Elías, 2011).

Para el grupo de los gramnegativos la mayor prevalencia se encontró con *Escherichia coli* con 25,7% (n=19), *Klebsiella planticola* con 13,5% (n=10), *Yersinia intermedia* con 10,8% (n=8) y *Alcaligenes faecalis* con 9,5% (n=7), este consorcio hace presumir que buena parte de la contaminación tiene origen fecal, posiblemente por material particulado presentes en la leche como pasto, tierra, madera y algunos otros de elementos no perceptibles. Figura 5.

La presencia de *Kluyvera ascorbata* se relaciona directamente con la contaminación fecal y de origen respiratorio de fuente humana, este microorganismo pertenece a la familia Enterobacteraceae y es responsable de bacteremias, colecistitis aguda y meningitis en personas inmunosuprimidas. El hallazgo en la leche pone manifiesto un riesgo alto para el consumidor con condiciones de inmunidad disminuidas y para los lactantes.

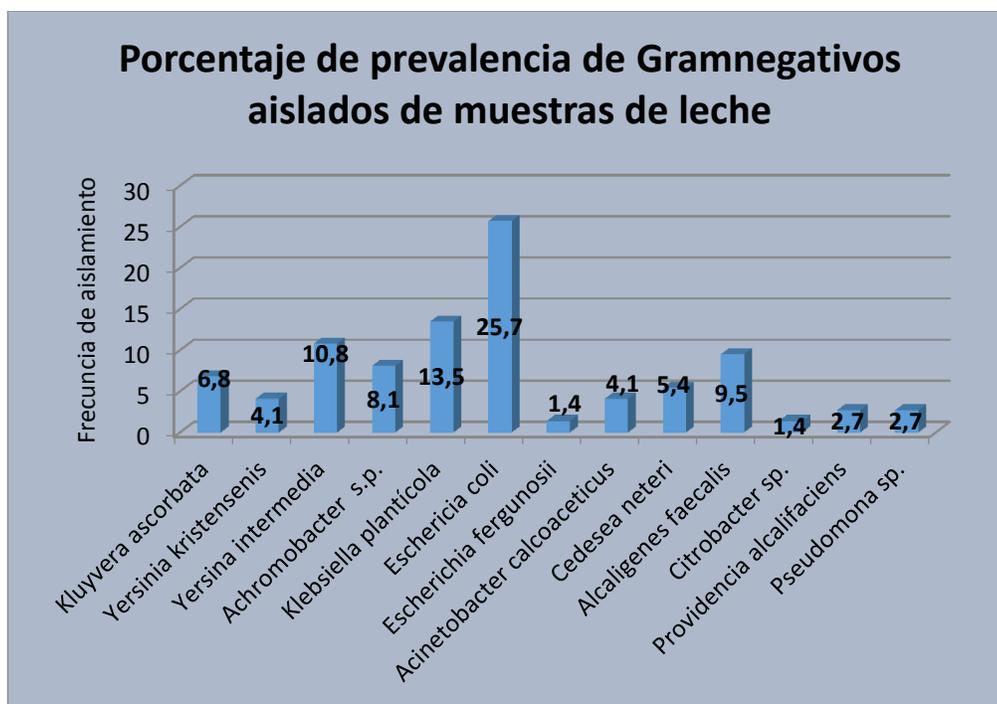


Figura 5. Prevalencia de gramnegativos aislados en el estudio. Fuente: Estudio.

En relación con otros estudios se muestra la prevalencia similar para la *Escherichia coli*, en el estudio en Sucre dicha prevalencia fue del 32,5% (Gómez, et al., 2013). Otro de los microorganismos aislado pertenece al género *Acinetobacter* este refiere importancia teniendo en cuenta que actualmente es uno de los géneros estudiados como potencial bacteria multiresistente, género asociado a mastitis subclínica (Rosales, 2015) por lo que su presencia sugiere además de la acción antropogénica de riesgo (Oliver, 2011) durante la manipulación de la leche, la necesidad de ampliar los estudios, de otra parte este hallazgo relaciona no solo la calidad microbiológica de la leche sino el riesgo de la comercialización de leches con géneros bacterianos con patrones de resistencia antibiótica (Décimo, 2016). El género *Pseudomona* es un indicador del proceso de cadena de frio y o manejo de las diferentes temperaturas a las que se expone el producto durante la conservación (Raats, 2011; De Jonghe, 2011), refiere entonces que su presencia que estas leche han permanecido tiempo prolongado en incubación en frio por lo que se genera un metabolismo negativo de la flora láctica llevando al deterioro y descomposición de la leche.

Otros hallazgos importantes son la presencia de *Candida sp.* con una prevalencia de 9,6% (n=21) que indica cambios en las características químicas de la leche como el valor del pH, posiblemente por tiempos prolongados de recolección y transporte que permite la blastogénesis fúngica, indicando además que estas leches tienen un proceso de agriado que depende de la degradación de sustratos proteicos catalizados por enzimas proteolíticas, lo que supone el descarte para producción de leche de consumo o derivados; el aislamiento de *Nocardia sp.* (n=2) se asocia con posibles abscesos mamarios, por lo que consideraría no apta para comercialización e identifica deficiencia en el control de la sanidad animal.

Por la condición de contaminación expuesta se hacen obligatorios los métodos de conservación como la ultrapasteurización o en su defecto la pasteurización, controles de calidad estrictos y restricción de la comercialización de estas leches crudas de manera directa. Igualmente los resultados han mostrado que el tiempo de transporte y las condiciones de temperatura durante el mismo no son suficientemente controlados.

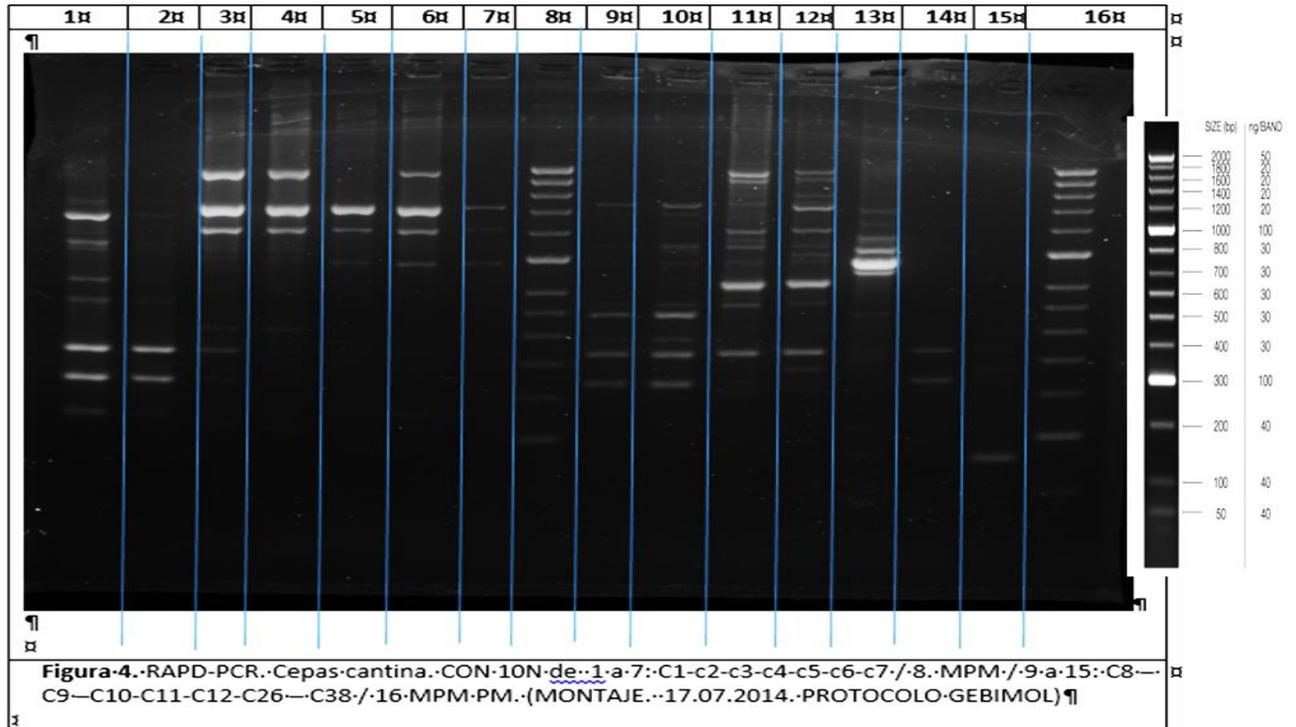
3.2 Caracterización de los perfiles de Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD) de cepas *Streptococcus agalactiae* aisladas de muestras de tanques de almacenamiento y cantinas de hatos y centros de acopio del departamento de Boyacá

Fueron caracterizadas genóticamente 16 cepas de *Streptococcus agalactiae* correspondientes a: 9 cepas del acopio Duitama que recolecta leche de los municipios de Belén, Tibasosa, Paipa, Santa Rosa de Viterbo, Duitama y Sotaquirá (C1, C3, C4, C6, C7, C8, C10, C11, C12); tres muestras tomadas de cantinas en el hato de Tanguavita (C26, C38, C75); dos muestras tomadas de cantinas de hatos de Chiquinquirá (C106 y C134); una muestra tomada de cantinas en hato de Toca C235 y una muestra de cantina tomada en un hato en el municipio de Miraflores C311. Se realizaron las extracciones y las amplificaciones RAPD – PCR. Se obtuvieron perfiles de amplificación con bandas entre 150 y 2000 pb, de acuerdo con la lectura frente al patrón de peso molecular (Figuras 6, 7, 8 y 9).

En la Figura 6 y 7 se observan las bandas correspondientes a los perfiles RAPD, en los perfiles 10N se observa amplificación entre cuatro y ocho bandas, dos de estos fragmentos

amplificados entre los 1400 y 1100 pb presentes en las cepas de provenientes del acopio de Duitama, hallazgo similar encontrado en el estudio de Limansky y otros, 2001.

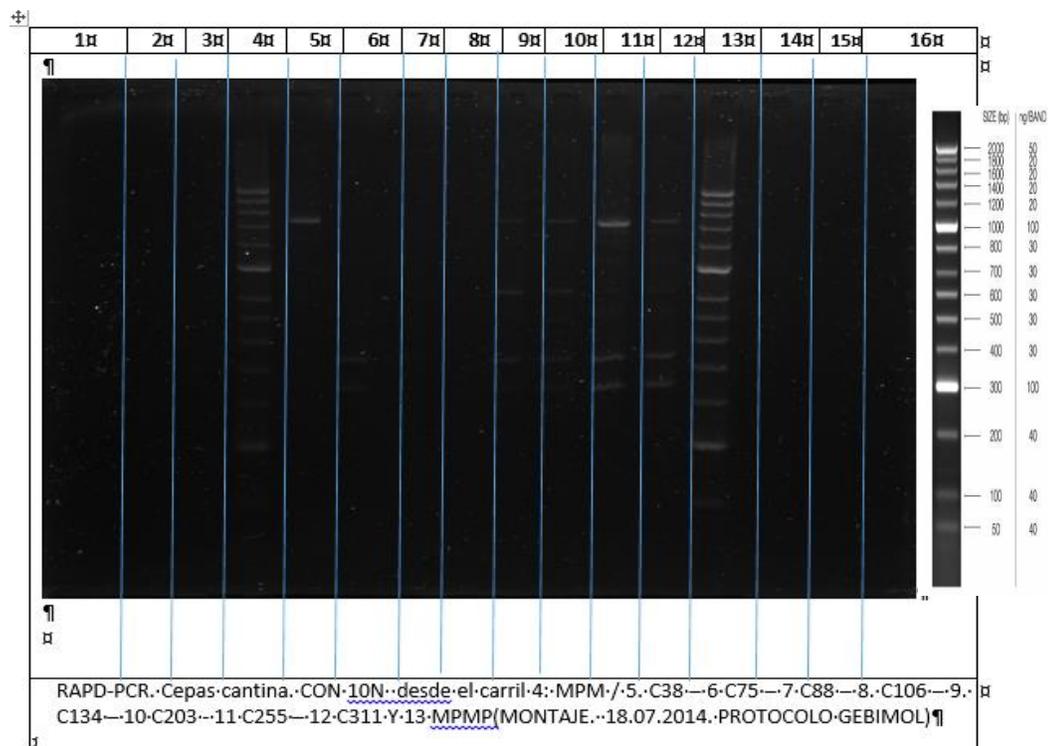
Figura 6. Perfiles de amplificación RAPD-PCR. Cepas cantina. CON 10N de (MONTAJE. 17.07.2014. PROTOCOLO GEBIMOL)



Fuente: Estudio.

Se realizó la amplificación con oligonucleótido 19N, perfiles que mostraron hasta 15 bandas. Figuras 8 y 9. La amplificación muestra en el perfil electroforético bandas más definidas y en mayor número, de esta amplificación se realizó la lectura de presencia (1) ausencia (0) de banda con respecto al patrón de peso molecular para realizar la matriz.

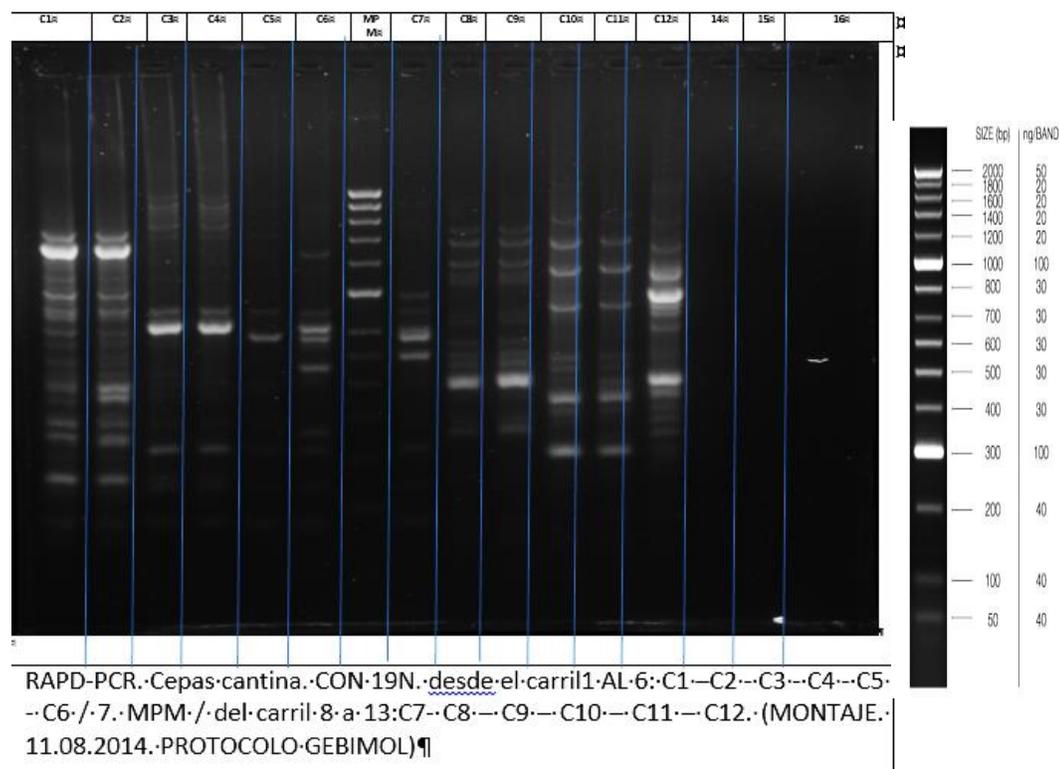
Figura 7. Perfiles de amplificación RAPD-PCR. Cepas cantina. CON 10N MONTAJE. 18.07.2014. PROTOCOLO GEBIMOL



Fuente: Estudio.

En la Figura 8 se observan las bandas correspondientes a los perfiles RAPD, en los perfiles 19N se observa amplificación entre cuatro y diez bandas, dos de estos fragmentos amplificados entre los 1400 y 2000 pb presentes en las cepas de los hatos de Tunguavita, Chiquinquirá, Toca y Miraflores, hallazgo similar al encontrado en las muestras del acopio de Duitama.

Figura 8. RAPD-PCR. Cepas cantina. CON 19N. MONTAJE. 11.08.2014. PROTOCOLO GEBIMOL

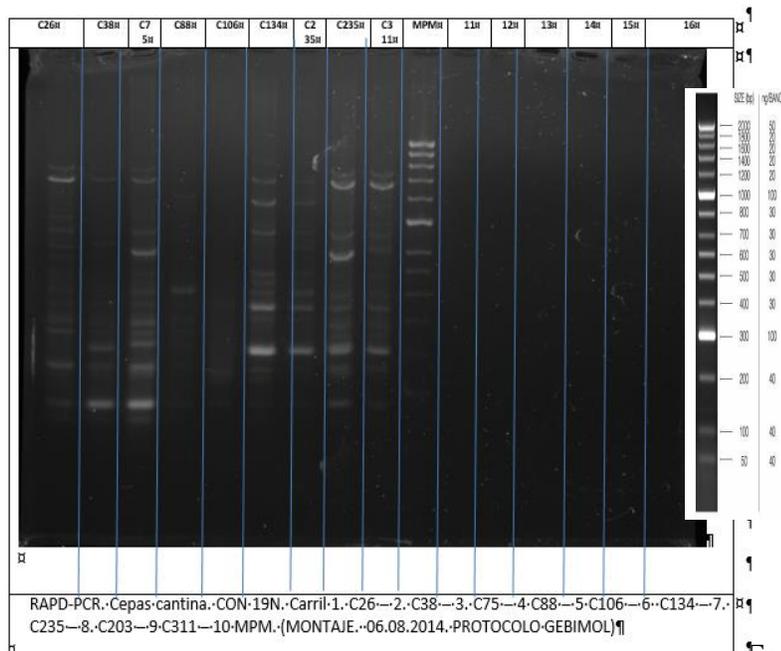


Fuente: Estudio.

En la figura 8 se muestran los perfiles realizados con 19N se observan hasta 12 bandas, de 1200 pb e inferiores. Se realizó un ensayo con cepas ATCC del género *Streptococcus*: *S. pneumoniae* ATCC 170314, *S. faecalis* ATCC 51299, *S. mutans* ATCC 25175 y *S. agalactiae* ATCC 12396, cepas correspondientes a patógenos humanos. En la figura 10 Corrido electroforético de perfiles RAPD, cepas ATCC del género *Streptococcus*.

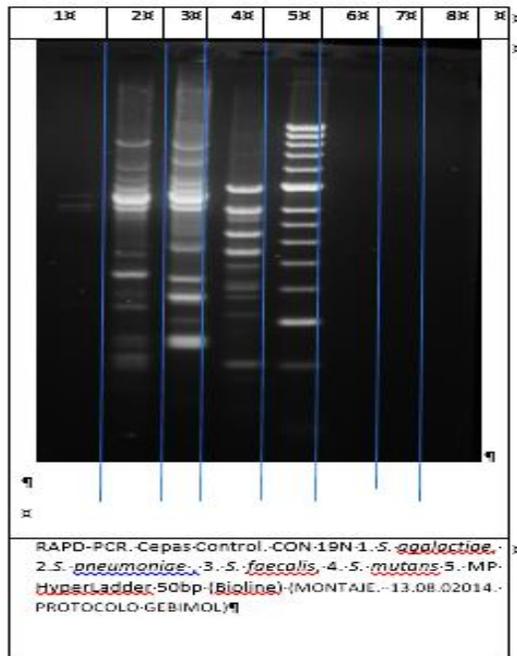
La matriz binaria de los corridos electroforéticos de amplificación con 19N correspondiente a la lectura de presencia o ausencia de bandas de las figuras 6 y 7, registrada en el programa NTSyS dio la siguiente lectura.

Figura 9. Perfiles de amplificación RAPD-PCR. Cepas cantina, primer 19N. MONTAJE. 06.08.2014. PROTOCOLO GEBIMOL



Fuente: Estudio

Figura 10. Montaje de Cepas control



Fuente: Estudio.

Tabla 4. Matriz binaria

PATRON PM	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C26	C38	C75	C106	C134	C235	C311
2000	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1800	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
1400	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1300	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
1100	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
800	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
780	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
680	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
600	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
500	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1

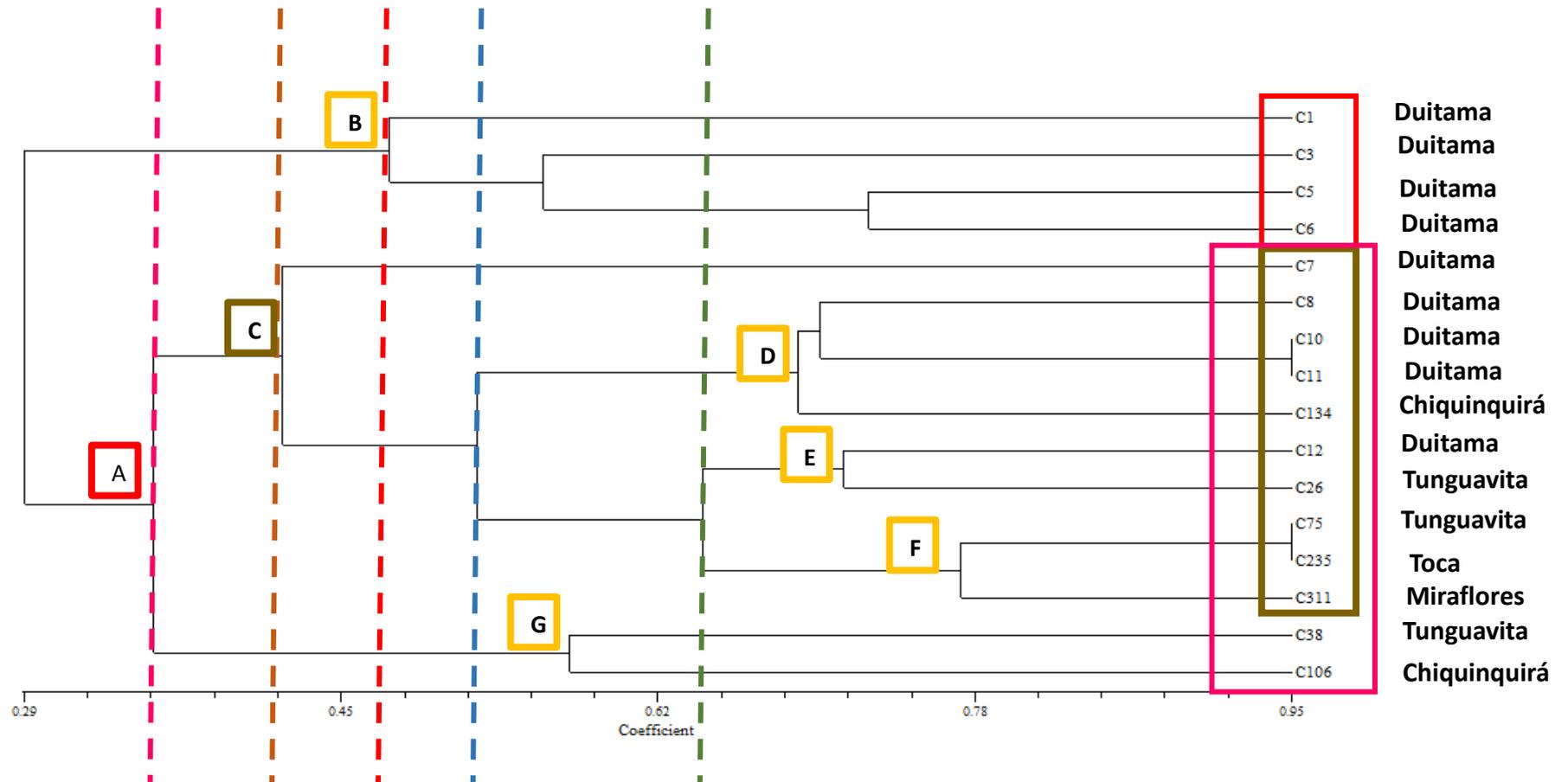
Fuente: Estudio.

En la figura 11 se observa el dendograma organizado según:

- Muestras acopio Duitama: que recolecta leche de los municipios de Belén, Tibasosa, Paipa, Santa Rosa de Viterbo, Duitama y Sotaquirá: C1, C3, C4, C6, C7, C8, C10, C11, C12.
- Muestras tomadas de cantinas en el hato de Tunguavita: C26, C38, C75.
- Muestras tomadas de cantinas de hatos de Chiquinquirá: C106 y C134.
- Muestra cantinas en hato de Toca: C235
- Muestra de cantina tomada en un hato en el municipio de Miraflores: C311.

En relación con los coeficientes de similitud se dan resultados similares con el estudio de Amal et al., 2013, quien realizó caracterización de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* obtenidos de pescado concluyendo la utilidad de esta técnica para la investigación epidemiológica molecular se patógenos de interés en la industria de alimentos; igualmente en el caso de la leche aporta información valiosa

Figura 11. Dendrograma, cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de muestras de leche provenientes de cantinas, tanques y centros de acopio del departamento de Boyacá



Fuente: el estudio

En el dendograma se observan tres grupos filogenéticos grandes, el primero agrupa a cuatro cepas procedentes de cantinas que llegan al acopio de Duitama, el segundo grupo se encuentra conformado por cepas del acopio de Duitama y presentan índice de similitud cercano con cepas obtenidas de muestra de cantinas de otros municipios. Es así como se obtuvieron los siguientes clúster:

- Clúster Duitama – Tunguavita (D)
- Clúster Duitama – Chiquinquirá (E)
- Clúster Toca - Tunguavita – Miraflores (F)
- Clúster Tunguavita – Chiquinquirá (G)

El resultado de los RAPDs ha discriminado a nivel de especie de *Streptococcus agalactiae*, mostrando la distribución de los cluster en los cuatros grupos relacionando un alto porcentaje de polimorfismos resultados similares con el género *Staphylococcus* expuestos por Aguirre, M. et al. (2006), que determinaron alto polimorfismos en tres cluster.

En el presente estudio los aislamientos del grupo B (cuatro cepas) corresponden a una misma zona de muestreo, a diferencia del grupo C en donde no se observaron relaciones de similitud estrecha, se observan ramas que relacionan las cepas de diferentes acopios. En el grupo C se observaron dos ramas idénticas que corresponden a los aislamientos C10 y C11 ambos de Duitama, así como C75 y C235 Tunguavita y toca respectivamente, que constituyen una rama única y son idénticos, lo que orienta a un origen común de estos dos pares de cepas.

Los resultados de los perfiles del presente estudio son similares a los estudios del *Streptococcus agalactiae* en humanos como en los estudios de Rojo et al., 2008 y Hannoun et. al, 2010 que caracterizaron cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de muestras de diferente origen provenientes de mujeres embarazadas colonizadas y de recién nacidos con sepsis y meningitis, perfiles obtenidos mediante RAPDs y electroforesis en campo pulsado.

5. CONCLUSIONES

En la muestra de leche en estudio se reportó una prevalencia de *Staphylococcus epidermidis* en un 16,9%, seguido de *Micrococcus roseus* con un 11,9%, correspondientes a especies saprofitas, para patógenos grampositivos la prevalencia fue de *Streptococcus agalactiae* con un 7,3% seguida de *Staphylococcus aureus* con un 0,5%. En flora gramnegativa la *Escherichia coli* mostró una prevalencia del 8,7% como saprofita, seguida de *Klebsiella planticola* con un 4,6% considerada patógena. En otros géneros la *Candida sp.* Presentó una prevalencia del 9,6%.

La microbiota aislada muestra flora saprofita y patógena por lo tanto refleja muchas condiciones de riesgo durante la producción, riesgo que supone infección en hatos y presencia de patógenos en humanos, así como tránsito de posibles cepas resistentes. Es una condición de alerta la presencia de consorcios microbianos en leches comercializadas en la fase de acopio, esto pone en discusión las estrategias de control y vigilancia de los entes gubernamentales y obliga a que se implemente medidas de regulación estricta, con el control de compra y venta de leche cruda.

A pesar que los programas de capacitación de buenas prácticas de producción lechera se tienen en el departamento, resultados microbiológicos de muestreos como el de este estudio evidencian que el cumplimiento de las recomendaciones para evitar la contaminación de la leche es deficiente y no controlado.

De la caracterización de los consorcios se establece la prevalencia de flora transitoria y saprófita en la mayoría de los casos, lo que explica que las estadísticas no arrojen brotes de contaminación frecuentemente, sin embargo este producto por la condición de alimento formador debe garantizar una inocuidad casi del 100%, teniendo en cuenta además que los mayores consumidores son niños en edad de lactantes y escolar, cuya condición de inmunocompetencia no está establecida totalmente.

Este estudio permite establecer que existe variabilidad genética entre las especies del género *Streptococcus*, ratifica la importancia del análisis molecular como base para la

evaluación de la relación genética de los aislados y su tránsito en la cadena productiva. Variabilidad que puede estar relacionada con los factores deficientes en las buenas prácticas de producción lechera y que permiten que la calidad e inocuidad de la leche cruda comercializada ponga en riesgo a la población consumidora.

En los diferentes ensayos realizados el estudio mostró reproducibilidad adecuada para el oligonucleótido de 19N, lo que muestra un protocolo estandarizado y ajustado a las condiciones analíticas para identificación de polimorfismos.

Se observó que en el dendograma un índice de 0,29 se determinan dos agrupamientos de acuerdo con las cepas aisladas en cada muestra esto representa una relación entre las diferentes regiones productoras del departamento y el tránsito de los clones de *Streptococcus agalactiae*, relacionando una prevalencia de 7,3% en el presente estudio.

El resultado de los perfiles RAPDs ha discriminado a nivel de especie de *Streptococcus agalactiae*, mostrando la distribución de los grupos desde un coeficiente de similitud del 0,29, entre coeficientes de 0,53 y 0,65 se encontraron cuatro cluster que se caracterizan por presentar aislamientos de diferente origen de acopio. Se observaron dos ramas idénticas que corresponden a los aislamientos C10 y C11 ambos de Duitama, así como C75 y C235 Tinguavita y Toca, respectivamente, que orienta a un origen común de estos dos pares de cepas o a nuevos aislamientos. De otra parte se puede observar con el presente estudio que las cepas del *Streptococcus* muestran un perfil polimórfico, lo que supone una buena aplicación de dicha técnica molecular y el tipo de muestreo.

En este estudio se muestra el perfil polimórfico del *Streptococcus agalactiae* aislado de muestras de cantina supone la mastitis subclínica, presente en los hatos, así como sugiere la evolución de las buenas prácticas, el manejo de la infección, que presionan el comportamiento y los cambios genéticos dentro de la especie, sin embargo al realizarse el estudio con la técnica de RAPD utilizando estos marcadores moleculares se proporciona una línea de base de la caracterización de flora patógena.

6. RECOMENDACIONES

La prevalencia de *Streptococcus agalactiae* y su variabilidad genética encontrada en el estudio, recomienda que las leches sean estudiadas luego de tratamiento de térmico, por medio de técnicas moleculares para detección con sensibilidad y especificidad en el control de calidad del producto para consumo humano.

Considerando los hallazgos microbiológicos de flora patógena y microorganismos indicadores se recomienda en posteriores estudios caracterizar el género *Listeria*.

Se recomienda la continuación de estudios de todas los negros aislados en el presente, utilizando métodos moleculares que lleven a la búsqueda de un método de detección de dichos microorganismo que sea eficiente y permita el monitoreo permanente de las condiciones de comercialización.

Es importante que se continúen los estudios moleculares para determinar un mayor número de agrupamientos en muestras de cantinas y tanques de acopio para generar un sistema de información sobre la aparición de los clúster que indiquen la presencia de cepas relacionadas con infecciones bovinas, proyectando información que pueda explicar la reincidencia o reinfección como una herramienta de vigilancia de la infección.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, M. B., Chassin-Noria, O., Zarzosa, A. O., Ramos, J. E. H., Alarcón, J. J. V., Patiño, A. B., & Meza, J. E. L. (2006). Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus spp.* asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Técnica pecuaria en México*, 44(1), 91-106.
- Álvarez Suárez, M. E. (2014). *Caracterización de tipos patógenos de Escherichia coli y otros peligros biológicos asociados a la leche de cabra y productos derivados*. Universidad de León. España.
- Amal, M. N. A., Zamri-Saad, M., Siti-Zahrah, A., Zulkaflī, A. R., & Nur-Nazifah, M. (2013). Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fishes in Malaysia. *Journal of applied microbiology*, 115(1), 20-29.
- Argilagos Casasayas, G. (2011). Factores de riesgo en la corioamnionitis. Hospital Ginecoobstétrico, "Tamara Bunke Bider", Santiago de Cuba, Cuba. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol_15_5_11/san11511.htm
- Arias, S. P., Loaiza, E. T., Restrepo, J. E. & Olivera, M. (2010). Caracterización del ordeño manual e identificación de puntos críticos de control para la calidad higiénica de la leche en una finca del norte de Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*, 7(2), 35-46.
- Ariznabarreta, A. & San Primitivo, F. (2002). Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to *Staphylococci*. *Journal Dairy Science*, 85, 1370-137
- Armenteros, M., Peña, Janachy., Pulido, J.L. & Linares, E. 2002. Caracterización de la situación de la mastitis bovina en rebaños de lechería especializada en cuba. *Revista Salud Animal*, 24(2), 99-105
- Baele, M., Storms, V., Haesebrouck, F., Devriese, L., Gillis, M., Verschraegen, G.,... Vaneechoutte, M. (2001). Application and evaluation of the interlaboratory reproducibility of tRNA intergenic length polymorphism analysis (tDNA-PCR) for identification of *Streptococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1435–1442.

- Barcaite, E., Bartusevicius, A., Tameliene, R., Kliucinskas, M., Maleckiene, L. & Nadisauskiene, R. (2014). Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 87, 260–271.
- Bedolla, C.C. & Castañeda, V.H. (2003). Agentes patógenos causantes de mastitis bovina. *Cuatro Vientos*, 38, 27-29.
- Benvenuto, S. C. (2014). *Caracterización de microorganismos esporulados presentes en leche pasteurizada comercial y leche cruda provenientes de tambos*. Tesis de grado Universidad Oriental de Uruguay, Montevideo.
- Bernal, E. (2014). *Gerente, Genética Animal de Colombia Ltda. Grupo de investigación de GAC, categoría C de Colciencias*. eleonorabernal@geneticaanimal.co.
- Berridge, B., Bercovier, H. & Frelief, P. (2001). *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Vet. Microbiology*, 78, 1165-173.
- Brown, T. (1979). Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. *Journal of Medical Microbiology*, 12(3), 363-371.
- Calderón, A. & Rodríguez, V. C. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano Cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 582-589
- Calderón, A., Rodríguez, V., Arrieta, G., Martínez, N. & Vergara, O. (2012). Calidad fisicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del sistema doble propósito en montería (córdoba) physicochemical and microbiological quality of raw milk in livestock enterprises dual purpose system in monteria. *Revista Udca Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 399-407.
- Calderón, R., Rodríguez, V. C., Arrieta, G. & Mattar, S. (2011). Prevalence of mastitis in dual purpose cattle farms in Monteria (Colombia): etiology and antibacterial susceptibility. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24, 19-28
- Calvinho, L.F. (2010). *Terapia antibiótica para vaca seca: revisión 2010*. Argentina: Aprocal. Recuperado el siete de Junio de 2016, de: <http://www.aprocal.com.Ar/wp-content/uploads/Terapia-Vaca-Seca-Revision-Calvinho-2010.pdf>

- Cepero, R. O., Castillo, Salado, J. R.J. & Monteagudo, E. (2000). *Detección de la mastitis subclínica mediante diferente técnica diagnóstica en unidades bovinas*. Cuba: Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Recuperado el siete de Junio de 2016, de <http://www.reduc.edu.cu/147/06/1/14706103.pdf>
- Colloredo, G., Guido, M., Sonzogni, A., & Leandro, G. (2003). Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *Journal of Hepatology*, 39 (2), 239-244.
- Consejo Nacional de Política Económica Social. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación. CONPES Social. (2008). *Política Nacional de Seguridad Alimentaria y Nutricional. PSAN*. Bogotá: CONPES.
- Correa, M. G. P. & Marín, J. M. (2002). O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 85, 125-132.
- Cotrino, V. (2006). *Diagnóstico y tratamiento de la mastitis*. Bogotá, Colombia.
- Cruz, C. A., Estepa, C.E., Hernández, L.J.J. & Sanabria, V.J.P. (2007). Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. *Actual Divulgación Científica*, 1, 81-91.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 460-470.
- Decimo, M., Silveti, T. & Brasca, M. (2016). Antibiotic resistance patterns of gram-negative psychrotrophic bacteria from bulk tank milk. *Journal of Food Science*.
- Declaración Universal de los Derechos Humanos, el Pacto Internacional de Derechos Económicos, Sociales y Culturales*. (1948)
- Definición de Estreptococo Grupo B*. (s.f.). Recuperado el siete de Junio de 2016, de http://www.groupbstrepinternational.org/espanol/info_main_e.html
- Dinsmore, R. P. (2002). Biosecurity for mammary diseases in dairy cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 18(1), 115-131.

- Duarte, R.S., Miranda, O., Bellei B.C., Brito, V.& Teixeira, L.M. (2004). Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *Journal Clinical Microbiology*, 42, 4214-4222.
- Edwards, M.S. & Nizet, V. *Group B streptococcal infections. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* (7th ed.). Philadelphia:Elsevier.
- Elías, O. A., Cortez, A., Brandão, P.E., Costa da Silva, R.& Langoni, H. (2011). Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 34-38.
- Elmoslemany, A. M., Keefe, G.P., Dohoo, I.R., Wichtel, J.J., Stryhn, H.& Dingwell, R.T. (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine*, 95(1-2), 32-40.
- Enciclopedia Wikipedia. (2011). Objetivos de la investigación de tipo descriptiva. Recuperado el siete de Junio de 2016, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Investigaciondescriptiva>.
- Enciclopedia Wikipedia. (2015). Corioamnionitis. Recuperado el siete de Junio de 2016, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Corioamnionitis>.
- Enciclopedia Wikipedia. (2016). Streptococcus_agalactiae. Recuperado el siete de Junio de 2016, de https://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_agalactiae
- Espitia-De La Hoz, F. J. (2008). Diagnóstico y tratamiento de la corioamnionitis clínica. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(3), 231–237.
- Estévez, J. N. R., Botero, J. E. R., Ruiz-Cortés, Z. T.& Ángel, M. O. (2011). Detección de riesgos de contaminación con microbios ambientales en un sistema de ordeño mecánico de un hato lechero del norte de Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(121), 8-15.
- Estuningsih, S., Soedarmanto, I., Fink, K., Lammler, C & Wibawan, W. T. 2002. Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia. *Journal Veterinary Medicine*, 49(4), 185-187.
- Facklam, R. R. & J. A. Washington II. 1991. *Streptococcus* and related catalase- negative gram-positive cocci, p. 238–257. En: Balows, A., Hausler, W. J., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D. & Shadomy, H. J. (ed.). *Manual of clinical microbiology*(5th ed). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

- FAO, C. M., & Nutrición, O. D. E. E. (1976). *Estrategias alimentares y nutricionales en el desarrollo nacional; 9º informe*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Faría, J. F., Valero-Leal, K., D'Pool, G., García, U. A., Allara, M. & Morales, D. (2005). Agentes bacterianos y contaje de células somáticas en leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica en cuatro fincas lecheras del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 4(1), 64-71.
- Farnsworth, R. J. (1993). *Examen microbiológico de la leche de tanque*. Aprocal.
- Fedegan. (2009). *Lo que usted necesita saber sobre la leche*. Fondo Estabilización de Precios FEP. Recuperado el siete de Junio de 2016, de http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/page/portal/pg_servicios/coyuntura_lechera/lo_que_usted_necesita_saber_cartilla.pdf
- François, S., Limansky, A., Toresani, I., Ebner G., Viale A., & Sutich, E. (2001). Caracterización de *Streptococcus* causantes de mastitis bovina en Argentina mediante métodos fenotípicos y genotípicos. *Veterinaria México*, 32(4), 305-310.
- Gallegos, A., & Moncada, J. N. (2011). *Uso de extractos de semillas de cítricos para el control de la mastitis bovina*. Recuperado el siete de Junio de 2016, disponible en <http://www.actaf.co.cu/produccion-organica/4430-uso-de-extractos-de-semillas-de-c%C3%ADtricos-para-el-control-de-la-mastitis-bovina.html>.
- Garnica García, M. L. D. (2013). *Estudio bacteriológico de la leche de tanque de rebaños ovinos y caracterización de cepas de cocos gram-positivos catalasa-negativos y de Mycoplasma agalactiae*. Tesis Doctoral Universidad de León – España. Recuperado el siete de Junio de 2016 de https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3014/tesis_0ed29f.PDF?sequence=1.
- Giménez, M., Sanfeliu, I., Sierra, M., Dopico, E., Juncosa, T., Andreu, A... Bosch, J. (2014). Evolución de la sepsis neonatal precoz por *Streptococcus agalactiae* en el área de Barcelona (2004-2010). Análisis de los fallos del cumplimiento del protocolo de prevención». *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Gómez, C. A. (2013). Calidad composicional e higiénica de la leche cruda recibida en industrias lácteas de Sucre, Colombia. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2).

- Gonzalo, C. J., Baro., A., Carriedo, J. A. & San Primitivo, F. (1993). Use of the Fossomatic method to determine somatic cell Counts in Sheep Milk. *Journal Dairy Science*, 76, 115-119.
- Gonzalo, C. J. A., Tardáguila, F. de la Fuente & San Primitivo, F. (1998). Optimización de las estrategias de disminución del recuento celular ovino: Programas de control a nivel poblacional. En: El Recuento de Células Somáticas en la leche de oveja. *Ovis*, 56, 55-70.
- Hannoun, A., Shehab, M., Khairallah, M. T., Sabra, A., Abi-Rached, R., Bazi, T., ... & Matar, G. M. (2010). Correlation between group B streptococcal genotypes, their antimicrobial resistance profiles, and virulence genes among pregnant women in Lebanon. *International journal of microbiology*, 2009.
- Herrera, M. F. (2001). *Aislamiento de Streptococcus agalactiae de lecherías de la octava región y su estudio mediante la técnica PCR*. Tesis de pregrado. Universidad de Concepción. Facultad de Medicina Veterinaria, Chile.
- Hills, J. (1991). *Unravelling housing finance: Subsidies, benefits, and taxation*. Oxford: University Press.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2004). *Microorganismos de los alimentos: análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*. Zaragoza (España): Acribia.
- Jayarao, B.M., Donaldson, S.C., Straley, B.A., Sawant, A.A., Hegde, N.V. & Brown, J.L. (2006). A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2451-2458.
- Kawata, K., Anzai, T., Senna, K., Kikuchi, N., Ezawa, A. & Takahashi, T. (2004). Simple and rapid PCR method for identification of *streptococcal* species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 57-64.
- Keefe, G.P., Dohoo, I.R. & Spangler, E. (2000). Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island. *Journal Dairy Science*, 80(3), 464-470.
- Lalezari, J. P., Holland, G. N., Kramer, F., McKinley, G. F., Kemper, C. A., Ives, D. V., & Jaffe, H. S. (1998). Randomized, controlled study of the safety and efficacy of intravenous cidofovir for the treatment of relapsing cytomegalovirus retinitis in

- patients with AIDS. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 17(4), 339-344.
- Las Heras, A., Vela, A. I., Fernández, E., Legaz, E., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J.F. (2002). Inusual Outbreak of Clinical Mastitis in Dairy Sheep Caused by *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(3), 1106 -1108.
- Lee, S. H. I., Mangolin, B. L. C., Gonçalves, J. L., Neeff, D. V., Silva, M. P., Cruz, A. G., & Oliveira, C. A. F. (2014). Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1812-1816.
- Libster R., E. K. M., Levent, F., Edwards, M.S., Rench, M.A., Castagnini, L.A., Cooper, T.... Shah, P. E. (2012). Long-term outcomes of group B streptococcal meningitis. *Pediatrics*, 130, e8'15
- Lindahl, G., Stalhammar, M., & Areschoug, T. (2005). Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 102-127.
- Lucas, V. & Lucas, M. (2011). *Análisis de leche de tanque, una herramienta útil para el monitoreo de mastitis y calidad de leche*. Universidad del Salvador.
- Magariños, H. (2000). Producción higiénica de la leche cruda. *Guatemala: Producción y Servicios Incorporados*, 6. Recuperado el siete de Junio de 2016 <http://portal.oas.org/LinkClick.aspx?fileticket=wlyuTwR3IEc%3D&tabid=585>
- Magariños, Haroldo. 2000. *Producción higiénica de la leche cruda. Una guía para la pequeña y mediana empresa*. Guatemala: Producción y Servicios Incorporados.
- Martínez, G., Harel J., Higgins, R., Lacouture, S., Daignault, D. & Gottschalk, M. (2000). Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates of Bovine and Human Origin by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 71-78.
- Medrano, J. F., Aguilar-Córdova, E. (1990). Genotyping of bovine k-casein loci following DNA sequence amplification. *Biotechnology*, 8, 144-146.
- Meiri-Bendek, I., E., Lipkin, A., Friedmann, G., Leitner, A., Saran, S., Friedmann & Kashi, Y. (2002). A PCR-Based Method for the Detection of *Streptococcus agalactiae* in Milk. *Journal Dairy Science*, 85(7), 1717-1723.

- Mellor, H. & Parker, P. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochemistry Journal*, 332, 281-292.
- Méndez, V.M.& Osuna, L.E. (2007). *Caracterización de la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda en algunos sistemas productivos de la región del alto del Chicamocha (Departamento de Boyacá)*. Universidad de la Salle, Bogotá. D. C.
- Meyer, R., Luthy, J.& Candrian, U. (1991). Direct detection by polymerase chain reaction (PCR) of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. *Letters in Applied Microbiology*, 13, 268–271.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2010, Febrero). Leche. *Boletín de Análisis por Producto*, 6.
- Ministerio de Agricultura. (2011). Decreto 1880 de 2011. Preservación de la leche como alimento nutricional en Colombia. Bogotá: El Ministerio.
- Ministerio de Agricultura. (2014). Decreto Nacional 539 de 2014. Preservación de Alimentos nutricionales en Colombia. Bogotá: El Ministerio.
- Ministerio de la Protección Social (2011). *Decreto 1880 de 2011, por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional*. Bogotá: El Ministerio.
- Ministerio de la Protección Social y otros. (2004). *Lineamientos para una Política de Inocuidad Agroalimentaria*. Bogotá: El Ministerio.
- Ministerio de Protección Social. (2006). *Decreto Número 616 de 2006. Por el cual se expide el Reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche cruda para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país*. Bogotá: El Ministerio.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2014). *Decreto número 539 de 2014, Por el cual se expide el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los importadores y exportadores de alimentos para el consumo humano, materias primas e insumos para alimentos destinados al consumo humano y se establece el procedimiento para habilitar fábricas de alimentos ubicadas en el exterior*. Recuperado el siete de Junio de 2016, de https://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=96&Itemid=142

- Moreno, F., Martínez R., G., Méndez, V. M., Osuna, L. E. & Vargas, M. R. (2007). Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (Departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria*, 14, 61-83.
- National Mastitis Council. (1999). Laboratory handbook on bovine mastitis. Wisconsin: National Mastitis Council.
- Neder, V., Signorini, M. L.; Cuatrin, A., Gianre V. & Calvino, L. F. (2014). Prevalencia de bacterias patógenas de mastitis bovina en leche de tanque de frío y evaluación de medios de cultivo para el recuento y la identificación de *Staphylococcus aureus*. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias*, 13, 1-2.
- Oliver, S. P., Murinda, S. E., Krause, D. O., & Hendrick, S. (2011). Milk and raw milk consumption as a vector for human disease. *Zoonotic Pathogens in the Food Chain*, 99-118.
- Orona-C., F., Pecina-Q., V., Rocha-Peña, M. A., Cadena-Hinojosa, M. A., Martínez de la Vega, O. & Almeyda-León, I. H. (2006). Caracterización molecular de genotipos comerciales y elite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México. *Agricultura Técnica en México*, 32(2), 171-180.
- Ortiz Ramírez, T. A. (2014). *Evaluación de la calidad higiénica, sanitaria e inocua, de la leche de tanque en hatos lecheros del Oriente y Norte de Antioquia*. Tesis de grado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Colombia.
- Rojo, Patricia, Araya, Pamela, Martínez T, M Angélica, Hormazábal, Juan Carlos, Maldonado, Aurora, & Fernández, Jorge. (2008). Caracterización molecular en aislados chilenos de *Streptococcus agalactiae*. *Revista médica de Chile*, 136(5), 606-612. Recuperado en 07 de junio de 2016, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872008000500009&lng=es&tlng=es. 10.4067/S0034-98872008000500009.
- Pereira, M. G., Lee, M., Bramel-Cox, P., Woodman, W., Doebley, J. & Whitkus, R. (1994). Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome*, 37(2), 236-243.

- Phuektes, P., Mansell, P. & Browning, G.F. (2001). Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84, 1140–1148.
- Picard, F.K.D., Boudreau, D., Boissinot, M., Huletsky, A., Richard, D., Ouellette Poppert, S. Spellerberg, B. (2009). Rapid identification of beta-hemolytic streptococci by fluorescence in situ hybridization (FISH). *International Journal of Medical Microbiology*, 299, 421–426.
- Poyart, C., Pellegrini, E., Gaillot, O., Boumaila, C., Baptista, M. & Trieu-Cuot, P. (2001). Contribution of Mn-Cofactored Superoxide Dismutase (SodA) to the Virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity*, 69(8), 5098-5106.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D. & Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, 28(3), 465-471.
- Ramírez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B. & Benjumea, J. (2001). Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1), 76-87.
- Ramírez, N., Palacio, L. G., Cerón, J.M. & Jaramillo, M.G. (2011). *Mastitis en Manual sobre prácticas en producción lechera enfocada al control de la mastitis*. Medellín, Colombia: Fondo Editorial Biogénesis.
- Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M. P., Prado, E. E., Pérez, M. A., Otero, J. L., & De Guevara, O. L. (1997). Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2), 142-157. Recuperado el siete de Junio de 2106, de http://www.cnl.org.co/index.php?option=com_remository&Itemid=&func=fileinfo&id=473
- Rentaría, A.M., Eguiarte, L. E., Souza, V. & Aguirre, X. (Eds.). (2007). *Breve revisión de los marcadores moleculares*. México: Ecología Molecular, Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.

- República de Colombia. (1991). *Constitución Política de Colombia*. Bogotá: Legis.
- Revista de Salud Animal. (2007). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. México.
- Richard, G.M., Olde, R., Herman, W., Barkema, S., Veenstra, D. E., Poole, R., Dingwell, T. & Gregory P., K. (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Canadian Veterinary Journal*, 47(6), 567–572.
- Rincón Ricote, M. I. (2010). Corioamnionitis histológica y morbilidad neonatal: Aproximación al síndrome de respuesta inflamatoria fetal. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 75(3), 172-178. Doi:10.4067/S0717-75262010000300005.
- Rodríguez Martínez, G. (2006). Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 12, 35-55.
- Rodríguez-Granger, J, Alvargonzalez, J. C., Berardi, A., Berner, R., Kunze, M., Hufnagel, M... Puertas A., R. F. M. Prevention of group B streptococcal neonatal disease revisited. The DEVANI European project. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 31, 2097–2104
- Rojas, F. A. & Ramírez, J. F. (2009). Determinación de las principales causas de contaminación y proliferación bacteriana en la leche producida por pequeños ganaderos del municipio de Rionegro, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 22(3), 369-381.
- Royo, P., Araya, P., Martínez, P., Hormazábal, J. C., Maldonado, A. & Fernández, J. (2008). Caracterización molecular en aislados chilenos de *Streptococcus agalactiae*. *Revista Médica de Chile*, 136, 606-612.
- Rosales Zambrano, D. & Torres, Y. (2015). *Identificación bacteriana empleando PCR-DG-GE en leche de vacas con mastitis de un rebaño mestizo gyr-holstein del municipio Obispo Ramos de Lora, Mérida, Venezuela*. (Tesis) Universidad de los Andes, Venezuela.
- Salazar, J. D. (2 de Febrero de 2013). El sector lechero. *Diario La República*.
- Schlegel, L., Grimont, F., Grimont, P.A. & Bouvet, A. (2003). Identification of Major Streptococcal Species by rrm-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 657-666.

- Sewalem, A., Kistemaker, G.J., Miglior, F. & Van Doormaal, B.J. (2006) Analysis of inbreeding and its relationship with functional longevity in Canadian dairy cattle. *Journal Dairy Science*, 89, 2210-2216.
- Shome, B. R., Bhuvana, M., Mitra, S. D., Krithiga, N., Shome, R., Velu, D.... Rahman, H. (2012). Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. *Tropical Animal Health Production*, 44(8), 1981-92.
- Soltys, J.& Quinn, M. T. (1999). Selective Recruitment of T-Cell Subsets to the Udder during *Staphylococcal* and *Streptococcal* Mastitis: Analysis of Lymphocyte Subsets and Adhesion Molecule Expression. *Infection and Immunity*, 76, 6293-6302.
- Stansfield, C. W.& Kenyon, D. M. (1992). Research on the comparability of the oral proficiency interview and the simulated oral proficiency interview. *System*, 20(3), 347-364.
- Street, N. W. (2003). *Capítulo 3: Manejo adecuado de la leche*. Recuperado el siete de Junio de 2016, de http://www.science.oas.org/oea_gtz/libros/la_leche/le_html/cap3_leche.
- Suzanne Cote, A. & Chisholm, M. D. Corioamnionitis. *NYU Langone Medical Center*.
- Tenhagen, B.A., Koster, G., Wallmann, J.& Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg Germany. *Journal Dairy Science*, 89, 2542-2551.
- Thompson, J.R., Everett, R.W. & Hammerschmidt, N.L. (2000b). Effects of inbreeding on production and survival in Holsteins. *Journal Dairy Science*, 83, 1856-1864
- Thompson, J.R., Everett, R.W. & Wolfe, C.W. (2000a). Effects of inbreeding on production and survival in Jerseys. *Journal Dairy Science*, 83, 2131-2138.
- Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A. J. & Lee, J. C. (2000). Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus spp.* from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2998-3003.
- Trujillo, C., Gallego, A. F., Ramírez, N.& Palacio, L. G. (2011). Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24, 11-18
- Valero, L., & Kutchynskaya, J. (2012). *Caracterización, capacidad enterotoxigénica y resistencia a antibióticos de cepas de Staphylococcus aureus aisladas de leche y queso*

- en tres municipios del estado Zulia*. Revista Científica, vol. XXI, núm. 3, mayo-junio, 2011, pp. 202-210
- Vásquez, J. F., Loaiza, E. T. & Olivera, M. (2012). Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Orinoquía*, 16(2), 13-23.
- Velasco-Bolaños, J., Cobo, C., Duque, P. C., Villa, N. A., Lasso, L., & Ceballos, A. (2014). *Prevalencia y Factores de Riesgo para Streptococcus agalactiae en Tanques de Leche en el Departamento de Caldas, Colombia*.
- Verani, J. R., McGee, L., Schrag, S.J. (2010). Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recommendations and Reports*, 59(RR-10), 1–32.
- Wellenberg, G.J., Van der Poel, W. H. M. & Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 27 – 45
- Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B. & Zschock, M. (2004). *Mastitis bovina, prevención, diagnóstico y tratamiento*. Guadalajara, Jalisco: Universitario.
- Yang, S. & Rothman, R.E. (2004). Review: PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infectious Disease*, 4, 337–48.
- Zadoks, R.N., González, R.N., Boor, K.J. & Schukken, Y.H. (2004). Mastitis-Causing Streptococci Are Important Contributors to Bacterial Counts in Raw Bulk Tank Milk. *Journal of Food Protection*, 67(12), 2644-2650.