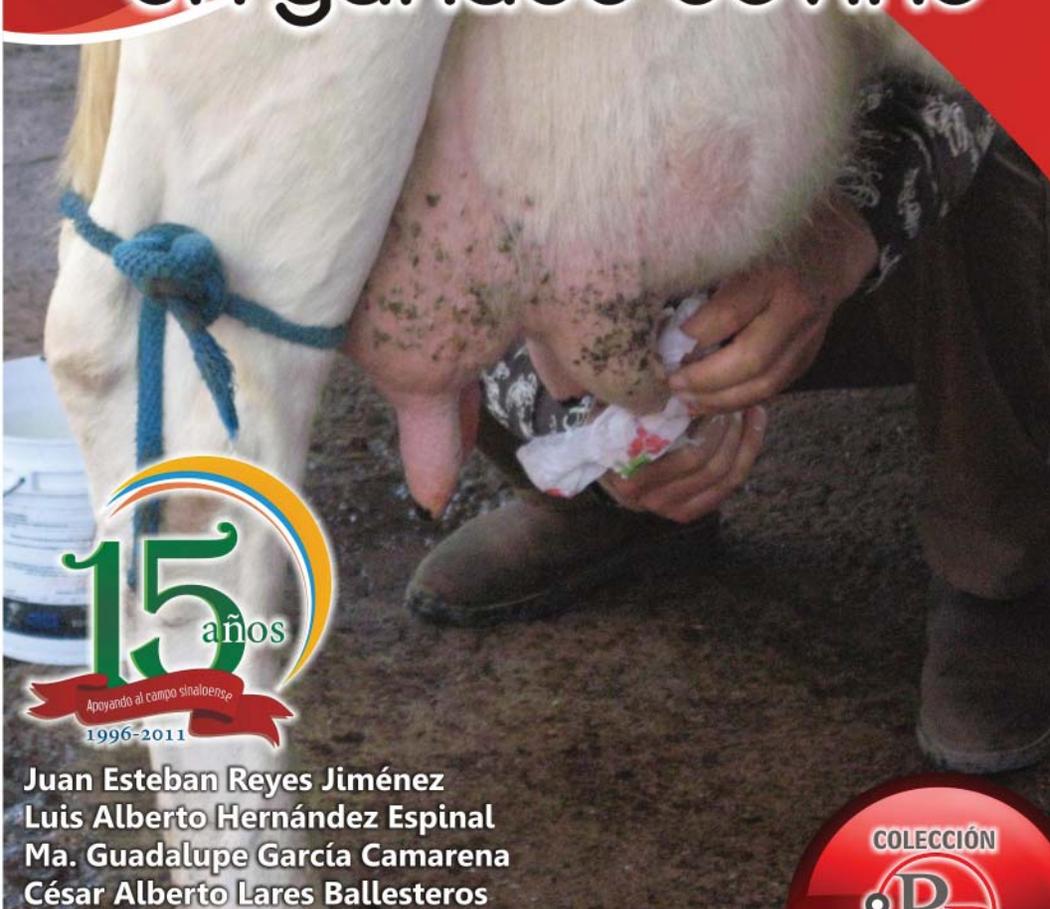


**FUNDACIÓN
PRODUCE**
Sinaloa A.C.
ENLACE, INNOVACIÓN Y PROGRESO



GOBIERNO
DEL ESTADO
DE SINALOA

Control de la mastitis en ganado bovino



Juan Esteban Reyes Jiménez
Luis Alberto Hernández Espinal
Ma. Guadalupe García Camarena
César Alberto Lares Ballesteros



RESULTADOS DE PROYECTOS

Control de la mastitis en ganado bovino

Juan Esteban Reyes Jiménez*
Luis Alberto Hernández Espinal*
Ma. Guadalupe García Camarena*
César Alberto Lares Ballesteros**

* Investigadores del Campo Experimental Valle de Culiacán del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

** Técnico Prestador de Servicios Profesionales Pecuarios del municipio de Mazatlán.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
Mastitis	7
Mastitis subclínica	8
Mastitis clínica/mastitis aguda	9
Las pérdidas causadas por mastitis	9
MICROORGANISMOS CONTAGIOSOS DE MASTITIS ASOCIADOS A LA UBRE	9
UTILIDAD DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	9
PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS	12
Toma antiséptica de muestras de leche.....	12
Preparación de los pezones	13
Toma de la muestra	13
Conservación y manejo de las muestras.....	13
Conservación.....	13
Preparación de las muestras.....	14
Preincubación de las muestras de leche.....	14
Incubación en agar sangre	15
Incubación en soya tripticasa.....	15
Incubación en Mueller-Hilton	15
Colocación de discos impregnados con antibióticos (sensidiscos).....	16
Lectura de los halos de inhibición	16
Interpretación de los resultados	16
POSIBLES CAUSAS DE LIMITACIÓN EN LA PRUEBA	17
IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS ESPECÍFICOS O ESPECIES DE AGENTES	
PATÓGENOS DE MASTITIS.....	18
ANÁLISIS DE LOS SERVICIOS A GANADEROS.....	21
BIBLIOGRAFÍA	24

INTRODUCCIÓN

En Sinaloa, la producción semiintensiva de leche de ganado bovino tiene problemas zoonosarios que afectan la productividad de los sistemas de producción de doble-propósito, la mastitis subclínica constituye el mayor problema en ganado cuyo principal propósito es la producción de leche, con lo que se ocasionan graves pérdidas económicas.

El sur de Sinaloa aporta una producción de leche de alrededor de 100 mil litros por día, producida por más de 500 ganaderos, con hatos de 50 a 100 animales, con diferente grado de encastamiento de la raza Holstein.

Mastitis

La mastitis es una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero, y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; ocasiona pérdidas económicas



Figura 1. Muestreo de leche para el diagnóstico de mastitis con la prueba California.

muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo, debido a la disminución en el rendimiento de leche y un aumento en el número de tratamientos clínicos y desecho temprano de vacas, por lo que se ha reconocido, durante algún tiempo, como la enfermedad más costosa en los hatos lecheros.

La mastitis bovina, normalmente, se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica. Es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no. Una inflamación intramamaria está asociada con un aumento en el conteo de células somáticas (CCS) en la leche. Sin embargo, la magnitud del aumento en el conteo de células somáticas varía de acuerdo a la bacteria involucrada en la infección intramamaria.

El término mastitis se deriva de las palabras griegas *mastos* que significa “pechos”, e *itis* que quiere decir “inflamación de”. La inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche en la ubre a una lesión traumática o la presencia de microorganismos infecciosos u otros agentes que han ingresado a la ubre. El propósito de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar el agente ofensivo, reparar los tejidos dañados y retornar la glándula a su función normal.

La mastitis causa entre 40 y 50 % de disminución en los márgenes económicos netos por vaca, con la mayor parte de estas pérdidas debidas entre 5 y 7 % por disminución en la cantidad de leche por lactancia. Las estimaciones de las pérdidas causadas por un menor rendimiento fluctúan de 100 a 500 kilogramos por vaca por lactancia. Cuando las mastitis clínicas ocurren, los gastos adicionales se presentan por: eliminación de leche anormal, las compras de medicinas y los honorarios por la atención veterinaria.

Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es una inflamación de la ubre sin síntomas externos reconocibles. El contenido de células somáticas está elevado en dos de tres muestreos (con un intervalo de una semana) y se observa la presencia de patógenos de mastitis, la composición química de la leche está alterada. En el establo lechero la determinación del contenido de células al inicio del ordeño, se puede hacer con la prueba celular de la leche [Prueba California para Mastitis¹ (CMT, por sus siglas en inglés)

¹ Prueba California para Mastitis (CMT): es usada como una prueba filtro para detectar altas cuentas celulares en la leche. La cuenta es usualmente alta en vacas frescas y vacas secas. Una prueba California positiva no indica necesariamente una infección bacteriana.

o prueba de Schalm]. Este es un método indirecto muy confiable para determinar el contenido celular.

FUNCIONAMIENTO FISIOLÓGICO DE LAS CÉLULAS LÁCTEAS

La leche contiene células somáticas, que en una glándula mamaria sana solo se presentan en cantidades pequeñas. En este caso, se trata de células de tejidos (células epiteliales) y de células de defensa (granulocitos, polimorfonucleares, neutrofilos, macrófagos y linfocitos). La importancia biológica de las células somáticas estriba en la intervención en la defensa contra infecciones de la ubre. En enfermedades y estimulaciones de la glándula mamaria aumenta el contenido de células en la leche, asimismo el contenido de células sanguíneas de defensa aumenta considerablemente.

Mastitis clínica/mastitis aguda

La mastitis aguda se observa con síntomas claros de una inflamación de la ubre, hay temperatura elevada, con dolores e inflamación. La leche está muy alterada microscópicamente y con frecuencia los animales presentan fiebre.

Las pérdidas causadas por mastitis

- a) En los casos de mastitis clínica:
 - Pérdida por baja producción del animal enfermo.
 - Pérdida de producción por la duración de la eliminación del medicamento.
 - Frecuentemente hay un perjuicio duradero en el rendimiento de la vaca.
 - Costos de medicamentos y del médico veterinario.
 - Aumento en los costos de la mano de obra.

- b) En los casos de mastitis subclínica:
 - Una considerable reducción en la producción diaria de leche.
 - Cambios importantes en la composición de la leche (cuajado del queso).
 - Se perjudica el valor higiénico de la leche.
 - Los daños causados a través de la mastitis subclínica son mucho mayores, ya que esa forma de mastitis es 20 a 50 veces más frecuente que la mastitis clínica.
 - Además de los altos costos financieros para el ganadero, la mastitis tiene una gran importancia en el valor higiénico de la leche y de sus subproductos.

Debido a lo siguiente:

- Algunos agentes causales de mastitis son patógenos en humanos.
- Puede haber residuos de antibióticos o químicos en la leche por el tratamiento de la ubre.
- El consumidor exige que la leche provenga de animales sanos.

Para la industria de lácteos son muy significativas las transformaciones causadas a la leche por la mastitis. El tiempo de cuajado aumenta en el caso de producción de queso y la cantidad de queso disminuye considerablemente.

MICROORGANISMOS CONTAGIOSOS DE MASTITIS ASOCIADOS A LA UBRE

La mastitis puede ser causada por, al menos, 135 agentes diferentes, principalmente bacterias, las cuales pueden ser patógenas o de origen ambiental. Entre las bacterias que con mayor frecuencia causan esta infección se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. Como factores ambientales determinantes se encuentran: la ubicación del ganado (estabulado o en pastura); la ausencia del control de moscas; hacinamiento; malas prácticas de ordeño; estación climática caliente; y malas condiciones de mantenimiento.

Estos agentes contagiosos pueden, a largo plazo, únicamente sobrevivir en la ubre. Por ello es la glándula mamaria el reservorio principal para los agentes contagiosos que salen al exterior en la leche.

El contagio se efectúa principalmente en la ordeña, de un cuarto a otro, de una vaca a otra y son transmitidos principalmente de la siguiente forma:

- Mediante la mano del ordeñador.
- A través de aerosoles de la leche.
- Mediante las toallas para secar la ubre.
- Mediante el equipo de ordeño.

UTILIDAD DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las bacterias pueden presentar una natural resistencia a los antibióticos (por ejemplo, *Escherichia coli* siempre es resistente contra la penicilina). También se sabe que existen genes mutantes que pueden inducir resistencia al ser traspasados entre las bacterias y transformando a las bacterias sensibles en resistentes, ocurriendo este fenómeno por mala dosificación del antimicrobiano o antibiótico (solamente uno o dos días de tratamiento, dosis sin calcular el peso real del cuerpo de una vaca, etc.), elección errónea del mismo (poner penicilina a una mastitis por coliformes o a un *Staphylococcus* ya reconocido como resistente a la penicilina).

Las Pruebas de Sensibilidad o Pruebas de Resistencia (también llamados antibiogramas) orientan el tratamiento de las mastitis, bajo la supervisión de un veterinario clínico. El fundamento de un antibiograma consiste en la cantidad de un antibiótico que es capaz de inhibir totalmente el crecimiento de un microorganismo en ciertas condiciones.

El antibiograma es una técnica de estudio *in vitro*² de la actividad de los antimicrobianos sobre un microorganismo determinado. La valoración de dicha actividad constituye una de las bases fundamentales para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas, ya que orienta en la selección de antibióticos que se han de utilizar en un enfermo en el que se conoce el agente causal de la infección, mediante el establecimiento de una predicción de la respuesta terapéutica, que se obtiene a través del análisis de datos y conceptos microbiológicos, farmacológicos y clínicos continuamente actualizados.

Los microorganismos pueden clasificarse en:

- Sensibles: cuando la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico para una bacteria se puede conseguir *in vivo*³ con dosis terapéuticas y la experiencia ha demostrado su eficacia.
- Resistentes: cuando el microorganismo no es inhibido por las concentraciones que normalmente se pueden obtener en el sitio de la infección.
- Intermedios: cuando las bacterias se inhiben con concentraciones que no se alcanzan con dosis habituales, pero que pueden alcanzarse con dosis más altas sin que sean tóxicas.

Las mastitis subclínicas son el principal reservorio de patógenos infecciosos mamarios, razón que obliga a conocer y estudiar la distribución de los modelos de sensibilidad que presentan las bacterias productoras de mastitis y que estarán presentes en las muestras de leche de las poblaciones de vacas que se están controlando y tratando por causa de la enfermedad. Solamente de esta forma veterinarios y ganaderos estarán en condiciones de tomar las decisiones estratégicas más efectivas que asegurarán un programa óptimo de uso de los antibióticos más específicos por ser los más efectivos y más baratos para un programa de control de la enfermedad en cada región.

² *In vitro*: técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo.

³ *In vivo*: significa "que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo". En ciencia, *in vivo* se refiere a experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo, por oposición a uno parcial o muerto. Pruebas con animales y los ensayos clínicos son formas de investigación *in vivo*.

PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Toma antiséptica de muestras de leche

Para hacer un examen bacteriológico, es indispensable la toma antiséptica de muestras bajo condiciones adecuadas. Además, es importante obtener cuidadosamente las muestras y trasladarlas en una hielera a baja temperatura.

EQUIPO Y MATERIAL

Los tubos de ensayo deben de estar bien cerrados y con un tapón hermético. Su esterilización debe ser mediante calor o gas. Si la tapa del tubo es de colores diferentes, esto puede ser útil para identificar los diferentes cuartos muestreados. El buen traslado de los tubos se puede realizar en las gradillas⁴ adecuadas.



Figura 2. Muestras de leche para envío a laboratorio.

TOALLAS DE LIMPIEZA

Se deben utilizar toallas de papel desechables, a las cuales se les rocía con una solución de etanol, propanol o isopropanol a concentración de 70 a 80 %.

HIELERA PORTÁTIL

Para el transporte de las muestras de leche del establo al laboratorio se utilizará una hielera hermética portátil.

⁴ Gradilla: utensilio que se utiliza en los laboratorios para mantener verticales y ordenados los tubos de ensayo.

Preparación de los pezones

Antes de tomar las muestras, los pezones deben de ser desinfectados. El lavado de los pezones se hace solamente si existe suciedad. En este caso se utilizará una solución desinfectante de cloro con 20 partes por millón (ppm) o con yodo a concentración de 60 ppm. Enseguida se secará el pezón con una toalla desechable.

Se desechan de 10 a 15 mililitros (mL) de leche de cada cuarto. Enseguida se limpia la punta del pezón y su orificio durante 10 a 15 segundos con una toalla desechable sumergida en alcohol, con esto ocurre la desinfección. Se utiliza una toalla para cada pezón. El pezón más cercano al técnico que toma la muestra es el último que se desinfecta y la primera muestra se toma del pezón más cercano.

Toma de la muestra

Las manos deberán desinfectarse antes de tocar la ubre. El tubo de ensayo debe colocarse de forma horizontal y debe evitarse la entrada de suciedad. La toma de muestra se hace con una presión mínima y de ser posible con una sola presión del pezón. El tubo de muestra debe ser llenado con dos tercios como máximo.

Conservación y manejo de las muestras

Los tubos de ensayo llenos con muestras deben de ser transportados en una gradilla adecuada hacia el laboratorio. Cuando hace mucho calor o existe retraso en el transporte, los tubos deben ser colocados en una hielera con agua y hielo. El procesamiento de la muestra deberá ser hecho inmediatamente después de su llegada al laboratorio. La temperatura de traslado será de 4 a 5 grados centígrados (°C). Deberá evitarse un almacenamiento de la muestra mayor de 24 horas.

Conservación

Las muestras deben ser preservadas en frío más de 24 horas para su investigación bacteriológica después de la toma. Para ello podemos utilizar preparaciones de ácido bórico (H_3BO_3), la concentración adecuada es de 0.5 a 0.6 % en la muestra. Esto se puede lograr también con 5 gramos de H_3BO_3 + 1 gramo de glicerina en 100 mL de agua destilada; de los cuales 1.2 mL de esa solución son suficientes para 10 mL de leche. Para ese propósito existen en soluciones comerciales. Las muestras conservadas de esta forma pueden permanecer 24 horas a temperatura ambiente (20 °C) y otras 24 horas más a 6 °C para enseguida ser analizadas.

Preparación de las muestras

Después de enfriar las muestras, las bacterias se concentran en la capa de grasa. Por ello todos los tubos deben ser cuidadosamente agitados y calentados a una temperatura de 16 a 18 °C.

Inoculación de los medios

En el diagnóstico microbiológico de la mastitis, no se puede hacer un inóculo cuantitativo. Debido a su tamaño y a la superficie sembrada existen las respectivas variaciones de la cantidad de cepas encontradas. Por ello se recomienda, utilizar un inóculo de 0.05 mL, el cual deberá ser sembrado en cuando menos media caja de Petri⁵ [se puede usar una asa con diámetro de 6 milímetros (mm). Una espátula de vidrio o un palillo de vidrio también pueden ser utilizados]. Para la investigación de todas las vacas de un hato, se puede utilizar un inóculo de 0.01 mL en un cuarto de una caja de Petri. Por lo tanto, todas las muestras de leche infectadas y no infectadas contendrán una cantidad baja de microbios. Algunos cuartos infectados pueden, en algunos casos, contener menos de 20 microorganismos patógenos por mililitro; entonces, son necesarias más investigaciones de diferentes muestras del mismo cuarto, esto porta más y mejor información que varias inoculaciones de una sola muestra.

Preincubación de las muestras de leche

En casos de las llamadas mastitis clínicas o subclínicas antisépticas (trastornos de la secreción), ocasionalmente puede ser encontrado el agente patógeno cuando se realiza un preenriquecimiento de la muestra a 37 °C con una duración de 6 a 18 horas antes de ser sembrado en agar sangre⁶. Este tipo de preenriquecimiento puede ser realizado únicamente cuando la muestra ha sido tomada en forma antiséptica. En el caso de la interpretación de las placas de agar sangre, debe tenerse mucha precaución y se hará una toma de muestras de los cuatro cuartos y todos serán enriquecidos. Únicamente en caso de que se presenten microorganismos patógenos en un cuarto sospechoso puede ser

5 Caja de Petri: recipiente de cristal utilizado en laboratorios, formado por dos discos que pueden adaptarse entre sí. La caja de Petri se utiliza generalmente para la separación de los microbios cuyas colonias se desarrollan aisladamente y pueden ser estudiadas con facilidad.

6 El agar sangre es una combinación de un agar base (agar nutritivo) con el agregado de 5 % de sangre ovina, también puede usarse sangre humana, para cultivos en una placa de agar. El agar sangre aporta muchos factores de enriquecimiento. Se usa también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos (que es un factor de virulencia).

diagnosticado con seguridad. Una confirmación del diagnóstico, deberá realizarse mediante la punción de la teta o mediante la investigación de muestras frescas de leche.

Incubación en agar sangre

El agar sangre es el medio de cultivo más adecuado para aislar los agentes causales de mastitis. La diferenciación de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus* spp., se puede hacer bien en este medio. Si al medio se le agrega el 0.1% de esculina⁷ se hace una mejor diferenciación de los *Streptococcus*. La temperatura de incubación varía entre 35 y 37 °C. La lectura de los medios se realiza entre 24 y 48 horas después de haber sido inoculados los medios o se realiza una sola lectura a las 36 horas.

Incubación en soya tripticasa

Tocar con un asa 4 o 5 colonias aisladas del mismo tipo morfológico e inocular en 4 o 5 mL de medio de cultivo, pudiendo ser caldo Mueller-Hilton⁸ o caldo soya tripticasa⁹; se incuba a 35 °C hasta que aparezca una turbidez (que se vea turbio) ligera (generalmente entre 2 y 5 horas). La turbidez se ajusta con solución salina estéril o caldo estéril hasta tener una densidad comparable, con un estándar que corresponde aproximadamente 108 microorganismos por mililitro. La suspensión ajustada del inóculo no debe permanecer más de 15 a 20 minutos antes de proceder a sembrar en la caja de Petri.

Incubación en Mueller-Hilton

Para inocular el agar se utiliza un hisopo estéril de algodón, el cual se humedece con la suspensión, se quita el exceso de caldo presionando y girando el hisopo sobre la pared interna del tubo por arriba del nivel

7 La esculina es un glucósido tóxico que se encuentra en el fruto del castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum*) y en el falso castaño de California (*Aesculus californica*). Los efectos que produce su ingesta son: espasmos, dolor de estómago, diarrea, desorientación e incluso la muerte. Se utiliza en microbiología para preparar un medio de cultivo para bacterias que se llama agar bilis esculina.

8 Agar Mueller-Hinton: este medio de cultivo ha sido recomendado universalmente para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

9 Agar tripticasa soya (TSA): TSA es un medio multiuso, producido por la digestión enzimática de soya y caseína. Es la base de otros tipos de agar, por ejemplo el agar sangre está hecho de TSA enriquecido con sangre. TSA permite crecer muchas bacterias semiafastidas incluyendo algunas especies de *Brucella*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Neisseria*, y *Vibrio*.

del caldo; se estría el medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie de agar, para obtener un inóculo uniforme, se efectúa un último barrido del hisopo sobre el reborde de la caja de Petri y el agar. Cuando el inóculo ha secado (de 3 a 5 minutos) se procede a colocar los discos.

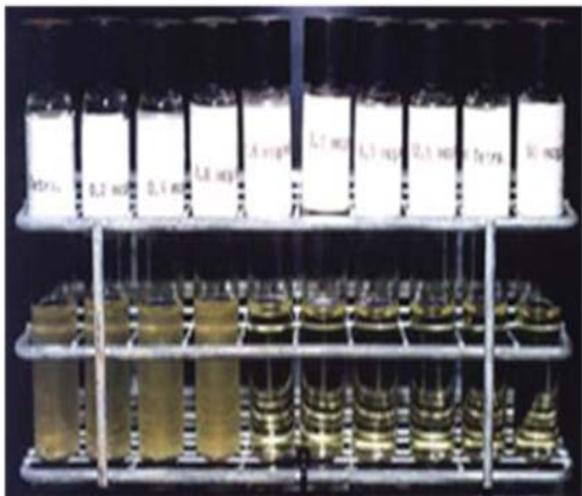


Figura 3. Crecimiento de bacterias en medio soya tripticasa a 37 °C.

Colocación de discos impregnados con antibióticos (sensidiscos)

Los discos se toman con pinza estéril y se colocan en el medio en un tiempo menor de 15 minutos después de haber inoculado la placa; los discos deberán presionarse ligeramente para asegurar un contacto con la superficie, deberá prevenirse una sobreposición de las zonas de inhibición con una distribución adecuada de los discos y con un límite no menor de 15 mm de los bordes de la placa. Después de 15 minutos de haber colocado los discos, invertir la caja de Petri e incubar a 35 °C sin agregar dióxido de carbono (CO₂). El tiempo de incubación es de 16 a 18 horas.

Lectura de los halos de inhibición

La medición de los halos de inhibición se hace con compases de calibración Vernier, regla o plantilla diseñada para este propósito, por el fondo de la caja la cual se ilumina con luz reflejada.

Interpretación de los resultados

Las cepas se clasificarán en Resistentes (R), Intermedias (I) o Sensibles (S), dependiendo del diámetro del halo de inhibición (incluyendo los 6 mm del disco), de acuerdo a la siguiente tabla.

Cuadro 1. Antimicrobiano y diámetro de halo de inhibición en milímetros.

Antimicrobiano	Contenido del disco	<i>E. coli.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
Penicilina	10 µg	-----	-----
Oxacilina	1 µg	-----	18-24
Ampicilina	10 µg	16-22	27-35
Nafcilina	1 µg	-----	16-22
Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10 µg	18-24	28-36
Ampicilina / Sulbactam	10/10 µg	19-24	29-37
Piperacilina / Tazobactam	100/10 µg	24-30	27-36
Ticarcilina / ácido clavulánico	75/10 µg	24-30	29-37
Cefepime	30 µg	31-37	23-29
Cefazolina	30 µg	21-27	29-35

µg: microgramos.



Figura 4. Antibiograma para identificar la sensibilidad del microorganismo causante de la mastitis.

POSIBLES CAUSAS DE LIMITACIÓN EN LA PRUEBA

- Uso de otro medio que no sea el de Mueller-Hinton (MH).
- Preparación inadecuada del medio MH, sobre todo falta de control de pH (acidez).
- Conservación inadecuada de las placas de Petri con el medio Mueller-Hinton.
- Almacenamiento inadecuado de los discos con antibióticos.

- Inóculo inadecuado por error en el ajuste de la densidad del microorganismo en el caldo.
- No eliminar el exceso de líquido del hisopo antes de inocular las cajas.
- Preparación o almacenamiento inadecuado del estándar de referencia para turbidez.
- Tiempo inadecuado entre la preparación del inóculo y la inoculación.
- Tiempo inadecuado en la aplicación de los discos después de la inoculación de la placa.
- Tiempo inadecuado en la incubación de la placa después de la colocación de los discos.
- Temperatura diferente de 35 °C o el uso de atmósfera con aumento de bióxido de carbono en la incubación.
- Lectura de resultados antes de 16-18 horas.
- No leer cuidadosamente los límites de las zonas de inhibición.
- Cultivos mixtos.
- Aplicación del procedimiento a microorganismos de crecimiento lento o anaeróbicos (desprovistos de oxígeno).
- No utilizar cepas de calidad controlada o no anotar los resultados de la prueba de control.
- Error de transcripción al anotar los resultados de pruebas individuales.
- Trabajar en condiciones de esterilidad, en presencia de mechero o en campana de flujo laminar.
- Con pinza estéril, presionar ligeramente los multidiscos para asegurar el contacto con la superficie del medio de cultivo.
- Las placas de Petri deben incubarse solo en posición horizontal.

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS ESPECÍFICOS O ESPECIES DE AGENTES CAUSANTES DE MASTITIS

Staphylococcus aureus

Esta bacteria produce en agar sangre colonias blanco-grisáceas y ocasionalmente doradas, con un diámetro de 3 a 5 mm. Regularmente, se observan zonas típicas de hemólisis¹⁰. La α -hemolisina produce una zona clara con una hemólisis completa, mientras que la β -hemolisina causa una zona clara delimitada con una hemólisis incompleta. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* no son hemolíticas o producen una zona muy estrecha de hemólisis completa, limitada. Los estafilococos

¹⁰ La hemólisis (eritrocateresis) es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes). El eritrocito carece de núcleo y orgánulos, por lo que no puede repararse y muere cuando se desgasta.

formadores de las hemolisinas tienen por lo regular el factor aglutinante y son coagulasa positivos. Las colonias de estafilococos las cuales tienen una zona muy pequeña de hemólisis (1 mm o menos), o que tienen una hemólisis parcial, son por lo regular coagulasa negativos. También esas cepas pueden causar infecciones de la ubre con un número elevado de células somáticas en leche. Los estafilococos son bacterias cocoides gram positivas¹¹ y se agrupan en forma de racimos de uva, observando las bacterias al microscopio.

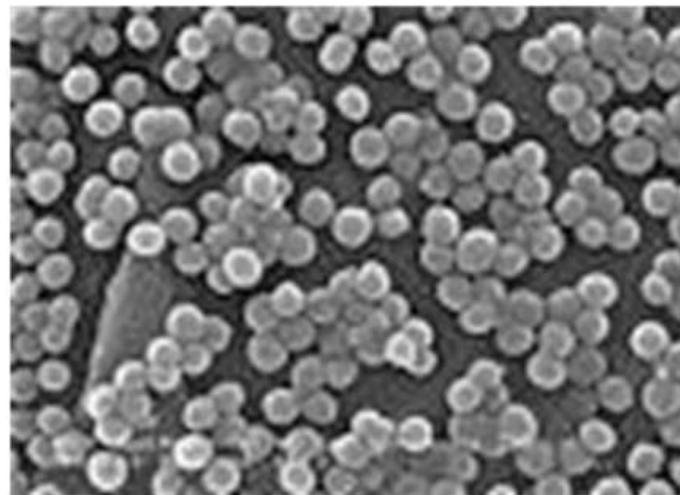


Figura 5. Características propias de *Staphylococcus spp.* al microscopio.

IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

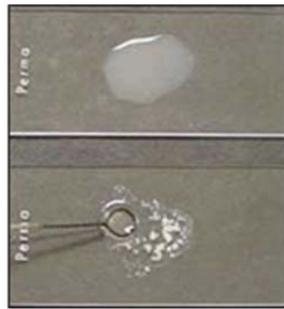
Si se encuentra presente una zona clara de β -hemólisis en el agar sangre no se necesita hacer la prueba de coagulasa o la del factor de aglutinación. En los demás casos se debe hacer, ya sea la identificación del factor de aglutinación, de la coagulasa o se puede hacer una prueba con un *kit* (paquete) comercial que nos ayude a la clasificación de los estafilococos, especialmente de los coagulasa negativos.

LA PRUEBA DEL FACTOR DE AGLUTINACIÓN

A una asa de bacterias que se han tomado de una caja con medio de agar sangre, se le agrega una gota de solución salina fisiológica y esto se mezcla en un portaobjetos con unas gotas de plasma citratado bovino, de cerdo

¹¹ Gram-positivas: bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por acción de la tinción de Gram.

o conejo. La aglutinación significa un resultado positivo. Paralelamente se realiza una prueba control utilizando NaCl (cloruro de sodio) fisiológico.



Formación de coágulo (+)

Figura 6. Prueba de coagulasa en portaobjetos.

PRUEBA DE COAGULASA EN TUBO DE ENSAYO

Se toma una colonia sencilla de un cultivo de 24 horas de incubación, o se pueden tomar 0.02 mL de un cultivo en caldo, esto se mezcla con 1.0 y 3.0 mL de plasma citratado de conejo, de cerdo o de humano (este plasma previamente se diluirá en solución salina fisiológica 1:5). Además, se deben tener dos controles, uno positivo y otro negativo. La incubación se hace en baño María¹² a 37 °C. La coagulación del plasma se observa entre las 3 y 24 horas de incubación.



Figura 7. Prueba de coagulasa en tubo de ensayo.

12 Baño María: forma de preparación que consiste en dejar un recipiente con el alimento en agua hirviendo un determinado tiempo, con el propósito de aplicar calor de esta forma y provocar que cuaje.

Los estreptococos

En el agar sangre los estreptococos forman colonias pequeñas, brillantes, suaves, catalasa¹³ negativas y que están rodeadas de forma diferenciada por zonas de hemólisis (α -hemólisis, β -hemólisis). Existen colonias similares que no pertenecen a los estreptococos. Por ello, la identificación de las colonias de estreptococos se realiza regularmente mediante un subcultivo en un medio líquido y observando las bacterias al microscopio.



Figura 8. Características propias de *Streptococcus* spp. al microscopio.

ANÁLISIS DE LOS SERVICIOS A GANADEROS

En Sinaloa, a partir de las 61 cepas patógenas aisladas se identificaron por sus propiedades bioquímicas y de cultivo, a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Escherichia coli*.

Se aislaron 39 cepas de *Staphylococcus aureus*, por ser la más frecuente, todas las cepas fueron resistentes a penicilina (100 %), asimismo, el mayor porcentaje se detectó en ampicilina (97.43 %), oxacilina (87.87 %), cefalotina (83.33 %), dicloxacilina (83.33 %) y nafcilina (81.81%). Sin embargo, resultó ser sensible a *Enrofloxacin baytril* (83.34 %) y cefepime (78.79 %), como se observa en la Figura 9.

Para el caso de *Streptococcus* spp., se aislaron 18 cepas, el mayor porcentaje de resistencia fue con oxacilina (38.88 %), penicilina (27.77

13 La catalasa es una enzima que se encuentra en organismos vivos y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua.

%), ampicilina (27.77 %) y nafcilina (27.77 %). Resultando sensible a la mayoría de los antibióticos en más de 85 % y en un 100 % resultó ser sensible a enrofloxacin baytril y cefepime.

Finalmente, se aislaron cuatro cepas patógenas bacterianas de *Escherichia coli*, resultando 100 % resistente a penicilina, oxacilina (50 %), nafcilina (50 %) y piperacilina/tazobactam (25 %). Sin embargo, al resto de los antibióticos resultó sensible en 100 %.

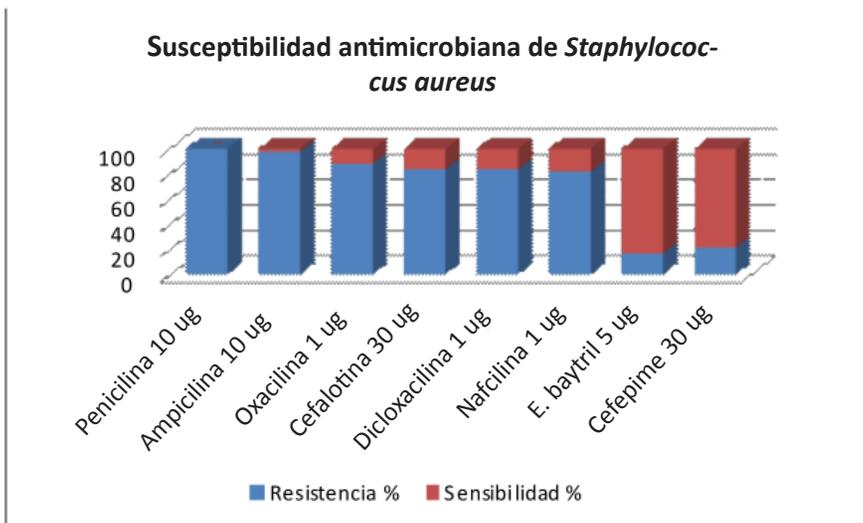


Figura 9. Susceptibilidad antimicrobiana de 39 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica de varios establos en Sinaloa.

Esto significa que probablemente en los establos evaluados se han utilizado con frecuencia los antibióticos antes mencionados para el control de la mastitis, lo cual ha expuesto a las bacterias a una presión de selección alta, lo que ha provocado el desarrollo de resistencia de las bacterias patógenas causantes de la mastitis.

Con base en los resultados se puede concluir que las bacterias patógenas causantes de mastitis bovina en Sinaloa, presentan resistencia a más de un antimicrobiano, siendo recomendable que se realice el antibiograma para cada aislado y que la adquisición de antibióticos se realice a través de receta veterinaria, además realizar un permanente monitoreo de resistencia bacteriana.

Con base en los resultados obtenidos del estudio realizado de investigación hasta enero de 2010 sobre la mastitis bovina en el sur de Sinaloa, se determinó que de las 24 pruebas de sensibilidad

(antibiogramas) en leche, el porcentaje de sensibilidad de diferentes bacterias aisladas de las muestras de leche a distintos antibióticos —viendo para cada germen el porcentaje de sensibilidad a cada uno de los diez antibióticos enfrentados, calculados para Sensibles (S), Intermedios y Resistentes (R), así como el número de gérmenes encontrados— destacan *Staphylococcus aureus* (75 % de los casos) como el agente que más mastitis origina; seguido del grupo de los estreptococos, donde cabe resaltar el 40 % de los casos de *Streptococcus agalactiae*, recordando que la mastitis por este germen se puede erradicar, ya que solo sobrevive dentro de la ubre, por lo que con un tratamiento adecuado (penicilina), se puede controlar.

Ante el resultado de un análisis, donde nos indican el germen aislado y el antibiograma, se deben elegir para aplicar al tratamiento aquellos antibióticos (aplicar a través del canal del pezón) que consten como S (sensibles), en el supuesto de que haya varios; en general se elegirá el más barato y con menos reacciones secundarias, respetando siempre los plazos de espera (3 a 4 días) para entregar la leche a la industria.

Finalmente, cabe señalar que el poco conocimiento que tienen los productores sinaloenses sobre la mastitis bovina (cómo se controla, y lo más importante: cómo se previene), provoca que se esté consumiendo leche de mala calidad o mamitosa, y en ocasiones con residuos de antibióticos en la carne y productos de la leche.

BIBLIOGRAFÍA

Barbosa S., Monardes H., Cue R. 2007. Evaluation of test-day somatic cell count of first lactating Holstein Cows. *Rev. Bras. Zoot.* 36:94-102.

Barry Al. Thornsberry C. Susceptibility test difusión test procedures. En: E. Lennette (Ed.). American Society for Microbiology. Washintong, D.C. pp 978-987, 1985.

Bradley A. 2002. Bovine mastitis an evolving disease. *Vet. J.* 164:116-126.

Ceron Muñoz, M., Tonhati, H., Duarte, J., Oliveira, J., Muñoz Berrocal, M., Jurado Gámez, H. 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85: 2885-2889.

Correa, M. G. P. y Marin, 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.

Dos Santos, J. N., Netto dos Santos, K.R., Gentiline, E., Sordelli, D., de Freire Bastos, M. C. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology.* 85: 133-144.

Djabri, B., Barielle, N., Beaudreau, F., Seegers, H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res.* 33: 335-357.

Giono Cerezo Silvia 1983. Prueba de Bauner Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectología III (7):* 325.

Lammers A., Van Vorstenbosch J., Erkens J., Smith H. 2001. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Vet. Mic.* 80:255-265.

Leigh, J. A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Veterinary Journal.* 157(3): 225 -38.

National Mastitis Council. Current Concepts of Bovine Mastitis 1998. 4th ed. Natl. Mastitis Council, Madison, WI.

Oliver S., Gillspie B., Headrick S., Lewis M., Dowlen H. 2005. Prevalence, risk factors and strategies for controlling mastitis in heifers during the periparturient period. *Intern. J. Appl .Res. Vet. Med.* 3:150-162.

Osteras, O. *et al* 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey. *J.Dairy Sci.* 89:1010-1023.

Oviedo B. J., Valdez A. J., Cajero J. M., Ochoa Z. A., López M J., Bravo P. A., BAaizabala A. V. 2006. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 20:1-11.

Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; Approved Standard, 8 edition, Supplemental Tables pp 20-53, 2003.

Philpot, W.N. y Nickerson, S.C. 1993. Mastitis: El contraataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Publicado por Babson Bros. Co. 1-138.

Reyes, J. J. E., Lares, B. C. A., Martínez A. C. O. 2009. Buenas prácticas de manejo e higiene para obtener leche de calidad. Folleto técnico. INIFAP, México.

Vadillo, S., Píriz, S. y Mateos, E. 2002. Manual de microbiología veterinaria. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. España.

Wolter, W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschöck, M. 2004. Mastitis bovina: prevención diagnóstico y tratamiento. Ed. Universitaria. Universidad de Guadalajara. México.

Wellenberg, G.J., van der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology.* Article 2361.

**FUNDACIÓN
PRODUCE**
Sinaloa A.C.
ENLACE, INNOVACIÓN Y PROGRESO

FUNDACIÓN PRODUCE SINALOA, A. C.

CONSEJO CONSULTIVO ZONA SUR
Carretera a Chametla km 5.6
Tel. (694) 955-00-74
Rosario, Sinaloa, México.

OFICINAS CENTRALES
Gral. Juan Carrasco, No. 787 Nte.
Culiacán, Sinaloa, México.
Tel./Fax (667) 712-02-16 y 46
Correos electrónicos:
direcciongeneral@fps.org.mx
divulgacion@fps.org.mx
En Internet:
www.fps.org.mx



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias



GOBIERNO
DEL ESTADO
DE SINALOA