UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA UNAN-LEÓN

ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIAS



Tesis para optar al título de Médico Veterinario

Caracterización microbiológica de la leche proveniente de vacas con Mastitis Subclínica en fincas de doble propósito del Departamento de León afiliadas a la asociación de Ganaderos de León (ASOGAL) durante el período septiembre-octubre de 2016.

Elaborado por:

Br: Bernaldo Abel Thompson Bello.

Br: Alba Dolores Ingram Oporta.

Tutor: Dr. Migdonio R. Quintanilla Darce. MsC

Cotutor: Dr. Byron Flores Somarriba. MsC, PhD

"A la Libertad por la Universidad."





DEDICATORIA

Esta tesis la dedico en especial a mi **madre Noelia Bello,** que en el transcurso de su elaboración y redacción me brindó su apoyo incondicional y sobre todo deposito su confianza en que podría culminarla.

A la memoria de mi **padre Gabriel Bernardo Thompson** que aunque físicamente no esté conmigo fue pilar fundamental para culminar mi meta. A mis hermanos que siempre me han brindado su apoyado.

Deseo dedicarle también a Dios, dueño de la sabiduría, por darme salud y la capacidad de concluir con este proyecto.

Br. Bernaldo Thompson B.





DEDICATORIA

A **Dios** primeramente. Mi amigo fiel, compañero silencioso de todas mis batallas.

A la memoria de un ser maravilloso que me enseño a querer la vida con todo y sus momentos de oscuridad. Una de las personas más importantes en mi formación no solo profesional sino como ser humano. Porque no muere quien jamás se olvida. Te amare eternamente **tía Frida Ingram H. (R.I.P.)**

A mi **madre Dolores Oporta G**. mujer luchadora e incomparable, quien me inspiró cada día. Mi triunfo es tu triunfo.

A mi **padre Dennis Ingram E.** El héroe de mi vida. Quien creyó en mí desde siempre.

A mis **tíos Ivor Ingram H. y Hellen Ingram H.** a quienes debo la posibilidad de que este sueño se haya hecho realidad; son el mayor tesoro que la vida me ha regalado.

A mis hermanos y resto de familia que de una u otra manera fueron y serán siempre parte de esto.

A mí querido amigo y compañero **Bernaldo Thompson B.** por acompañarme a lo largo del camino, por la paciencia y aprendizaje mutuo.

A mis tutores y amigos que formaron parte de todo este trayecto recorrido por el apoyo y tiempo dedicado.

Br. Alba Ingram O.



*

AGRADECIMIENTO

A Dios, que ha sido guía espiritual y nuestra fortaleza en momentos que consideramos estar solos y quien puso en el camino compañía y manos amigas que permanecieron a nuestro lado aun en los peores momentos.

A nuestros padres, por apoyarnos y motivarnos a ser mejores personas y que en conjunto con los demás miembros de nuestra familia han sido parte de este triunfo.

A nuestros tutores, **Dr. Migdonio Quintanilla D. y Dr. Byron Flores S.**, por dirigirnos en la redacción de esta tesis, y por instruirnos en la búsqueda de la excelencia.

A nuestro querido **Rembrandt Gutiérrez V.** por la paciencia y acompañamiento en la elaboración y análisis de la base de datos de nuestro estudio. Gracias por regalarnos de su tiempo.

A nuestros docentes, que de diferentes maneras durante el transcurso de la carrera nos transmitieron los conocimientos necesarios para convertirnos en profesionales de calidad.

Infinitas Gracias a todos los que permitieron que estos años se convirtieran en una grandiosa experiencia.

Br. Alba Ingram O.

Br. Bernaldo Thompson B.





CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	6
II.	ANTECEDENTES	8
III.	JUSTIFICACIÓN	. 10
IV.	PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	. 11
V.	OBJETIVOS	. 12
VI.	MARCO TEÓRICO	. 13
VII.	MATERIAL Y MÉTODO	. 26
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	. 30
	CONCLUSIÓNES	
Χ.	RECOMENDACIÓNES	. 34
XI.	REFERENCIAS	. 35
XII.	ANEXOS	. 39





I. INTRODUCCIÓN

La importancia del sector pecuario en la economía nacional reside en que representa el 7.3% del Producto Interno Bruto (PIB), mucho más alto que en el resto de los países de Centroamérica¹. Dentro de este, el papel de la industria láctea se ha incrementado en los últimos años. De acuerdo a datos del MAG-FOR, 2013, la producción de leche creció hasta el 4%, alcanzando los 224 millones 800 mil galones².

La producción de leche a nivel nacional reviste una gran importancia por su triple responsabilidad:

- 1. Es un alimento vital para la población
- 2. Genera empleos en fincas e industrias
- 3. Genera divisas³.

De todas las enfermedades que afectan la glándula mamaria de los bovinos y que tiene repercusión sobre la producción lechera, la más importante es la mastitis. Los hatos lecheros que carecen de programas de control de esta enfermedad, sufren grandes pérdidas, ya que el 50% de las vacas están afectadas en mayor o menor grado⁴.

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria de origen infeccioso que puede ser ocasionada por factores traumáticos, mecánicos y biológicos; siendo estos últimos por lo general los desencadenantes de la infección⁴. Una gran variedad de microorganismos han sido involucrados como causales de mastitis bovina, dentro de los que sobresale *Staphylococcus aureus* como el principal agente etiológico por su prevalencia y patogenicidad y al que se le atribuye más del 80% de las infecciones intramamarias⁵.





Existen varios tipos de mastitis, la más frecuente es la subclínica, esta es una forma en la cual no hay signos visibles en la glándula mamaria, pero sí en la producción de leche con el incremento en el número de células somáticas⁴. La presencia de esta enfermedad es perjudicial; ya que desde el punto de vista económico reduce el rendimiento y acorta la vida productiva de las vacas afectadas y constituye un riesgo potencial a la salud pública.

Si bien existe una gran variedad de medidas de control de la enfermedad, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de la mastitis bovina, la mayoría de las drogas microbianas utilizadas son betalactámicos, aminoglucósidos y macrólidos⁶.

Uno de los principales inconvenientes de la terapia con antibióticos es la mala administración y selección, lo cual favorece la aparición de cepas resistentes lo que influye negativamente en el tratamiento de la enfermedad. Otro aspecto desfavorable resulta de la acumulación de residuos de antibióticos en el animal y sus implicaciones en la salud humana⁷.

Dada la necesidad que existe en la industria láctea de mejorar sus índices productivos de manera que pueda abrirse nuevas puertas en la cadena de exportación y conociendo el papel que juega la mastitis bovina como uno de los principales problemas sanitarios que afecta el desarrollo de la competitividad del sector lácteo se hace cada vez más importante profundizar el estudio en cuanto a los principales agentes implicados en esta enfermedad, los perfiles de resistencia que desarrollan frente a la terapia con antibióticos así como los mecanismos individuales de resistencia que posee cada uno.





II. ANTECEDENTES

Berrios y Peralta, 2004, en 4 hatos lecheros de León, Nicaragua, aislaron: *S. aureus* 62%, *S.* coagulasa negativa 37%, *Streptococcus* spp. 6% y *E. coli* 1%. Se evaluó la sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus* y *E. coli*, las cepas de *S. aureus* fueron resistentes a tetraciclina (30%) y penicilina (15%) y del 98 al 100% sensible a Eritromicina, Trimetropim-sulfa, Gentamicina, Ceftriaxone, Oxacilina, en el caso de *E.coli* presentó resistencia frente a todos los antibióticos evaluados a excepción de Ceftriaxone⁸.

Meza, J. E. L. et al. 2006, Universidad Autónoma del Estado de México; determinó la sensibilidad a los antibióticos, los resultados obtenidos fueron: 17 de los aislamientos mostraron resistencia a Ampicilina, Dicloxacilina y Penicilina. En el caso de la Dicloxacilina no se detectaron aislamientos sensibles; sin embargo, 3 de ellos presentaron una sensibilidad intermedia. El 90% de los aislamientos fue resistente a Ceftazidima. Solo el 5% del aislamiento mostró resistencia a Cefuroxima/Lincomicina, Eritromicina y Tetraciclina. Los aislamientos presentaron resistencias múltiples, particularmente a los antibióticos del grupo de las penicilinas con escasas excepciones⁹.

Aguirre, J. y Zeledón, K. 2007, León, Nicaragua, realizaron un estudio sobre aislamiento e identificación fenotípica de *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de Fingerprinter (PHP) a partir de leche bovina afectada con mastitis subclínica en 6 fincas del municipio de León. Obteniendo como resultado *S. aureus* 77.9%, *S. epidermis* 4.4%, 3.8% *Streptococcus* α - hemolítico, 4.4% *Streptococcus* β - hemolítico del grupo A, *Enterobacter* y *Pseudomona* 0.5%¹⁰.





Acuña y Rivadeneira, 2008, Ecuador, identificaron y determinaron las bacterias aisladas de leche con mastitis bovinas, los resultados obtenidos demuestran que la prevalencia de mastitis es mayor en las haciendas donde hay deficiencia en las prácticas de ordeño limpio, (44.6%). *S. aureus* fue la bacteria más frecuente (34.6%), los antibióticos más eficaces contra Gram (-) fueron: Tetraciclina, Enrofloxacina y Neomicina, mientras que los patógenos Gram (+) fueron sensibles principalmente a Amoxicilina más ácido Clavulánico, Enrofloxacina, Tetraciclina y resistente a Cloxacilina¹¹.

Chavarría, S y Meléndez L, 2011, León, Nicaragua. Identificación de agentes bacterianos implicados en mastitis subclínica de vacas que abastecen los centros de acopio del municipio de El Sauce y Tecuaname. Los agentes encontrados fueron *Staphylococcus aureus* (71%), *Klebsiella* spp. (11%), *Staphylococcus* coagulasa negativo (7%), *E.coli* (7%) y con menor presencia *Streptococcus* spp. (4%). De las cepas aisladas el 78.6% presento sensibilidad a Gentamicina, 75% a Oxitetraciclina, 69.2% para Ciprofloxacina, 67.9% a Enrofloxacina, el 35.7% a Cefalexina y Amoxicilina más ácido Clavulánico, un 12.5% a Eritromicina y el 6.3% a la Vancomicina¹².





III. JUSTIFICACIÓN

Nicaragua ha sido exportador neto de productos lácteos desde 1998 hasta la fecha, siendo este rubro el tercero más importante en las exportaciones del país. Sin embargo, para obtener un producto exportable, de calidad e inocuo existen parámetros que determinan la calidad de la leche, los cuales se rigen de acuerdo a las especificaciones establecidas.

En el país, las industrias lecheras y los hatos se rigen por la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense (NTON). De esta manera, se encuentran tres aspectos bien definidos que rigen la calidad de la leche:

- 1. Composición físico-química.
- 2. Cualidades organolépticas.
- 3. Características microbiológicas de la leche.

Estos componentes se ven afectados como consecuencia de la mastitis¹³.

La mastitis es una de las enfermedades de mayor impacto en la actividad lechera a nivel mundial, siendo la mastitis subclínica, la cual pasa desapercibida para el productor, la causante de la mayor parte de las pérdidas. Conocer cuáles son los patógenos bacterianos que están implicados en el desarrollo de esta enfermedad, es de vital importancia, para que el tratamiento que se establezca sea: eficiente, oportuno y concluyente.

El presente estudio está enfocado en determinar la prevalencia de mastitis subclínica en fincas dedicadas a la producción lechera del Departamento de León, así como aislar los principales agentes bacterianos desencadenantes de la enfermedad, conocer y evaluar la resistencia que poseen frente a los principales antibióticos utilizados para el tratamiento de mastitis subclínica bovina.





IV. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las características microbiológicas de la leche proveniente de vacas con Mastitis Subclínica en fincas de doble propósito del Departamento de León afiliadas a la asociación de ganaderos de León (ASOGAL) durante el período septiembre-octubre de 2016?





V. OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar microbiológicamente la leche proveniente de vacas con mastitis subclínica en fincas de doble propósito del Departamento de León, afiliadas a la Asociación de Ganaderos de León (ASOGAL) durante el período septiembre-octubre de 2016.

Objetivos Específicos:

Detectar las vacas con mastitis subclínica utilizando la prueba de california (CMT).

Identificar los principales agentes bacterianos implicados en la mastitis subclínica de las fincas en estudio por medio de análisis microbiológico.

Evaluar el perfil de sensibilidad bacteriana a los antibióticos más utilizados en el tratamiento de la mastitis subclínica mediante el método de difusión en agar (Kirby-Baüer).

Detectar *Staphylococcus aureus* meticilino resistente por medio de métodos fenotípicos empleando discos de Oxacilina (OX 1µg).





VI. MARCO TEÓRICO

Anatomía y Fisiología de la glándula mamaria

La ubre bovina está constituida por cuatro glándulas mamarias, mejor conocidas como cuartos. Cada cuarto es una unidad funcional en sí misma que opera independientemente y drena la leche por su propio canal¹⁴; se encuentra localizada en la región inguinal⁸.

Sistema secretor de leche

La ubre es una glándula exocrina, debido a que la leche es sintetizada en células especializadas agrupadas en los alveolos y luego excretada fuera del cuerpo por medio de un sistema de conductos. El alveolo es la unidad funcional de producción¹⁴.

El pezón forma una especie de ducto ensanchado proyectado a la superficie de cada glándula por medio del cual la leche puede ser extraída de la misma. La punta de la teta se cierra con un anillo de musculo liso o esfínter llamado canal del pezón¹⁴.

Lactogénesis

Usualmente se divide en dos fases denominadas respectivamente fase I y II.

Lactogénesis I

Durante el periodo final de la preñez la glándula mamaria está en capacidad de producir leche, la cual elabora en cantidades mínimas, pero su secreción en forma abundante y copiosa ocurre hasta el momento del parto. A esta **lactogénesis I** se le conoce como el período de la diferenciación citológico- enzimática¹⁵.

Lactogénesis II

Se inicia con la secreción de todos los constituyentes de la leche a partir de los últimos cuatro días antes del parto y se prolonga por unos cuantos días postparto. Se considera la lactogénesis II como la secreción copiosa, que se continúa con la galactopoyesis o mantenimiento de la lactación¹⁵.





Mastitis Bovina

Definición

La mastitis es la enfermedad infecto-contagiosa más común en el ganado bovino. El termino deriva del griego "mastos" ubre e "itis" inflamación. Se define como la inflamación de la glándula mamaria; generalmente se presenta como una respuesta a la invasión por microorganismos patógenos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica. Puede presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño^{3 16}.

Clasificación

SEGÚN ETIOLOGÍA				
Traumáticas	Microbiológicas			
✓ Físicas	✓ Bacterianas			
✓ Químicas	√ Fúngicas			
SEGÚN EF	IDEMIOLOGÍA			
Mastitis Contagiosa	Mastitis Ambientales			
Agente causal tiene como único reservorio	El agente causal se encuentra en el ambiente,			
la glándula mamaria	no en glándula mamaria.			
SEGÚN SIN	TOMATOLOGÍA			
Clínica	Subclínica			
Aguda/crónica:	✓ Ningún signo de inflamación			
✓ Inflamación de la ubre	✓ Leche parece normal			
✓ Leche visiblemente alterada				

Tabla Nº1. Tomado de Berrios y Peralta 2004, modificado por Ingram y Thompson 2016(Nuevos datos en epidemiologia y sintomatología).





Etiología

Los agentes etiológicos más comunes de mastitis son *Streptococcus, Staphylococcus, Coliformes, Corynebacterium pyogenes, Pseudomonas* y levaduras; cabe destacar que existen más de 140 microorganismos diferentes que pueden causar una infección intramamaria¹⁷.

Según la reacción inflamatoria se les ha clasificado en patógenos mayores y patógenos menores. Los patógenos mayores producen una elevación marcada de las Células Somáticas y los menores un aumento leve. Otra clasificación útil es la que los divide en contagiosos, ambientales, oportunistas y otros¹⁷.

Patógenos contagiosos

Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Mycoplasma spp, Corynebacterium spp. Todos ellos colonizan la glándula mamaria y pueden ser propagados por diferentes mecanismos tanto directos como indirectos. Además son los principales causantes de infecciones subclínicas.

Patógenos ambientales

Streptococcus ambientales y coliformes. Todos aquellos que habitan en el medio que rodea al animal y si las condiciones son favorecedoras colonizan la glándula mamaria.

Patógenos oportunistas

Staphylococcus coagulasa negativos (ECN). Normalmente estos microorganismos se encuentran en la piel sana del pezón y en las manos del ordeñador. A menudo son denominados microorganismos oportunistas, ya que habitan zonas donde les es sencillo colonizar el canal del pezón y penetrar hasta los tejidos secretores¹⁷.

Epidemiología

La infección de la glándula mamaria se produce a través del conducto del pezón, a partir de dos fuentes principales de contaminación: la ubre infectada y el medio. Por lo tanto, según su epidemiología las mastitis pueden clasificarse como contagiosas o ambientales¹⁸.





RESERVORIOS Y FORMA DE CONTAGIO DE DIFERENTES GRUPOS ETIOLÓGICOS PRODUCTORES DE MASTITIS.

Grupos etiológicos	Reservorio	Forma de contagio		
Staphylococcus aureus	Ubre infectada	Ordeñadora, manos, otros materiales		
Streptococcus agalactiae	Ubre infectada	Ordeñadora, manos y otros materiales		
Arcanobacterium pyogenes	Ubre infectada, camas	Moscas		
Streptococcus uberis	Camas	Preparación de ubres y reposo		
Pseudomonas	Agua	Reposo		
Enterobacterias	Camas	Preparación de ubres		
Mycoplasma	Ubre infectada	ordeñadora		
Levaduras	Ambiente	Tratamientos		
Corynebacterium bovis	Ubre infectada	Mala desinfección		

Tabla Nº 2. Tomado de: http://solomamitis.com. Modificado por Ingram y Thompson 2016

La capacidad de cada agente etiológico en cuanto a la producción de mastitis va estar en dependencia de por lo menos dos grupos de factores importantes: características bacterianas y mecanismos de transmisión¹⁸.

Características bacterianas:

• La capacidad del microorganismo de sobrevivir en el medio, es decir, su resistencia a influencias ambientales, incluyendo procedimientos de limpieza y desinfección.





- Su capacidad para colonizar el conducto del pezón.
- Su capacidad para adherirse al epitelio mamario y establecer una reacción camítica.
- Su resistencia al tratamiento antibiótico.

Mecanismos de transmisión

Dependen de:

- Grado de infección del medio, incluyendo cuarterones infectados.
- Eficiencia del personal y aparatos de ordeño.
- Susceptibilidad de la vaca, que guarda relación con:
 - o Fase de lactación: la fase temprana (primeros 2 meses) es la más susceptible.
 - Edad de la vaca: las vacas de más edad (más de 4 lactaciones) son más susceptibles.
 - Nivel de resistencia hereditaria, posiblemente en relación con la forma del pezón y anatomía del conducto del pezón.
 - Lesiones de la piel del pezón, en especial del orificio.
 - Factores inmunitarios, incluyendo estado leucocitario de cada glándula mamaria y, entre otras cosas, infección anterior, en especial por Staphylococcus aureus. Las infecciones por otras bacterias de baja patogenicidad podrían aumentar la resistencia a los patógenos productores de mamitis, al provocar un aumento del contenido de polimorfonucleares en la leche.

Patogenia

La infección comienza cuando los microorganismos penetran el canal del pezón y se multiplican en la glándula mamaria⁴. El desarrollo de la enfermedad lo podemos resumir en tres etapas:





Invasión: etapa en la que los microorganismos pasan del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el conducto glandular¹⁹. Los factores predisponentes influyen en la frecuencia y la facilidad de la invasión. Así pues en términos generales la fase de invasión está condicionada por⁸:

- 1. La presencia y densidad de población de las bacterias causales en el medio.
- 2. La frecuencia de infección del cuarto glandular y el grado de contaminación de la piel de los pezones se utiliza con frecuencia como índice de este factor.
- 3. Frecuencia con que los pezones de la vaca, especialmente los ápices, se hallan contaminados con estas bacterias, depende en gran medida de la eficacia de la higiene del ordeño.
- 4. Grado de la lesión de los esfínteres de los pezones, que facilitan la entrada de las bacterias al conducto glandular.

Infección: etapa en la que los gérmenes se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario⁸. Depende del tipo de bacteria implicada, determinado por su capacidad de multiplicarse en la leche, de adherirse al epitelio mamario y de su virulencia⁸.

La infección subclínica recurrente puede resultar consecuente con la existencia intracelular de bacterias protegidas de las defensas del hospedador y del efecto de los antibióticos⁸.

Inflamación: etapa en la cual aparece mastitis clínica y aumenta el recuento de leucocitos en la leche ordeñada⁸.

Síntomas

Es asintomática concambios no visibles en la leche⁴¹⁶.

Diagnóstico

Antes de realizar las pruebas diagnósticas para la detección de mastitis subclínica es recomendable realizar un examen clínico general a la vaca.





El diagnostico de mastitis subclínica se realiza por medio de pruebas bioquímicas basadas en las alteraciones producidas por los gérmenes en la leche. Estas pruebas incluyen métodos microbiológicos y citológicos.

Conductividad eléctrica de la leche

La prueba de conductividad eléctrica (PCE) se ha utilizado como indicador de la mastitis durante la última década; se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico²⁰ ²¹.

Prueba de California para mastitis (CMT)

El principio de esta prueba se basa en la reacción que ocurre entre el reactivo Alquil-uril sulfato de sodio contenido en el CMT y el núcleo de las células somáticas presentes en la leche cuando estas se encuentran con un número de 300,000 células por ml de leche o más, producto de la infección de la glándula, se va a producir un gel o gelatina como resultado de la reacción¹⁹.

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases:

	Tipo de reacción						
Negativo	Mezcla permanece líquida	< 200.000					
Trazas	Leve precipitación que desaparece	150.000-500.000					
1 cruz	Mezcla viscosa	400.000-1.500.000					
2 cruces	Mezcla espesa (apariencia de clara de huevo)	800.000-5.000.000					
3 cruces	Formación de una especie de coágulo que se queda adherido al fondo.	>5.000.000					

Tabla Nº 3. Fuente: Saran y Chaffer, 2000





La prueba de California para mastitis es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%. Sus principales ventajas son que es una técnica muy sensible y se puede utilizar tanto en una muestra de cuartos, como una muestra del tanque enfriador. A pesar de sus ventajas, la técnica presenta inconvenientes como los siguientes:

- 1. Los resultados pueden ser interpretados de forma variable, entre los individuos que realicen la prueba, por lo que resulta necesario homologar el criterio de casos positivos y su categorización en grados.
- 2. Pueden presentarse falsos positivos en leche de animales con menos de diez días de paridos o en vacas próximas a secarse. Esto está asociado a las modificaciones del epitelio glandular; ya que en los primeros 30 días de lactación y los días próximos al secado se da una mayor concentración de células somáticas.
- 3. la mastitis clínica aguda da resultados negativos, debido a la destrucción de los leucocitos por las toxinas provenientes de los microorganismos presentes²⁰.

Cultivo bacteriológico

El objetivo del análisis microbiológico es hacer el aislamiento y caracterización de los microorganismos causantes de la mastitis.

La recolección de muestras de cuartos individuales y el cultivo en el laboratorio de los organismos presentes, es la forma más confiable de determinar el tratamiento con antibióticos más apropiados.

La mayoría de las bacterias causantes de mastitis se multiplican bien en agar sangre de carnero y agar MacConkey convirtiéndose en los medios básicos para el proceso de aislamiento del agente etiológico. Agar sangre de carnero es un medio de cultivo que permite el crecimiento no selectivo de los microorganismos. agar MacConkey al contrario es un medio selectivo que se utiliza para determinar el crecimiento de bacterias Gram negativas¹⁶.





Tinción de Gram

Luego del cultivo bacteriológico a todos los aislamientos se le debe realizar la tinción de Gram.

Esta nos sirve para clasificar a los microorganismos en dos grandes grupos, Gram positivos y Gram negativos; a la vez podemos observar la forma de las bacterias.²²

Prueba de catalasa

Es empleada para diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positiva) del género enterococcus (catalasa negativa). La prueba es positiva cuando se ponen en contacto una colonia de la bacteria en estudio, con peróxido de hidrogeno al 3% y se producen burbujas de oxígeno.

Prueba de coagulasa

Permite diferenciar *Staphylococcus aureus*, coagulasa positiva del resto de especies de *Staphylococcus*, que son coagulasa negativos^{23.}

En un tubo con 0.5 ml de plasma resuspender una colonia aislada hasta una turbidez visible, incubar a 37°C durante 2 horas, con la formación de coagulo es una prueba positiva, en caso contrario el medio continua líquido.

Antibiograma

El objetivo del antibiograma es medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico²³.

Sensibilidad Bacteriana a los Antibióticos

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible.





Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas²³.

Hay diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir de manera semicuantitativa las CIM. Estos métodos permiten categorizar una cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. **Ver en anexo Tabla Nº4**

Nomenclatura:

- 1. Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- 2. Intermedia, cuando el éxito terapéutico es impredecible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).
- 3. Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.

Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un aspecto particular de su evolución natural; traducida por la aparición de cepas refractarias al efecto bacteriostático y bactericida de los antibióticos²⁴. Esta resistencia puede ser natural o adquirida.

Resistencia natural: cuando cepas de una misma especie son resistentes a un antibiótico y esto puede ser debido a particularidades de la pared bacteriana o por la producción de enzimas que hidrolizan o modifican la molécula²⁴.

Resistencia adquirida: aparece en algunas cepas de una especie normalmente sensible. Es la forma más habitual de presentación de una resistencia bacteriana y puede provenir de mutaciones o bien originarse por transferencia de genes²⁴.





Método de difusión en agar (kirby-Baüer)

En 1966, después de los estudios realizados por Baüer, Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad fue estandarizado y correlacionado definitivamente con la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) correspondientes. El método de difusión por disco (o método Kirby-Baüer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido y aun es, uno de los más utilizados en los laboratorios de todo el mundo²³.

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Ver en anexo Tabla Nº 5. Se incuban las placas durante 16-24 horas a 35°C y al cabo de este tiempo se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias publicadas por el National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS). Con esta referencia podemos informar si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente a cada uno de los antibióticos ensayados en las placas²³.

Tratamiento de mastitis subclínica

Esta enfermedad no se puede eliminar por completo del hato, pero la incidencia se puede llevar al mínimo, el control de la enfermedad se hace a través de buenas prácticas de manejo, uso de selladores, tratamiento durante el período seco de los animales y sacrificio de los animales con enfermedad crónica.

Los casos de mastitis subclínica son mejor tratados al momento del secado²⁵.

Un hecho que muchas veces se desconoce, es que existe un ritmo normal de recuperación espontánea de las infecciones subclínicas de mastitis del orden del 25 al 30%; de tal manera que, a lo largo de sucesivos controles con CMT o RCS, es posible observar que muchos cuartos se normalizan mientras que otros nuevos resultan positivos²⁶.





Durante la lactancia el tratamiento se hará sólo en casos excepcionales, en el saneamiento de un foco infectivo o en vacas jóvenes y valiosas o bien en el rechazo de la leche por exceso celular. Si se conoce el germen causal y existe un antibiograma, el tratamiento podrá realizarse de forma específica²⁵ ²⁷.

Tratamiento blitz

Este tratamiento se puede usar en el caso de infecciones por *Streptococcus agalactiae* para disminuir su prevalencia en el hato, consiste en tratar una vez todas las vacas (o sólo las infectadas detectadas mediante cultivo) con penicilina procaínica, de preferencia en una base de larga acción. Este método obliga a no ordeñar los cuartos a las vacas tratadas durante 48 horas y luego eliminar la leche ordeñada por lo menos durante los siguientes 4 ordeños para eliminar los residuos del antibiótico²⁶.

Profilaxis

En un hato lechero las Buenas Prácticas de Ordeño son necesarias para minimizar el riesgo de infección y diseminación de Mastitis Subclínica y alcanzar de esta manera niveles óptimos de calidad en la leche producida. (Ver rutina de ordeño en anexo Tabla Nº 6).

Para reducir el número de infecciones de mastitis, el factor más importante en el procedimiento de ordeño es el uso de soluciones cloradas o yodadas para el presellado y sellado de pezones como método más efectivo de control.

Las finalidades de usar selladores o inmersiones de pezones son:

- Eliminar la gota de leche que queda en el pezón (con esto se elimina el contagio de organismos de mastitis por las moscas de una vaca a otra).
- Disminuir la carga de microorganismos que están en el pezón en el momento de la inmersión de éste.
- Dejar una película de la solución desinfectante en los pezones entre ordeños.





Los planes de control y prevención de mastitis incluyen la ejecución de los siguientes pasos:

Mantener un ambiente limpio, seco y ventilado, controlar la propagación de vectores, examen de vacas que se deseen introducir a la explotación como reposición, identificación de las vacas afectadas, ordeño en escala de sanas a enfermas, rutina de ordeño adecuada e higiénica, uso adecuado y mantenimiento del equipo de ordeño, higiene personal de los ordeñadores, descarte de vacas con mastitis crónica, elaboración de CMT periódicamente, optimizar las defensas del hospedador, seguimiento del estado sanitario de la ubre, tratamiento de problemas de la piel, de ubre y pezones, tratamiento de casos clínicos durante la lactación, terapia de secado al final de la lactación¹⁰.

El tratamiento antibiótico tiene grados variables de eficacia; la vacunación sólo es capaz de reducir en parte la incidencia, sin embargo, datos recientes demuestran que una vacuna podría ser eficaz como método profiláctico contra mastitis. Una vacuna de sub-unidades que posee antígenos estructuralmente íntegros, lo cual permite una respuesta inmune más efectiva y de mayor duración en los animales ha sido desarrollada en la universidad de Chile, hasta el momento se ha logrado la reducción en el recuento bacteriano de un 99.9% en animales vacunados frente a animales tratados con placebo²⁸.





VII. MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio: Descriptivo, de tipo transversal.

Área de estudio: 8 fincas afiliadas a la Asociación de Ganaderos de León (ASOGAL) en el Departamento de León.

Las fincas en estudio se caracterizan por tener una explotación de tipo extensiva, las razas que predominan son el cruce entre Pardo-Brahmán y Holstein-Brahmán y el ordeño en todas es manual.

Finca	Municipio	Forma de ordeño	Lugar de ordeño	Vacas en producción	Número de ordeños al día
1	Nagarote	Puño	Sala	88	1
2	Nagarote	Puño	Corral	35	1
3	León	Puño	Sala	96	2
4	León	Puño	Sala	30	1
5	León	Pellizco	Sala	22	1
6	León	Puño	Corral	13	1
7	León	Martillo	Sala	14	1
8	Quezalguaque	Puño	Sala	12	1

Tabla Nº 7. Fuente: Ingram y Thompson 2016

Selección de las fincas: la selección de las fincas fue por conveniencia; el productor mostró interés y la participación voluntaria de los mismos reduce los costos del estudio.





Población en estudio: Hembras bovinas en lactación pertenecientes a las 8 fincas afiliadas a ASOGAL.

Número de muestras: 310 Hembras bovinas en producción láctea

Selección de la muestra: hembras que estén en período de lactación de 30-240 días.

Criterios de inclusión:

- Período de lactación mayor a 30 días y menor de 240 días.
- Sin ningún tratamiento previo.
- Sin mastitis clínica.
- Participación voluntaria del productor.

Criterios de exclusión:

- Período de lactación menor a 30 días y mayor a 240 días.
- Con mastitis clínica.
- Que estén o hayan estado en tratamiento previo.
- Que el productor no tenga interés en participar.

Método

Prueba de california para mastitis (CMT: siglas en inglés); la cual se realizó durante el ordeño.

Recolección de la muestra para análisis microbiológico:

- Previo a la recolección de la muestra, se seleccionó de forma detallada las vacas que iban a ser sometidas a análisis basándose en los resultados obtenidos en la prueba de california (CMT). Se seleccionaron 17 cuartos de 1 cruz, 18 cuartos de 2 cruces, 17 cuartos de 3 cruces y 6 controles negativos, estos últimos con el objetivo de evaluar la sensibilidad de la prueba. En total fueron 58 muestras distribuidas de manera proporcional al número de especímenes por finca en las ocho fincas.
- Se lavó la ubre con agua y jabón enfocándose más en el cuarto seleccionado.
- Se secó con papel toalla y se desinfecto con alcohol al 70%.





- Se eliminaron los primeros chorros.
- Se recolectaron aproximadamente 5ml de leche en un tubo de ensayo estéril.
- Se identificó la muestra y almaceno en un termo con hielo a una temperatura de 4°C - 8°C para ser llevada al laboratorio.

Análisis microbiológico:

- Cultivos en Agar sangre de carneros, Muller Hinton y MacConkey.
- Clasificación de Bacterias.
- Antibiograma utilizando el método de Kirby- Baüer.

Lo anteriormente escrito se realizó en el Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI) de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria en la UNAN-LEON.

Aislamiento: Las muestras fueron sembradas en las primeras 2hrs después de haber sido llevadas al laboratorio. Se inocularon 20 μl de leche previamente homogenizada en platos Petri con agar sangre de carnero al 5% (ASC) y agar MacConkey, se realizó un rallado convencional, se identificó cada muestra y luego se incubaron a 37°C durante 24-48 horas.

Identificación bacteriana: después de 24-48 horas de incubación se procedió a realizar la lectura de los platos para determinar la presencia o ausencia de crecimiento. En los casos donde hubo crecimiento se realizó tinción de Gram para una clasificación e identificación general de las bacterias.

La caracterización de las bacterias encontradas se realizó por medio de pruebas bioquímicas específicas para bacterias Gram + y Gram – según el caso.

Se caracterizó solo el género de las bacterias con excepciones como en el caso de *Staphylococcus* spp que se sometió a pruebas de coagulasa y catalasa para identificar si era *S. aureus* o *Staphylococcus* coagulasa negativa

En el caso de las Gram - se realizaron las pruebas bioquímicas: TSI (Triple Azúcar Hierro), LIA (Agar Lisina Hierro) y Citrato de Simmons.





Determinación de los perfiles de sensibilidad bacteriana: después de la identificación bacteriana se realizó el antibiograma a cada una de las muestras utilizando el método de difusión en agar Mueller Hinton (Kirby Baüer) con los discos impregnados de los siguientes antibióticos: Amoxicilina + ácido Clavulánico (AMC), Cefalexina (CL), Enrofloxacina (ENO), Oxitetraciclina (OT), Gentamicina (CN), Vancomicina (VAN) y Trimetropim-Sulfa (SXT) En los casos de *Staphylococcus aureus* se determinó su capacidad meticilino resistente empleando discos de Oxacilina(OX 1µg).

Para la realización de esta prueba se preparó una suspensión en solución salina a una escala de turbidez de 0.5 McFarland a partir de una colonia pura re aislada con 24 horas de crecimiento en agar sangre de carnero. Con un hisopo estéril se inoculó la superficie de una placa de agar Muller Hinton con dicha suspensión, se hizo un rallado convencional, luego se colocaron los discos de antibióticos y se incubaron a 37°C por 24-48 horas.

Análisis estadístico

Los análisis descriptivos se realizaron en base a frecuencias absolutas y relativas en caso de variables categóricas. En variables numéricas se utilizaron medidas de tendencia central como la media y la desviación estándar.

El análisis estadístico diferencial para buscar asociación entre variables categóricas se realizó utilizando chi- cuadrado o fisher. En el caso de variables numéricas se utilizó el ANOVA de un factor cuando había más de 2 valores en la variable.

El resultado se presenta en tablas, gráficos de barras y sectores para variables categóricas y gráficos de caja y bigote para variables numéricas.

Los datos fueron almacenados y analizados en Stadistical Paquet for the Social Science (SPSS. Versión 22). Los resultados se expresan en gráficos y tablas procesados en Excel 2010.





VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 310 vacas que fueron analizadas a través de la prueba CMT, se obtuvo que el 71% (219) resultaron positivas a mastitis subclínica y el restante 29% (91) resultó negativo. (Ver anexo Nº1). Este dato no coincide con los resultados encontrados por Berrios y Peralta (54%), 2004 en un estudio realizado en 4 fincas lecheras del Departamento de León; igualmente no tiene similitud con los resultados obtenidos por Aguirre y Zeledón, en 2007 en un estudio realizado en 6 fincas del mismo Departamento y cuya prevalencia de mastitis fue 52.1%. Esto determina que el grado de mastitis subclínica en las zonas en estudios aumento en estos últimos 12 años entre el 17 y 18.9 %. (Ver gráfico Nº 1 en anexos)

En las 58 muestras seleccionadas para análisis microbiológico se incluyeron 6controles negativos; hubo crecimiento bacteriano en el 75.9% (44). (Ver gráfico N° 2 en anexo)

Al relacionar los resultados del CMT con los resultados del cultivo bacteriano se observó que: de las 44 muestras que presentaron crecimiento; 40 fueron positivas a la prueba y 4 negativas. De las 14 que fueron negativas al cultivo, 12 fueron positivas y 2 negativas por CMT.

En las muestras que presentaron crecimiento se encontró que los principales microorganismos aislados fueron: *Corynebacterium* spp 48% (21), *Staphylococcus aureus* 25% (11), *Staphylococcus* coagulasa negativo 25% (11) y *Klebsiella* spp 2% (1). (**Ver gráfico N° 3 en anexo**). Boscan et al, 2009, identificaron que en ganado de doble propósito la bacteria predominante como causa de mastitis fue *Corynebacterium bovis* 46.73%, luego Staphylococcus epidermidis 20.56 % y en menor porcentaje se encontró *Staphylococcus aureus* con 12.15%; este es un dato importante que se asemeja al encontrado en este estudio y que nos hace suponer que esta predominancia este asociado a malas prácticas de higiene durante el ordeño. También existe una variación con el estudio de Berrios y Peralta, 2004, Aguirre, J. y Zeledón, K. 2007, Chavarría, S y Meléndez L, 2011 que identifican a *Staphylococcus aureus* como el principal agente etiológico en la mastitis subclínica.





Al comparar los resultados de la identificación y clasificación bacteriana con los de la prueba CMT se obtuvo que de las 21 muestras con *Corynebacterium* spp, 18 eran positivas a la prueba de campo y 3 fueron negativas. De los 11 *Staphylococcus aureus* encontrados 10 fueron positivos y 1 negativo, los 11 *Staphylococcus coagulasa* negativo fueron positivos y la única muestra de *Klebsiella spp* fue positiva. Este análisis refleja que si bien es cierto que la prueba de california es uno de los principales métodos de diagnóstico rápido de mastitis; no se debe obviar que es una prueba que presenta deficiencias debido a la gran diversidad de errores a los que se encuentra expuesta y a la gran variabilidad en su interpretación, lo cual tiende a generar lo que ya hemos visto: resultados falsos positivos o falsos negativos. (Ver gráfico Nº 4 en anexos)

Todos los microorganismos aislados en este estudio son considerados agentes causantes de mastitis clínica o subclínica según datos encontrados en otros estudios como el de Acuña y Rivadeneira en 2008 y Jiménez y Salazar en 2013. Cada uno de ellos representa en menor o mayor grado un riesgo para la salud pública.

El resultado del análisis general del antibiograma se presenta en la tabla Nº 5, en donde se observa que el 100% de las bacterias aisladas fue sensible a Gentamicina, 97.7 a Enrofloxacina, 84.2% a Oxitetraciclina, el 44.2% presento sensibilidad a Cefalexina, el 43.2% fue sensible a Amoxicilina más ácido Clavulánico y el 39% presentó sensibilidad frente a Trimetropim-sulfa.

En cuanto a la resistencia presentada por las bacterias a los distintos antibióticos se obtuvo que: el 61% presentó resistencia a Trimetropim-sulfa, 56.8% a Amoxicilina más ácido Clavulánico, 55.8% a Cefalexina y 10.5% a oxitetraciclina. Las bacterias no desarrollaron resistencia frente a Enrofloxacina ni a Gentamicina.

Al evaluar los resultados obtenidos en cuanto al perfil de sensibilidad de los *Staphylococcus aureus* aislados tenemos que el 82% (9) fue sensible a Oxacilina y el 18% (2) resistente. El 91% (10) de ellos presentó sensibilidad a Vancomicina y el restante 9% (1) fue resistente.





PERFIL DE SENSIBILIDAD BACTERIANA A LOS DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Total de bacterias	Resistente	Sensible	Intermedio
AMC	44	56.8%	43.2%	
ENO	43		97.7%	2.3%
CL	43	55.8%	44.2%	
SXT	41	61%	39%	
CN	29		100%	
ОХ	22	50%	50%	
VAN	22	22.7%	77.3%	
ОТ	19	10.5%	84.2%	5.3%

Tabla Nº8.

AMC: Amoxicilina + ácido clavulánico, ENO: Enrofloxacina, CL: Cefalexina, SXT: Trimetropin-sulfa, CN: Gentamicina, OX: Oxacilina, VAN: Vancomicina y OT: Oxitetraciclina

En base a lo obtenido de la evaluación general de los perfiles de sensibilidad bacteriana a los distintos antibióticos utilizados en el estudio se puede expresar lo siguiente y es que en los últimos años según un estudio realizado por Pellegrino en 2011, la multiresistencia desarrollada por las bacterias es una problemática que está asociada a la carencia de políticas que regulen el uso de los antibióticos en el tratamiento de las distintas infecciones tanto en medicina humana como en veterinaria. El uso incorrecto de estos ha favorecido y sigue favoreciendo la transferencia horizontal de cepas bacterianas mutiresistentes de los animales al hombre y viceversa, lo que implica un riesgo emergente para la salud pública.





IX. CONCLUSIÓNES

La prevalencia de mastitis subclínica encontrada en las fincas estudiadas fue de 71%. El porcentaje se ha incrementado en 17 y 18.9 % en los últimos 12 años y que no solo afecta a más vacas sino también la ganancia de los productores.

Corynebacterium spp es el principal agente productor de mastitis subclínica en las vacas pertenecientes a las fincas en estudio con un 48%.

De los Staphylococcus aureus encontrados solo el 18% fue meticilino resistente

Todos los microorganismos aislados representan un riesgo para la salud de la población, por lo tanto, la leche de estas fincas se considera una fuente de infección.

Los antibióticos más eficaces in vitro para tratar a los animales afectados en las fincas en estudio resultaron ser: Gentamicina, Enrofloxacina, y Oxitetraciclina.

Los antibióticos menos eficaces in vitro para el tratamiento de mastitis subclínica bovina son Trimetropim-sulfa con una resistencia del 61%, Amoxicilina más ácido clavulánico con 56.8% y Cefalexina con 55.8% de resistencia.





X. RECOMENDACIÓNES

Cumplir las medidas higiénicas ya establecidas antes, durante y después del ordeño

Realizar CMT al menos una vez por mes a las vacas en producción láctea para identificar a los animales afectados.

Realizar análisis microbiológico a partir de leche con mastitis subclínica para identificar el agente causal, evaluar sensibilidad bacteriana y elegir el antibiótico más conveniente para el tratamiento.

Los antibióticos utilizados deben de ser aplicados conforme las indicaciones del médico veterinario con el fin de evitar la generación de resistencia frente a ellos y respetar el período de retiro que se aplique a estos.

Tomar las medidas necesarias en cuanto al control y tratamiento de *Staphylococcus* aureus meticilino resistente ya que la presencia de estos sugiere un riesgo para la salud pública.





XI. REFERENCIAS

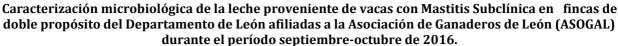
- Sanidad e Inocuidad Pecuaria en Centroamérica y República Dominicana: Available at: http://docplayer.es/Sanidad e inocuidad pecuaria en Centroamérica y república dominicana.html.
- 2. MAGFOR. (2016).
 - Available at: http://www.magfor.gob.ni/noticias/2014/Enero/aumento_leche.html.
- Solís Bermúdez, M. A. Utilización de la solución hipertónica (agua de mar) en el tratamiento de la mastitis bovina en la Finca 'Guadalupana' del municipio de Nagarote, departamento de León. (UNA, 2007).
- Quezada Espinoza, H. & Moreira Cerda, G. Estudio epidemiológico de la prevalencia de mastitis subclínica en el departamento de Juigalpa, Chontales. (UNA, 2006).
- 5. Watts, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **16**, 41–66 (1988).
- 6. Zecconi, A., Piccinini, R. & Fox, L. K. Epidemiologic study of intramammary infections with Staphylococcus aureus during a control program in nine commercial dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **223**, 684–688 (2003).
- 7. Pellegrino, M. S. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de Staphylococcus aureus asiladas de leche. (2011).
- Berríos Aráuz, R. F. & Peralta Ramírez, A. E. Estudio epidemiológico de la mastitis subclínica bovina en cuatro hatos lecheros del Departamento de León, e identificación y sensibilidad antimicrobiana in vitro de los agentes etiológicos implicados. (2004).





- Meza López, J. E. et al. Caracterización molecular de aislamientos de Staphylococcus spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 44, 91–106 (2012).
- 10. Aguirre Valverde, J. F. & Zeledón Aráuz, K. J. Aislamiento e identificación fenotípica de Staphylococcus aureus mediante la técnica de Fingerprinter (PHP) a partir de leche bovina afectada con mastitis subclínica en seis fincas del Municipio de León, durante eL período mayo 2005-mayo 2006. (2007).
- 11. Acuña Molina, V. L y Rivadeneira Espinosa, A. P. Identificación y antibiograma de pátogenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la Provincia de Pichincha, Ecuador, abril 2008.
- 12. Meléndez Martínez, L. M y Chavarría Narváez, S. E. Identificación de agentes bacterianos implicados en mastitis subclínica de vacas que abastecen los centros de acopio del municipio de El Sauce y Tecuaname, municipio de La paz centro (León), septiembre-diciembre 2011.
- 13. Rivera Suárez, A. M. Determinación de la prevalencia de Mastitis subclínica en ganado Reyna, Rancho Los Peiranos, Nandaime, Granada. (UNA, 2014).
- 14. Glándula mamaria y secreción láctea.
 Available at: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e bovina/11GlandulaMamaria.pdf.
- 15. Fisiología de la glándula mamaria.
 Available at: http://biblioteca.ihatuey.cu/link/libros/veterinaria/fgm.pdf.
- 16. Pinzon Trujillo, A, Moreno Vázquez, F. C & Rodríguez Martínez, G. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (Departamento de Boyacá). Revista Medicina Veterinaria 17, 23–35 (2009).



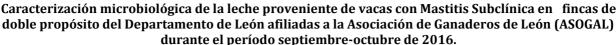




- 17. Espinoza Salazar, M. G. & Mier Jiménez, J. P. Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California mastitis test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del Cantón el Chaco, provincia del Napo. (2013).
- 18. Mamitis bovina: definición, etiología y epidemiología. *Ciencia Veterinaria* (2014).

 Available at: http://cienciaveterinaria.com/ mamitis definición etiología y epidemiología/.
- 19. Altamirano López, J. del S & Dávila Navarro, O. A. Prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras de las fincas asociadas a la red fría de la Cuenta Reto del Millenium (CRM); en las comunidades La Reynaga Malpaisillo y Los Zarzales. (2011).
- 20. Castañeda, VH, Bedolla, CC, Wolter, W. Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis). REDVET Rev. Electrónica Vet. VIII, (2007).
- 21. Norberg, E. *et al.* Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* **87**, 1099–1107 (2004).
- 22. Luis F. Calvinho, Méd. Vet., PhD. Diagnostico de mastitis. | APROCAL. APROCAL
- 23. El antibiograma.
 - Available at: http://www.microinmuno.gb.fcen.uba.ar/SeminarioAntibioticos.htm.
- 24. Oromí Durich, J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Med. Integral 367-370







- 25. Caraguay Guaillas, M. E. Diagnóstico de Mastitis subclínica por el método California Mastitis Test, aislamiento, identificación y sensibilidad del germen en las ganaderías de la parroquia Chantaco del Cantón Loja. (UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA).
- 26. Andresen S, H. Mastitis: prevención y Control. *Rev. Investig. Vet. Perú* **12,** 55–64 (2001).
- 27. Barragán, Segundo. *Mastitis, Descripción y Desarrollo de la enfermedad.* 1–12 (Facultad de Ciencias Veterinarias., 1998).
- 28. Albéitar Portal Veterinaria

Available at: http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/15097/actualidad/una nueva vacuna de subunidades desarrollada por la universidad de chile podría terminar con la mastitis bovina.html.





XII. ANEXOS

F	PERFIL DE RESISTENCIA DE LOS ANTIBIOTGICOS Diámetro de la zona de inhibición en mm						
Antibiótico	Staphylococcus coagulasa negativa	Staphylococcus aureus	Klebsiella spp	Corynebacterium spp			
Gentamicina	R : ≤ 12 I :13-14 S : ≥ 15	R : ≤ 12 I :13-14 S : ≥ 15	R: ≤ 12 I: 13-14 S: ≥ 15	R: ≤ I: S: ≥			
Trimetropim+ sulfametoxazol	R : ≤ 10 I : 11-15 S : ≥ 16	R : ≤ 10 I : 11-15 S : ≥ 16	R : ≤ 10 I : 11-15 S : ≥ 16	R: ≤ I: S: ≥			
Oxitetraciclina	R : ≤ 14 I : 15-18 S : ≥ 19	R: ≤ 14 I: 15-18 S: ≥ 19	R: ≤ 14 I: 15-18 S: ≥ 19	R: ≤ I: S: ≥			
Amoxicilina+ Ácido Clavulánico	R : ≤ 19 S : ≥ 20	R : ≤ 19 S : ≥ 20	R : ≤ 13 I : 14-17 S : ≥ 18	R: ≤ I: S: ≥			
Oxacilina	R : ≤ 17 S : ≥ 18	R : ≤ 10 I : 11-12 S : ≥ 13	R: ≤ I: S: ≥	R: ≤ I: S: ≥			
Cefalexina	R : ≤ 14 I : 15-17 S : ≥18	R : ≤ 14 I : 15-17 S : ≥ 18	R: ≤14 I: 15-17 S: ≥ 18	R: ≤ I: S: ≥			
Vancomicina	S: ≥ 17	S : ≥17	R: I: S:	R: ≤ I: S: ≥			

Tabla Nº 4 Criterios de interpretación basados en el método de kirby-bauer de pruebas de sensibilidad para microorganismos. Tomado de BD BBL sensi-disc antimicrobial susceptibility Tes Discs (R: resistente, I: intermedio, y S: sensible).

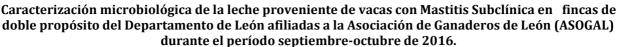
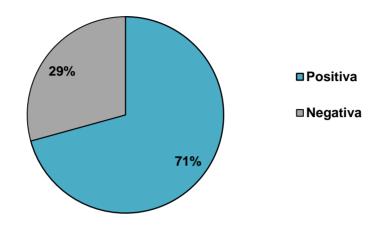




GRÁFICO Nº 1



PREVALENCIA DE MASTITIS SUBCLINICA

GRÁFICO Nº 2

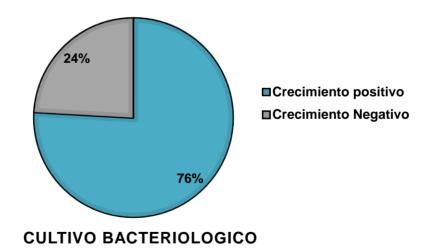
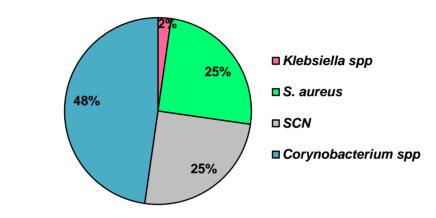


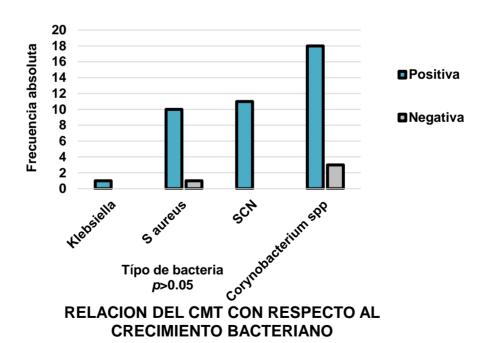


GRÁFICO Nº3



BACTERIAS PRESENTES EN LA LECHE

GRÁFICO Nº 4



CLASES DE ANTIBIOTICOS				
Nombre genérico	Espectro de acción	Mecanismo de acción	Mecanismos de resistencias.	
		Aminoglucocidos		
Gentamicina	Bacterias Gram + y Gram	Se une a la unidad 30S del ribosoma, provocando una alineación y reconocimiento anormal por el ARN, por lo que inhibe la síntesis de proteínas.	Está relacionado con la síntesis de enzimas. Su modificación tiene como consecuencia el bloqueo en el paso del antibiótico a través de la membrana y formación de compuestos inactivos capaces de alterar función del ribosoma.	
		Cefalosporinas (de primera generac	,	
Cefalexina	Gram + y Gram -	Interrumpen la síntesis del peptidoglicano.	Producción de betalactamasa, permiabilidad de la pared celular y sensibilidad de la proteína de unión de la penicilina.	
		Glicopéptidos		
Vancomicina	Bacterias Gram+	Actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglicano en un paso metabólico diferente a los agentes betalactámicos. Alteran la permeabilidad de membrana e inhiben la síntesis de ARN.	La mayoría de las bacterias Gram- son intrínsecamente resistentes a la vancomicina, porque su membrana externa es impermeable a las grandes moléculas de glicopéptidos (a excepción Neisseria <i>spp</i>) al igual que algunas Gram +.	
		Penicilinas		
Amoxicilina,Oxacilina	Gram+ y Gram-	Interrumpen la síntesis de peptidoglicano.	Desarrolla resistencia debido a la síntesis de betalactamasa.	
inhibidor de β-lactamasas				
Ácido Clavulánico	Gram = y Gram negativas	inhiben la síntesis de folato en la bacteria mediante la interacción con la enzima dihidrofolatoreductasa.	las alteraciones de la permeabilidad por pérdida de porinas junto con una producción "normal" de TEM-1, y otra posibilidad es la hiperproducción de su betalactamasa cromosómica, al no ser ésta sensible a los inhibidores de betalactamasas	
		Tetraciclinas		
Oxitetraciclina	Gram + y Gram -	Se une a la unidad 30S del ribosoma por lo que inhibe la	Alteración del sistema de transporte activo de la tetraciclina hacia el citoplasma y el	

		síntesis de proteínas. Sulfonamidas	bombeo del antibiótico al exterior y protección del ribosoma a través de proteína citoplasmática evitando la acción del antibiótico en la unidad 30s.
Sulfametoxazol,	Bacteriana por Gram+ y Gram-	Inhiben la enzima bacteriana que origina la incorporación del ácido paraaminobenzoico (PABA) en el ácido dihidropteroico, entre otras funciones inhibitorias de la síntesis de ADN y ARN.	Es causada por la mutación de las enzimas que son inhibidas por las sulfonamidas permitiendo la síntesis de ácido fólico a partir del PABA.
		Diaminopirimidinas	
Trimetoprim	Infecciones bacterianas por Gram+ y Gram- sensibles.	Inhiben la síntesis de folato en la bacteria mediante la interacción con la enzima dihidrofolato-reductasa.	Es el resultado de una reducción en la permeabilidad celular y enzimatica o la producción de una reductasaalterada con disminución de la afinidad por el antibiótico, estos pueden aparecer por mutación o, por la intervención de reductasas resistentes codificadas por plásmidos.

Tabla № 5

	RUTINA DE ORDEÑO					
Pre-	ordeño	Orde	eño	Post-ordeño		
1.	Limpieza del lugar de ordeño.	1.	Ropa adecuada	Después del ordeño los animales deben		
	Diariamente con agua y detergente.	2.	Despunte	permanecer en pie al menos 1 hora.		
2.	Traslado de los animales al lugar de		Eliminación de los primeros chorros.	Recomendable suministrar alimento y		
	ordeño.	3.	Lavado de los pezones	agua en una galera o enviar		
	No gritar ni golpear a los animales.		Cuando el ordeño es con ternero, el	directamente a pastoreo.		
	No utilizar perros, ya que estos		lavado se hace después de estimular			
	pueden desencadenar síntomas de		a la vaca.			
	estrés y afectar la bajada de la leche.		No lavar la ubre completa			
	Sujeción de patas y cola para evitar	4.	Secado de pezones			
	algún accidente.		Con papel toalla desechable o paños			
3.	Higiene del ordeñador		individuales.			
	Uñas cortas y limpias	5.	Ordeño del animal			
	Lavado de manos con agua y jabón		Hacerlo de forma suave y segura,			
4.	Preparación y limpieza de los		empleando el método más adecuado			
	utensilios de ordeño.	6.	Sellado de los pezones			
			Solo en caso de no usar ternero.			
			Usar solución desinfectante a base de			
L			yodo al 1,2 y 5%			

Tabla Nº 6

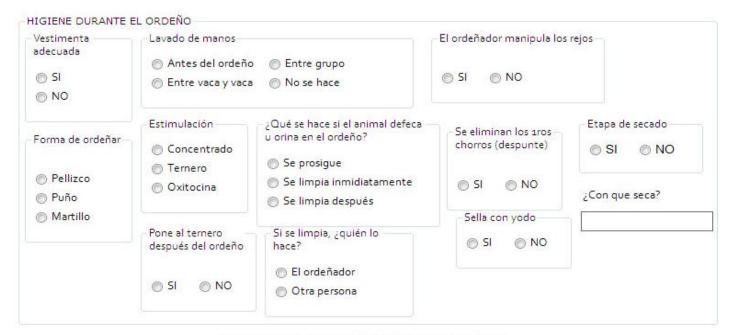


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA UNAN - LEÓN

MEDICINA VETERINARIA

Ficha epidemiológica - Mastitis Subclínica Bovina

DATOS DEL A FINCA Propietario Departamento Municipio Comunidad DATOS DEL ANIMAL Nº de Identificación Nombre Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de lactancia en días SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Sala específica de ordeño Sala específica de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Tipo de explotación Vacas en Produ Vacas Horas Vacas Secas Nº de Ordeño Nanual Nº de Ordeño Nombre Edad en años Ltrs de leche por día Nº de Ordeños al día 1 4-5 2-3 6-mas Prueba del CMT SI NO Desinfección de la Ubre Se lava con agua Solo agua Yodo Cloro Jabón Limpieza de sala				Nº Ficha
Propietario Departamento Municipio Comunidad DATOS DEL ANIMAL Nº de Identificación Nombre Bedad en años Ltrs de Ieche por día Manual Nº de Identificación Nombre Holstein-Brahamam Holstein-Brahamam Holstein-Pardo Período de Iactancia en días SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Se lava con agua y desinfectante Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yacas en Produ Vacas Horras Vacas Horras Vacas en Produ Vacas Horras Vacas Horras Vacas Horras Vacas En Produ Vacas Horras Vacas Produ Se Java Con Balanca Se Jav		Tipo de explo	tación	
Departamento Municipio Comunidad Tipo de Ordeño Manual Mecánico Nombre Edad en años Ltrs de leche por dia Raza Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Periodo de lactancia en días Si No HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala especifica de ordeño Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Tierra Concreto Si No Techo Si No	Nombre de la Finca Propietario			Vacas en Produce
Municipio Comunidad Tipo de Ordeño Manual Mecánico Description Manual Mecánico Ltrs de leche por día Raza Nº de ldentificación Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de lactancia en días Si No HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Si No Cloro Jabón Techo Cloro Jabón				Vacas Horras
Municipio Comunidad Tipo de Ordeño Manual Mecánico Manual Mecánico Manual Mecánico DATOS DEL ANIMAL Nº de Identificación Nombre Edad en años Ltrs de Ieche por día Raza Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jensey-Holstein Holstein-Pardo Período de Iactancia en días SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Se lava con agua y desinfectante Tierra Concreto Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche SI NO Cloro Jabón Techo Solo agua Yodo Cloro Jabón		-		Vacas Secas
DATOS DEL ANIMAL Nº de Identificación Nombre Edad en años Ltrs de leche por día Raza Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de lactancia en días SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala especifica de ordeño Sala especifica de ordeño Tierra Concreto Tierra Concreto SI NO Manual Mecánico Edad en años Ltrs de leche por día N° de Ordeños al día 2 1 2 2 Prueba del CMT SI NO Desinfección de la Ubre Se barre Se lava con agua Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Sustancia para desinfectar la ubre Solo agua Yodo Cloro Jabón		Tipo de Ordei	ño	132 301 700 700
DATOS DEL ANIMAL Nº de Identificación Nombre Edad en años Ltrs de Ieche por día Raza Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de Iactancia en días SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Sala específica de ordeño Tierra Concreto Si NO Limpieza de los recipientes para la leche Si NO Solo agua Yodo Cloro Jabón		@ Manual	Macánico	
No de Identificación Nombre Edad en años Ltrs de Ieche por día Raza Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de Iactancia en días SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche SI NO Solo agua Yodo Cloro Jabón		- Monour	O III Ceallico	
Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de lactancia en días N° de Ordeños al día 1 0 4-5 2-3 6-mas Prueba del CMT Prueba del CMT SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo Cloro Jabón				
Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de lactancia en días Prueba del CMT Prueba del CMT SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche SI NO	lombre	Edad en años	Ltrs de leche por	día
Pardo-Brahamam Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de lactancia en días SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Si NO Correto Si No	- Nº de partos			-
Holstein-Brahamam Jersey-Holstein Holstein-Pardo Período de lactancia en días Antecedentes de Mastitis SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo Cloro Jabón Cloro Jabón		No.	de Ordeños al día	
		0	1 🔘 2	
Holstein-Pardo Período de lactancia en días Antecedentes de Mastitis SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Se barre Se barre Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo Cloro Jabón	© 2-3 © 6-mas			
Antecedentes de Mastitis SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Se barre Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo Cloro Jabón		Pru	eba del CMT	
Antecedentes de Mastitis SI NO HIGIENE PREVIA AL ORDEÑO Lugar de ordeño Corral Se barre Se barre Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo Cloro Jabón	Período de lactancia en día	as 🗍 🍙	SI @ NO	
Lugar de ordeño Corral Se barre Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo Cloro Jabón				
 ○ Corral ○ Sala específica de ordeño ○ Se lava con agua ○ Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño ○ Tierra ○ Concreto Limpieza de los recipientes para la leche ○ Solo agua ○ Yodo ○ Cloro ○ Jabón 	HIGIENE PREVIA A	AL ORDEÑO		
 Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo SI NO Cloro Jabón 	¿Comó se limpia?	_ D	esinfección de la Ubre	
 Sala específica de ordeño Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo SI NO Cloro Jabón 	100		N Se hace Mos	se hace
Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo SI NO SI NO			Je liace () No:	se nace
Piso de sala de ordeño Tierra Concreto Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo SI NO SI NO	Age of Conference and Conference of	sinfectante		
 □ Tierra □ Concreto □ Limpieza de los recipientes para la leche □ Solo agua □ Yodo □ Cloro □ Jabón 	Se lava con agoa y de	Silifectance		
Tierra Concreto Concreto Con	2000 - 500 -		ustancia para desinfecta	er la ubre
⊚ SI ⊗ NO		es para la	Solo agua Yodo	
	─ SI			
Limpieza de sala				
Fillibiera de sala				
Limpieza de sala		Nº de partos 1	Intensiva Tipo de Orde Manual Nombre Edad en años No 1	Intensiva Extensiva Tipo de Ordeño Manual Mecánico No de partos 1 4-5 2-3 6-mas Período de lactancia en días Período de lactancia en días Desinfección de la Ubre Se barre Se lava con agua Se lava con agua y desinfectante Limpieza de los recipientes para la leche Solo agua Yodo Tipo de Ordeño Ltrs de leche por No de Ordeños al día 1 2 Prueba del CMT SI NO Desinfección de la Ubre Se hace No se lava con agua Solo agua Yodo



DATOS DE MASTITIS SUBCLINICA

Utiliza protocolo de tratamiento —	Rota los antibioticos	Examen clínico de la ubre
contra mastitis	⊚ SI ⊚ NO	
Cuándo? 1 mes 2 meses	Respeta el periodo de retiro post tratamiento	Resultados CMT Prueba Positiva Negativa Trazas
3 a más meses	¿Qué hace con la leche de retiro?	CDI CDD CTI CTD
Γipo de Antibiotico	Se da al terneroDerivados	
Sulfa Cefalexina	Consumo en el hogar Acopio	
Amox + Ac Enrofloxacina	Se da a otros animales	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N

DATOS DEL LABORATORIO

Cultivo Bacteriologico	Tinción de Gram	Prueba de la catalasa
Crecimiento		Positva Negativa
Agar MacConkey Agar Sangre Crecimiento Negativo	Prueba de la coagulasa Positiva Negativa	
	Antibiograma	
	Genta	AMC
Genero/Especie	Resistente	Resistente
S.aureus		○ Intermedio
Klebsiella	Sensible	Sensible
S.cn Streptococcus E.coli Corynebacterium	ENO Resistente Intermedio Sensible	SXT Resistente Intermedio Sensible
	CL	ОТ
	Resistente	Resistente
	Intermedio	Intermedio
		Sensible
	OX	-VAN -
	Resistente	Resistente
	Intermedio	Intermedio
	Sensible	Sensible