

ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS – I.A.S.A. I
“GRAL. CARLO MAGNO ANDRADE PAREDES”

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y ANTIBIOGRAMA DE
 PATÓGENOS PRESENTES EN LECHE CON MASTITIS EN
 GANADERÍAS BOVINAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Elaborado por:

VANESA LORENA ACUÑA MOLINA
ALEXANDRA PATRICIA RIVADENEIRA ESPINOSA

Sangolquí, Abril 2008

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

Vanessa Lorena Acuña Molina

Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa

**COORDINADOR ENCARGADO DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS IASA**

Ing. Patricia Falconi

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Carlos Orozco B.

El Prado, Abril del 2008

CERTIFICACIÓN

Certificamos que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por las Srtas. Vanessa Lorena Acuña Molina y Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario.

Dr. Joar García
DIRECTOR

Ing. Diego Vela
CODIRECTOR

Ing. Jaime Villacís
BIOMETRISTA

El Prado, Abril del 2008

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Vanessa Lorena Acuña Molina
Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa

DECLARAMOS QUE:

El proyecto de grado denominado “Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan después de los párrafos correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de nuestra autoría.

En virtud de esta declaración, nos responsabilizamos del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Quito, Abril del 2008

Vanessa Lorena Acuña Molina

Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CERTIFICADO

Dr. Joar García e Ing. Diego Vela

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado **“Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha”**, realizado por **Vanessa Lorena Acuña Molina** y **Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a **Vanessa Lorena Acuña Molina** y **Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa** que lo entreguen al **Ing. Patricia Falconi**, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Quito, Abril del 2008

Dr. Joar García
DIRECTOR

Ing. Diego Vela
CODIRECTOR

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

AUTORIZACIÓN

Nosotros, Vanessa Lorena Acuña Molina y Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa

Autorizamos a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha”, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y autoría.

Quito, Abril del 2008

Vanessa Lorena Acuña Molina

Alexandra Patricia Rivadeneira Espinosa

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios, a mi Madre Dolorosa por ser quienes me han dado la fortaleza para terminar mis estudios exitosamente y de esta manera alcanzar las metas propuestas.

A mis amados padres Patricio y Luisa y mis queridos hermanos Santiago y José Luis, a mi abuelita Marujita quienes son el tesoro de mi vida y sobre todo por brindarme su amor y apoyo incondicional y haberme enseñado a ser una persona de bien.

A mis amigos y compañeros con los que he compartido momentos inolvidables a lo largo de mi carrera, los llevare siempre en mi corazón.

Alexandra

Quiero dedicar mi esfuerzo y empeño en la elaboración de esta investigación a Dios, él es el principio y fin de todas las cosas. A mis queridos padres Jaime y Alicia por su amor y apoyo durante todo momento, a mis hermanas Paola y Jenny por ser mis grandes amigas. A mis familiares y amigos, por brindarme su cariño y ayuda.

Vanessa

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarnos la oportunidad de terminar nuestros estudios con éxito y darnos la fortaleza para conseguir nuestros logros.

A nuestros padres, hermanos y familiares por depositar su cariño, confianza y entrega incondicional.

A todas las personas del Instituto Nacional de Higiene Izquieta Pérez, y de manera especial al Dr. Julio Arévalo por habernos dado su apoyo, y principalmente su amistad en todo momento. A la Lic. Ruth Vásquez por compartir sus conocimientos desinteresadamente y colaborarnos en la realización de esta investigación.

Al Dr. Joar García nuestro director, por guiarnos y ayudarnos a llevar con éxito todas las dificultades que se presentaron en el transcurso de este tiempo.

Ing. Diego Vela como nuestro codirector e Ing. Jaime Villacís como nuestro biometrista, quienes nos colaboraron y guiaron durante todo el proceso de investigación.

Al Ing. Esteban Jácome por su interés y colaboración, por darnos la apertura para trabajar con haciendas de La Holandesa.

A nuestros amigos quienes siempre estuvieron en los buenos y malos momentos durante todo este tiempo, especialmente a todos aquellos que nos han brindaron ayuda cuando más lo necesitamos.

Alexandra y Vanessa

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2.3. HIPOTESIS.....	4
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. MASTITIS.....	5
3.1.1. GENERALIDADES.....	5
3.1.2. MANEJO.....	6
3.1.2.1. FACTORES FÍSICOS.....	6
3.1.2.1.1 Heridas Físicas.....	6
3.1.2.1.2 Desinfectantes.....	7
3.1.2.1.3 Personal.....	7
3.1.2.1.4 Equipo de Ordeño.....	7
3.1.2.1.5 Otros Factores.....	8
3.1.2.2. FACTORES GENÉTICOS.....	8
3.1.2.3. FACTORES NUTRICIONALES.....	9
3.1.3. TIPO DE MASTITIS.....	10
3.1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LA MASTITIS DE ACUERDO AL ORIGEN.....	10
3.1.3.1.1 Mastitis Contagiosa.....	10
3.1.3.1.2 Mastitis Originada en la piel de los pezones.....	10
3.1.3.1.3 Mastitis Ambiental.....	10
3.1.3.1.4 Mastitis Iatrogénica.....	10
3.1.3.2. POR LA INTENSIDAD DE LA INFECCIÓN.....	11
3.1.3.2.1 Mastitis Subclínica.....	11
3.1.3.2.1 Mastitis Clínica.....	11
3.1.3.2.1.1 Mastitis Moderadamente Aguda.....	12
3.1.3.2.1.2 Mastitis Severamente Aguda.....	12
3.1.3.2.1.3 Mastitis Crónica.....	13

3.1.3.2.1.4 Mastitis con Glándula Improductiva.....	14
3.1.4. PATÓGENOS.....	14
3.1.4.1. Staphylococcus aureus.....	15
3.1.4.2. Streptococcus agalactiae.....	16
3.1.4.3. Streptococcus dysgalactiae.....	17
3.1.4.4. Streptococcus uberis.....	17
3.1.4.5. Coliformes.....	17
3.1.4.5.1 Escherichia coli.....	19
3.1.4.6. Pseudomonas.....	19
3.1.4.7. Corynebacterium.....	20
3.1.4.8. Bacillus cereus.....	21
3.1.5 DIAGNÓSTICO.....	22
3.1.5.1 Pruebas de Campo.....	23
3.1.5.2 Pruebas de Laboratorio.....	23
3.1.5.3 Pruebas de Tanque.....	23
3.1.6. PRUEBAS DE CAMPO.....	23
3.1.6.1 PALPACIÓN DE LA UBRE.....	23
3.1.6.2 PAPEL INDICADOR.....	24
3.1.6.3 PRUEBA DE WISCONSIN (WMT).....	24
3.1.6.4 PRUEBA DE FONDO NEGRO.....	24
3.1.6.5 CALIFORNIA MASTITIS TEST.....	25
3.1.7. BUENAS PRÁCTICAS DE ORDEÑO.....	27
3.1.7.1. ACTIVIDADES PRE-ORDEÑO.....	29
3.1.7.2. RUTINA EN LA SALA DE ORDEÑO.....	29
3.1.7.2.1 Lavado de Pezones.....	29
3.1.7.2.2 Secado de Pezones.....	30
3.1.7.2.3. Extracción de primeros chorros en Fondo Negro.....	30
3.1.7.3. ORDEÑO.....	30
3.1.7.3.1 Ordeño Manual.....	31
3.1.7.3.2 Ordeño Mecánico.....	31
3.1.7.3.2.1 Colocación de Pezoneras.....	32

3.1.7.3.2.2 Retiro de Pezoneras	32
3.1.7.3.2.3 Sellado de Pezones	33
3.1.7.3.2.4 Higiene del Equipo de Ordeño	34
3.1.7.4.MEDIDAS DE CONTROL.....	34
3.1.8. ANTIMASTITICOS	35
3.1.8.1. INGREDIENTES ACTIVOS.....	36
3.2. LABORATORIO.....	37
3.2.1. TOMA DE MUESTRA DE LECHE.....	37
3.2.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	39
3.2.2.1. MEDIOS ENRIQUECIDOS	40
3.2.2.1.1 Agar Sangre.....	41
3.2.2.1.2. Cerebro Corazón.....	41
3.2.2.2. MEDIOS BÁSICOS	41
3.2.2.2.1 Agar Mueller Hinton	42
3.2.2.3. MEDIOS SELECTIVOS.....	43
3.2.2.3.1 Agar MacConkey	44
3.2.2.4. MEDIOS DIFERENCIALES.....	45
3.2.2.4.1 Agar Citrato de Simmons	45
3.2.2.4.2 Ureasa	45
3.2.2.4.3 Medio Sim	46
3.2.2.4.4 Coagulasa	46
3.2.2.4.5 Catalasa	46
3.2.2.4.6 Lisina Iron Agar	47
3.2.3. COLORANTES.....	47
3.2.3.1 Violeta de Genciana	47
47 3.2.3.2 Lugol	47
3.2.3.3 Alcohol Cetona	48
3.2.3.4 Fushina	48
3.2.4. AISLAMIENTO DE MUESTRAS	48
3.2.4.1. SIEMBRA DE MUESTRAS.....	49
3.2.4.1.1 Siembra por Estrías en Agar.....	50

3.2.4.1.2 Siembra en Tubo de Ensayo.....	51
3.2.4.2. COLONIAS PURAS.....	52
3.2.4.3. TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN	53
3.2.5. BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.....	54
3.2.5.1. TEORÍAS DE LA TINCIÓN GRAM.....	54
3.2.5.2. PROCEDIMIENTO DE LA COLORACIÓN GRAM.....	58
3.2.5.3. MORFOLOGÍA BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS	60
3.2.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	61
3.2.6.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS.....	62
3.2.6.1.1 Prueba de coagulasa.....	62
3.2.6.1.2 Prueba de catalasa	63
3.2.6.1.3 Fermentación manitol	64
3.2.6.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.....	64
3.2.6.2.1 Prueba de TSI	65
3.2.6.2.2 Citrato de Simmons	66
3.2.6.2.3 Medio Rojo de Metilo	66
3.2.6.2.4 Prueba de Ureasa.....	67
3.2.6.2.5 Prueba de Indol	67
3.2.6.2.6 Lysina Iron Agar (LIA)	68
3.2.7. ANTIBIOGRAMA.....	71
3.2.7.1. PROCEDIMIENTO PARA EL ANTIBIOGRAMA.....	71
3.2.7.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	72
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
4.1. LOCALIZACIÓN.....	75
4.2. EQUIPOS Y MATERIALES.....	75
4.4. METODOS.....	76
4.4.1. PREVALENCIA DE MASTITIS	76
4.4.2. NIVEL TECNOLÓGICO DE LAS HACIENDAS	77
4.4.3. PATÓGENO MÁS REPRESENTATIVO.....	79
4.4.4. SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA DE PATÓGENOS.....	86

4.4.5. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	88
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	90
5.1. PREVALENCIA DE MASTITIS.....	90
5.2. NIVEL TECNOLÓGICO DE LOS HATOS.....	92
5.3. PATÓGENOS IDENTIFICADOS.....	95
5.4. SENSIBILIDAD DE PATÓGENOS A LOS ANTIBIÓTICOS.....	98
5.4.1. REACCIÓN DE LOS PATÓGENOS FRENTE A CADA ANTIBIÓTICO.....	99
5.4.2. REACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A CADA PATÓGENO....	104
5.4.3. DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO.....	111
VI. CONCLUSIONES.....	116
VII. RECOMENDACIONES.....	118
VIII. RESUMEN.....	119
IX. ABSTRACT.....	121
X. BIBLIOGRAFÍA.....	123
XI. WEBGRAFÍA.....	126
XII. ANEXOS.....	131

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 3.1. Fuentes más comunes (de mayor a menor prevalencia) y formas de diseminación de las bacterias más comunes productoras de mastitis.....	15
Cuadro 3.2. Interpretación de los resultados de la prueba de CMT.....	26
Cuadro 3.3. Distribución de Ingredientes Activos de los Antibióticos.....	37
Cuadro 3.4. Tiempos y temperaturas de incubación de microorganismos.....	53
Cuadro 3.5. Reacción-Interpretación prueba de LIA.....	68
Cuadro 3.6. Reacciones de los ingredientes activos según su Concentración.....	73
Cuadro 4.1. Datos de las haciendas muestreadas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	74
Cuadro 4.2. Formato de calificación de acuerdo a las buenas prácticas de ordeño...	78
Cuadro 4.3. Calificación de las haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	78
Cuadro 4.4. Interpretación de pruebas bioquímicas bacterias positivas, Pichincha, Ecuador, 2008.....	82
Cuadro 4.5. Reacciones de pruebas bioquímicas, Pichincha, Ecuador, 2008.....	85
Cuadro 5.1. Porcentaje de mastitis en los hatos ganaderos de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	91
Cuadro 5.2. Tipos de haciendas según su calificación, Pichincha, Ecuador, 2008....	93
Cuadro 5.3. Tipos de haciendas y grado de mastitis de las haciendas, Pichincha, Ecuador, 2008.....	94
Cuadro 5.4. Bacterias Gram negativas encontradas en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	95
Cuadro 5.5. Bacterias Gram positivas encontradas en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	96
Cuadro 5.6. Análisis de varianza del diámetro de bacterias Gram positivas y Gram negativas, Ecuador, 2008.....	112
Cuadro 5.7. Promedio + error estándar de las bacterias Gram negativas, Pichincha, Ecuador, 2008.....	113
Cuadro 5.8. Promedio + error estándar de las bacterias Gram positivas, Pichincha,	

Ecuador, 2008.....	114
Cuadro 5.9. Promedio + error estándar de las bacterias Gram positivas, Pichincha, Ecuador, 2008.....	114
Cuadro 5.10. Promedio + error estándar de antibióticos usados para bacterias Gram negativas, Pichincha, Ecuador, 2008.....	114
Cuadro 5.11. Promedio + error estándar de antibióticos usados para bacterias Gram positivas, Pichincha, Ecuador, 2008.....	115

LISTADO DE FIGURAS

Figura 3.1. Tres de las principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño..	6
Figura 3.2. Prueba de fondo negro.....	25
Figura 3.3. Tres tipos de ordeño.....	31
Figura 3.4. Ordeño manual con mano llena.....	31
Figura 3.5. Sellado del pezón después del ordeño.....	33
Figura 3.6. Limpieza de tanques.....	34
Figura 3.7. Siembra en estrías por agotamiento.....	51
Figura 3.8. Siembra en tubo de ensayo.....	52
Figura 3.9. Preparación de placa portaobjetos para su observación en el microscopio.	58
Figura 3.10. Cocos en racimo, cocos en cadena y tétradas.....	60
Figura 3.11. Bacilos Gram positivos gruesos y delgados, y bacilos Gram negativos delgados y cortos.....	61
Figura 3.12. Prueba Coagulasa.....	63
Figura 3.13. Reacción de la Prueba de Catalasa.....	64
Figura 3.14. Reacciones bioquímicas de bacterias Gram Negativas.....	70
Figura 5.1. Porcentaje de prevalencia de mastitis por hacienda ganadera de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	92
Figura 5.2. Grado de infección según el tipo de hacienda, Pichincha, Ecuador, 2008.	94
Figura 5.3. Bacterias Gram negativas presentes en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	96
Figura 5.4. Bacterias Gram positivas presentes en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.....	97
Figura 5.5. Sensibilidad de los patógenos Gram negativas frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.....	100
Figura 5.6. Sensibilidad de los patógenos Gram negativas frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.....	101
Figura 5.7. Sensibilidad de los patógenos Gram positivos frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.....	102

Figura 5.7. Sensibilidad de los patógenos Gram positivos frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.....	103
Figura 5.9. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram negativas, Ecuador, 2008.....	106
Figura 5.10. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram negativas, Ecuador, 2008.....	107
Figura 5.11. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram positivas, Ecuador, 2008.....	108
Figura 5.12. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram positivas, Ecuador, 2008.....	109
Figura 5.13. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram positivas, Ecuador, 2008.....	110

I. INTRODUCCIÓN

La mastitis es la enfermedad más común en los bovinos en todo el mundo y la más costosa para el productor por las pérdidas de leche, vacas afectadas y el dinero invertido en Médicos Veterinarios y medicamentos (Cano 2006). Además, los cambios en la composición de la leche (reducción de calcio, fósforo, proteína y grasa, e incrementos de cloro y sodio) reducen su calidad (Agrobit Gestión Agropecuaria 2004).

La mastitis es un síndrome ya que es multifactorial, es solamente un signo de más de 100 enfermedades y clínicamente significa inflamación de la glándula mamaria; ésta inflamación debido a la presencia de patógenos se convierte en una infección provocando daños al epitelio mamario (Cano 2006). La mastitis también puede ser provocada por: lesiones físicas, mala desinfección de las ubres en el ordeño, máquinas de ordeño mal utilizadas, deficiente sellado post-ordeño, mal estado de las camas, entre otros factores que permiten el ingreso de microorganismos patógenos a las glándulas mamarias o causan daño físico del tejido, provocando así su inflamación.

Las pérdidas económicas por mastitis en el ganado bovino son para el productor, por las pérdidas directas, entre las que se pueden mencionar: la eliminación de leche con mastitis, el tratamiento de la enfermedad, la eliminación de leche con antibiótico, tiempo con baja producción hasta que el animal se recupere totalmente, entre otras. Y para la industria debido a la disminución en el suministro de materia prima para su procesamiento y la baja calidad de la misma (Pedraza 1991).

En Estados Unidos de América, se ha estimado que las pérdidas solo por menor producción de leche alcanzan a 1 billón de dólares anuales y que el costo promedio de la mastitis clínica fluctúa entre 27 y 50 dólares/vaca/año (DeGraves y Fetrow 1993). En Chile, Pedraza (1991), estableció que la disminución en la producción de leche por lactancia en vacas con mastitis clínica puede llegar a un 14%, al compararla con la de animales que no presentaban la enfermedad. Según el Consejo Nacional de Mastitis en México, se estima una pérdida promedio de 225 dólares anuales por vaca en el hato, de los cuales 78 son atribuidos a casos de mastitis clínica (López *et al.* 2006).

Si se habla de que las pérdidas para los países desarrollados son representativas a su producción; las cifras alcanzadas en los países en desarrollo, como Ecuador, no podrían dejar de ser significativas, aunque existen pocos o ningún dato que exprese dicha pérdida. Por ello la necesidad de llevar un control específico de la mastitis en el país, lo que se puede lograr mediante análisis bacteriológicos y pruebas de sensibilidad/resistencia para tener una idea real del estado de la enfermedad y así disminuir los gastos ocasionados en los hatos ganaderos.

Como menciona Martin *et al.* (2002), en un estudio realizado en la Universidad de Chile, Universidad Austral de Chile y Cooprinsem; donde determinó la sensibilidad de bacterias patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X^a Región, frente a los antimicrobianos utilizados con mayor frecuencia en lecherías de Chile. Se utilizó para ello el Método de Dilución en Placa para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de cada cepa bacteriana. Se tomaron 963 muestras correspondientes a las dos primeras regiones, de las cuales se aislaron 449 cepas

bacterianas y se encontró un fuerte predominio de *Escherichia coli* (40,76%). En la Xª Región, de 2000 muestras se aislaron 1012 cepas, y se encontró un predominio de *Staphylococcus aureus* (55,53%). Para las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus coagulasa negativo*) presentaron altos porcentajes de resistencia (>25%), frente a amoxicilina, ampicilina, penicilina, estreptomina y lincomicina. Para las cepas de *E. coli* no se presentó resistencia superior al 25%.

López *et al.* (2006), en un estudio realizado en la Universidad Autónoma del Estado de México; determinó la sensibilidad a los antibióticos utilizando para esto sensibilizadores para bacterias Gram positivas impregnados con antibióticos. Después de que las bacterias se incubaron a 37° C por 18 horas, se midió el halo de inhibición para determinar el grado de sensibilidad. Los resultados obtenidos fueron: 17 de los aislamientos mostraron resistencia a ampicilina (85%), dicloxacilina y penicilina. En el caso de la dicloxacilina no se detectaron aislamientos sensibles; sin embargo, 3 de ellos presentaron una sensibilidad intermedia. Por otro lado 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 excepciones.

Estos y muchos trabajos nos muestran la importancia del diagnóstico, aislamiento y antibiograma, para tener éxito en el control de ésta enfermedad.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar los agentes causales de mastitis encontrados en muestras de leche obtenidas de haciendas de ganaderías bovinas de la Provincia de Pichincha.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el nivel tecnológico de las haciendas.
- Determinar la prevalencia de mastitis en 20 haciendas muestreadas de la provincia de Pichincha.
- Determinar el patógeno más representativo en leche con mastitis.
- Establecer sensibilidad y resistencia de los patógenos mediante antibiogramas.

2.3. HIPOTESIS

- Las vacas de las haciendas ganaderas de alta tecnificación presentan menor grado de prevalencia de mastitis que las haciendas de baja tecnificación.
- Los patógenos presentes en las haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha coinciden con los patógenos más comunes causantes de mastitis.
- La resistencia del patógeno frente a los antibióticos está dada por los tratamientos aplicados en el manejo del hato en las diferentes localidades.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. MASTITIS

3.1.1. GENERALIDADES

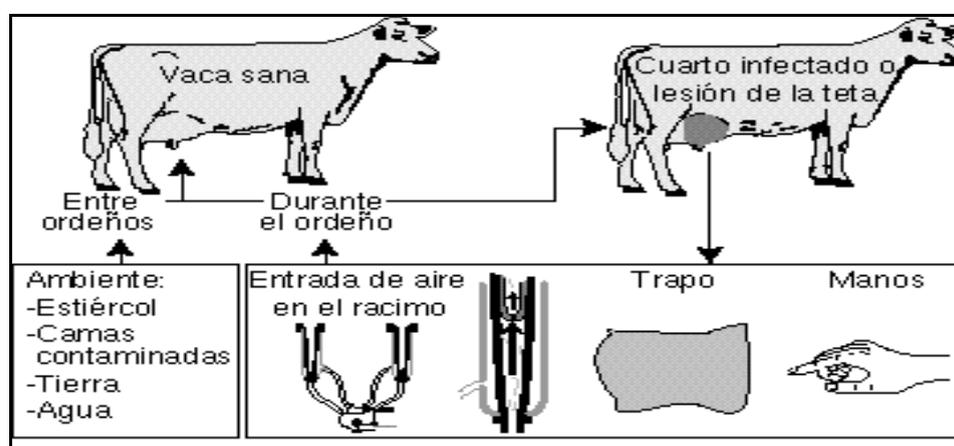
Mastitis (del griego mastos = glándula mamaria y del sufijo itis = inflamación). Se define como la inflamación de la glándula mamaria que generalmente se presenta como una respuesta a la invasión por microorganismos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño (Avila y Gutiérrez 2004).

Según (Acebo 2006), la mastitis es la enfermedad más común y costosa del ganado lechero, debido a los efectos que ocasiona sobre la producción y la calidad de leche. Algunas investigaciones aseguran que la mastitis causa una disminución en la producción del 70% de las pérdidas totales, y otros porcentajes contribuyen a la disminución en el precio por deficiencias de calidad, gastos en medicamentos, servicio veterinario, desecho de animales, descarte en la leche, problemas de residuos de antibióticos.

Diferentes investigadores han reportado que los porcentajes de vacas eliminadas a causa de mastitis varían anualmente desde 1,3 hasta 25%, datos obtenidos en un hato del Altiplano de México (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.2. MANEJO

Es importante considerar la fuente y formas de transmisión de la enfermedad. Los organismos que causan la mastitis viven en diferentes ambientes (materia fecal, cama, piel, etc.). La limpieza general de las vacas y su alojamiento, como también buenos procedimientos de manejo (especialmente ordeño) son formas efectivas de controlar la difusión de la mastitis (ARA 2006). (Figura 3.1)



Fuente: Díaz 2006

Figura 3.1. Tres de las principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño.

3.1.2.1. FACTORES FÍSICOS:

3.1.2.1.1. Heridas Físicas

Las heridas físicas pueden causar daños en la piel del pezón. Si estas heridas involucran apertura de la punta del pezón (canal), por lo general, no se recuperan apropiadamente. Tales heridas incrementan el riesgo de entrada de bacterias a la glándula a través de la apertura del pezón y causan nuevas infecciones y elevados recuentos de células somáticas (Jaramillo 2007).

3.1.2.1.2. Desinfectantes

Al adquirir un desinfectante para pezones es aconsejable que se conozca su capacidad de controlar la microflora existente en el medio donde se aplicará. Después de terminado el ordeño del ganado se deberá eliminar los restos del desinfectante y lavar bien los recipientes (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.2.1.3. Personal

Explotaciones especializadas en producción el personal utiliza el ordeño mecánico, pero ejecuta las actividades con diferentes grados de eficiencia, ya que carecen de entrenamiento específico. En explotaciones menores el ordeño se hace manualmente, con el empleo de diferentes métodos de ordeño como son: "mano llena", "pellizco" y "pulgar", siendo recomendable el primer método, pero son pocos los ordeñadores que lo emplean ya que la mayoría aplica una combinación de los tres métodos mencionados (Avila y Gutiérrez 2004).

El personal que labora en la zona para ordeño, constituye uno de los elementos más importantes en el modelo de producción, sin embargo, es poca la atención que la administración de los establos pone en la selección y supervisión de este personal (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.2.1.4. Equipo de ordeño

Los sistemas para ordeño han evolucionado buscando reducir el número de trabajadores destinados al manejo de las unidades en ordeño, mejorando la capacidad del equipo y las condiciones sanitarias durante el proceso de ordeño. Cuando el funcionamiento del equipo

es ineficiente así como las condiciones sanitarias con que se realizan las actividades de ordeño, la máquina ordeñadora puede tomar parte en la presentación de mastitis al transportar microorganismos, establecer estos y/o lesionar al pezón (Avila y Gutiérrez 2004).

Los parámetros de operación del equipo de ordeño deben estar ajustados a los estándares apropiados, y las unidades de ordeño deben ser usadas correctamente para prevenir la irritación de la punta del pezón o los daños que puedan conducir a mastitis (Jaramillo 2007).

3.1.2.1.5. Otros Factores

El uso de selladores de baja calidad (químicos fuertes que pueden ser muy ácidos, muy cáusticos, detergentes muy agresivos), así como productos que tienen tendencia a remover grasas de la piel y dejarla muy seca. Picaduras de insectos y exposición a la humedad o el calor (condiciones de mucho sol), también pueden provocar problemas en la piel y en la punta del pezón, que llevarán a una inflamación de la glándula mamaria (Jaramillo 2007).

3.1.2.2. FACTORES GENÉTICOS

Es un hecho que algunas vacas presentan una mayor susceptibilidad a la mastitis que otras. Los factores estructurales del canal del pezón son importantes en la regulación de la entrada de microorganismos. Algunos autores afirman que si el tono de las estructuras anatómicas de la apertura del pezón es reducido, lo que es un carácter heredable, la resistencia a la entrada de los microorganismos será menor. Se seleccionará genéticamente vacas con

diámetro pequeño del canal del pezón, lo que hará que la frecuencia de mastitis disminuya (Mc Donald 1977).

Otros factores inhibidores de crecimiento bacteriano aumentan en la inflamación; uno de ellos es la lactoferrina, proteína que compite con los microorganismos que requieren hierro (Avila y Gutiérrez 2004).

También se encuentran factores inmunológicos como linfocitos T y B, inmunoglobulinas, leucocitos, neutrófilos y polimorfo nucleares, elementos efectivos en algunas infecciones por coliformes (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.2.3. FACTORES NUTRICIONALES

La alimentación actual de la vaca lechera está destinada a mantener un alto nivel de producción; esto constituye un factor de tensión fisiológico que puede provocar mastitis clínica en vacas con antecedentes de infecciones o mastitis subclínica (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.3. TIPOS DE MASTITIS

3.1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LA MASTITIS DE ACUERDO AL ORIGEN

Según (Varela 2002), la mastitis se clasifica de la siguiente manera:

3.1.3.1.1. Mastitis contagiosa: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.*

3.1.3.1.2. Mastitis originada en la piel de los pezones: *Staphylococcus no aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes* y otros, *Streptococcus no agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis*, *S. uberis*, entre otros.

3.1.3.1.3. Mastitis ambiental: *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter freundii*.

3.1.3.1.4. Mastitis iatrogénica: Asociada al uso inadecuado de cánulas intramamarias con la etiología de Mohos o Levaduras de los géneros: *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporum*.

El aspecto cremoso de la secreción láctea, el largo periodo de evolución de la enfermedad, la no respuesta clínica a antibióticos y el uso repetido de los mismos por vía intramamaria son factores que se deben tener en cuenta para sospechar de estos microorganismos.

3.1.3.2. CLASIFICACIÓN POR LA INTENSIDAD DE LA INFECCIÓN

3.1.3.2.1. Mastitis Subclínica

Según Pinzón (1989) la mastitis subclínica no es fácilmente visible ni se puede detectar sin ayuda de pruebas especiales. Casi todos los cuartos afectados se ven normales y la leche tiene apariencia normal; pero según Avila y Gutiérrez (2004) existe una disminución en la producción de leche e incremento en el número de células somáticas.

La mastitis subclínica es considerada la más importante por diversas razones, como menciona Pinzón (1989): Es de 15 a 40 veces más común que la mastitis clínica, generalmente precede a la forma clínica, por lo tanto, si queremos controlar la forma clínica, debemos empezar por controlar la subclínica, es de larga duración, es difícil de detectar, disminuye la producción de leche, influye negativamente en la calidad de la leche, provoca infección en otros animales del rebaño.

3.1.3.2.2. Mastitis Clínica

Es aquella que se puede ver a simple vista y se caracteriza por anomalías en la leche tales como escamas o grumos. A nivel de la vaca enferma, el cuarto afectado puede estar caliente, inflamado y sensible (Pinzón 1989).

La clasificación de la mastitis clínica es:

3.1.3.2.2.1. Mastitis Moderadamente Aguda (MMA)

La infección tiene más de 24 horas, la vaca presenta sus constantes fisiológicas y ubre totalmente normales, pero en la leche se observa natillas o tolondrones que pueden ser detectados al realizar la prueba del tazón oscuro obligatoria antes de ordeñar a cada vaca. Se reduce en un 30 % la producción. La MMA se trata localmente por vía intramamaria o intrapezón, se desinfecta la abertura natural del pezón y se aplican productos comerciales para mastitis, es decir cada 12 horas, utilizando el mismo producto comercial con el mismo principio activo por 3 ordeños consecutivos o de acuerdo lo requiera el caso, si este tratamiento no es efectivo se debe cambiar a otro antibiótico aplicándolo por 3 ordeños por lo menos; al seguir el procedimiento mencionado se evitará resistencia a los antibióticos aplicados (Cano 2006).

3.1.3.2.2.2. Mastitis Severamente Aguda (MSA)

La infección tiene más de 72 horas. Las constantes fisiológicas están normales; la leche sale con más cantidad de tolondrones, se puede apreciar cierta inflamación en la glándula, la misma que está dura y caliente. Se pierde el 40% de producción (Cano 2006).

Según Avila y Gutiérrez (2004), en esta forma de mastitis podrán presentarse signos sistémicos como septicemia, toxemia, fiebre, anorexia, depresión, movimientos ruminales disminuidos, entre otros signos.

La MSA se tratará local y parenteral, con el mismo principio activo, cada 12 horas por un lapso no menor a 3 días, ya que esto provocaría resistencia; si se desea utilizar otro antibiótico deberá ser uno que sea sinérgico, cuidando de no usar principios activos

antagónicos que se inactiven o provoquen daño; para lo cual es necesario tener un conocimiento en farmacología (Cano 2006).

3.1.3.2.2.3. Mastitis Crónica (MC)

La infección tiene más de 5 días, toda la leche sale con tolondrones, la ubre está severamente inflamada, endurecida y caliente, la vaca tiene fiebre, taquicardia, atonía ruminal, anorexia, etc., se pierde el 50% de producción (Cano 2006).

La MC también se tratará local y parenteral, igual que la anterior con la diferencia de que al estar más tiempo infectada el tratamiento será más prolongado, más agresivo, la glándula tardará más en recuperarse y las pérdidas económicas serán mayores; ya que se considera la leche que se deja de producir, la leche que se tira por la infección y por el tiempo del tratamiento. Al utilizar el antibiótico vía parenteral la dosis inicial es generalmente el doble en comparación a las dosis subsecuentes, el tratamiento dura aproximadamente 5 días. Antes de realizar el tratamiento local es necesario efectuar lavados intramamarios con Soluciones Salinas Fisiológicas (SSF) y antibiótico, acompañadas de un masaje, el lavado debe realizarse las veces que sea necesario hasta que la solución salga sin tondrones o exudados y posteriormente se iniciará con el tratamiento local (Cano 2006).

Se realizará un tratamiento sintomático, si el animal presenta fiebre, dolor e inflamación mediante la aplicación de un antipirético, analgésico y anti inflamatorio; si presenta anorexia se aplica por vía oral una transfusión de líquido ruminal con sonda, microflora comercial liofilizada o estimular el apetito con vitaminas; si esta deshidratado se aplicará agua por vía oral con sonda o se aplicarán sueros intravenosos, subcutáneos o

intraperitoneales según el porcentaje de deshidratación; y así aplicar el tratamiento según sean los síntomas (Cano 2006).

3.1.3.2.2.4. Mastitis con glándula improductiva o glándula ciega (MI)

La infección tiene en ocasiones semanas, la glándula se ve pequeña, está flácida y fría, no se obtiene leche sino exudados, las constantes fisiológicas están normales debido a que la fibrina aisló esta glándula provocando una hipoxia y necrosis del parénquima con abscesos y exudados; inclusive el parénquima se puede desprender (Cano 2006).

La Mastitis con glándula improductiva se trata igual que la crónica, el primer lavado se dará con SSF y antisépticos para retirar los exudados, tejidos infectados o necrosados, después se lavará con la Solución Salina Fisiológica y antibiótico para retirar el desinfectante. Para el tratamiento local se usarán jeringas antimastíticas para secado de tal manera que el antibiótico permanezca más tiempo y así eliminar el foco de infección y salvar la mayor cantidad de tejido glandular posible (Cano 2006).

3.1.4. PATÓGENOS

Según (Pinzón 1989), la mastitis es ocasionada por organismos microscópicos que penetran la ubre a través del canal de los pezones. La penetración puede ocurrir por multiplicación, movimiento mecánico, propulsión durante el ordeño o por una combinación de factores. Aproximadamente del 90 al 95% de los casos son provocados por cuatro microorganismos. Los cuales son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*.

Según Kirk (1984), los gérmenes más importantes de la inflamación de la ubre son los estreptococos, los estafilococos, los coliformes, *Corynebacterium pyogenes*, las pseudomonas y levaduras. Los gérmenes menos frecuentes son los micoplasmas, clostridios, klebsiellas, aerobacter, bacilo céreo, nocardias, hongos, etc. (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Fuentes más comunes (de mayor a menor prevalencia) y formas de diseminación de las bacterias más comunes productoras de mastitis.

Tipo de bacteria	Porcentaje de todas las infecciones	Causa primaria	Principales formas de difusión
<i>Streptococcus agalactiae</i>	> 40%	Ubre infectada	De cuarto a cuarto; vaca a vaca durante el ordeño
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 - 40%	Ubre infectada, pezón lesionado	De cuarto a cuarto, vaca a vaca durante el ordeño
<i>Streptococcus ambiental</i> ¹	5 - 10%	Cama, materia fecal	Medio ambiente de la vaca
Coliformes ²	<1%	Materia fecal	Medio ambiente de la vaca

¹*Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*; ²*Escherichiacoli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiellia pneumoniae*
Fuente: (ARA 2006).

3.1.4.1. *Staphylococcus aureus*

Está permanentemente en el medio ambiente de la vaca y su depósito principal en las vacas adultas lo constituyen las ubres y pezones afectados. Este organismo no progresa en la piel de los pezones sanos, pero rápidamente forma colonias en los canales de los pezones, especialmente si existe lesión cerca de las puntas de las mismas, lo cual facilita su penetración al interior de la ubre y la invasión de los tejidos de la misma, ocasionando la formación de un tejido cicatrizal. Este tejido impide que los medicamentos penetren en los lugares infectados, haciendo que el tratamiento en la lactancia sea a menudo ineficaz. (Pinzón 1989). *Staphylococcus aureus* son patógenos contagiosos y son transmitidos por

los tejidos infectados durante el proceso de ordeño. Este patógeno puede producir gangrena y afectar otros tejidos; sin embargo no puede sobrevivir grandes periodos en el medio ambiente (Hogan *et al.* 1999).

Es un microorganismo esférico aproximadamente de 0.8 micrómetros de diámetro, que en frotis teñido con la técnica de Gram aparece de color púrpura (Gram positivo) y en racimos, haciendo honor a su nombre en griego "staphylo" que quiere decir en racimo de uvas; no son móviles, ni forman esporas, generalmente no cápsulados aunque en ocasiones pueden aparecer aislamientos con cápsula (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.4.2. *Streptococcus agalactiae*

Es común en muchos rebaños lecheros y se encuentra principalmente en ubres infectadas. En rebaños infectados, el organismo puede aislarse del aire, en el lugar donde duermen los animales, en el equipo de ordeño, las manos del ordeñador u otros objetos, pero su presencia en esos lugares es el resultado de la contaminación con leche infectada; al no haber infección en la ubre, el organismo desaparecerá de todos estos lugares secundarios, normalmente dentro de tres semanas (Pinzón 1989).

Este microorganismo es considerado un parásito obligatorio, y el único organismo susceptible de ser erradicado de todo un rebaño lechero. El microorganismo es muy sensible al tratamiento de penicilina, incluso, durante la lactancia. Una excelente higiene, el buen manejo del ordeño, el tratamiento de las infecciones conocidas durante la lactancia y el tratamiento de rutina en las vacas secas erradican el organismo o lo mantiene a un nivel muy bajo (Pinzón 1989).

La infección de los animales sanos con este tipo de estreptococos suele producirse tras la compra de animales enfermos (Kleinschroth *et al.* 1991).

3.1.4.3. *Streptococcus dysgalactiae*

La fuente principal son las ubres infectadas, amígdalas y lesiones en la piel (Pinzón 1989). *Streptococcus dysgalactiae* puede ser contagiado de una vaca a otra durante el ordeño y las vacas pueden también llegar a ser infectadas por el medio ambiente (Hogan *et al.* 1999).

3.1.4.4. *Streptococcus uberis*

Se encuentran con mayor frecuencia en la piel de la ubre y de los pezones, dentro de éstas. Es la causa más importante de infecciones antes de la primera parición y durante el período de secado de la vaca (Pinzón 1989).

El *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* son responsables también por la mayoría de las mastitis que se presentan ya sea al comienzo o al final del período de seca. Además de estas dos especies de bacterias, existen muchos otros estreptococos ambientales (*Streptococcus bovis*, *Streptococcus fecalis*) que pueden causar mastitis (Adams y Moss 2005).

3.1.4.5. Coliformes

La incidencia de la infección es, generalmente poca, aunque pueden ocurrir brotes cuando existen condiciones que aumentan la exposición a las mismas. Los coliformes provienen

del estiércol. Las vacas más viejas, produciendo leche libre de leucocitos, son susceptibles a ser atacadas por este patógeno (Pinzón 1989).

Las bacterias coliformes son habitantes normales del suelo e intestino de las vacas. Se acumulan y multiplican en la materia fecal y en la cama. Los coliformes pueden causar mastitis solamente si las partículas contaminadas del medio ambiente entran en contacto con la ubre. Estos microorganismos no se adhieren a los conductos y al alvéolo de la ubre, en lugar se multiplican rápidamente en la leche y producen toxinas que son absorbidas dentro del torrente circulatorio; produciendo infecciones que conducen a mastitis clínicas agudas. La temperatura corporal de la vaca puede elevarse a 40°C y el cuarto infectado se inflamará y se volverá sensible al tacto. Los mecanismos de defensa de la vaca pueden eliminar las bacterias de la ubre, pero las toxinas permanecen y la vaca puede llegar a morir. Las vacas libres de otras bacterias causantes de mastitis (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*) parecen ser más susceptibles a las bacterias coliformes (ARA 2006).

Son microorganismos facultativos a excepción del género *Klebsiella*, móviles; los géneros *Escherichia* y *Klebsiella* usualmente capsulados, no esporulados, Gram negativos que fermentan la lactosa (Pérez y Vázquez 1987).

Se reporta que del 80 al 90% de infecciones intramamarias por coliformes se presentan como una mastitis clínica ligeramente aguda, auto limitante y algunas veces como severamente aguda (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.4.5.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli se encuentra en cantidades abundantes en el estiércol de los animales. La frecuencia de presentación aumenta al inicio de la lactación y disminuye conforme ésta avanza (Rothbauer *et al.* 1988).

Los signos clínicos antes discutidos generalmente dan la información suficiente para hacer un diagnóstico preliminar, pero en ciertos casos clínicos será necesario diferenciar con infecciones causadas por microorganismos Gram positivos, mediante el cultivo bacteriológico de una muestra de leche (Avila y Gutiérrez 2004).

En la mastitis sobreaguda causada por *Escherichia coli*, la toxemia puede matar a una vaca en 3 días, si no se da un tratamiento a tiempo, han dado resultado los tratamientos a base de sulfatrimetoprin y las quinolonas con el tratamiento sintomático según los signos (Pinzón 1989).

3.1.4.6. *Pseudomonas*

Generalmente aparece una infección persistente que puede estar caracterizada por exacerbaciones agudas o sub-agudas intermitentes (Pinzón 1989). Según Avila y Gutiérrez (2004), se puede manifestar clínicamente en formas variadas como: severamente aguda, suave o crónica.

La exposición extensa o tratamientos intramamarios se ha registrado como una causa de la infección. Las *pseudomonas* a menudo emanan de fuentes de aguas contaminadas, de la tierra o de las máquinas ordeñadoras que no han sido limpiadas debidamente (Pinzón 1989).

Es un bacilo delgado Gram negativo que se tiñe con dificultad, de 0.3 micrómetros de ancho por 1-3 de largo, con extremos redondeados y provistos de tres flagelos polares, microorganismo que también es fitopatógeno (Kirk y Bartlett 1984).

Pseudomona aeruginosa no crece en medios aeróbicos. Coagula la leche por las enzimas que produce, hidrolizando lentamente la caseína y coagula el suero hepático. Elabora enzimas proteolíticas, piosinosas de origen lipóide que hemolizan glóbulos rojos. Este microorganismo tiene propiedad bacteriolítica por sus enzimas (piosinasa, alfa-hidroxifenazina y una sustancia oleosa) y una proteína termoestable (Ávila y Gutiérrez 2004).

Pseudomona aeruginosa ha sido aislada tanto de los animales infectados como del agua utilizada para lavar el equipo de ordeño, considerándose ésta la fuente de contaminación. La mastitis producida por *P. aeruginosa*, puede en ocasiones ser confundida con mastitis gangrenosa por *Staphylococcus aureus* por los síntomas; de ahí la importancia del diagnóstico de laboratorio como confirmación del diagnóstico clínico antes de instaurar medidas terapéuticas y/o profilácticas ante un brote de mastitis (Las Heras *et al.* 2001).

3.1.4.7. *Corynebacterium*

Corynebacterium es un bacilo pequeño de forma cocobacilar, ocasionalmente pleomórfico de 0.2 a 0.3 y 0.5 a 2 micrómetros de largo, aeróbico, que en el frotis se puede apreciar individualmente o formando empalizadas, es Gram positivo. Es resistente cuando se

encuentra en exudados y en material o equipo de trabajo contaminado. Susceptible generalmente al iodo y penicilinas (Avila y Gutiérrez 2004).

Este patógeno produce una mastitis característica en vacas secas, se observa también en vacas en lactancia. Produce una inflamación que se caracteriza por la formación de un exudado purulento de olor fétido (Pinzón 1989).

La colonización de la glándula mamaria por *Corynebacterium bovis* o especies de *Staphylococcus* no proveen un efecto biológico de protección contra las infecciones intramamarias por microorganismos ambientales y menos contra coliformes (Avila y Gutiérrez 2004).

El microorganismo puede ser transmitido por material o equipo contaminado de una glándula mamaria enferma a otra durante la práctica de ordeño, por moscas portadoras del microorganismo que coloniza a la glándula mamaria a nivel del conducto del pezón o por traumatismos en la misma glándula (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.4.8. *Bacillus cereus*

Es responsable en las glándulas mamarias de las vacas infectadas de presentación de cuadros clínicos de mastitis hemorrágicas y ocasionalmente gangrenosas. Es un microorganismo aeróbico, formador de esporas, alargado con terminales redondeadas o cuadradas, que se aprecia formando cadenas. En cultivo sobre gelosa sangre, las colonias

se aprecian vidriosas-glaseadas de color grisáceo-verdoso que producen hemólisis (Avila y Gutiérrez 2004).

3.1.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de Mastitis Bovina debe estar orientado al conocimiento de la prevalencia de la enfermedad en el hato, tipo epidemiológico de la enfermedad y la resistencia bacteriana de los agentes involucrados (Marshall y Edmondson 2005).

Las pérdidas económicas en un hato se llegan a determinar por la disminución de la producción, para lo cual es necesario identificar y corregir a tiempo los puntos críticos que favorecen a la difusión de la enfermedad (Marshall y Edmondson 2005).

Es importante establecer un esquema de monitoreo que permita controlar la enfermedad, es decir llevar a cabo un manejo adecuado de los animales, especialmente durante el ordeño, condiciones ambientales apropiadas, funcionamiento adecuado del equipo de ordeño, nivel de preparación de las personas encargadas del ordeño (Marshall y Edmondson 2005).

El plan de diagnóstico integral de mastitis en un hato comprende un monitoreo permanente con pruebas de campo, laboratorio y en tanque, entre las más utilizadas y comunes se puede mencionar:

3.1.5.1 Pruebas de Campo: Prueba de Mastitis California (CMT), prueba de palpación, prueba de Wisconsin, prueba con papel indicador, prueba de fondo negro.

3.1.5.2 Pruebas de Laboratorio: Recuento de células somáticas (RCS), cultivos microbiológicos, caracterización del microorganismo, pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

3.1.5.3 Pruebas en Tanque: Recuento de Células Somáticas del tanque (RCS-T).

3.1.6. PRUEBAS DE CAMPO

3.1.6.1. PALPACIÓN DE LA UBRE

La inspección de la ubre puede revelar engrosamientos o estrechamientos de algunos de los cuartos, alteraciones de la piel y pezón y lesiones traumáticas. Con la palpación de la ubre y, sobre todo del pezón se aprecian endurecimientos y zonas dolorosas. En la zona de transición de la cisterna mamaria al canal del pezón pueden observarse estrechamientos (aumento del grosor del epitelio) que originan trastornos en la emisión de leche (Kleinschroth *et al.* 1991).

Si hay una inflamación aguda, el cuarto correspondiente aparece aumentado de tamaño, es doloroso y muestra enrojecimiento con elevación de la temperatura; lo cual se debe comprobar midiendo la temperatura, considerando temperatura elevada a partir de 39°C (Kleinschroth *et al.* 1991).

3.1.6.2. PAPEL INDICADOR

Con este papel se comprueban las modificaciones del pH de la leche. Según la gravedad de la mastitis, el valor del pH de la leche evoluciona de normal (6.6) a alcalino. El uso de papel indicador se aconseja cuando las alteraciones son muy ostensibles, por lo que, en la actualidad, ha perdido significación (Kleinschroth *et al.* 1991).

3.1.6.3. PRUEBA DE WISCONSIN (WMT)

Se aplica ampliamente para descartar las muestras de leche del rebaño con células somáticas. Los rebaños con una puntuación baja entre 3 y 12, están en condiciones de buena a regular, mientras que los rebaños con puntuaciones superiores a 12, requieren de atención inmediata (Pinzón 1989).

3.1.6.4. PRUEBA DE FONDO NEGRO

Según Winterhalter (2005) los primeros chorros de leche son los que tienen mayor contaminación porque es la leche que se encuentra en la cisterna del pezón por lo tanto debe ser extraída. De esta manera se puede observar la presencia de grumos y alteración del color (Figura 3.2).



Fuente: Díaz 2006

Figura 3.2. Prueba de fondo negro.

3.1.6.5. CALIFORNIA MASTITIS TEST

Uno de los mejores caminos para detectar el índice de mastitis es el CMT - California Mastitis Test (Marshall y Edmondson 2005).

La prueba de CMT es una prueba de campo de fácil manejo y buena sensibilidad que se fundamenta en la capacidad que tiene el reactivo Lauril Sulfato de Sodio para reaccionar con el DNA celular produciendo viscosidad directamente proporcional al número de células somáticas presentes en la muestra de leche (Marshall y Edmondson 2005).

Una vez que la vaca está lista para ser ordeñada con pezones limpios y secos, se escurren los 3 ó 4 primeros chorros de leche de cada pezón en los compartimentos de la bandeja apropiada. Se inclina la bandeja en un ángulo de 60° para igualar la cantidad de leche en cada uno (deben quedar entre 2 y 4ml de leche). Se agrega una cantidad igual de reactivo y

se inicia un proceso suave de agitación por rotación durante 15 a 20 segundos. Se lee e interpreta la prueba de inmediato (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Interpretación de los resultados de la prueba de CMT

Grado de CMT	Rango de Células Somáticas	Interpretación
N (Negativo)	0 – 200,000	Cuarto Sano
T (Trazas)	200,000 – 400,000	Mastitis Subclínica
1	400,000 – 1,200,000	Mastitis Subclínica
2	1,200,000 – 5,000,000	Infección Seria
3	Más de 5,000,000	Infección Seria

Fuente: Mellenberger 2000.

La interpretación de la prueba de CMT es analizada de la siguiente forma de acuerdo al grado de mastitis que presenta: **NEGATIVO:** No hay precipitado por lo tanto no hay infección. **TRAZAS:** Ligera precipitación que desaparece al agitar, en este caso es necesario comparar una mama con la otra; si presentan algo de precipitación no se considera infección. Si solamente una mama presenta infección se considera infectada. **TIPO 1:** Existe una ligera agitación con algunos filamentos gruesos, al mover la paleta por unos 20 segundos los grumos tienden a desaparecer. No existe la formación de gel. **TIPO 2:** Formación de gel apariencia de una clara de huevo. **TIPO 3:** Formación de gel rápido, no pierde la forma a pesar de la agitación.

El CMT mide en forma indirecta el número de células somáticas / ml. Normalmente la leche de una glándula mamaria sana tiene menos de 100.000 cel/ml. donde el 80% de las células son macrófagos y el 20% o menos corresponden a Neutrófilos (Mellenberger 2000).

Cuando hay inflamación originada en un proceso infeccioso el número de células somáticas aumenta por incremento de los Neutrófilos que acuden a cumplir su acción

fagocítica en el sitio de la infección llegando a representar hasta el 90% del recuento de células somáticas (Mellenberger 2000).

En la literatura no hay coincidencia sobre el número de células a partir del cual se considera que una glándula mamaria esta afectada de mastitis, pero en términos generales recuentos superiores a 500.000 cel/ml. con más del 50% de Neutrófilos se deben considerar como cuadros de mastitis. Número que se verá incrementado hasta varios millones según la intensidad y extensión de la lesión (Mellenberger 2000).

El CMT es una prueba que tiene una alta sensibilidad pero presenta algunas deficiencias en especificidad, dando falsos positivos durante la primera semana después del parto; y en vacas que tienen más de 7 meses de producción y varios partos. En estos casos el grado de viscosidad es similar en los 4 pezones (Mellenberger 2000).

3.1.7. BUENAS PRACTICAS DE ORDEÑO

Las Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) son una guía para la implementación de las normas mínimas necesarias que deben ser aplicadas en los hatos lecheros en Ecuador, para minimizar los riesgos de contaminación de la leche por agentes químicos, físicos y microbiológicos, así como minimizar el impacto ambiental que genera la producción de leche, maximizar el bienestar laboral de los trabajadores y maximizar las condiciones de bienestar de los bovinos que son explotados para la producción de leche (Correa 2005).

Según Winterhalter (2005), la rutina de ordeño es simplemente la sucesión de pasos que se deben realizar para lograr obtener en forma rápida y eficiente la mayor cantidad de leche posible y con la mejor calidad sin afectar la ubre de la vaca.

El ordeño es el acto de coleccionar leche de una ubre de una vaca luego de estimularla adecuadamente y de esta manera se convierte en la actividad más importante de la ganadería de leche (Díaz 2006).

El Bienestar Animal aplicando las Buenas Prácticas Operacionales permitirá no estresar los animales. Hay tres componentes importantes a tener en cuenta en la correcta rutina de ordeño (Winterhalter 2005):

- **El acto de ordeño debe ser rápido**, ya que el mecanismo hormonal que lo regula es muy corto, y la liberación de oxitocina dura unos 5 minutos.
- **Obtener la mayor cantidad de leche con la mejor calidad**, es decir que no el 100% de la leche debe ser extraída, siempre queda un porcentaje mínimo de leche que es la leche residual. Es normal que así suceda, esta leche no causa ningún tipo de trastorno, ni mastitis como se piensa habitualmente.
- **Se debe cuidar la ubre en el ordeño** a fin de no causar daño que puedan perjudicar la futura producción. Hay que recordar que es un tejido vivo que estará en contacto con la máquina y un mal manejo puede ser la vía de entrada de enfermedades.

3.1.7.1. ACTIVIDADES PRE-ORDEÑO

El ordeño no comienza en la sala misma. Es muy importante la forma de arrear los animales hacia la sala, y se deben cuidar todos los aspectos en el corral de espera. El arreo debe producirse en forma tranquila y pausada, ya que es el primer estímulo del animal antes del ordeño. Se deben evitar todos los movimientos bruscos, las corridas, los ruidos extraños, corridas de perros a fin de que el animal llegue a la sala de ordeño en forma calmada y sin estrés. Una vez llegada al corral de espera debe continuar el buen trato y los animales deben entrar a la sala por sí mismos sin golpes ni palos (Winterhalter 2005).

Los operarios deberán estar en perfectas condiciones higiénicas y de salud para llevar a cabo el ordeño y equipado del uniforme apropiado y limpio. Las uñas de las manos deben ser cortas y en perfecto estado de higiene (Correa 2005).

3.1.7.2. RUTINA EN LA SALA DE ORDEÑO

La rutina de ordeño es una serie de procedimientos que permiten obtener leche de calidad bajo ciertos parámetros técnicos y de higiene. Entre ellos:

3.1.7.2.1. Lavado de pezones

El primer paso una vez ingresado el animal a su lugar de ordeño es el lavado de los pezones, se debe tener cuidado al momento de lavar los pezones ya que si se realiza un lavado de toda la ubre estaríamos pasando todas las bacterias y la suciedad de la ubre hacia

los pezones, con la facilidad que puedan penetrar por la pezoneras. Este lavado actúa como estímulo para la liberación de oxitocina (Winterhalter 2005).

3.1.7.2.2. Secado de pezones

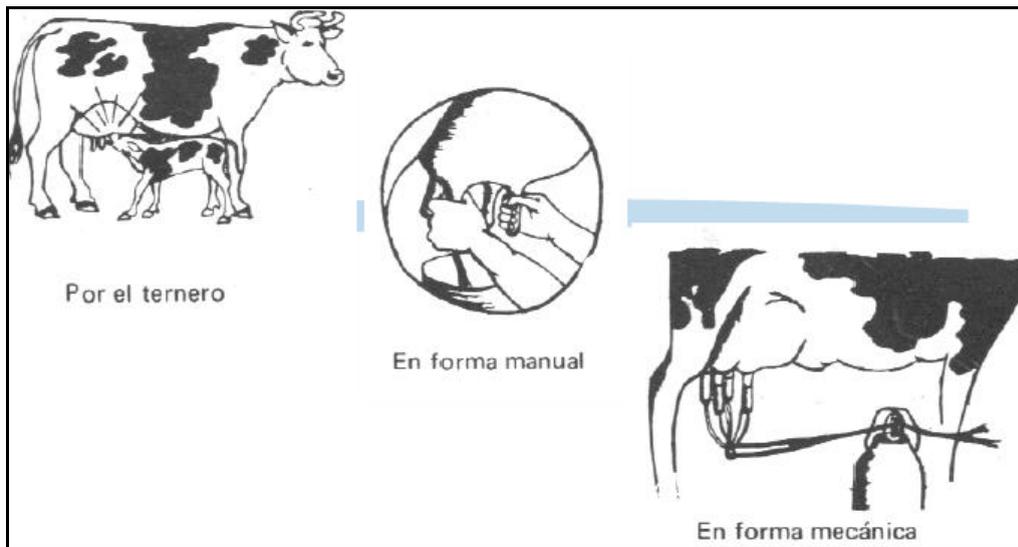
Las exigencias de leche de calidad son mayores y con el secado de pezones se evita la contaminación de la leche, utilizando para ello una toalla por vaca para evitar la diseminación de la enfermedad (Winterhalter 2005).

3.1.7.2.3. Extracción de los primeros chorros en vaso de fondo negro

Los primeros chorros de leche son los que tienen mayor contaminación porque es la leche que se encuentra en la cisterna del pezón por lo tanto debe ser extraída en un balde de fondo negro ya que de esta manera se pueden detectar los signos de mastitis, observando la presencia de grumos y alteración en el color (Winterhalter 2005).

3.1.7.3. ORDEÑO

El ordeño se lo puede realizar de tres maneras: la primera y natural es el ordeño que hace el ternero al momento de lactar, el segundo es el ordeño manual en balde y el tercero es el ordeño mecánico (Figura 3.3).



Fuente: Díaz 2006.

Figura 3.3. Diferentes tipos de ordeño.

3.1.7.3.1. ORDEÑO MANUAL

Según (Díaz 2006) existen dos formas de ordeño manual: Ordeño de mano llena y Pellizco. En el primer caso en el ordeño se utilizan los cinco dedos de mano, mientras que en el segundo se utiliza dos o tres dedos de la mano especialmente cuando los pezones son pequeños (Figura 3.4).



Fuente: Díaz 2006.

Figura 3.4. Ordeño manual con mano llena.

En el ordeño manual es más probable el contagio de la enfermedad debido a que existe una sola persona encargada del ordeño y generalmente no toma las medidas adecuadas al momento de la extracción de la leche perjudicando su higiene y calidad.

3.1.7.3.2. ORDEÑO MECÁNICO

Un ordeño mecánico demanda varias normas estrictas de limpieza y desinfección en sus equipos, de igual manera una adecuada utilización de los implementos, así:

3.1.7.3.2.1. Colocación de pezoneras

La colocación de las pezoneras debe ser inmediatamente después de los pasos anteriores, una vez lavados los pezones, se extraen los primeros chorros en fondo negro y se colocan inmediatamente las pezoneras (Winterhalter 2005).

Colocar primero las posteriores y luego las anteriores. Cuando se colocan las pezoneras hay que observar que éstas queden correctamente colocadas, ya que cualquier problema en su colocación puede traer trastornos de mastitis.

Evitar el deslizamiento hacia abajo con entrada de aire o trepado de las mismas, evita traumatismos en el pezón que terminan en mastitis (Winterhalter 2005).

3.1.7.3.2.2. Retiro de las pezoneras

Para retirar las pezoneras primero se debe cortar el vacío, para evitar fluctuaciones. Debe realizarse cuando el pasaje de leche deja de pasar por el colector y es en un momento determinado, para que no se produzca sobre ordeño (Winterhalter 2005).

El sobre ordeño se produce por el accionar de la máquina sobre un pezón sin leche. La lesión se puede producir en el esfínter del pezón o sobre la mucosa de la cisterna, pero en definitiva es una agresión que da origen a la mastitis (Winterhalter 2005).

El apoyo sobre el colector es una práctica muy frecuente que se realiza entendiendo que en los últimos chorros de leche se encuentra mayor porcentaje de grasa, pero esos últimos chorros corresponden a la leche residual, que no debe ser extraída de la ubre hasta el próximo ordeño (Winterhalter 2005).

3.1.7.3.2.3. Sellado de pezones

Después de cada ordeño deben desinfectarse los pezones con un sellador en base a yodo. La desinfección cumple dos funciones: *Acción desinfectante* matando las bacterias que pudieran quedar en la piel del pezón o en el esfínter y *Acción humectante* para la piel que la deja elástica sin formación de grietas.

El sellador es utilizado debido a que el esfínter del pezón permanece abierto durante unos 20 minutos después del ordeño y de esta forma sellamos tanto la cisterna como el mismo.

En el sellado hay que mojar todo el pezón para desinfectar bien la piel (Figura 3.5).

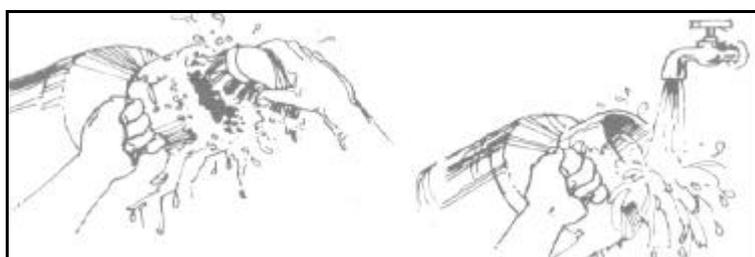


Fuente: Díaz 2006.

Figura 3.5. Sellado del pezón después del ordeño.

3.1.7.3.2.4. Higiene del equipo de ordeño

La correcta higiene del equipo de ordeño (máquina, tanque y utensilios) es fundamental para asegurar la calidad de la leche. El aumento de la carga bacteriana se debe en un 95% a la higiene de los equipos. La ordeñadora debe estar siempre limpia y regulada (Figura 3.6).



Fuente: Díaz 2006.

Figura 3.6. Limpieza de tanques.

3.1.7.4. MEDIDAS DE CONTROL

Entre las medidas de control se puede mencionar: adecuada rutina de ordeño, diagnóstico precoz con la prueba del fondo negro, sellado de pezón, tratamiento de los casos clínicos, funcionamiento de la máquina de ordeño, chequeo diario por el ordeñador, un chequeo sistemático una vez al año, tratamiento de vacas secas, el tratamiento con antibiótico tiene un doble efecto, cura las posibles mastitis subclínicas con que la vaca se pudiera haber secado, protege a la glándula de posibles mastitis durante el período seco, venta de vacas con mastitis crónica, evita contagio cuando se trata de *Staphylococcus aureus*, control periódico de la evolución de las subclínicas CMT, registrar las vacas que están enfermas,

que cuarto y si repiten mastitis, toda vaca que en una lactancia tenga más de 3 mastitis debe ser rechazada para evitar la difusión en el rodeo.

3.1.8. ANTIMASTITICOS

Etimológicamente el término antiséptico proviene de anti=contra y sepsis = putrefacción. Los antisépticos son agentes químicos que al aplicarse tópicamente sobre el tejido vivo, podrán evitar la reproducción de los microorganismos existentes, afectar el metabolismo de éstos o matarlos y entonces se dice que la acción es germicida (Avila y Gutiérrez 2004).

Neave *et al.* (1969) y Pankey *et al.* (1984), reportan que después del ordeño la inmersión de los pezones en antisépticos representa una práctica importante en el control de mastitis. Los antimastíticos comúnmente disponibles para el ganadero son en la mayoría de los casos eficaces contra *Streptococcus* y *Staphylococcus* pero poca acción tienen contra coliformes. Cuando nos enfrentamos a un problema de mastitis de origen ambiental, es necesario atender las condiciones sanitarias de los alojamientos de las vacas, las prácticas de manejo para preparación del ganado al ordeño, higiene del equipo para ordeño mecánico, así como de toda actividad relacionada al ordeño.

El Consejo Nacional para Mastitis de Estados Unidos de Norte América (NAC.), en su publicación C11636, menciona que más del 50% de las nuevas infecciones podrán ser prevenidas con el empleo de un buen antimastítico inmediatamente después de cada ordeño de la vaca. También señala que esta práctica requiere tiempo para mostrar su beneficio.

Usar antimastíticos que carecen de control de calidad, podrán resultar en daños severos a los pezones y en pérdidas cuantiosas en la producción de leche. Emplear en forma constante el antiséptico eficaz para pezones, es solamente una de las prácticas de manejo requeridas para controlar la mastitis en el hato (Avila y Gutiérrez 2004).

El Consejo Nacional para Mastitis mencionado por Avila y Gutiérrez (2004), cita ciertas alternativas para probar los antimastíticos:

- Pruebas estandarizadas para evaluar la actividad germicida del antiséptico en pezones afectados de las glándulas mamarias bajo condiciones de laboratorio.
- Pruebas dirigidas a evaluar el antimastítico bajo condiciones experimentales en vacas donde se aplican al pezón microorganismos tradicionalmente considerados como patógenos para la glándula mamaria y se reta el antiséptico determinando su eficacia.
- Prueba desarrollada en ganado explotado bajo condiciones comerciales y en la que se evalúa la habilidad del antimastítico para prevenir nuevas infecciones bajo condiciones naturales.

3.1.8.1. INGREDIENTES ACTIVOS

Es importante conocer la distribución del ingrediente activo, usado en los antimastíticos, en la ubre; ya sea aplicado por vía Parenteral o Intramamaria (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Distribución de Ingredientes Activos de los Antibióticos.

<i>Buena Distribución</i>		<i>Distribución Limitada</i>		<i>Distribución Pobre</i>	
Parenteral	Intramamaria	Parenteral	Intramamaria	Parenteral	Intramamaria
Eritromicina	Eritromicina	Sulfametazina	Penicilina	Cefalexina	Estreptomina
Tilosina	Tilosina	Penicilina	Cloxacilina	Cetiofur	Neomicina
Espiramicina	Espiramicina	Ampicilina	Oxacilina	Cefoperazona	Apramicina
Lincomicina	Lincomicina	Amoxicilina	Cefalotina	Estreptomina	Kanamicina
Pirlimicina	Pirlimicina	Cloxacilina	Cefacetril	Neomicina	Amikacina
Florofenicol	Florofenicol	Meticilina	Cepacetril	Apramicina	Gentamicina
Trimetropin	Trimetropin	Cefalotina	Cefuroxime	Kanamicina	Tobramicina
Oxitetraciclina	Penetamato	Cefapirina	Cetiofur	Amikacin	Espectinomina
Enrofloxacina	Ampicilina	Cefuroxime	Cefaperazona	Gentamicina	Aminosidina
Penetamato	Moxicilina		Oxitetraciclina	Polimixina	Polimixina
	Novobiocina			Vancomicina	Colistina
	Enrofloxacina				Rifaximina

Fuente: Zia 1987.

3.2. LABORATORIO

3.2.1. TOMA DE MUESTRA DE LECHE

Para realizar un examen bacteriológico concluyente es necesario obtener muestras de leche por ordeño separado de los cuarterones, adoptando las máximas medidas higiénicas. Es preciso que no existan gérmenes en las proximidades del animal que puedan llegar a la leche extraída. Si no es así, los gérmenes de la suciedad ambiental dificultarán el análisis y su resultado (Kleinschroth *et al.* 1991).

La técnica de muestreo debe basarse en los siguientes puntos:

- Según Hogan *et al.* (1999) se debe etiquetar los tubos para el muestreo (fecha, hacienda, vaca, cuarto afectado). Para Vet-Uy laboratorio (2004), la muestra debe estar acompañada de una historia del caso, con datos clínicos, anatomopatológicos, epidemiológicos (número de animales expuestos, número de afectados en el establecimiento y en el lote donde se presentó el caso), indicar tratamientos y vacunaciones efectuadas, otras enfermedades que se hayan observado en los días precedentes, duración del brote y el diagnóstico presuntivo.
- Eliminar la suciedad de la glándula mamaria y de los pezones, mediante un lavado y secado, antes de proceder a la colección de la muestra (Hogan *et al.* 1999).
- Despunte, eliminar unos pocos chorros de leche de los pezones, y observar los signos en la leche y en la glándula de una posible mastitis clínica (Hogan *et al.* 1999).
- Presellar todos los cuartos con un producto efectivo, manteniéndolo en contacto por 30 segundos (Hogan *et al.* 1999).
- Secar los pezones completamente con toallas individuales (Hogan *et al.* 1999).
- Usar algodón con el 70% de alcohol, eliminando el exceso; limpiar los pezones, iniciando por el pezón más alejado. No se debe usar el mismo algodón para más de un pezón. Cuidar los pezones desinfectados de posible contaminación en patas, cola, estiércol, etc. (Hogan *et al.* 1999).
- Para tomar la muestra se debe iniciar por el pezón más cercano, destapar el tubo de ensayo y cuidadosamente sostener la tapa con la boca hacia abajo, colocar el tubo a 45° para la recolección de la muestra. Recomendaciones: No debe tocar el tubo el pezón,

llenar el tubo de 2 – 3 ml con un máximo de 5 ml (1-3 chorros). No llenar el tubo más de las $\frac{3}{4}$. La muestra se puede tomar únicamente del cuarto afectado y evitar contaminaciones. Menciona Vet-Uy laboratorio (2004) que se puede utilizar también recipientes de vidrio de boca ancha, limpios y enjuagados con agua destilada, secados en estufa y estériles. Hogan *et al.* (1999). Procurarse no tocar el tapón inferior ni tampoco el borde del tubo con el fin de evitar posibles contaminaciones y cerrando los tubos inmediatamente después de tomada la muestra (Kleinschroth *et al.* 1991).

- Sellar los pezones luego de tomar la muestra si la vaca ya ha sido ordeñada (Hogan *et al.* 1999).
- Las muestras recolectadas requieren inmediata refrigeración o colocación en hielo (Hogan *et al.* 1999).

3.2.2. MEDIOS DE CULTIVO

El cultivo se hace en el medio adecuado y con la temperatura idónea, por lo que los gérmenes presentes en la leche se multiplican a las pocas horas en una proporción que llega a las 100.000. Las diversas bacterias muestran un crecimiento distinto por lo que pueden diferenciarse entre sí por su forma y color (Kleinschroth *et al.* 1991).

Existen medios tanto generales como específicos utilizados para el crecimiento e identificación de los microorganismos, en este caso en particular las bacterias. Si bien es cierto cada fabricante presenta en el producto sus recomendaciones que hay que tomarlas

en cuenta, hay que considerar una preparación de medios de referencia que sigue cada laboratorio (Val 2007).

De acuerdo a Mateos (2004) los medios se clasifican en:

Básicos: Diseñados para el crecimiento de bacterias y el mantenimiento de poblaciones; los más comunes son: Agar tripticasa soya, Agar nutritivo, Agar Mueller-Hinton.

Enriquecidos: Contienen el medio básico al cual se le ha agregado algún suplemento nutritivo, por ejemplo sangre o hemoglobina; la adición de estas sustancias los hace altamente nutritivos.

Selectivos: Seleccionan las bacterias que solo se desarrollan en presencia de compuestos agregados al medio de cultivo. Se usan para cultivar microorganismos especiales como mycobacterias, hongos etc.

Selectivos diferenciales: A este tipo de medios se adicionan reactivos o sustancias químicas a los medios de cultivo permitiendo la diferenciación de los distintos tipos de bacterias y la selección de determinados géneros o especies.

Medios diferenciales: (Pruebas Bioquímicas) Nos ayudan a clasificar las bacterias en géneros y especies según su comportamiento frente a los azúcares, urea, utilización de carbono, movilidad y otras reacciones bioquímicas específicas de cada microorganismo.

3.2.2.1. MEDIOS ENRIQUECIDOS

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuada, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe

contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (Val 2007).

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos (Val 2007).

Dentro de los medios generales para tratar los patógenos que causan la mastitis los más comunes usados en la identificación incluyen: agar sangre, agar sangre con hemolysin y blood-esculin agar (Hogan *et al.* 1999).

3.2.2.1.1. Agar Sangre

En la preparación comercial del medio es viable la sangre de oveja o en su lugar sangre de vaca controlando las colonias de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* que producen zonas de hemólisis en estos medios (Hogan *et al.* 1999). El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes (Val 2007).

La preparación de agar sangre según “El Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Inquieta Pérez” (2003): Pesar el agar Columbia a razón de 39g. por litro de agua destilada. Calentar la suspensión hasta que la solución llegue a la ebullición para permitir una disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15’. Precalentar el baño María a

50°C. Retirar el medio del autoclave y colocarlo a baño María. Sacar la sangre del refrigerador para que tome la temperatura ambiente. Cobrar la sangre en el medio agitando suavemente para permitir que se distribuya uniformemente y repartir en cajas Petri.

3.2.2.1.2. Infusión De Cerebro Corazón

Es un medio líquido para el cultivo de bacterias, a continuación su preparación (BBL 1974): Disolver 37 gr. del material deshidratado en un 1 litro de agua destilada. Para cultivos en sangre se recomienda añadir de 0.5 a 1.0 agar por litro de medio prehidratado y que el medio hierve por 1 minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121AC, (15lb. de presión de vapor), durante 15 a 20 minutos. Para mejores resultados usar el mismo día de su preparación, de lo contrario calentar por unos minutos y dejar enfriar antes de usar.

3.2.2.2. MEDIOS BÁSICOS

3.2.2.2.1. Agar Mueller Hinton

El agar Mueller Hilton es un agar especial con los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias y diseñado para la fácil e igual propagación de los antibióticos. Se usa para antibiograma porque es un medio donde antimicrobianos se difunden muy bien (Benson *et al.* 1994).

La preparación de agar Mueller Hinton, según “El Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Inquieta Pérez” (2003), es el siguiente: Disolver 35 g de Agar Mueller Hinton en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave durante 15´ a 120°C. Esperar a que el medio alcance una temperatura de 60°C aproximadamente. Distribuir en cajas Petri .

3.2.2.3. MEDIOS SELECTIVOS

Cada espécimen se maneja individualmente y la selección del medio depende de la naturaleza del espécimen. Es conveniente inocular un medio para usos generales para asegurar el descubrimiento de microorganismos, por ejemplo: las placas de agar sangre, base de agar de soya Trypticase con 5 a 10% de sangre de cordero desfibrinada, estéril, promueven un excelente crecimiento de los estafilococos y apoyan el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos difíciles que pueden también estar presentes (BBL 1974).

El diagnóstico se asegura con medios selectivos de cultivo, en los que crece preferentemente una bacteria determinada. Junto a esto, el examen microscópico confirma el tipo de bacteria responsable (Kleinschroth *et al.* 1991).

Pruebas Específicas para *Streptococcus* (Hogan *et al.* 1999)

- Reacción CAMP
- *S. aureus* beta-hemolítico
- Fermentación de carbohidratos.
- Otros

Pruebas Específicas para Staphylococcus (Hogan *et al.* 1999)

- Prueba de Coagulasa

Pruebas Específicas para Patógenos Gram Negativos (Hogan *et al.* 1999)

- Agar MacConkey
- TSI (Triple Sugar Iron)
- Citrato de Simmons
- Motilidad

3.2.2.3.1. Agar MacConkey

Se emplea en la investigación de organismos coliformes, y también se puede usar para el aislamiento de *Vibrio comma* de las especies patógenas de bacilos entéricos. La inhibición de los organismos Gram-positivos se obtiene mediante la mezcla de sales biliares (BBL 1974).

Preparación (BBL 1974): Suspender 50 g. del medio en un litro de agua destilada. Mezclar hasta obtener una suspensión uniforme. Calentar suavemente agitando frecuentemente y se hierve durante 1 minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15lb de presión), durante 15 minutos.

El medio fundido se enfría a 45°C, se coloca en cajas Petri con 20 ml aproximadamente en cada una, se deja solidificar las cajas destapadas parcialmente.

3.2.2.4. MEDIOS DIFERENCIALES

3.2.2.4.1. Agar Citrato De Simmons

El agar de citrato de Simmons se usa para diferenciar las bacterias entéricas Gram-negativas, basándose en la utilización de citrato. Se recomienda para la diferenciación de coliformes aislados del agua (BBL 1974).

Para la preparación (BBL 1974): Se suspenden 24.2 g. del polvo en un litro de agua destilada. Dejar remojar durante 5 a 10 minutos. Se mezcla bien y se calienta suavemente agitando frecuentemente hasta que el medio hierva hasta 1 minuto. Distribuir en tubos y auto clavar a 121°C (15lb de presión), durante 15 minutos. Dejar enfriar en posición inclinada. Inocular estriando la superficie y puncionar el fondo; los cultivos deben incubarse durante 4 días de 35 a 37°C.

3.2.2.4.2. Ureasa

Se emplea para la identificación de bacterias con capacidad para utilizar la urea y se recomienda particularmente para diferenciar los miembros del género *Proteus* de la *Salmonella* y *Shigella* en el diagnóstico de enfermedades entéricas (BBL 1974).

Preparación (BBL 1974): Usar 3.87 g. para cada 100 ml de agua destilada, sin calentar. Disolver el polvo y pasar por un filtro bacteriológico estéril de Seitz o de bujía; o de lo contrario colocar en autoclave los tubos cerrados no de forma hermética, durante 7 a 10 minutos a 5 lb de presión o a 8 lb. durante 20 minutos. Distribuir en porciones de 0.5 a 2

ml en tubos pequeños estériles. Se puede emplear en cantidades mayores pero el efecto disminuye.

3.2.2.4.3. Medio Sim

Este medio se emplea para la determinación de la producción de sulfuros, formación de indol y movilidad de los bacilos entéricos. Su preparación (BBL 1974): Suspender 30 g. del material seco en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y cuando se obtenga la suspensión uniforme, caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C, (15lb. de presión de vapor), durante 15 minutos. Repartir en tubos de ensayo llenos hasta la mitad, inocular con aguja por punción en el centro hasta la mitad de su profundidad. Incubar durante 18 a 24 horas o más.

3.2.2.4.4. Coagulasa

Para la prueba de coagulasa se utiliza el plasma de conejo o humano. Siguiendo el protocolo del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquierda Pérez” (2003), el plasma de conejo se obtiene de la centrifugación de la sangre de conejo a 2000 RPM por un periodo de 10 minutos. A continuación se retira el plasma (sobrenadante) y se coloca en tubos estériles a razón de 2 a 3ml por tubo, para su congelación.

3.2.2.4.5. Catalasa

Para la prueba de catalasa se emplea el Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) al 3%, esta concentración se la consigue comercialmente, caso contrario se realizan las diluciones respectivas hasta obtener éste porcentaje.

3.2.2.4.6. Lia (Lisina Iron Agar)

Suspender 23 g. del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Dispensar en tubos de vidrio, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb. de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar en posición inclinada (Cortés 2001).

3.2.3. COLORANTES

3.2.3.1. Violeta De Genciana

Según el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (2003), se requiere de: 1 g. de Cristal violeta, 10 ml. de alcohol de 95% y 90 ml. de solución acuosa de ácido fénico al 2%. La preparación del colorante Violeta de Genciana se realiza: Colocar en un mortero cristal violeta y triturar junto con el alcohol de 95%; una vez disuelto el colorante agregar 90 ml. de solución de ácido fénico. Dejar macerado por 24 horas, filtrar y colocar en un frasco oscuro.

3.2.3.2. Lugol

Para la preparación de lugol se requiere de: 1 g de yodo metálico y 2 g de yoduro de potasio para 300 ml. de agua destilada. Se coloca el yodo metálico y el yoduro de potasio en un mortero y se tritura, posteriormente se adiciona poco a poco el agua destilada. Envasar en un frasco oscuro (Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” 2003).

3.2.3.3. Alcohol Acetona

Para la preparación de alcohol acetona se mezcla 75ml de alcohol al 95% con 25 ml. de Acetona. Se envasa en un frasco de vidrio y esta listo para utilizar (Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” 2003).

3.2.3.4. Fushina

Para la composición del colorante, se necesita: 1 g. de Fushina básica, 5 g. de ácido fénico y 10 ml de alcohol etílico 96°. En la preparación se mezcla en un mortero hasta conseguir un homogeneizado completo; una vez ligado se añade lentamente agua destilada hasta 90 ml. (Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” 2003).

3.2.4. AISLAMIENTO DE MUESTRAS

Según Cotrino (2006) la mayor limitante que se tiene para el aislamiento del agente causal de mastitis y su correcta correlación con el caso clínico es la deficiente calidad higiénica con la que se toma la muestra en el hato. Si no se toman las medidas de limpieza y desinfección de los pezones, o no se usa material estéril para la toma de la muestra o si se contamina con las manos o el ambiente, las muestras presentarán contaminación con microorganismos que se multiplicarán muy rápidamente enmascarando a los verdaderos responsables de la infección.

Dos criterios para considerar que la muestra es adecuada para el diagnóstico son: Recuento de Células por el método microscópico y diferentes clases de colonias que aparezcan en el cultivo (Cotrino 2006).

Todas las bacterias causantes de mastitis se multiplican bien en Agar Sangre convirtiéndose en el medio básico para el proceso de aislamiento del agente etiológico. Con el fin de aumentar las posibilidades de éxito del aislamiento y aprovechando las propiedades de la leche como medio de cultivo, las muestras pueden ser preincubadas a 37° C durante 6 a 8 horas y posteriormente sembrar en Agar Sangre. Al aparecer colonias distintas en todos los aspectos a la mayoría de colonias presentes, la muestra se declara como contaminada y no se procesa ninguna bacteria para antibiograma (Pedrique 2002).

3.2.4.1. SIEMBRA DE MUESTRAS

Sembrar o inocular, es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Luego de sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

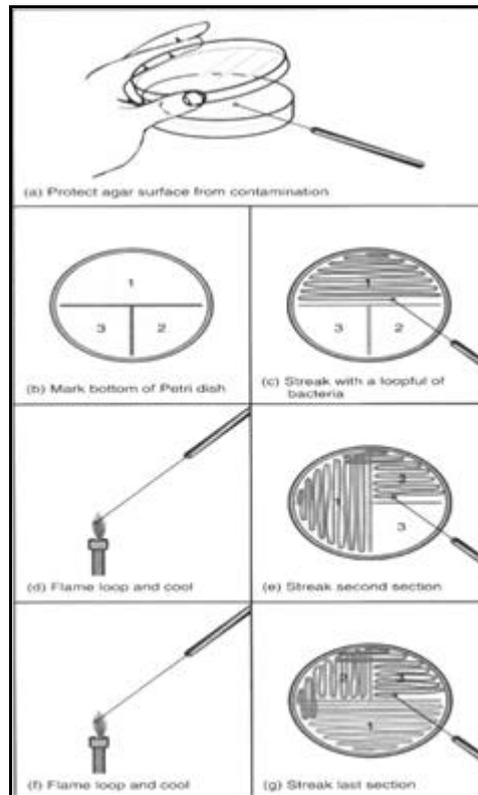
La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, asa, hisopo o pipeta estéril (Mateos 2004).

3.2.4.1.1. Siembra Por Estrías En Agar

Según BBL (1974) la siembra de estrías se utiliza para estudiar la morfología y propiedades hemolíticas de esas colonias aisladas, ya que estas características pueden ser de valor para el diagnóstico y la identificación (Figura 3.7).

Método: Se flamea toda la longitud del asa hasta la incandescencia, manteniéndolo verticalmente en el mechero Bunsen; mueva rápidamente el porta agujas hacia abajo dentro de la llama para que se flameen ligeramente algunos centímetros del mismo y se deja enfriar. Posteriormente se utiliza el dedo meñique de la mano derecha quite el tapón de rosca (o el algodón) del tubo que contiene la muestra. A continuación se toma con el asa una delgada porción del espécimen; la cantidad de inóculo utilizada depende del número de organismos en el espécimen; tiene que ser lo bastante ligera para obtener colonias aisladas. Se retira el tapón de la rosca (o el algodón) en el tubo. Se levanta la cubierta de la placa de cultivo y haga estrías en una cuarta parte, más o menos, del área de la superficie. Se flamea el asa y se deja enfriar. Se hace girar de nuevo la placa y se realizan estrías como se hizo anteriormente en el área restante. Se tapa la placa y se flamea el asa hasta esterilizarla. Por último se pone a incubar.

No se debe tocar el espécimen con el asa caliente por una posible contaminación bacteriana o muerte de los microorganismos del espécimen debido al intenso calor del alambre.

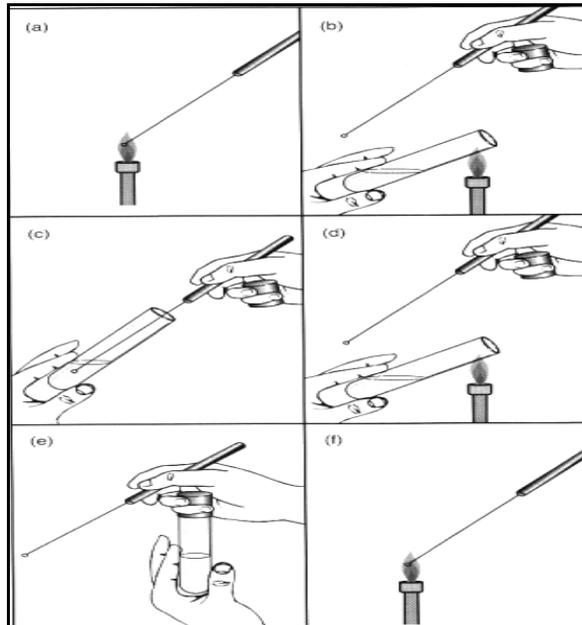


Fuente: Mateos 2004

Figura 3.7. Siembra en estrías por agotamiento.

3.2.4.1.2. Siembra En Tubo De Ensayo

Según el método descrito por BBL (1974) la siembra en tubo es la siguiente: Se examina la placa y se escoge la colonia que se va a transferir. Se flamea la aguja para esterilizarla y se la deja enfriar. Se retira la colonia con la aguja y se tapa. Se retira el tapón o el algodón del tubo que contiene el medio inclinado; se inserta la aguja y se pasa a lo largo de la superficie del medio desde el fondo hasta la parte superior. Se retira el asa y se vuelve a colocar el tapón o algodón, teniendo cuidado de no golpear o sacudir el alambre contra el tubo. Se flamea la aguja para esterilizarla. Finalmente se pone a incubar (Figura 3.8).



Fuente: Mateos 2004.

Figura 3.8. Siembra en tubo de ensayo.

3.2.4.2. COLONIAS PURAS

Un cultivo puro es aquel formado por células provenientes de una sola inicial y por tanto perteneciente a la misma especie y cepa. Es una situación artificial ya que en la Naturaleza los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas y heterogéneas. Es un artificio obligado para estudiar cada especie y cepa de microorganismo en particular (Mateos 2004).

Métodos para aislar cultivos puros :

- Técnica de siembra por estrías en placa.
- Técnica de vertido en placa.

- Técnica de enriquecimiento del cultivo: consiste en diseñar condiciones de cultivo que favorezcan específicamente al microorganismo que queremos aislar y que se encuentra en pequeñas cantidades.
- Técnica de las diluciones en serie: se utiliza para microorganismos cuya proporción es mayoritaria dentro de la población mixta.
- Técnica de aislamiento de una sola célula mediante un micromanipulador.

3.2.4.3. TEMPERATURA Y TIEMPO DE INCUBACIÓN

Según Hogan *et al* (1999) los tiempos y temperaturas de incubación varían de acuerdo al microorganismo y grupo de microorganismos (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Tiempos y temperaturas de incubación de microorganismos.

Microorganismo	Tiempo	Temperatura (°C)
<i>Streptococcus</i>	24 a 48 horas	35 a 37
<i>Staphylococcus</i>	24 a 48 horas	35 a 37
<i>Bacterias Gram negativas</i>	24 a 48 horas	35 a 37
<i>Mohos, levaduras y hongos</i>	24 a 72 horas	23 a 37
<i>Nocardia spp.</i>	2 a 5 días	35 a 37
<i>Prototheca spp.</i>	48 a 72 horas	23 a 37
<i>Corynebacterium bovis</i>	48 a 72 horas	35 a 37
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2 a 4 días	35 a 37
<i>Corynebacterium spp.</i>	1 a 4 días	35 a 37
<i>Bacillus Gram positivos</i>	24 a 48 horas	35 a 37
<i>Mycobacterium spp.</i>	3 a 5 días	23 a 37
<i>Mycoplasma spp.</i>	2 a 10 días	35 a 37

*Condiciones culturales y necesidades especiales.

Fuente: Hogan *et al*. 1999.

3.2.5. BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

Según (Mayberry 2002) la tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias, sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

3.2.5.1. TEORÍAS DE LA TINCIÓN GRAM

Según (Mayberry 2002) una posible teoría del mecanismo de tinción es la siguiente: El colorante básico entra al microorganismo, donde forma con el yodo una laca insoluble en agua. El alcohol o la acetona empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos Gram. positivos, tratados con mordiente, y forma una barrera que la laca no puede atravesar. En las células Gram. negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células Gram. positivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo de violeta de genciana con yodo. Algunos autores objetan esta teoría, pero es indudable la importancia general de la pared celular.

Varias son las teorías emitidas para explicar el mecanismo de la tinción de Gram. Stearn y Stearn (1923) basan la suya en una combinación química entre el colorante y las proteínas de las bacterias. Las proteínas y aminoácidos son cuerpos anfóteros, esto es, tienen la

facultad de reaccionar con ácidos y con bases, gracias a sus grupos amino y carboxilo; en soluciones ácidas, reaccionan con los ácidos, y en soluciones alcalinas lo hacen con las bases.

Stearn y Stearn comprobaron que la reacción de tinción de las bacterias obedece en gran parte a su contenido proteínico; estos microorganismos se conducen como cuerpos anfóteros, al combinarse con colorantes ácidos en soluciones ácidas y con los básicos en medio alcalino. La combinación con ambos tipos de colorante no se produce en el “punto isoeléctrico”. Como los microbios contienen más de una proteína, ese punto no tiene un valor preciso y definido, sino que constituye más bien una gama o escala que comprende dos o tres unidades de pH.

Según Stearn y Stearn, los gérmenes Gram positivos tienen una escala isoeléctrica de pH inferior a la de los gérmenes Gram negativos; y, a base de sus datos experimentales, deducen las siguientes conclusiones:

Los microorganismos Gram positivos pueden hacerse Gram negativos al aumentar la acidez. Los microorganismos Gram negativos pueden hacerse Gram positivos al aumentar la alcalinidad. Los microbios de reacción positiva a los colorantes ácidos pueden hacerse Gram negativos por aumentar la alcalinidad. Los microbios de reacción positiva a los colorantes básicos pueden hacerse Gram negativos por aumentar la acidez. En la zona isoeléctrica característica de cada especie es muy escasa la tendencia a retener cualquier colorante. Parece estar bien demostrado que las proteínas de las bacterias no son simples, sino más bien una débil combinación de sustancias proteínicas con otras lipóideas o grasas.

La materia grasa extraída de los microorganismos Gram positivos difiere de la obtenida de los microbios Gram negativos, en que la primera contiene una proporción mucho mayor de ácidos no saturados que muestren gran afinidad por los agentes oxidantes. Todos los mordientes (como el yodo) empleados en la coloración Gram son oxidantes; su efecto, en general, consiste en dar a la sustancia oxidada un carácter más ácido. Esto aumenta la afinidad de un microorganismo por los colorantes básicos.

El cambio de respuesta a la coloración de Gram con el tiempo es propio, sobre todo, de los microorganismos débilmente Gram positivos cultivados en los medios que contengan sustancias capaces de fermentar, y cuya reacción se vuelve ácida en el curso del desarrollo. Gianni (1952) comprobó que los microorganismos Gram positivos como *Bacillus subtilis* y *B. anthracis* tomaban negativamente el Gram cuando los cultivos databan de dos a tres horas. Luego se desarrollaba la sustancia Gram. positiva debajo de la pared celular, para invertir la reacción. Otra explicación de la reacción de Gram puede ser la posible existencia de una capa exterior alrededor de un núcleo Gram. negativo.

Gianni (1952) ha comunicado que si la reacción Gram positiva depende de que se forme una combinación compleja entre los componentes de la coloración de Gram y las proteínas de la pared celular, sería de esperar que las bacterias desintegradas por medios físicos retuviesen este tinte, ya que ese tratamiento no podría cambiar el carácter químico de los materiales de dicha pared. Por el contrario, los gérmenes Gram positivos desintegrados pierden su capacidad de retener el colorante primario y toman negativamente el Gram.

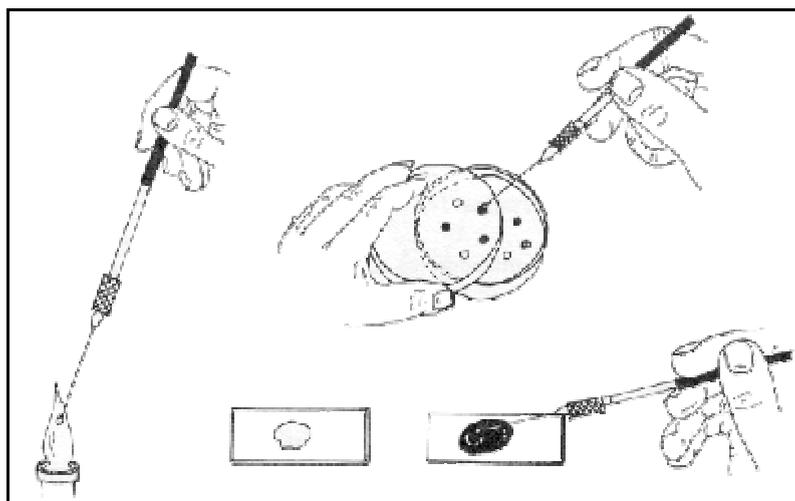
La pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas es permeable a la violeta de genciana. Sin embargo, la de las primeras no lo es al complejo de yodo y colorante formado en el interior de la célula.

Según Gianni (1952) los resultados experimentales obtenidos con una difusión celular exenta de proteínas, y la escasa solubilidad del complejo de yodo y violeta cristal en alcohol y acetona, parecen sustentar la opinión de que la reacción Gram positiva consiste esencialmente en la formación, dentro de la célula, de una cantidad apreciable de complejo de yodo y colorante difícil de eliminar con el disolvente. La pared celular de las bacterias Gram positivas, a diferencia de la de las Gram negativas, sería prácticamente impermeable al violeta cristal. Los microorganismos aparecerán teñidos después de tratarlos con violeta cristal, por ser absorbido el colorante en la superficie externa de la pared celular, y el disolvente eliminará sin dificultad el complejo formado después del tratamiento con yodo.

Gianni (1952) han sostenido que la permeabilidad de la pared celular al violeta cristal, la escasa solubilidad del complejo de yodo y colorante en alcohol y acetona, y el libre acceso del disolvente al complejo constituido, son los principales factores que intervienen en el mecanismo de esa coloración.

3.2.5.2. PROCEDIMIENTO DE LA COLORACIÓN GRAM

Según Mayberry (2002) el protocolo para la coloración Gram: Recoger muestra estéril, hacer el extendido en espiral, dejar secar a temperatura ambiente, fijar la muestra al calor (flameado 3 veces aproximadamente), agregar violeta de genciana y esperar 1 minuto, éste tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas, enjuagar con agua, agregar lugol, esperar 1 minuto y enjuagar con agua, agregar alcohol acetona y esperar 2-3 segundos y enjuagar con agua. Agregar fushina y esperar 1 minuto, éste colorante dejará de color rosado las bacterias Gram negativas. Finalmente se enjuaga, se seca y se observa al microscopio óptico con lente de 100x con aceite de inmersión (Figura 3.9).



Fuente: Urtis 2004.

Figura 3.9. Preparación de placa portaobjetos para su observación en el microscopio.

Según (Mayberry 2002) el primer paso en cualquier tinción debe ser siempre la fijación con calor. Posteriormente el cristal violeta penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas).

El lugol está formado por I_2 (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio), el cual está presente para solubilizar el iodo. El I_2 entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con violeta de genciana (Mayberry 2002).

La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I_2 /de violeta de genciana. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen (Mayberry 2002).

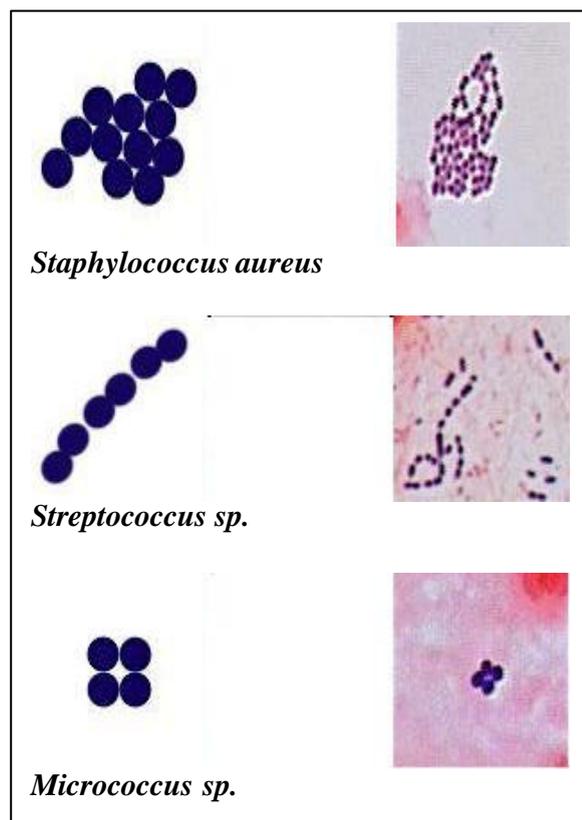
Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la fushina. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules (Mayberry 2002).

La tinción negativa es el reverso del procedimiento de tinción usual, las células se dejan sin teñir, pero se colorea en cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopia óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas (Val 2004).

3.2.5.3. MORFOLOGÍA BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

Las bacterias Gram positivas se presentan en forma de cocos, bacilos, espirilos. Los cocos están agrupados en racimo, cadena, tétradas, entre otras. Los bacilos pueden ser cortos, largos, delgados o gruesos dependiendo del patógeno.

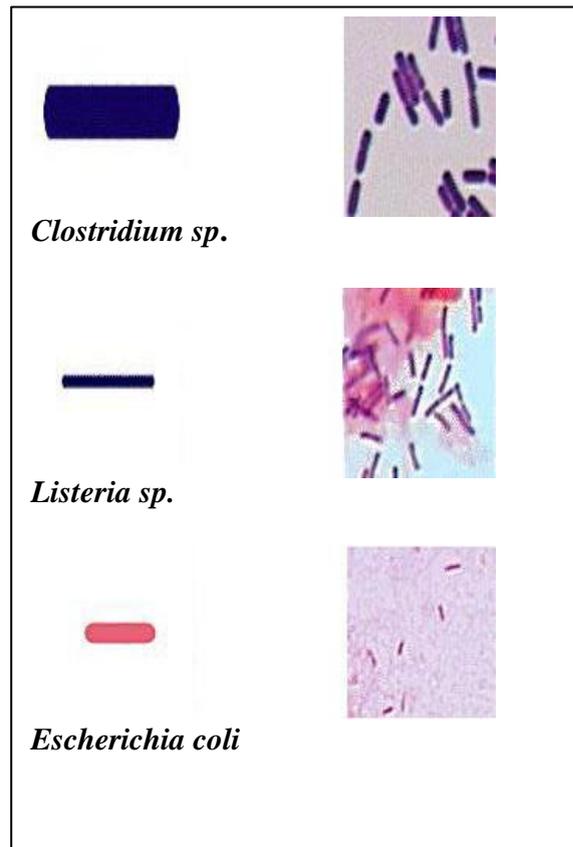
Cada patógeno tiene una forma característica, así: cocos en racimos es la forma típica de *Staphylococcus aureus*, cocos en cadena típica de *Streptococcus sp.*, cocos en tétradas es forma típica de *Micrococcus sp.* (Figura 3.10).



Fuente: Kohard 2004.

Figura 3.10. Cocos en racimo, cocos en cadena y tétradas.

Los bacilos Gram positivos gruesos son la forma típica de *Clostridium sp.*, los bacilos finos son la forma típica de *Listeria sp.*; los bacilos Gram negativos finos y cortos son característicos de Enterobacterias, como por ejemplo *Escherichia coli*. (Figura 3.11).



Fuente: Kohard 2004.

Figura 3.11. Bacilos Gram positivos gruesos y delgados, y bacilos Gram negativos delgados y cortos.

3.2.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales conocida su reacción, nos permiten identificar distintos

microorganismos presentes. Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en el medio de cultivo (Cortés 2001).

3.2.6.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS

3.2.6.1.1. Prueba De Coagulasa

La habilidad de coagulación que tiene el plasma es el método más ampliamente usado para distinguir *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus spp.* Coagulasa-Negativos. La prueba en tubo de coagulasa es considerado más definitivo que la prueba en placa (Hogan *et al.* 1999).

El plasma de coagulasa se inocula mediante un asa con una colonia emulsionada, o con 0,05 ml de cultivo de 18 horas en Caldo de soya Trypticase (BBL 1974), siendo este medio de enriquecimiento podemos hablar también del caldo Cerebro-Corazón.

Durante la incubación en un baño María a 37 °C, examinar periódicamente los tubos; cualquier coagulación es un resultado positivo (BBL 1974). Caso contrario la prueba de coagulasa se la puede llevar a cabo en placas portaobjetos y obtener resultados en menor tiempo, con la formación de coágulos como indicativo de una prueba positiva (Figura 3.12).

Para la prueba en placa portaobjetos, se deja caer unas gotas de plasma, se agrega una colonia escogida y se mezcla con el asa o una aguja de inoculación; la agrupación de cepas

productoras de enzimas debe ser visible en 5 segundos y cualquier resultado dudoso debe hacerse por cualquier método más lento para su confirmación (BBL 1974).

En la prueba de tubo se debe inocular 0,5 ml de plasma con inóculo de 24 horas de haber cultivado, utilizando un aplicador fino estéril para la inoculación. Para la interpretación, una reacción positiva corresponde a semi-sólido a sólido gelificado, como por ejemplo *Staphylococcus aureus*; una reacción negativa se presenta en estado líquido después de 24 horas de incubación, como por ejemplo *Staphylococcus chromogenes* (DBL 2005)

Una prueba positiva puede aparecer entre 2 a 4 horas o hasta 24 horas, siendo un resultado positivo evidente. Algunos *S. aureus* producen la enzima staphylokinase que puede producir lisis del coagulo que permite una incubación más larga. Todos los resultados negativos tienen que mantenerse incubados por un total de 24 horas (Hogan *et al.* 1999).



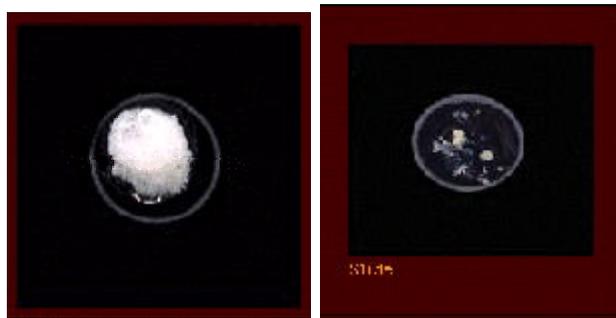
Fuente: Kiser 2007.

Figura 3.12. Resultado positivo de la prueba de coagulasa.

3.2.6.1.2. Prueba De Catalasa

Para esta prueba Hogan *et al.* (1999) recomiendan colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % en una placa portaobjetos y se emulsifica una colonia en el peróxido.

Para la interpretación la producción de burbujas es una reacción positiva, por ejemplo *Staphylococcus*; la ausencia de burbujas es una reacción negativa, por ejemplo *Streptococcus*. Se debe tener en cuenta que las células rojas de la sangre producen catalasa, por lo que se debe evitar coger el agar sangre con la colonia porque las células rojas pueden dar un falso- positivo. Por lo tanto, nunca correr directamente la prueba sobre la caja de agar sangre (Figura 3.13).



Fuente: Kiser 2007.

Figura 3.13. Reacción de la Prueba de Catalasa, Izquierdo (positivo), Derecho (negativo)

3.2.6.1.3. Fermentación en Manitol

Los cultivos por punción en medio con manitol pueden reaccionar en 24 horas, pero debe continuarse la incubación porque algunas especies fermentan lentamente. Los estafilococos mostrarán una carencia característica de motilidad en este medio. La fermentación con manitol puede también descubrirse directamente en las placas de Agar de Vogel y Hohnson y en las de agar con coagulasa y manitol (BBL 1974).

3.2.6.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

3.2.6.2.1. Prueba TSI

La prueba de Triple Sugar Iron Agar es un medio diferencial complejo (de color rojo) compuesto por 3 azúcares: 10% lactosa, 10% sucrosa y 1% dextrosa y un ligador que es en este caso el hierro. La siembra se realiza tanto en la superficie del agar (aerobiosis) como en la profundidad de éste (anaerobiosis) (Kiser 2007).

Medio K (alcalino) de color rojo. Medio A (ácido) de color amarillo. K/A, si la bacteria metaboliza sólo la glucosa: en la superficie la utilizará por vía respiratoria, y donde la tensión de oxígeno disminuya lo suficiente, empleará una pequeña proporción por vía fermentativa. Esto generará una pequeña cantidad de ácidos que serán neutralizados por las aminas derivadas de la decarboxilación oxidativa de las proteínas (Faddin 2007).

Según Faddin (2007) el medio mantendrá su color rojo en la superficie, al no haber cambiado de pH. Por el contrario, las bacterias crecidas en la profundidad emplearán desde el primer momento la glucosa por vía fermentativa, generando ácidos que no serán neutralizados, provocándose un descenso del pH y el color del medio en el fondo del tubo cambiará a amarillo A/A . Si la bacteria, además fermenta lactosa: los ácidos producidos modificarán también el pH de la superficie del medio. Las aminas no son capaces de neutralizar la cantidad de ácidos producidos en esta fermentación, ya que la lactosa se encuentra en el medio a mayor concentración que la glucosa. El color del medio en la superficie cambiará a amarillo. K/K (Figura 3.14).

Si la bacteria es aerobia estricta (no fermentadora), el medio permanece de color rojo. Los azúcares son respirados, degradándose completamente hasta CO_2 , que se elimina y no modifica el pH. A/A(g) aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo. K/A (H_2S) aparición de un precipitado de color negro en el fondo del tubo. Algunas bacterias respiradoras anoxobióticas son capaces de emplear el tiosulfato sodio como aceptor final de electrones en la cadena transportadora. Este compuesto se reduce a ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro Fe^{2+} presente en el medio formando un precipitado negro de sulfuro de hierro (Faddin 2007).

3.2.6.2.2. Citrato de Simmons

Según Faddin (2007) este medio indica la capacidad de las bacterias de metabolizar el citrato. Contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de fosfato y azul de bromotimol como indicador de pH. Únicamente las bacterias capaces de metabolizar citrato podrán multiplicarse en este medio, al utilizar los fosfatos presentes liberan iones amonio (básicos) que junto con la eliminación de citrato (ácido) generará una fuerte gasificación del medio que será aparente con un cambio de color del indicador de pH de verde a azul (Figura 3.14).

3.2.6.2.3. Medio Rojo De Metilo - Vogues Proskauer

Según Clavell *et al.* (1999) las enterobacterias son anaerobios facultativos que utilizarán la glucosa en 2 fases:

- Metabolismo aeróbico consumiendo rápidamente el oxígeno del medio.

- Metabolismo anaeróbico (fermentación) que puede ser de 2 tipos dependiendo de los productos finales obtenidos: fermentación ácido-mixta cuyos productos finales son ácidos orgánicos (fórmico, acético, láctico y succínico) y etanol; y fermentación butilén glicólica cuyos productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoína como intermediario. La liberación de ácidos orgánicos generará un acusado descenso del pH que podrá ser detectado añadiendo al medio un indicador de pH como el rojo de metilo (rojo a pH 4.0).

Según Faddin (2007) si la fermentación que se ha llevado a cabo produce acetoína puede ser detectada añadiendo al medio KOH y alfa-naftol que reaccionarán con este compuesto produciendo rojo característico (Figura 3.14).

3.2.6.2.4. Prueba de Ureasa

Según Faddin (2007) el indicador de pH utilizado es el rojo fenol. Esta prueba detecta la presencia de la enzima ureasa en el metabolismo bacteriano, la cual al hidrolizar urea forma productos amoniaco que alcalinizan el medio y se evidencia con el cambio de color del medio desde un amarillo pálido hasta un rojo fucsia (Figura 3.14).

3.2.6.2.5. Prueba Del Indol

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptofanasa, para la realización de esta prueba la bacteria se cultiva durante 24-48 horas en

un caldo de triptona con NaCl al 0,5% (la triptona presenta abundante triptófano) (Faddin 2007).

Según Faddin (2007) si la bacteria posee la enzima triptofanasa, al añadir al medio 5 gotas del reactivo de Kovacs, se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. Si esto ocurre después de 24 horas, la prueba se considera completa, pero si es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba. Por ello es conveniente hacer siempre la prueba no en el tubo incubado sino en una porción de unos 2ml que se retira de él asépticamente (Figura 3.14).

3.2.6.2.6. Lysine Iron Agar LIA

Según Faddin (2007) este medio también es conocido como LIA, es una prueba que permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de SH₂ y es más sensible que el TSI para la detección de SH₂. Es muy utilizado para descartar Salmonella de aislamientos primarios (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Reacción-Interpretación prueba de LIA.

Reacción	Interpretación
Azul (alcalino)	Hay movilidad
Rojo	No hay movilidad
Ennegrecimiento	Descarboxila ornitina
Ruptura del Agar	No descarboxila
Fondo Amarillo y Tendido púrpura	Descarboxilación de lisina

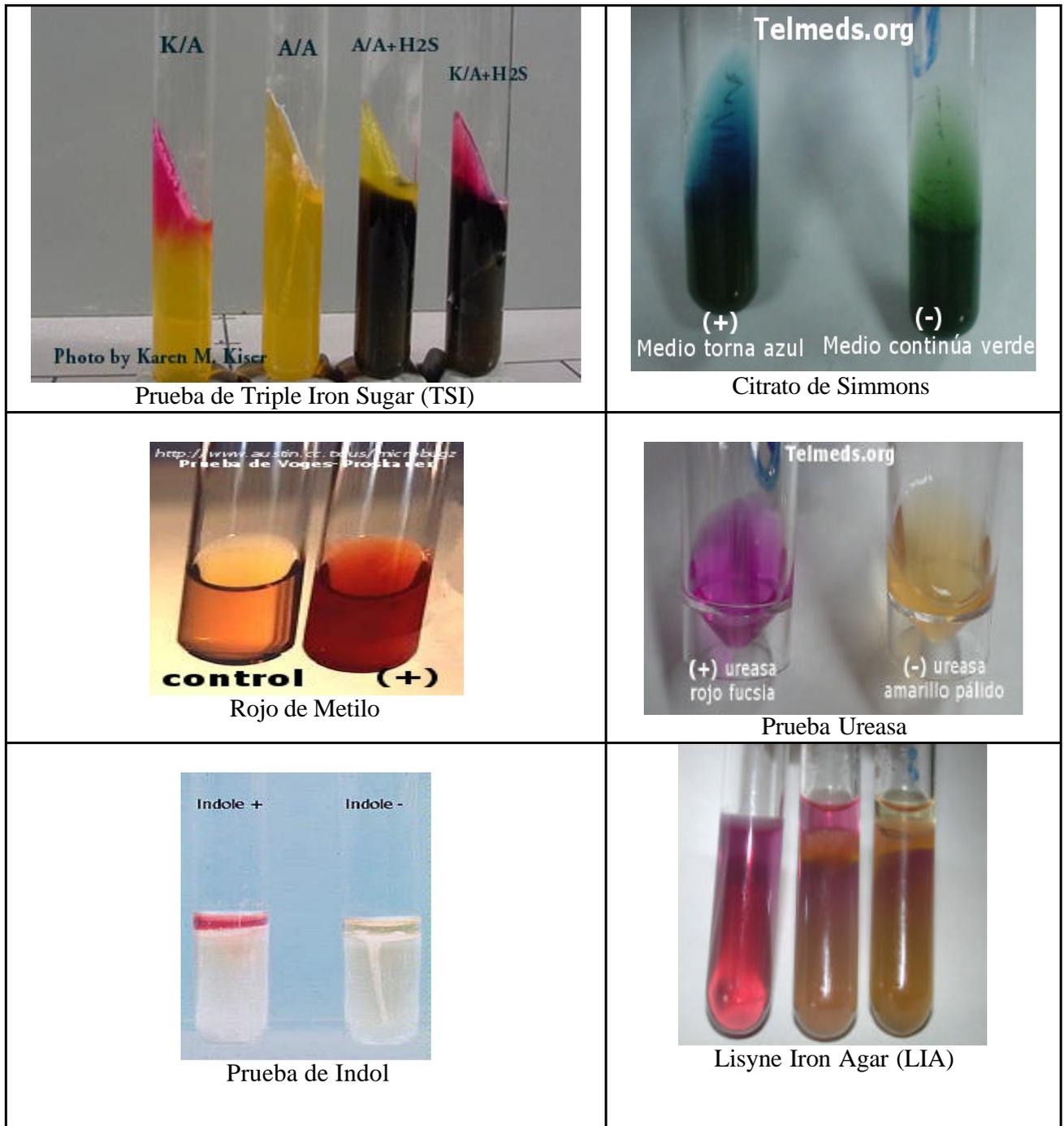
Fuente: Faddin 2007

Edwards y Fife desarrollaron este medio para diferenciar a *Salmonella arizonae*. Debido a que *S. arizonae* fermenta la lactosa rápidamente, la producción de H₂S es suprimida en el Agar de Hierro y Triple Azúcar. Eliminando la lactosa e incorporando la lisina, Edwards y Fife encontraron que este medio diferencia a los bacilos entéricos en base a su capacidad para descarboxilar o desaminar la lisina y producir H₂ S. Este medio es especialmente recomendado para la identificación de bacilos que fermentan rápidamente la lactosa (Faddin 2007).

En este medio la peptona provee la fuente de carbono y nitrógeno. El extracto de levadura provee vitaminas y cofactores para el crecimiento. La dextrosa es la fuente de energía. El hidrocloreto de L-lisina es el sustrato donde actúan las enzimas descarboxilasa o desaminasa. El citrato férrico de amonio y el tiosulfato de sodio actúan como indicadores de la producción de H₂S. El púrpura de bromocresol es un indicador de pH (Faddin 2007).

A partir de una colonia aislada se siembra en el medio por picadura en el fondo y por estría en la superficie. Se incuba a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 48 horas. Se examinar los tubos para observar cambios de color y ennegrecimiento

Existen diferentes reacciones que pueden darse en esta prueba: Producción de H₂S con la formación de un precipitado negro en la superficie, ausencia de precipitado negro, descarboxilación de la Lisina, fondo y superficie del medio de color púrpura (alcalino), fondo amarillo (ácido) con superficie púrpura (alcalina), desaminación de la Lisina con superficie púrpura. *Proteus* y *Providenza* producen cultivos con superficie roja sobre fondo amarillo.



Fuente: Kiser 2007.

Figura 3.14. Reacciones bioquímicas de bacterias Gram Negativas

3.2.7. ANTIBIOGRAMA

Según Val (s.f.), el antibiograma consiste en medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. Además por medio del antibiograma se determina la evolución de las resistencias bacterianas.

Usualmente se utiliza el agar de Mueller-Hinton en las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento. Cuando se trata de estreptococos u otros microorganismos exigentes, se le añade al Mueller-Hinton, 5% de sangre desfibrinada. De los métodos existentes, el más popular es el del disco de papel. La variante más utilizada de este método es la de Kirby Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición (Pedrique 2002).

3.2.7.1. PROCEDIMIENTO PARA EL ANTIBIOGRAMA

Según (Pedrique 2002), es necesario seguir las siguientes recomendaciones: Autoclavar el medio de cultivo y dejar enfriar a 45-50°C. Verter asépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa de Petri, para obtener una capa de 4 mm. de espesor aproximadamente. Para una placa de 10 cm. de diámetro se requieren 30 ml de medio y para una de 15 cm. se requieren 70 ml. Dejar solidificar el medio de cultivo y luego secar las placas durante 30 minutos antes de usarlas para la inoculación. Inocular la placa con 1 ml de la suspensión del germen de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez equivalente a $1,5 \times 10^6$ bacterias (Equivale al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland). La suspensión debe cubrir la superficie de placa de Petri y es necesario eliminar el sobrante.

Colocar la tapa a la placa y dejar secar el inóculo por 3 a 5 minutos. Colocar los discos con los antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles o usando un aplicador de discos. Oprimir los discos suavemente con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos deben estar espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm. y entre ellos de 30 mm. Incubar a 35 – 37°C hasta el siguiente día (aproximadamente 18-19 horas). Si se requieren los resultados con rapidez se pueden leer las zonas de inhibición después de 6-8 horas de incubación, pero estos resultados deben ser confirmados mediante una nueva lectura después de la incubación por las 18 -19 horas. La medida del diámetro de la zona de inhibición se hace preferentemente desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, esto puede hacerse con una regla milimetrada, un vernier o cualquier otro Instrumento similar.

Los resultados deben ser analizados de acuerdo al aro que presenta cada uno de los sensi discos utilizados, si no existe la presencia del aro indica que hay crecimiento bacteriano en las zonas, por lo cual el microorganismo es resistente a este antibiótico. El sensi disco que contenga el aro con mayor diámetro es el más efectivo, es decir el microorganismo analizado es sensible a este antibiótico.

3.2.7.2. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Por facilidad de manejo y disponibilidad de reactivos la prueba de sensibilidad antimicrobiana más usada es el método de difusión con discos sobre Agar Mueller Hinton.

La selección de principios activos a probar dependerá de: la disponibilidad de productos comerciales en el mercado local, la legislación del país sobre uso de antibióticos, el tipo de microorganismo aislado, si es para vaca en lactancia o en el periodo seco y si se va a usar vía parenteral o vía intramamaria. En una caja de Agar de 100 mm. de diámetro se pueden colocar ocho sensidiscos como máximo.

Cuadro 3.6. Reacciones de los ingredientes activos según su Concentración.

Ingredientes Activo	Concentración	Interpretación		
		Mínimo	Intermedio	Máximo
Enrofloxacina	5mcg	19	-	20
Amoxicilina+Ac. Clavulónico	10 mcg	19	-	20
Penicilina	10 u	20	21-28	29
Cloxacilina	1mcg	19	-	20
Streptomina	10 mcg	11	12-14	15
Cephalexina	30 mcg	14	15-17	18
Neomicina	30 mcg	12	13-16	17
Tetraciclina	30 mcg	14	15-18	19
Sulfatrimetoprin	23,75 ug	10	11 15	16

Fuente: Laboratorios Vet Uy 2004.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LOCALIZACIÓN

La fase de campo se llevó a cabo en veinte haciendas ubicadas en la provincia de Pichincha, de las cuales seis, son proveedores directos de la fábrica de quesos “La Holandesa”, y el resto son proveedores de distintas pasteurizadoras (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Datos de las haciendas muestreadas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

# Hacienda	Ubicación	Nombre de la hacienda	Altitud (m.s.n.m)	Proveedores
1	Aloag	Aychapicho	2.863	Particular
2	Aloag	San Carlos	2.863	"La Holandesa"
3	Cayambe	La Gitanilla	3.011	Particular
4	El Quinche	El Molino	2.729	"La Holandesa"
5	Machachi	San Carlos-Chaupi	2.886	Particular
6	Machachi	Gamboa	2.886	Particular
7	Machachi	Santa Teresita	2.886	Particular
8	Machachi	San Francisco	2.886	Particular
9	Nono	San Luis Intipungo	3.087	Particular
10	Nono	San Juan Escalera	3.087	Particular
11	Nono	Los Cedros	3.087	Particular
12	Patichubamba	El Relicario	2.862	Particular
13	San Fernando	Particular	2.750	Particular
14	San Fernando	El Prado	2.750	"La Holandesa"
15	San Fernando	San Juan	2.750	"La Holandesa"
16	Santo Domingo	María Isabel	600	Particular
17	Selva Alegre	Sigsicunga	2.539	Particular
18	Tambillo	El Consuelo	2.750	Particular
19	Tambillo	Miraflores	2.750	"La Holandesa"
20	Tumbaco	Cadet	2.356	"La Holandesa"

La fase de laboratorio fue realizada en los laboratorios veterinarios del Instituto Nacional de Higiene “Leopoldo Izquieta Pérez”, ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Guamaní, a 12.5 Km. de la Panamericana Sur, en la entrada al Beaterio.

4.2. MATERIALES Y EQUIPOS

Los equipos utilizados en la fase de laboratorio fueron: Medidor de pH: pH-Meter E488, balanza electrónica: AND EW-600^a, plancha eléctrica: tipo 2600, centrifugadora: Clay Adams RPM max. 6000, autoclave, refrigeradora, microscopio compuesto binocular, cámara de flujo laminar: Biological & Diagnostic Supplies Ltda., incubadora, agitador magnético: Mag-mix 65904, agitador: Vortex, cronómetro: Control company, cámara digital: Sony.

En la fase de campo se utilizaron cooler: dimensiones 17x20x27 cm., tubos de ensayo estériles de 10 ml. con tapa de caucho, algodón, guantes, alcohol al 72%, overol, botas, gel refrigerante, marcador permanente, esferos, libreta de campo, gradilla.

En la fase de laboratorio se utilizaron violeta de genciana, fushina, lugol, colorante albert, reactivo de Kovacs, rojo de metilo, agar Sangre: HI-MEDIA/INDIA, agar MacConckey: MERCK, agar Mueller Milton: MERCK, agar TSI (Triple Azúcar Hierro): HI-MEDIA/INDIA, citrato de Simmons, LIA (Agar Lisina Hierro), SIM, Urea, agar Manitol, caldo cerebro corazón, leche descremada UHT, peróxido de hidrógeno, plasma de conejo, agua destilada, alcohol acetona, pipetas graduadas de 1 y 10 ml, pipetas Pasteur, mortero,

cajas petri de vidrio, placas portaobjetos, erlenmeyer, frasco al vacío para sangre desfibrinada, asa de platino, mechero Bunsen, pèra, gradilla, papel filtro, papel aluminio, papel indicador de temperatura, papel empaque, piola, gas, palillos, agujas, filtro, jeringa, alcohol yodado, alcohol al 95 %, cloro, desinfectante, gasa, algodón.

4.3. MÉTODOS

Todo proceso que a continuación se describe fue realizado bajo estrictas condiciones de asepsia de materiales, instrumentos, medios de cultivo, soluciones, etc., de la misma manera se procedió con el manejo de las muestras.

Cabe mencionar que en los medios generales como MacConkey y Agar sangre, se consideró un máximo de dos tipos de colonias en cada uno de ellos, debido a que un mayor número de tipo de colonias se consideró como contaminación y se procedió a una resiembra de la muestra.

4.3.1. PREVALENCIA DE MASTITIS

Para determinar la prevalencia de mastitis, el primer paso fue realizar la prueba de CMT (*California Mastitis Test*) en las haciendas visitadas. Este procedimiento fue acompañado de una recopilación de datos como: número de vacas en ordeño, número de vacas muestreadas, cuartos afectados y nivel de infección de los mismos. El porcentaje de prevalencia se calculó dividiendo el número de vacas en ordeño para el número de vacas

muestreadas multiplicando por cien, cabe mencionar que se tomaron en cuenta para el muestreo únicamente las vacas a partir de grado dos en CMT.

$$\% \text{ prevalencia} = \frac{\text{nvacasordeño}}{\text{nvacasmuestreadas}} \times 100$$

A continuación se recolectó las muestras con la mayor asepsia posible, para aquellas vacas positivas en más de un cuarto; la recolección se la realizó equitativamente de los cuartos afectados, colocando similares cantidades de cada uno de ellos en un mismo tubo de ensayo.

Posteriormente se procedió a una correcta identificación de las muestras y una inmediata colocación en el cooler con gel refrigerante para mantener las muestras en condiciones adecuadas. Su traslado al laboratorio se realizó lo más pronto posible, pudiendo prolongarse siempre que las muestras se encuentren en refrigeración.

4.3.2. NIVEL TECNOLÓGICO DE LAS HACIENDAS

El nivel tecnológico de las haciendas se evaluó de acuerdo a las buenas prácticas de ordeño que manejaba cada una de las haciendas, la calificación fue sobre veinte puntos y se tomaron en cuenta los siguientes parámetros (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Formato de calificación de acuerdo a las buenas prácticas de ordeño.

PARÁMETRO		CALIFICACIÓN
Higiene de instalaciones y equipos		3
Prácticas De Ordeño	Maltratan a las vacas	0,5
	Despunte	2
	Lavado de pezones	1
	Secado de ubres	2
	Ordeño	1
	Sellado	1,5
	Ambiente de ordeño	0,5
	Personal de ordeño	1,5
Manejo de leche ordeñada		4
Limpieza y desinfección del equipo		2
Limpieza y desinfección sala ordeño		1
TOTAL		20

Fuente: La Holandesa 2007.

Las calificaciones de las veinte haciendas (Anexo 1) se tomaron en cuenta para incluirlas según su equivalencia en los tipos de haciendas (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Calificación de las haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

CALIFICACIÓN	EQUIVALENCIA	NIVEL PRÁCTICAS ORDEÑO
20 – 19	A	ALTA
16 – 18	B	MEDIA
13 – 15	C	REGULAR
12 – 0	D	BAJA

4.3.3. PATÓGENO MÁS REPRESENTATIVO

Para determinar el agente más representativo de las muestras de mastitis se tuvo que seguir varios procesos: siembra, purificación, aislamiento e identificación de patógenos. Una vez que las muestras llegaron al laboratorio se registró de acuerdo al protocolo del laboratorio “Izquieta Pérez”, con los siguientes datos: fecha, número de muestras, tipo de muestra, hacienda, localidad, provincia y responsable.

Los medios de cultivo tanto generales como específicos fueron preparados como menciona la literatura (BBL 1974), los cuales estuvieron listos previa la llegada de las muestras para la siembra e identificación de patógenos.

Las muestras a temperatura ambiente fueron pesadas equitativamente y centrifugadas a mil quinientas revoluciones por minuto (1500 RPM) por un periodo de diez minutos. Los tubos centrifugados fueron trasladados a una cámara estéril, de cada uno de ellos se eliminó el sobrenadante y el precipitado se sembró por agotamiento, en cajas Petri de agar sangre y agar MacConkey, con su respectiva identificación.

Los medios fueron incubados durante 24 horas a una temperatura de 37° C. Después de este periodo se realizó la lectura de las cajas para determinar la presencia o ausencia de patógenos, registrando cada uno de estos datos. Cuando las muestras presentaban crecimiento se procedió a realizar la coloración Gram para una primera y general clasificación de bacterias.

En una cámara estéril se procedió a preparar la placa mediante frotis utilizando para ello una pequeña cantidad de cada colonia recogida con la ayuda de un asa de platino; posteriormente se realizó la extensión de la misma sobre la placa portaobjetos con movimientos giratorios, para poder observar bacterias separadas. Luego del frotis se fijó la placa al calor, evitando quemar las bacterias, pues varía su morfología y dificulta su observación. Para las placas preparadas se empleo la coloración Gram y se observó al microscopio utilizando el lente de 100x con aceite de inmersión. Por medio de la observación se llegó a clasificar las bacterias de acuerdo a su forma y coloración. Por la forma en: cocos y bacilos; y por la coloración se observaron bacterias Gram positivas con color azul-violáceas y Gram negativas rojas. Los cocos positivos presentaron agrupaciones en racimos o en cadenas, observación que permitió la identificación de grupos de *Staphylococcus* o *Streptococcus* respectivamente. Las cajas con colonias blancas pequeñas, y bacilos positivos cortos en coloración Gram fueron incubadas durante 48 horas para obtener un mayor crecimiento, debido a que son características morfológicas propias de *Corynebacterium*.

La caracterización de las bacterias encontradas se realizó por medio de pruebas bioquímicas específicas para bacterias positivas o negativas según sea el caso. Se llegó a caracterizar solo el género y no la especie de las bacterias encontradas, con algunas excepción, como es el caso de *Staphylococcus aureus*.

Para esto, se realizó una purificación de la colonia en agar sangre si fue una bacteria positiva y en agar MacConkey si fue una bacteria negativa. La purificación consistió en sembrar nuevamente la colonia que se quiso identificar, de esta manera se obtuvo en el

medio de cultivo colonias con las mismas características, es decir colonias puras necesarias para las pruebas bioquímicas.

Las pruebas bioquímicas son un conjunto de medios que al reaccionar positiva o negativamente, expresan las características propias e inconfundibles de un determinado patógeno. Por tal motivo permiten llegar a una identificación precisa del patógeno.

Las pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas en forma de cocos se basó en: pruebas de catalasa, coagulasa y agar manitol. Para la prueba de catalasa se utilizó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en una placa portaobjetos, sobre la cual se colocó con la ayuda de un palillo una colonia aislada; a continuación se mezcló la colonia con el peróxido y se observó la presencia o ausencia de burbujas de O₂. Aquellas bacterias que presentaron burbujas (+) continúan en el grupo de *Staphylococcus*, y la ausencia (-) pertenece a los *Streptococcus*. Al momento de recoger la muestra es importante evitar coger el agar sangre ya que este puede dar un resultado falso positivo.

En la prueba de coagulasa se colocaron dos gotas de plasma en una placa portaobjeto y con un palillo o asa de platino se recogió la colonia y se disolvió en el plasma realizando movimientos circulares lentos; se observó una reacción positiva ante una evidente formación de pequeños coágulos en el líquido y en una reacción negativa la bacteria se disuelve en el plasma formando líquido de color crema con ausencia de coágulos.

La habilidad de coagulación permitió dividir al grupo de *Staphylococcus* en: *Staphylococcus* coagulasa negativa y *Staphylococcus* coagulasa positiva, con reacción

negativa y positiva respectivamente. *Staphylococcus aureus* presentó una reacción positiva y *Streptococcus* negativa.

En la prueba de manitol se tomó una colonia aislada con una aguja de platino que permita realizar una punción en medio del agar manitol inclinado, la reacción se observó a las 24 horas. Una reacción positiva se observó al cambio de coloración de rojo a amarillo.

A continuación se detalla las interpretaciones de las pruebas bioquímicas para bacterias positivas (Cuadro 4.4)

Cuadro 4.4. Interpretación de pruebas bioquímicas bacterias positivas, Pichincha, Ecuador, 2008.

PATÓGENO	CATALASA	COAGULASA	MANITOL
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus</i> Coagulasa Negativa	+	-	+
<i>Staphylococcus</i> Coagulasa Negativa	+	-	-
<i>Staphylococcus</i> Coagulasa Positiva	+	+	-
<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	-
<i>Streptococcus sp.</i>	-	+	-
<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	+

En el caso de bacilos positivos se realizó la coloración Albert para diferenciar entre *Corynebacterium sp.* y *Bacillus sp.*. Para esta coloración se preparó la placa portaobjetos de la misma manera que la empleada en coloración Gram, paso seguido se utilizó el colorante Albert y se observó corpúsculos metacromáticos de color negro para el caso de *Corynebacterium sp.* y bacilos de color verde sin ninguna diferenciación para *Bacillus sp.*.

En el caso de las bacterias Gram negativas se procedió a purificar las bacterias en agar MacConkey; posteriormente se realizaron las pruebas bioquímicas: TSI (Triple Azúcar Hierro), Citrato de Simmons, LIA (Agar Lisina Hierro), SIM, Indol, Rojo de Metilo y Urea. Para realizar la prueba de TSI se realizó una punción en el medio con una aguja que contenía una pequeña muestra de la bacteria aislada, el medio fue incubado a 37° C por 24 horas; transcurrido este periodo se realizó la lectura en base a la reacción del medio, estas reacciones fueron: coloración de la superficie inclinada y/o del fondo, formación de burbujas, grietas, presencia de sulfuro ferroso (color negro).

La prueba de citrato fue realizada para identificar la presencia de un grupo de enterobacterias capaces de desarrollarse en un medio que contenga sales inorgánicas de amonio como única fuente de nitrógeno, citrato, carbono, diferenciándose de otras enterobacterias que carecen de esta capacidad.

Para esta prueba se utilizó un tubo con agar citrato de Simmons, solidificado en posición inclinada, en el que se sembró la bacteria en prueba dejándola incubar a 37° C por 24 horas; al finalizar este periodo de incubación se procedió a leer los resultados, una reacción positiva muestra un cambio radical de color verde original a azul intenso debido a la alcalinización del medio por degradación del citrato, una reacción negativa no cambia la coloración original del medio.

Para la prueba de LIA (Agar Lisina Hierro) se cogió un tubo con agar LIA, solidificado en posición inclinada, en el cual se sembró la bacteria en prueba dejándola incubar a 37° C

por 24 horas; al finalizar este periodo de incubación se procedió a leer los resultados, una reacción positiva es aquella que mantiene la coloración púrpura propia del agar; una reacción negativa provoca el cambio de coloración de púrpura a amarilla debido a la descarboxilación de la lisina.

Por medio de la prueba SIM se determinó la motilidad de las bacterias, para lo cual se utilizó tubos con 5ml de medio semisólido, solidificado en posición vertical, las muestras fueron sembradas por picadura, se incubaron por espacio de 24 horas a 37° C.

En los tubos en que crecieron bacterias no productoras de H₂S el medio no estuvo ennegrecido, en el caso de existir motilidad se constató el trayecto seguido por las bacterias en su desplazamiento.

La prueba de Indolestuvo destinada a descubrir la presencia de triptófano como producto de la acción bacteriana. Para el procedimiento se utilizó tubos de 5ml contenidos de caldo tristona (rico en triptófano) al 1% con 0.5% de NaCl; el tubo fue sembrado e incubado en incubadora a 37° C por 24 horas, al cabo de este periodo se practicó la prueba, añadiendo al cultivo 0.5 ml. del reactivo de Kovacs.

La positividad de la prueba fue dada por la aparición de un anillo de color rojo intenso en la superficie del cultivo, la negatividad se dio por la presencia de un anillo del color del medio.

La finalidad de la prueba de Rojo de Metilo fue diferenciar las bacterias que fermentan la glucosa con formación exclusiva de ácido, por lo que el pH del medio pasó a ser ácido. Para esta prueba se usaron tubos de 5ml de caldo MRVP sembrados e incubados a 37° C por 24 horas. La prueba se realizó adicionando al cultivo 5 gotas del reactivo rojo de metilo. Los caldos positivos mostraron color rojo que se difundió por toda la masa del cultivo, los negativos mantuvieron su color original.

La prueba de Urea fue empleada para demostrar la capacidad de algunas enterobacterias, como Proteus de producir ureasa y de esta manera hidrolizar la urea, alcalinizando fuertemente el medio de cultivo, diferenciándose de otras bacterias incapaces de hacerlo, como las Salmonellas.

Se usaron tubos contenidos de 3 ml. de caldo urea, se sembraron e incubaron las bacterias a 37° C por 24 horas. Los casos positivos mostraron viraje de color amarillo inicial a rosado intenso, los casos negativos no mostraron un cambio de coloración.

Los resultados de las pruebas bioquímicas para bacterias negativas fueron interpretadas según la tabla de Diferenciación de Enterobacterias por Biochemical Test. (Anexo 2). A continuación se presentan resultados positivos de la reacción de las bacterias frente a diferentes medios de cultivos (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5. Reacciones de pruebas bioquímicas, Pichincha, Ecuador, 2008.

PRUEBA	REACCIÓN	
	POSITIVA	NEGATIVA
Catalasa	Presencia de burbujas de O ₂ .	Ausencia de burbujas de O ₂ .
Coagulasa	Formación de coágulos.	Líquido homogéneo.
Manitol	Cambio de color de rojo a amarillo.	Medio de color rojo.
Citrato	Cambio de color de verde a azul.	Medio de color azul.
LIA	Medio de color lila.	Cambio de color lila a amarillo.
Indol	Aparición de un anillo de color rojo.	Anillo de color del medio.
Movilidad	Difusión a partir de la línea de inóculo.	Ausencia de difusión.
Rojo de Metilo	Cambio de color amarillo a rojo.	Medio de color amarillo.
Ureasa	Cambio de color melón a fucsia.	Medio de color melón.

4.3.4. SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA DE PATÓGENOS

El antibiograma se utilizó con la finalidad de medir la sensibilidad bacteriana frente al uso de varios antibióticos ya que existen reacciones distintas. Por medio del antibiograma se determinó el antibiótico más efectivo para cada uno de los patógenos encontrados.

Una vez identificadas las bacterias se procedió a realizar dos antibiogramas por cada una de las bacterias encontradas, para lo cual se utilizó diferentes sensidiscos para bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.

Para bacterias Gram positivas se utilizó: cloxacilina (CX), cephalexina (CL), amoxicilina+ac.clavulónico (AMC+AC), sulfatrimetoprin (SXT), tetraciclina (TE), enrofloxacina (ENR), penicilina (P).

Para bacterias Gram negativas se utilizó: cloxacilina (CX), cephalexina (CL), enrofloxacin (ENR), sulfatrimetoprin (SXT), tetraciclina (TE), neomicina (N), estreptomicina (SS).

Para realizar el antibiograma se utilizó agar Sangre para antibiogramas de bacterias Gram positivas, agar Mueller-Hinton para antibiogramas de bacterias Gram negativas; en el caso de *Corynebacterium* se utilizó agar de Mueller-Hinton con 5% de sangre desfibrinada.

Para este procedimiento fue necesario verificar que todos los medios estén correctamente elaborados y libres de contaminación. En el caso de las cajas petri para la elaboración de antibiogramas el agar debió tener una capa de 5mm de espesor, cubriendo en su totalidad la caja petri, el agar estuvo completamente gelificado para iniciar el procedimiento.

Las bacterias fueron sembradas en Caldo Cerebro Corazón para lo cual se utilizó tubos con 5ml de caldo, se dejó incubar por 12 horas hasta que el caldo este turbio.

Se usaron pipetas de 1ml con las que se recogió la suspensión del germen que presentaba una alta turbidez, la suspensión debe cubrir la superficie de la caja petri, se eliminó el sobrante y se dejó secar el inóculo por un periodo de 3 minutos.

Después de transcurrido este periodo se colocó los sensidiscos escogidos de acuerdo a la clasificación de la bacteria. Los discos se colocaron sobre el agar mediante pinzas estériles, se oprimió los discos suavemente con una pinza para asegurar el contacto de los discos con el medio de cultivo. Se colocaron siete discos por cada caja los cuales estuvieron espaciados de manera que la distancia a la pared de la placa sea de 15 mm. y entre ellos de 30 mm.

Las muestras fueron incubadas a 35 – 37° C por un periodo de 24 horas aproximadamente. Una vez que se observó claramente los aros alrededor de los discos se procedió a medir con una regla milimetrada de forma circular la zona de inhibición.

Los resultados fueron analizados de acuerdo al aro que presentó cada uno de los discos utilizados. La ausencia de aro se interpretó como la resistencia de la bacteria al antibiótico, mientras que la presencia de aro se interpretó como la sensibilidad de la bacteria frente al antibiótico, lo cual depende de la concentración de antibiótico en el disco para determinar si fue sensible, intermedio o resistente, de acuerdo a escalas estandarizadas.

4.3.5. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

La información se analizó con estadística descriptiva (promedio, error estándar y coeficiente de variación) y diferentes técnicas gráficas.

Para comparar el diámetro del halo de los patógenos, entre tipo de hacienda y antibióticos, se realizó un análisis de varianza en arreglo factorial, bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + H_k + AP_{ij} + AH_{ik} + PH_{jk} + APH_{ijk} + e_{ijkl}$$

Donde:

μ = media general

A_i = efecto del i -ésimo antibiótico

P_j = efecto del j -ésimo patógeno

H_k = efecto de la k -ésima hacienda

AP_{ij} = efecto de la interacción antibiótico patógeno

AH_{ik} = efecto de la interacción antibiótico hacienda

PH_{jk} = efecto de la interacción patógeno hacienda

APH_{ijk} = efecto de la interacción antibiótico patógeno hacienda

e_{ijkl} = error experimental

Además se realizaron pruebas de comparación de media de Duncan al 5% para antibióticos, patógenos, haciendas e interacciones.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

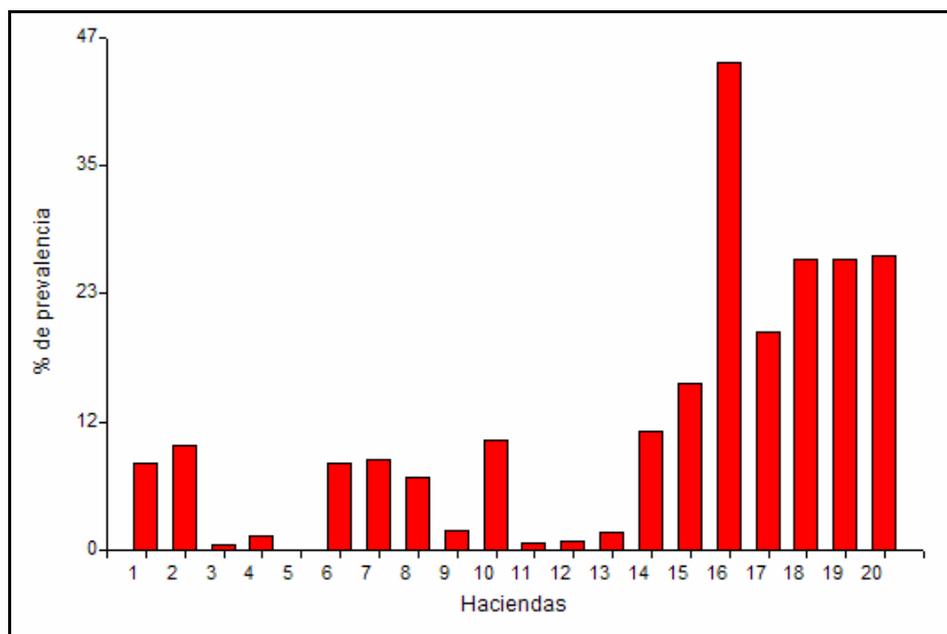
5.1. PREVALENCIA DE MASTITIS

De las 1321 vacas en ordeño fueron muestreadas 141, lo que corresponde al 10,67% de vacas con mastitis en las 20 haciendas visitadas. Para determinar el porcentaje de prevalencia se consideró el número de vacas en ordeño versus las vacas muestreadas de cada hacienda. Las haciendas con menor prevalencia de mastitis fueron: Gamboa, Aychapicho, Los Cedros, La Gitanilla, Sigsicunga, El Relicario y El Consuelo las mismas que presentaron menos del 3% de vacas con mastitis (Cuadro 5.1 y Figura 5.1).

Cuadro 5.1. Porcentaje de mastitis en los hatos ganaderos de la Provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

N° HACIENDA	HACIENDA	VACAS ORDEÑO	VACAS MUESTREADAS	% PREVALENCIA
1	San Luis Intipungo	38	3	7,89
2	San Juan Escalera	21	2	9,52
3	Aychapicho	178	1	0,56
4	Sigsicunga	80	1	1,25
5	Gamboa	s/d	1	0,00
6	Santa Teresita	25	2	8,00
7	María Isabel	36	3	8,33
8	San Francisco	30	2	6,67
9	El Consuelo	58	1	1,72
10	Particular	10	1	10,00
11	Los Cedros	142	1	0,70
12	La Gitanilla	120	1	0,83
13	El Relicario	64	1	1,56
14	El Prado	83	9	10,84
15	Miraflores	85	13	15,29
16	San Juan	47	21	44,68
17	San Carlos-Chaupi	50	10	20,00
18	Cadet	45	12	26,67
19	San Carlos	94	25	26,60
20	El Molino	115	31	26,96
TOTAL		1321	141	10,67

La hacienda con mayor prevalencia de mastitis en su hato fue San Juan con el 44,68%, la misma que tenía 47 vacas en ordeño y 21 muestreadas. A continuación se encontraron las haciendas: El Molino, Cadet y San Carlos con el 26,96%, 26,67% y 26,60%, de prevalencia respectivamente (Figura 5.1).



1 San Luis Intipungo	6 Santa Teresita	11 Los Cedros	16 San Juan
2 San Juan Escalera	7 María Isabel	12 La Gitanilla	17 San Carlos-Chaupi
3 Aychapicho	8 San Francisco	13 El Relicario	18 Cadet
4 Sigsicunga	9 El Consuelo	14 El Prado	19 San Carlos
5 Gamboa	10 Particular	15 Miraflores	20 El Molino

Figura 5.1. Porcentaje de prevalencia de mastitis por hacienda ganadera de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

5.2. NIVEL TECNOLÓGICO DE LOS HATOS

Las haciendas fueron calificadas de acuerdo a las buenas prácticas de ordeño y se dividieron en haciendas de tipo: A, B, C, D. Las haciendas de tipo A (nivel bueno) cumplen con parámetros de limpieza y calidad de la leche durante el ordeño. Haciendas B, C y D generalmente tienen algunas falencias en lo referente a higiene de materiales y equipos, o incumplimiento de normas dentro de los procesos del ordeño, siendo clasificadas en niveles medio, regular y malo respectivamente (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.2. Tipos de haciendas según su calificación, Pichincha, Ecuador, 2008.

TIPO DE HACIENDA	NOMBRE	CALIFICACIÓN
A	El Relicario	19,48
B	La Gitanilla	16,16
B	Miraflores	17,12
B	San Juan	16,20
B	San Carlos	17,35
C	San Luis Intipungo	13,38
C	Gamboa	12,50
C	Santa Teresita	14,01
C	María Isabel	12,95
C	San Francisco	12,88
C	El Consuelo	15,10
C	Particular	13,31
C	Los Cedros	13,45
C	El Prado	13,44
C	San Carlos-Chaupi	12,90
C	Cadet	12,61
C	El Molino	15,03
D	San Juan Escalera	11,52
D	Aychapicho	11,52
D	Sigsicunga	12,40

Existen un desigual número de hatos por cada tipo de hacienda, de acuerdo a su calificación. El grado de infección no tiene una relación directa al tipo de hacienda, debido a que la mastitis se presenta en todos los hatos, pues es una enfermedad multifactorial y por tanto dificulta su erradicación (Cuadro 5.3).

Cuadro 5.3. Tipos de haciendas y grado de mastitis de las haciendas, Pichincha, Ecuador, 2008.

TIPO DE HACIENDA	HACIENDAS		GRADO DE MASTITIS
	N°	PORCENTAJE (%)	
A	1	5	2
B	4	20	3
C	12	60	2
D	3	15	3
TOTAL	20	100	

Fueron veinte haciendas muestreadas, de las cuales el 60% correspondieron a haciendas de tipo C, el 20% haciendas tipo B, el 15% haciendas D y por último el 5% para haciendas tipo A. Para los tipos de hacienda se observó que el grado de mastitis se presentó indistintamente, así haciendas tipo A tuvieron grado 2, haciendas B grado 3, haciendas C grado 2 y tipo de haciendas D grado 3 (Cuadro 5.3 y Figura 5.2).

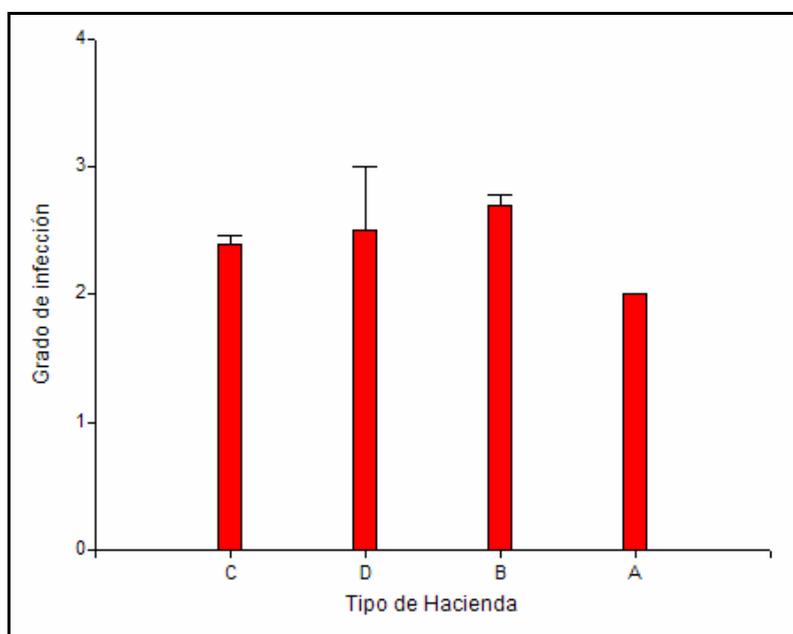


Figura 5.2. Grado de infección según el tipo de hacienda, Pichincha, Ecuador, 2008.

5.3. PATÓGENOS IDENTIFICADOS

De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas se presentan a continuación los patógenos encontrados en las distintas haciendas visitadas (Cuadro 5.4 y Cuadro 5.5).

Cuadro 5.4. Bacterias Gram negativas encontradas en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	NÚMERO	PORCENTAJE (%)	TIPO HACIENDA
<i>Aeromona cavia</i>	1	0,71	C
<i>Shewanella putrefasciens</i>	1	0,71	C
<i>Shigella sp.</i>	1	0,71	C
<i>Pseudomona fluorescens</i>	1	0,71	B
<i>Enterobacter</i>	2	1,42	C,B
<i>Escherichia coli</i>	2	1,42	C,D
<i>Pseudomona sp.</i>	3	2,13	C,B
<i>Ausencia</i>	130	92,20	A,B,C
TOTAL	141	100	

El 92,20% de las muestras recolectadas correspondieron a los tipos de hacienda A, B y C, en los cuales no hay presencia de bacterias Gram- negativas.

El 2,13% correspondió a *Pseudomonas sp.* en las haciendas B y C; 1,42% a *Enterobacter* y *E. coli* en las haciendas de tipo B, C y C, D respectivamente. Los patógenos como: *Aeromona cavia*, *Shewanella putrefasciens*, *Shigella sp.* y *Pseudomona fluorescens*; pertenecieron a haciendas de tipo B y C, con el 0,71% cada una (Figura 5.3).

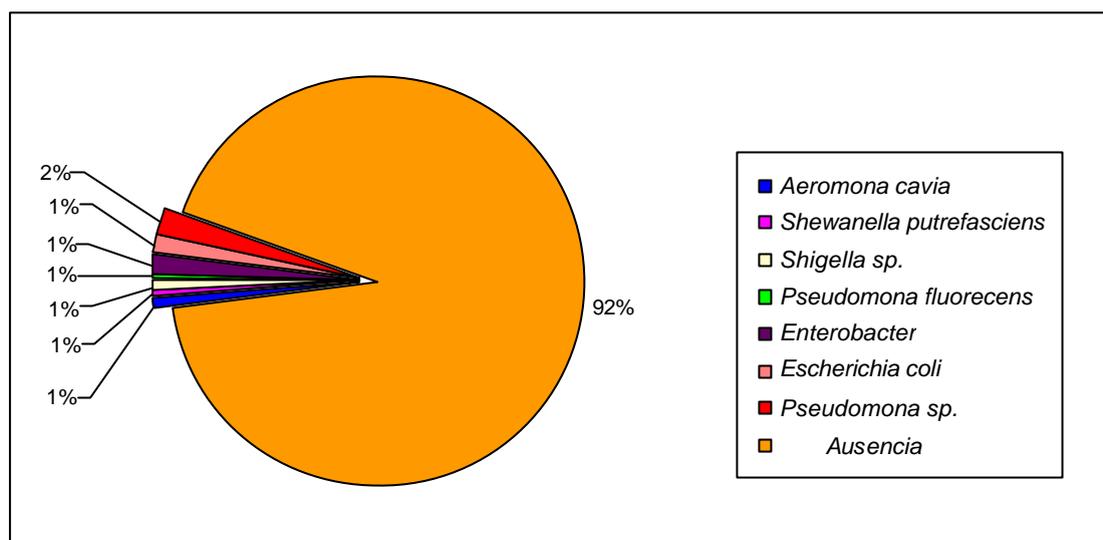


Figura 5.3. Bacterias Gram negativas presentes en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

A diferencia de las bacterias Gram negativas, en las bacterias Gram positivas únicamente en seis muestras hubo ausencia de crecimiento, en las demás se identificó nueve patógenos (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5. Bacterias Gram positivas encontradas en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	NÚMERO	PORCENTAJE	TIPO HACIENDA
<i>Bacillus cereus</i>	1	0,65	B
<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	1	0,65	D
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0,65	C
Ausencia	6	3,92	B,C,D
<i>Bacillus sp.</i>	7	4,58	B, C
<i>Staphylococcus coagulasa (+)</i>	8	5,23	B, C
<i>Staphylococcus coagulasa (-)</i>	19	12,42	A, B, C, D
<i>Streptococcus sp.</i>	25	16,34	B, C
<i>Corynebacterium sp.</i>	32	20,92	B, C
<i>Staphylococcus aureus</i>	53	34,64	B, C
TOTAL	153	100	

Staphylococcus aureus representó 34,64%, *Corynebacterium* 20,92% y *Streptococcus* 16,34%, siendo estos los valores más representativos del total de los patógenos encontrados los cuales se encontraban ubicados en haciendas de tipo B y C (Figura 5.4).

Staphylococcus coagulasa (-) participó con el 12,42% repartido en todas las haciendas. *Staphylococcus coagulasa* (+) con un porcentaje del 5,23%, seguido de: *Bacillus sp.* con el 4,58%, las mismas que se ubicaron en tipos de haciendas B y C. Ausencia 3,92% en haciendas B, C y D. Con el 0,65 % se encuentra: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus simulans*; en las haciendas B, D y C respectivamente (Figura 5.4).

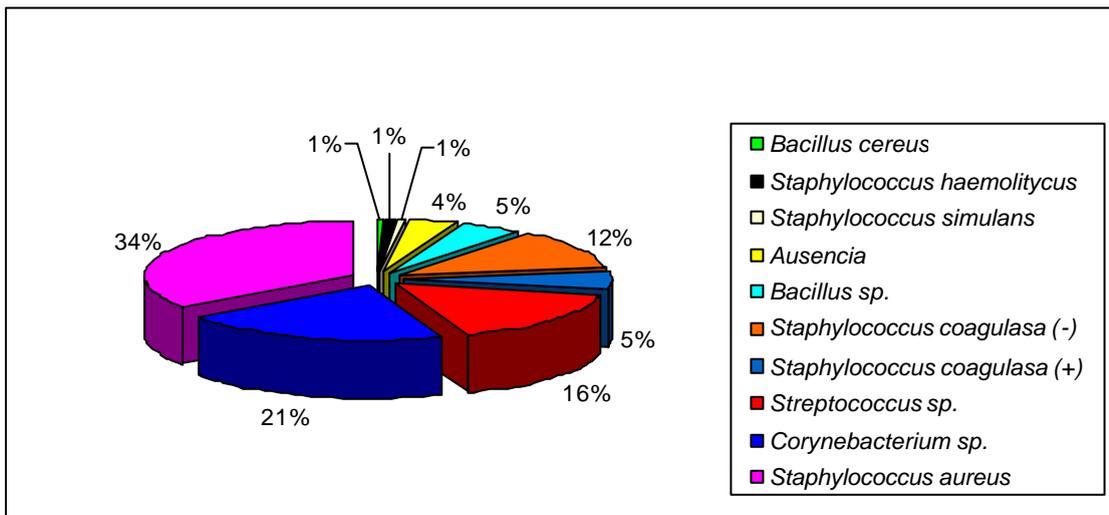


Figura 5.4. Bacterias Gram positivas presentes en haciendas ganaderas de la provincia de Pichincha, Ecuador, 2008.

5.4. SENSIBILIDAD DE PATÓGENOS A LOS ANTIBIÓTICOS

Para conocer la sensibilidad de los antibióticos frente a los patógenos Gram negativos se utilizaron siete tipos de sensidiscos: TE (Tetraciclina), CL (Cephalexina), CX (Cloxacilina), SS (estreptomina), SXT (Sulfatrimetoprin), N (Neomicina), y ENR (Enrofloxacin).

Para las bacterias Gram positivas se utilizaron los siguientes sensidiscos: TE (Tetraciclina), CL (Cephalexina), CX (Cloxacilina), P (Penicilina), SXT (Sulfatrimetoprin), AMC+AC (Amoxicilina + Acido clavulónico), y ENR (Enrofloxacin).

Cada uno de los sensidiscos utilizados fueron de diferentes concentraciones y de diferente interpretación para determinar la sensibilidad y resistencia.

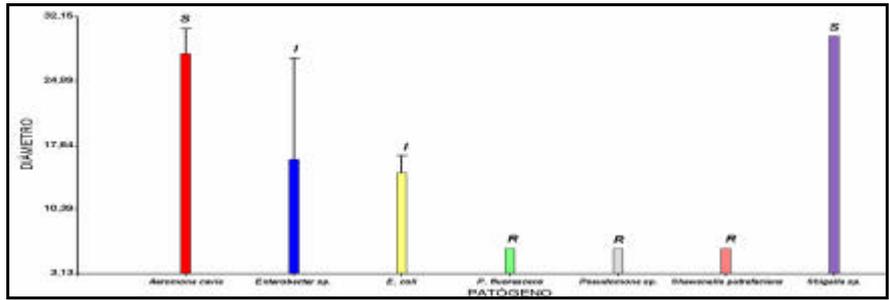
5.4.1. REACCIÓN DE LOS PATÓGENOS FRENTE A CADA ANTIBIÓTICO

Al comparar cada una de las bacterias Gram negativas frente a los antibióticos propuestos se llegó a determinar que *Aeromonas cavia*, fue sensible a todos los antibióticos, mientras que *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli* fueron intermedias para Cephalexina, para el resto de antibióticos estas bacterias presentaron resistencia, *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* fueron resistentes para Cephalexina, Cloxacilina, intermedias para Sulfatrimetoprin, y para el resto de antibióticos son resistentes; *Shewanella putrefaciens* fue resistente para Cephalexina, Cloxacilina, y para el resto de antibióticos fue sensible. *Shigella sp.* fue

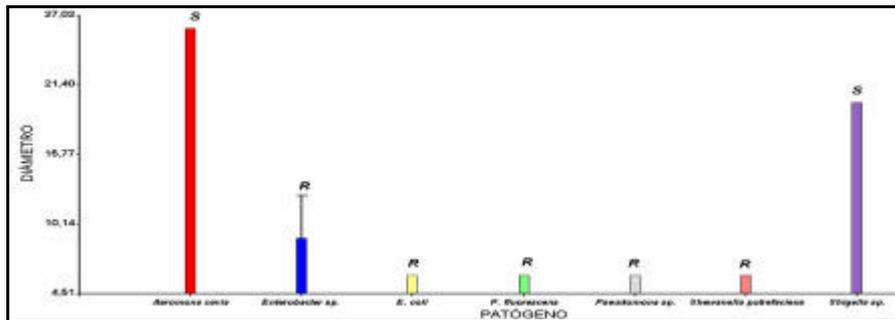
resistente para Estreptomicina mientras que para el resto de antibióticos fue sensible (Figura 5.5).

Para las bacterias Gram positivas se determinó que *Bacillus sp*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Staphylococcus coagulasa positiva*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* fueron resistentes a Cloxacilina, intermedios para Penicilina y para el resto de antibióticos estas bacterias presentaron sensibilidad, *Bacillus cereus* presentó resistencia a todos los antibióticos excepto para Enrofloxacin y Tetraciclina que fueron sensibles. *Staphylococcus haemolyticus* es intermedio para Cephalexina, sensible para Amoxicilina+Ac.Clavulónico y para el resto de antibióticos presentó resistencia. *Staphylococcus simulans* fue resistente para Cloxacilina y Penicilina mientras que para el resto de antibióticos fue sensible. Se determinó que todas las bacterias Gram positivas presentaron resistencia para la Cloxacilina (Figura 5.6).

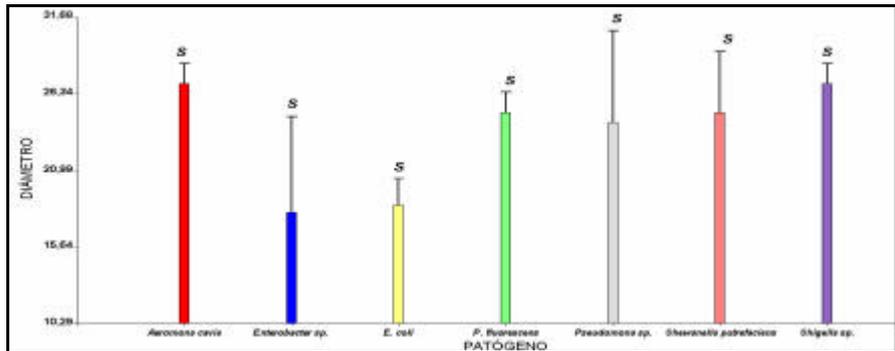
El patógeno más representativo en esta investigación fue *Staphylococcus aureus* con 34,64% de un total de 141 muestras, estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Martín *et al.* (2002) en una investigación realizada en Chile en la Xª Región, donde encontró a *Staphylococcus aureus* con 55,53% como patógeno más representativo de un total de 2000 muestras. En la misma investigación realizada en la V Región y Región Metropolitana se encontró a *Escherichia coli* (40,76%) como patógeno más representativo, discrepando con la presente investigación cuyo patógeno Gram negativo más representativo fue *Pseudomonas sp.* que representa (2,13%).



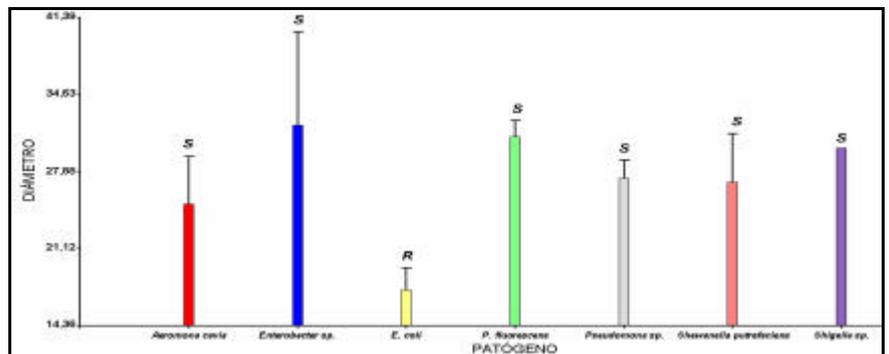
Cephalaxina



Cloxacilina



Enrofloxacin



Neomicina

Figura 5.5. Sensibilidad de los patógenos Gram negativos frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.

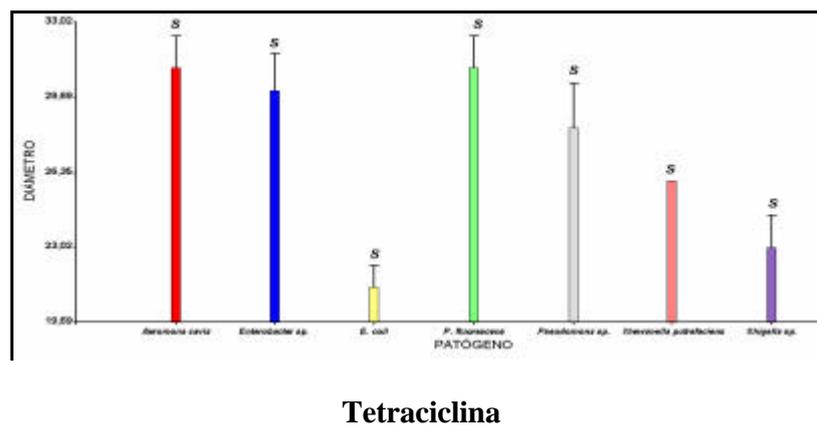
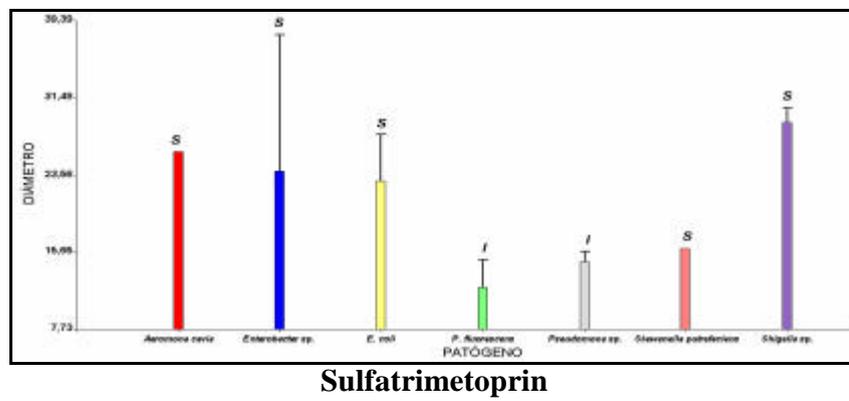
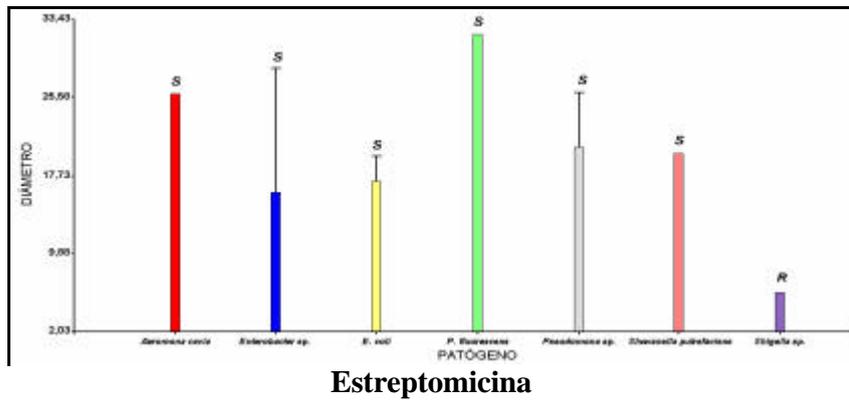
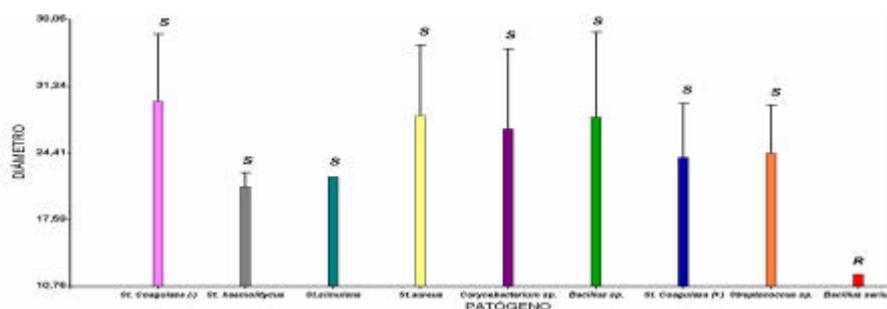
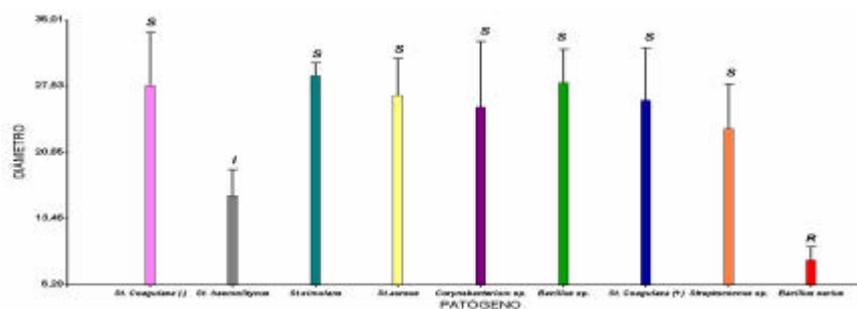


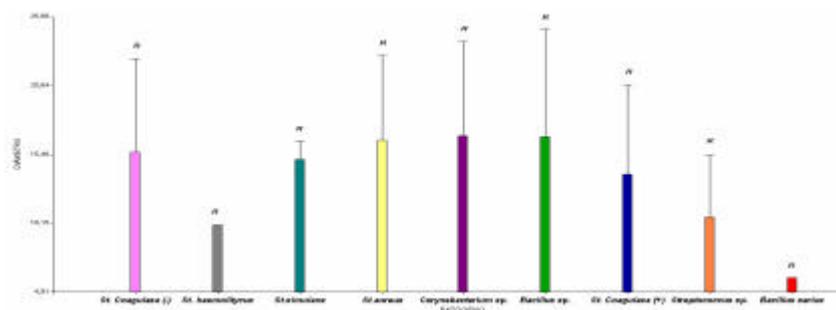
Figura 5.6. Sensibilidad de los patógenos Gram negativos frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.



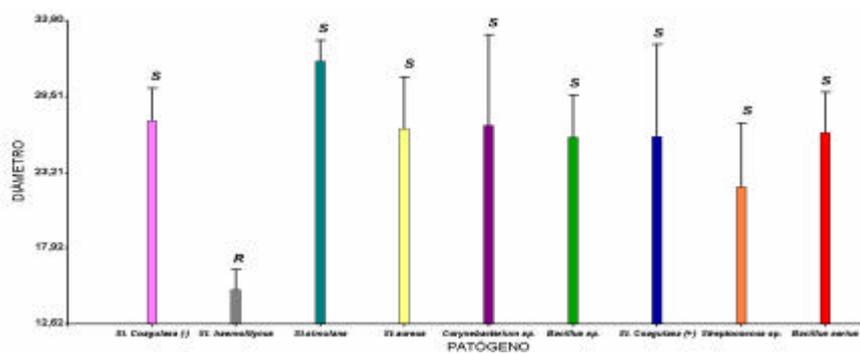
Amoxicilina+Ac.clavulónico



Cephalexina



Cloxacilina



Enrofloxacin

Figura 5.7. Sensibilidad de los patógenos Gram positivos frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.

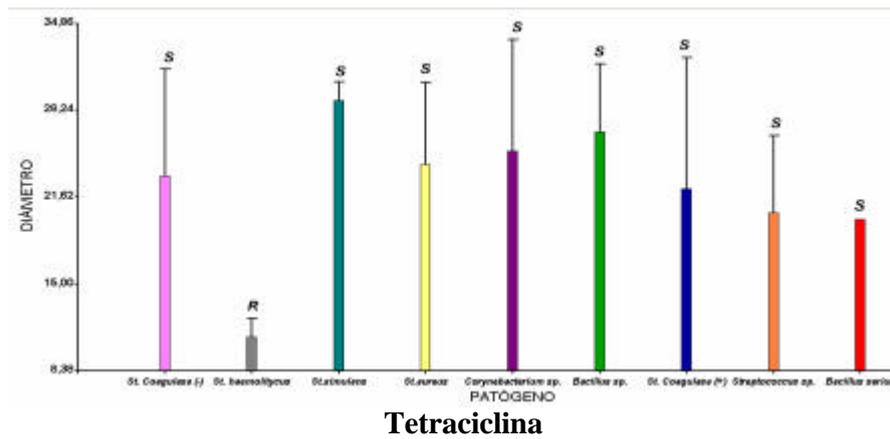
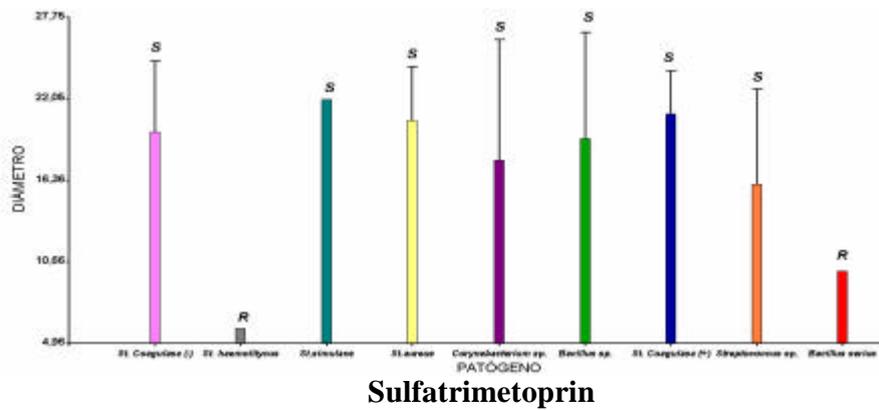
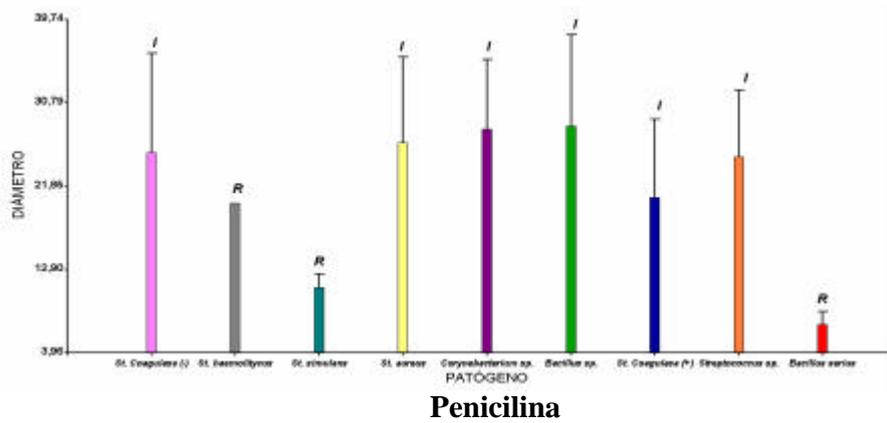


Figura 5.8. Sensibilidad de los patógenos Gram positivos frente a los antibióticos, Ecuador, 2008.

5.4.2. REACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS FRENTE A CADA PATÓGENO

Según el análisis estadístico se determinó que todos los tratamientos presentaron sensibilidad para *Aeromona cavia*, la Cloxacilina fue resistente para todas las bacterias Gram negativas a excepción de *Aeromona cavia* y *Shigella sp.* que presentaron sensibilidad; la estreptomicina es sensible para todas las bacterias a diferencia de *Shigella sp.* que es resistente a este antibiótico, Cephalexina es sensible para *Shigella s.* y *Aeromona cavia*, e intermedio para *Enterobacter sp.* y *Escherichia coli* mientras que para el resto de bacterias este antibiótico fue resistente. Enrofloxacin al igual que Tetraciclina son sensibles para todos los casos, Neomicina es resistente únicamente para *Escherichia coli* ya que para el resto de bacterias es sensible. Sulfatrimetoprin es intermedio para *Pseudomona fluorescens* y *Pseudomona sp.*, para el resto de bacterias es sensible (Figura 5.7).

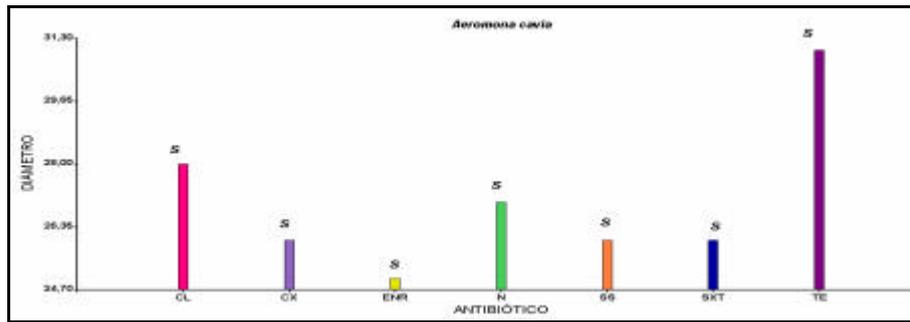
En el caso de las bacterias Gram positivas estas presentaron características de reacción similares frente a los siguientes antibióticos siendo todas las bacterias analizadas resistentes para Cloxacilina, en el caso de penicilina presentaron resistencia *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus simulans* y *Bacillus cereus*, para el resto de bacterias este antibiótico fue intermedio. Enrofloxacin y Tetraciclina fueron resistentes para *Staphylococcus haemolyticus* mientras que para el resto fueron sensibles. Amoxicilina+Ac.Clavulónico presentó resistencia para *Bacillus cereus*, para el resto de bacterias este antibiótico fue sensible. Cephalexina fue intermedio para *Staphylococcus haemolyticus*, fue resistente para *Bacillus cereus*, y para el resto de bacterias fue sensible.

Sulfatrimetoprin es resistente para *Bacillus cereus* y *Staphylococcus haemolyticus*, mientras que para el resto de bacterias es sensible (Figura 5.8).

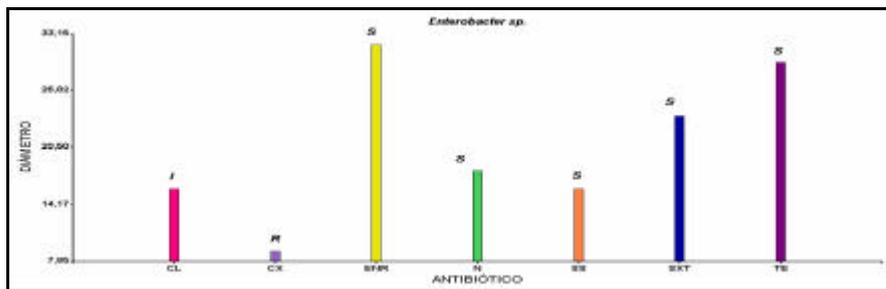
Las bacterias Gram positivas presentaron sensibilidad intermedia y resistencia en la mayoría de los casos para Penicilina, datos que concuerdan con Martin *et al.* (2002), quienes obtuvieron altos porcentajes de resistencia (>25%) para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus coagulasa negativo*; de manera similar sucede con López *et al.* (2006), donde de 17 aislamientos mostraron resistencia a Ampicilina (85%), Dicloxacilina y penicilina.

De las bacterias Gram positivas únicamente *Bacillus cereus* fue resistente a Amoxicilina+Ac.Clavulónico; discrepando con Martin *et al.* (2002), quienes obtuvieron altos porcentajes de resistencia (>25%) para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus coagulasa negativo*.

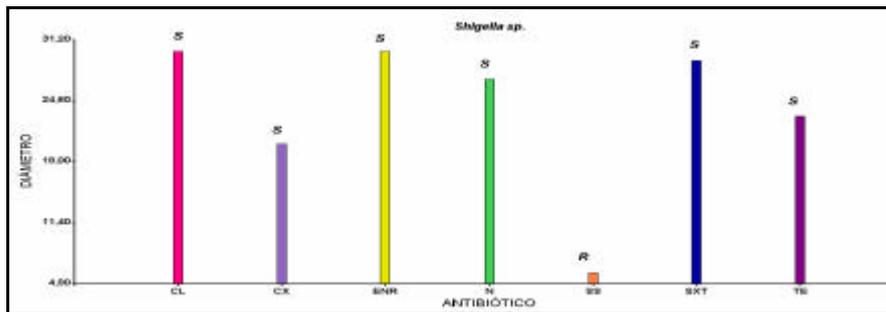
Únicamente *Staphylococcus haemolyticus* presentó resistencia a Tetraciclina, datos similares a los obtenidos por López *et al.* (2006), donde solo el 5% del aislamiento mostró resistencia a cefuroxima/lincomicina, eritromicina y tetraciclina.



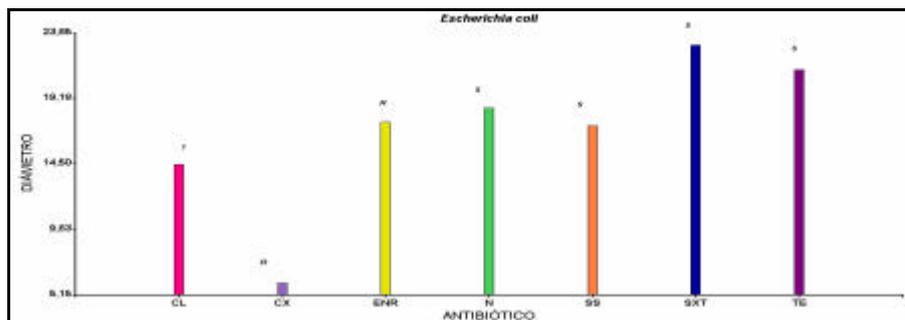
Aeromonas cavia



Enterobacter sp.

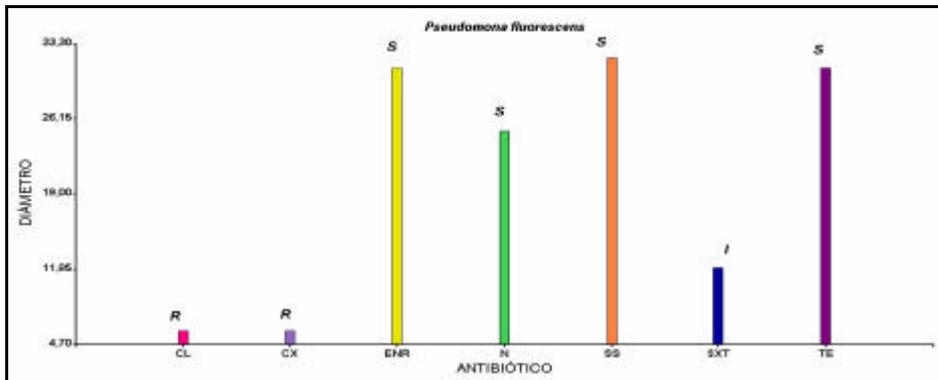


Shigella sp.

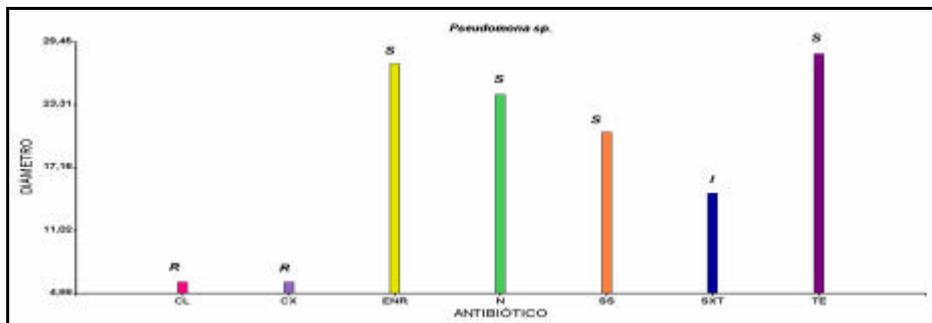


Escherichia coli

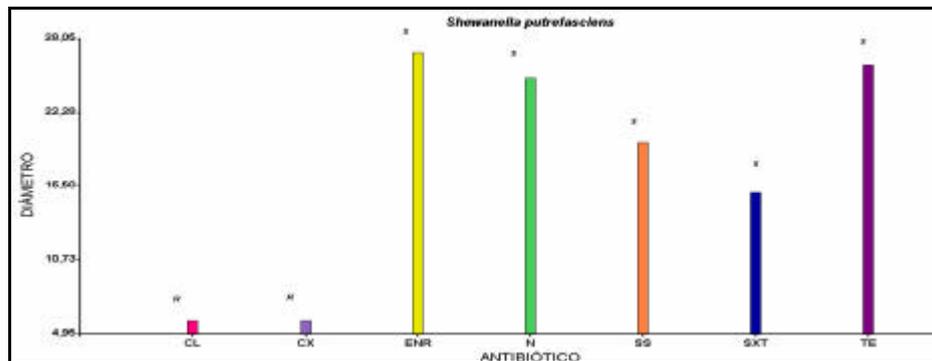
Figura 5.9. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram negativas, Ecuador, 2008.



Pseudomonas fluorescens

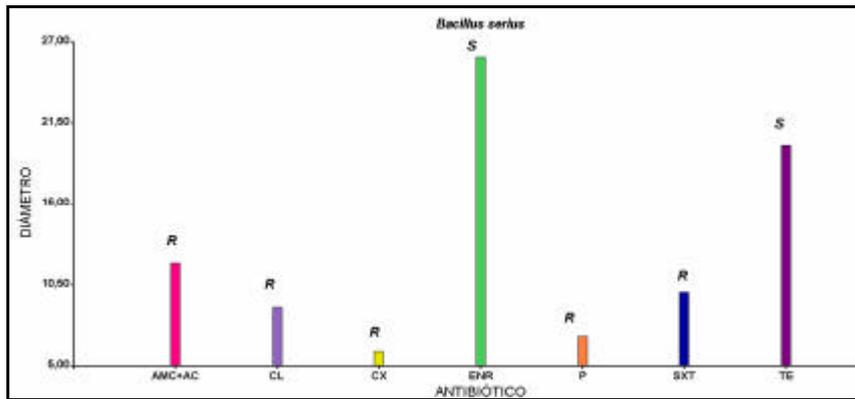


Pseudomonas sp.

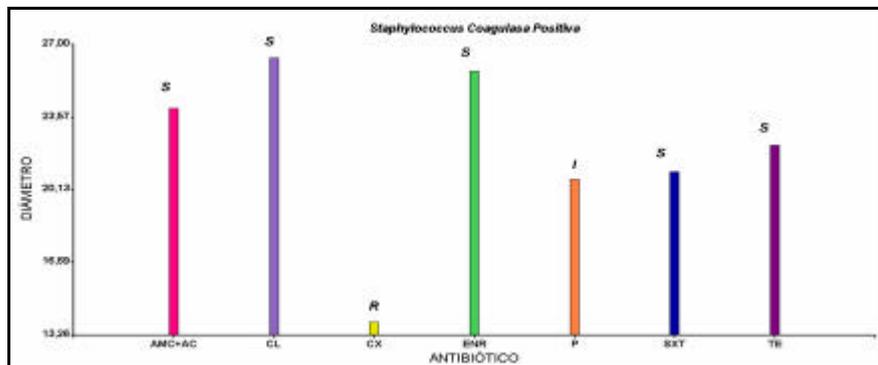


Shewanella putrefasciens

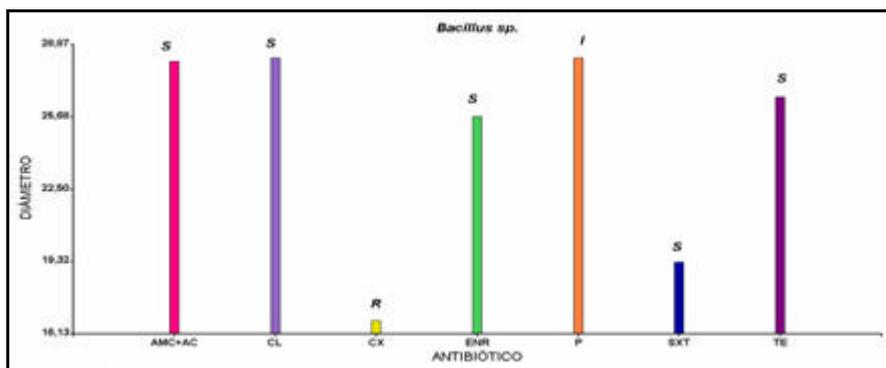
Figura 5.10. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram negativas, Ecuador, 2008.



Bacillus cereus

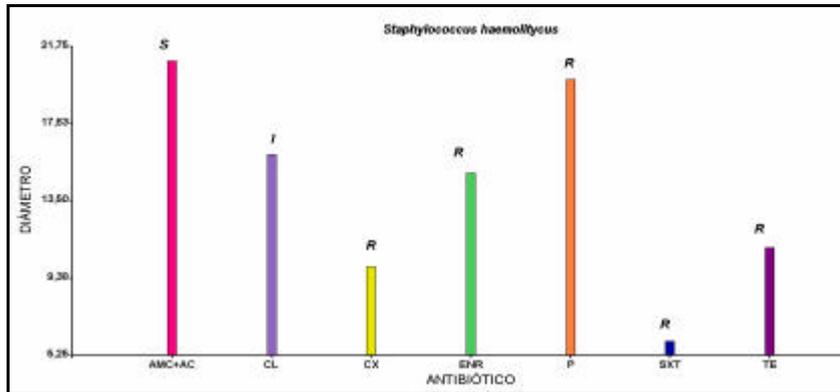


Staphylococcus Coagulasa Positiva

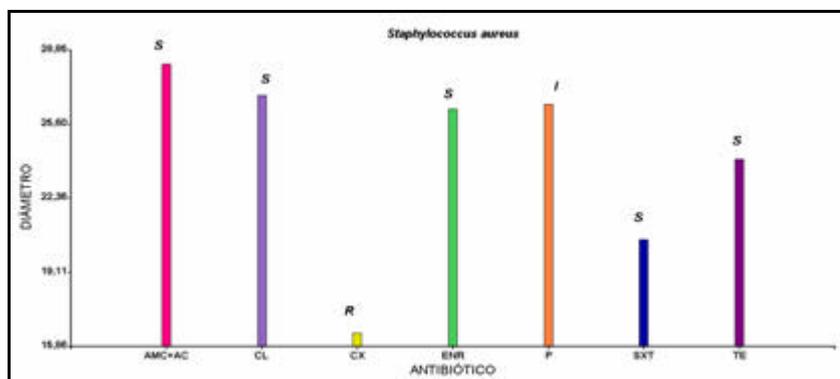


Bacillus sp.

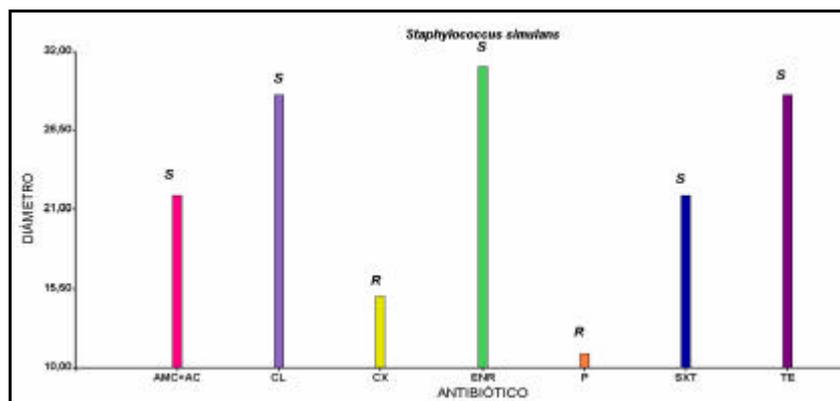
Figura 5.11. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram positivas, Ecuador, 2008.



Staphylococcus haemolyticus

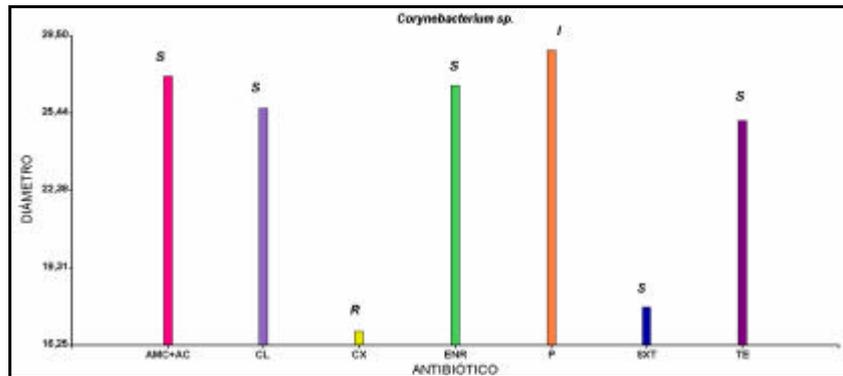


Staphylococcus aureus

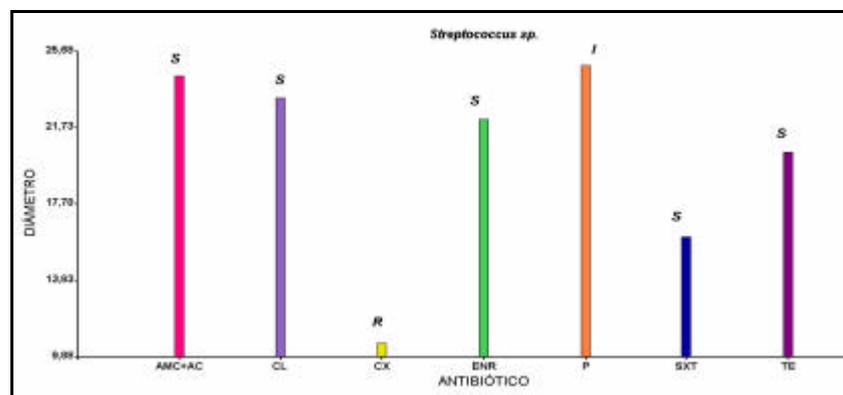


Staphylococcus simulans

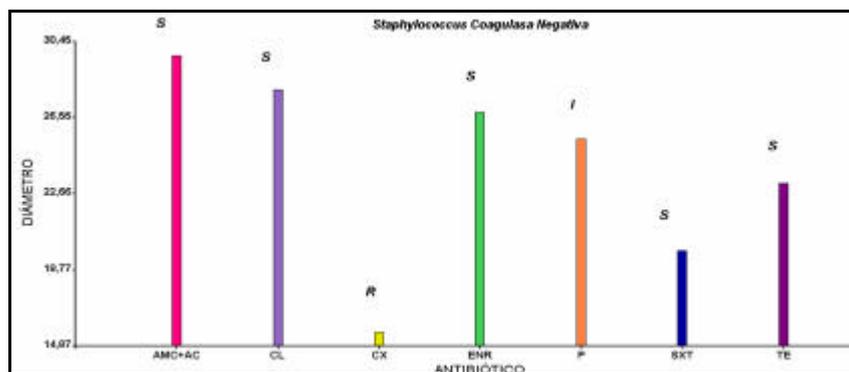
Figura 5.12. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram positivas, Ecuador, 2008.



Corynebacterium sp.



Streptococcus sp.



Staphylococcus Coagulasa Negativa

Figura 5.13. Eficiencia de los antibióticos frente a las bacterias Gram positivas, Ecuador, 2008.

5.4.3. DETERMINACIÓN DEL DIÁMETRO

Al analizar el diámetro de los halos se encontraron efectos e interacciones significativas para los antibióticos, patógenos, tipo de hacienda. En el caso de antibiótico vs. patógeno existe diferencia estadísticamente significativa ($F_{5,48}=1,43$; $p=0,0291$), esto se debe a que cada patógeno tiene una diferente reacción al ser tratado con distintos antibióticos (Cuadro 5.6).

En el análisis de las bacterias Gram negativas si existe diferencias significativas entre antibiótico vs. tipo de hacienda ($F_{6,12}=2,07$; $p<0,0277$), debido a que en cada hacienda los antibióticos se manejan de forma independiente; además la mastitis se presentó esporádicamente en todo tipo de hacienda, muchas veces sin importar el nivel tecnológico de las mismas, pues es necesario considerar otros factores que influyen en la presencia de mastitis en un hato. Para las demás fuentes de variación existieron diferencias significativas (Cuadro 5.6).

Cuadro 5.6. Análisis de varianza del diámetro de bacterias Gram positivas y Gram negativas, Ecuador, 2008.

Fuente de Variación	DIAMETRO (p-valor)	
	GRAM POSITIVAS	GRAM NEGATIVAS
Modelo	<0.0001	<0.0001
Antibiótico	<0.0001	<0.0001
Patógeno	<0.0001	<0.0001
Tipo de hacienda	0.0048	<0.0001
Antibiótico vs.Patógeno	0.0291	<0.0001
Antibiótico *Tipo de hacienda	0.0020	0.0277
Patógeno*Tipo de hacienda	0.0003	<0.0001
Antibiótico *Patógeno*Tipo de hacienda	<0.0001	<0.0001
CV%	27.65%	14.55%

Valores corresponden a la probabilidad asociada a cada fuente de variación.

Para este análisis se procedió a medir el diámetro del halo que presentó cada uno de los patógenos frente a los diferentes antibióticos, cabe recalcar que el diámetro de 6mm representa el diámetro del disco, en este caso se consideró como resistente. Para determinar la sensibilidad de los patógenos frente a los antibióticos es importante tomar en cuenta la concentración de cada uno de ellos. Este parámetro es necesario ya que la concentración de cada uno de los discos es diferente por lo tanto su interpretación es específica para cada uno.

Con respecto a los antibióticos utilizados para *Aeromona cavia* se determinó que TE mostró menor diámetro que ENR ya que son estadísticamente diferentes, de igual manera el diámetro del halo en bacterias Gram negativas se aprecia en el Cuadro 5.7.

Cuadro 5.7. Promedio \pm error estándar de las bacterias Gram negativas, Pichincha, Ecuador, 2008.

ANT.	<i>Aeromona Cavia</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Shigella sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomona fluorescens</i>	<i>Pseudomona sp.</i>	<i>Shewanella Putrefaciens</i>
CL	28 \pm 2 ab	16 \pm 5,8 ab	30 \pm 0 e	14,5 \pm 1 b	6 \pm 0 a	6 \pm 0 a	6 \pm 0 a
CX	26 \pm 0 ab	9 \pm 1,7 a	20 \pm 0 b	6 \pm 0 a	6 \pm 0 a	6 \pm 0 a	6 \pm 0 a
ENR	25 \pm 3 a	32 \pm 4,1 c	30 \pm 0 e	17,5 \pm 1 bc	31 \pm 1 d	27,3 \pm 0,7 d	27 \pm 3 D
N	27 \pm 1 ab	18 \pm 3,4 abc	27 \pm 1 d	18,5 \pm 1 cd	25 \pm 1 c	24,3 \pm 2,6 cd	25 \pm 3 Cd
SS	26 \pm 0 ab	16 \pm 6,3 ab	6 \pm 0 a	17,3 \pm 1,3 bc	32 \pm 0 d	20,7 \pm 2,2 c	20 \pm 0 Bc
SXT	26 \pm 0 ab	21 \pm 7 abc	29 \pm 1 de	23 \pm 2,4 e	12 \pm 2 b	14,7 \pm 0,4 b	16 \pm 0 B
TE	31 \pm 1 b	30 \pm 0,8 bc	23 \pm 1 c	21,3 \pm 0,5 de	31 \pm 1 d	28,3 \pm 0,8 d	26 \pm 0 D

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Con respecto a los antibióticos utilizados para *Staphylococcus aureus* se determinó que AMC+AC, CX, ENR, TE, son estadísticamente diferentes, el antibiótico que mostró mayor diámetro de halo fue ENR y el menor diámetro fue de CX, las interpretaciones de las otras bacterias se puede apreciar en el Cuadro 5.8.

Cuadro 5.8. Promedio \pm error estándar de las bacterias Gram positivas, Pichincha, Ecuador, 2008.

ANT.	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>St. Coagulasa -</i>
AMC+AC	12,0 \pm 0,0 c	28,1 \pm 2,3 b	28,3 \pm 0,7 e	26,9 \pm 1,0 b	29,7 \pm 1,1 e
CL	9,0 \pm 1,0 abc	28,3 \pm 1,0 b	26,9 \pm 0,4 de	25,6 \pm 0,9 b	28,0 \pm 0,9 de
CX	6,0 \pm 0,0 a	16,7 \pm 2,2 a	16,5 \pm 0,6 a	16,8 \pm 0,9 a	15,6 \pm 1,2 a
ENR	26,0 \pm 2,0 e	25,7 \pm 0,8 b	26,3 \pm 0,4 d	26,5 \pm 0,8 b	26,8 \pm 0,4 de
P	7,0 \pm 1,0 ab	28,3 \pm 2,6 b	26,5 \pm 0,9 d	27,9 \pm 0,9 b	25,5 \pm 1,7 cd
SXT	10,0 \pm 0,0 bc	19,3 \pm 2,0 a	20,6 \pm 0,4 b	17,8 \pm 1,1 a	19,8 \pm 0,8 b
TE	20,0 \pm 0,0 d	26,6 \pm 1,4 b	24,1 \pm 0,6 c	25,1 \pm 1,1 b	23,2 \pm 1,3 c

Con respecto a los antibióticos utilizados para *Streptococcus sp.* se determinó que CX, P, SXT, TE son estadísticamente diferentes, en este caso el antibiótico que mostró mayor diámetro de halo fue P y el menor diámetro fue SXT, las otras interpretaciones se pueden apreciar en el Cuadro 5.9.

Cuadro 5.9. Promedio \pm error estándar de las bacterias Gram positivas, Pichincha, Ecuador, 2008.

ANT.	<i>St.Coagulasa</i> +	<i>St. haemolyticus</i>	<i>St. simulans</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
AMC+AC	24 \pm 1,4 bc	21 \pm 1 d	22 \pm 0 c	24,4 \pm 0,7 de
CL	26,4 \pm 1,4 c	16 \pm 2 c	29 \pm 1 d	23,3 \pm 0,7 de
CX	13,9 \pm 1,7 a	10 \pm 0 b	15 \pm 1 b	10,6 \pm 0,7 a
ENR	25,8 \pm 1,6 bc	15 \pm 1 c	31 \pm 1 d	22,2 \pm 0,7 cd
P	20,6 \pm 2,1 b	20 \pm 0 d	11 \pm 1 a	25 \pm 1 e
SXT	21 \pm 0,8 b	6 \pm 0 a	22 \pm 0 c	16,1 \pm 1 b
TE	22,3 \pm 2,5 bc	11 \pm 1 b	29 \pm 1 d	20,5 \pm 0,8 c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En el caso de Sulfatrimetoprin presenta diferencias estadísticas entre *P. fluorescens* y *Shigella sp.* (Cuadro 5.10).

Cuadro 5.10. Promedio \pm error estándar de antibióticos usados para bacterias Gram negativas, Pichincha, Ecuador, 2008.

PATÓGENO	Cephalexina	Cloxacilina	Enrofloxacina	Neomicina	Estreptomycinina	Sulfatrimetoprin	Tetraciclina
<i>Aeromona cavia</i>	28,0 \pm 2,0 b	26,0 \pm 0,0 c	25,0 \pm 3,0 b	27,0 \pm 1,0 a	6,0 \pm 0,0 a	26,0 \pm 0,0 bc	31,0 \pm 1,0 bc
<i>Enterobacter sp.</i>	16,0 \pm 5,8 a	9,0 \pm 1,7 a	32,0 \pm 4,1 b	18,0 \pm 3,4 a	26,0 \pm 0,0 c	24,0 \pm 7,0 abc	30,0 \pm 0,8 bc
<i>Escherichia coli</i>	14,5 \pm 1,0 a	6,0 \pm 0,0 a	17,5 \pm 1,0 a	18,5 \pm 1,0 a	16,0 \pm 6,3 a	23,0 \pm 2,4 abc	21,3 \pm 0,5 a
<i>P. fluorescens</i>	6,0 \pm 0,0 a	6,0 \pm 0,0 a	31,0 \pm 1,0 b	25,0 \pm 1,0 a	17,3 \pm 1,3 b	12,0 \pm 2,0 a	31,0 \pm 1,0 c
<i>Pseudomona sp.</i>	6,0 \pm 0,0 a	6,0 \pm 0,0 a	27,3 \pm 0,7 b	24,3 \pm 2,6 a	32,0 \pm 0,0 c	14,7 \pm 0,4 ab	28,3 \pm 0,8 bc
<i>Shewanella putrefasciens</i>	6,0 \pm 0,0 a	6,0 \pm 0,0 a	27,0 \pm 3,0 b	25,0 \pm 3,0 a	20,7 \pm 2,2 c	16,0 \pm 0,0 abc	26,0 \pm 0,0 abc
<i>Shigella sp.</i>	30,0 \pm 0,0 b	20,0 \pm 0,0 b	30,0 \pm 0,0 b	27,0 \pm 1,0 a	20,0 \pm 0,0 bc	29,0 \pm 1,0 c	23,0 \pm 1,0 ab

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

AMC+AC.Clavulónico presenta diferencias significativas entre *Bacillus cereus*, *St. haemolyticus*, las interpretaciones de los otros antibióticos (Cuadro 5.11).

Cuadro 5.11. Promedio \pm error estándar de antibióticos usados para bacterias Gram positivas, Pichincha, Ecuador, 2008.

PATÓGENO	AMC+Ac, Clav,	Cephalexina	Cloxacilina	Enrofloxacina	Penicilina	SXT	Tetraciclina
<i>Bacillus cereus</i>	12,0 \pm 0,0 a	9,0 \pm 1,0 a	6,0 \pm 0,0 a	26,0 \pm 2,0 c	7,0 \pm 1,0 a	10,0 \pm 0,0 a	20,0 \pm 0,0 b
<i>Bacillus sp.</i>	28,1 \pm 2,3 d	28,3 \pm 1,0 d	16,7 \pm 2,2 d	25,7 \pm 0,8 c	28,3 \pm 2,6 c	19,3 \pm 2,0 bc	26,6 \pm 1,4 cd
<i>Corynebacterium sp.</i>	26,9 \pm 1,0 cd	25,6 \pm 0,9 cd	16,8 \pm 0,9 d	26,5 \pm 0,8 c	27,9 \pm 0,9 c	17,8 \pm 1,1 bc	25,1 \pm 1,1 bcd
<i>St. aureus</i>	28,3 \pm 0,7 d	26,9 \pm 0,4 cd	16,5 \pm 0,6 d	26,3 \pm 0,4 c	26,5 \pm 0,9 bc	20,6 \pm 0,4 bc	24,1 \pm 0,6 bcd
<i>St. Coagulasa (-)</i>	29,7 \pm 1,1 d	28,0 \pm 0,9 d	15,6 \pm 1,2 cd	26,8 \pm 0,4 c	25,5 \pm 1,7 bc	19,8 \pm 0,8 bc	23,2 \pm 0,3 bcd
<i>St. Coagulasa (+)</i>	24,0 \pm 1,4 bcd	26,4 \pm 1,4 cd	13,9 \pm 1,7 abcd	25,8 \pm 1,6 c	20,6 \pm 2,1 b	21,0 \pm 0,8 bc	22,3 \pm 2,5 bc
<i>St. simulans</i>	22,0 \pm 0,0 bc	16,0 \pm 2,0 b	10,0 \pm 0,0 ab	15,0 \pm 1,0 a	20,0 \pm 0,0 b	6,0 \pm 0,0 a	11,0 \pm 1,0 a
<i>St. haemolyticus</i>	21,0 \pm 1,0 b	29,0 \pm 1,0 d	15,0 \pm 1,0 bcd	31,0 \pm 1,0 d	11,0 \pm 1,0 a	22,0 \pm 0,0 c	29,0 \pm 1,0 d
<i>Streptococcus sp.</i>	24,4 \pm 0,7 bcd	23,3 \pm 0,7 c	10,6 \pm 0,7 abc	22,2 \pm 0,7 b	25,0 \pm 1,0 bc	16,1 \pm 1,0 b	20,5 \pm 0,8 b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

VI. CONCLUSIONES

El desconocimiento de las buenas prácticas durante el proceso de ordeño es un factor desfavorable que permite el desarrollo y proliferación de la mastitis.

El CMT es una prueba de campo de alta sensibilidad que ayuda a identificar a los animales enfermos, lo cual permite recoger muestras para ser analizadas en el laboratorio y de este modo se llega a identificar el agente causal de la enfermedad y el antimastítico más efectivo para un correcto tratamiento.

El grado de mastitis presente en los hatos no depende únicamente de las buenas prácticas de ordeño, así las haciendas de tipo B y D, presentan el mismo grado y de igual manera ocurre con las haciendas A y C; esto se debe a que la mastitis es una enfermedad multifactorial, por lo cual se toma en cuenta otros factores como: el ambiente, resistencia de antibióticos, nutrición, genética, detergentes utilizados, etc.

El mayor porcentaje de prevalencia de mastitis se presentó en la Hacienda San Juan a pesar de tener una calificación de tipo B; los posibles motivos fueron una carencia de tratamiento adecuado y oportuno, el uso indiscriminado de un mismo antibiótico y una mala aplicación de las prácticas de ordeño.

Las bacterias Gram positivas más representativas fueron: *Staphylococcus aureus* con el 34,64%, *Corynebacterium* con el 20,92% y *Streptococcus* con 16,34%. En las bacterias

Gram negativas se encontró el 92% de ausencia, lo cual indica que en nuestro medio éstas no inciden significativamente en el desarrollo de la enfermedad; así: *Pseudomonas sp.* corresponde al 2,13%, *Enterobacter* y *E. coli* representan el 1,42%.

Los antibióticos más eficientes para un correcto tratamiento contra bacterias Gram negativas fueron Tetraciclina, Enrofloxacin y Neomicina; ya que las bacterias presentan un elevado índice de sensibilidad. En el caso de las bacterias Gram positivas la mayoría de antibióticos ayudó eficientemente en el control de mastitis, principalmente Amoxicilina + Ácido Clavulónico, Enrofloxacin y Tetraciclina, a excepción de Cloxacilina que presentó resistencia para todos los casos.

La bacteria Gram negativa más sensible a los antibióticos utilizados fue *Aeromona cavia*; los demás patógenos Gram negativos mostraron sensibilidad a los antibióticos presentándose algunas excepciones: *Enterobacter sp.* fue resistente a CX e intermedia a CL; *Shigella sp.* fue resistente a SS; *Escherichia coli* fue resistente a CX y ENR e intermedio para CL; *Pseudomona fluorescens* y *Pseudomona sp.* presentaron resistencia a CL y CX, e intermedias a SXT; *Shewanella putrefasciens* presentó resistencia a CL y CX . En el caso *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa(+)*, *Staphylococcus coagulasa(-)*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium* y *Streptococcus sp.* presentaron características de reacciones similares, siendo resistentes para CX, intermedias para P y sensibles para los demás antibióticos. *Staphylococcus simulans* fue resistente a CX y P, mientras que *Bacillus cereus* presentó sensibilidad únicamente para ENR y TE. *Staphylococcus haemolyticus* fue sensible a AMC+AC.

VII. RECOMENDACIONES

Es necesario fomentar el buen manejo del hato durante el proceso de ordeño, en el caso de una alta prevalencia de mastitis es importante incentivar al ganadero para que los animales no útiles para la explotación lechera, sean descartados y así evitar el contagio al resto del hato.

Se recomienda realizar la prueba de CMT mensualmente ya que esta contribuye a tener un manejo adecuado de mastitis y un mayor control sobre el hato, evitando grandes pérdidas económicas. Por el mismo hecho de ser una prueba de campo ayuda a un diagnóstico oportuno para tomar medidas necesarias para su control.

Para la toma de muestras es importante capacitar a las personas encargadas del ordeño para un correcto procedimiento de las mismas y de esta manera evitar falsos positivos al momento del análisis.

Se recomienda que todos los hatos ganaderos trabajen conjuntamente con laboratorios bacteriológicos propios o particulares; esto permitirá realizar un tratamiento eficiente con el antibiótico más oportuno de acuerdo al patógeno encontrado como causante de la infección.

Se debe evitar el uso indiscriminado de un mismo antibiótico en el hato, pues este procedimiento provoca que las vacas presenten resistencia a dicho tratamiento.

VII. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes causales de mastitis y determinar la sensibilidad de los patógenos en las muestras frente a los diferentes antibióticos utilizados. Para lo cual se recolectaron muestras de leche en 20 haciendas ubicadas en la provincia de Pichincha, a una altura de 600 a 3.087 m.s.n.m con una temperatura promedio de 16.35 ° C; se recogieron muestras de leche con mastitis clínica y muestras con mastitis subclínica a partir de grado dos, empleando para ello la prueba de CMT (California Mastitis Test). La fase de laboratorio se llevó a cabo en los Laboratorios Veterinarios del Instituto Nacional de Higiene, ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Guamaní; a 12.5 Km. de la Panamericana Sur, entrada al Beaterio. En el mismo que fueron sembradas las muestras de leche en agar sangre y MacConkey e incubadas por 24 horas a 37°C. Posterior a su crecimiento se realizó: la coloración Gram; pruebas bioquímicas de catalasa, coagulasa y manitol para identificar bacterias Gram-positivas y pruebas bioquímicas con citrato de Simmons, TSI, urea, indol, Rojo de Metilo - Voges-Proskauer (RM-VP), Lysine iron agar (LIA) para identificar bacterias Gram-negativas. Las pruebas bioquímicas permitieron una clara identificación del patógeno, siendo cada colonia una unidad experimental. Para determinar el antibiótico más eficiente se midió la longitud del halo en milímetros con dos repeticiones y siete antibióticos. La información se analizó con estadística descriptiva (promedio, error estándar y coeficiente de variación) y diferentes técnicas gráficas; se realizó también un análisis de varianza en arreglo factorial. Además se realizaron pruebas de comparación de media de Duncan al 5%. Una vez identificadas las colonias se procedió a realizar su respectivo antibiograma,

para lo cual se utilizó diferentes sensidiscos de acuerdo a su clasificación, los sensidiscos a utilizarse fueron: Neomicina y Estreptomina para bacterias negativas, Amoxicilina+Ac.clavulónico y Penicilina para bacterias positivas; además de Cephalexina, Cloxacilina, Sulfatrimetoprin, Tetraciclina y Enrofloxacin los cuales son utilizados para las dos clases. Mediante los resultados de la presente investigación se determinó que el mayor porcentaje de prevalencia de mastitis se presentó en la Hacienda San Juan con el 44,68%. Las bacterias Gram positivas más representativas fueron: *Staphylococcus aureus* con el 34,64%, *Corynebacterium* con el 20,92% y *Streptococcus* con 16,34%. Las bacterias Gram negativas más representativas fueron: *Pseudomonas sp.* con el 2,13%, *Enterobacter* y *E. coli* representando el 1,42%. Los antibióticos más eficientes para un correcto tratamiento de bacterias Gram negativas fueron Tetraciclina y Neomicina; en el caso de las bacterias Gram positivas la mayoría de antibióticos podrán ayudar eficientemente en el control, a excepción de Cloxacilina que fue resistente para todas las bacterias, en cuanto a Penicilina las bacterias presentan sensibilidad intermedia y resistencia.

XI. ABSTRACT

The objective of this document was to separate and to identify the causes of mastitis and to determine the pathogens' sensitivity in the samples against the different antibiotics used. For this purpose, milk samples were collected in 20 properties located in the province of Pichincha, at a height of 600 to 3.087 m.s.n.m with an average temperature of 16,35 °C; samples of milk with clinical mastitis were taken and samples with subclinical mastitis from degree two, test CMT (Californian Mastitis Test) was used. The laboratory phase was carried out in the Veterinary Laboratories from the National Institute of Hygiene, located in the province of Pichincha, Quito, Guamaní parish; at a distance of 12,5 km. from the Panamericana highway, by the Beaterio convent. In this laboratory milk samples were seeded in agar blood and MacConkey and incubated for 24 hours at 37°C. Additionally to this, the Gram coloration; biochemical tests of catalasa, coagulasa and manitol to identify Gram-positive bacteria and biochemical tests with citrato of Simmons, TSI, urea, indol, Red of Methyl - Voges-Proskauer (RM-VP), Lysine iron to identify Gram-negative bacteria were performed. The biochemical tests showed a clear identification of the pathogen, being each colony an experimental unit. In order to determine the most efficient antibiotic the length of haul was measured in millimetres with two repetitions and seven antibiotics. The information was analyzed with descriptive statistics (average, standard error and variation coefficient) and different graphical techniques; a variance analysis was also made in factorial adjustment. Duncan average comparison tests were made to 5%. Once the colonies were identified, the corresponding antibiograma was made, for which different

sensidiscos were used according to their characteristics, the sensidiscos used were: Neomicina and Estreptomina for negative bacteria, Amoxicilina+Ac.clavulónico and Penicilina for positive bacteria; in addition to Cephalexina, Cloxacilina, Sulfatrimetoprin, Tetraciclina and Enrofloxacina which were used on both types. By means of the present results taken from the present investigation, it was determined that the greater percentage of prevalence of mastitis appeared in the San Juan Property with 44.68%. The more representative positive Gram bacteria were: *Staphylococcus aureus* with 34.64%, *Corynebacterium* with 20.92% and *Streptococcus* with 16.34%. The most representative negative Gram bacteria was: *Pseudomonas sp.* with 2.13%, *Enterobacter* and *E. coli* representing 1.42%. The most efficient antibiotics for a correct treatment of negative Gram bacteria were Tetraciclina and Neomicina; in the case of the positive Gram bacteria most antibiotics would efficiently control, with the exception of Cloxacilina that was resistant for all the bacteria, regarding to Penicillin the bacteria presented intermediate sensitivity and resistance.

X. BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.; Moss, M. 2005. Food Microbiology. University of Surrey, Guildford, UK. p. 187 – 253.
- BBL (Baltimore Biological Laboratory). 1974. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. Edt. Rohde, P. México.
- Clavell, L.; Castro, N.; Gutiérrez, S. 1999. Selección De Pruebas Bioquímicas para la identificación de microorganismos. Venezuela. p. 4-6
- Cotrino, B. 2006. Diagnóstico de Mastitis. Aislamiento de Microorganismos. National Mastitis Council USA. p. 54-62.
- DBL. 2005. Diagnostic Bovine Laboratory. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows. USA. P. 301-305.
- Benzon, D.; Henderson, A.; Rodostits, O.1994. Medicina Veterinaria. 5a. Ed. México. Interamericana McGraw-Hill. p. 83-92.
- Degraes, F.; Fetrow, J. 1993. Economics of mastitis and mastitis control. Veterinarian Clinic North America. Estados Unidos. Tomo 9, p. 421-434.

- Hogan, J.; Gonzalez, R; Harmon, R; Nickerson, S.; Oliver S.; Pankey, J.; Smith, K. 1999. Laboratory Handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council. Estados Unidos. p. 34-89.
- Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Inquieta Pérez”. 2003. Protocolos Del Laboratorio de Microbiología. 1ra versión.
- Kleinschroth *et al.*1991. La Mastitis. Laboratory Handbook on bovine mastitis. Estados Unidos. p. 72 – 104.
- Kirk, J.; Barlett, P. 1984. Mastitis in a Hariana cow- A case report. Indian. p. 58-76.
- Marshall, R.; Edmondson, J. 2005. Department of Food Science and Nutrition. Venezuela. p. 103-184.
- Mateos, P. 2004. Bacteriología y Virología Veterinaria. 5ª ed. España. p. 958
- Neave, F.; Dodd, F.; Kinwill, R.; Westgarth, D. 1969. Control of mastitis in dairy herd by hygiene and management. Estados Unidos. p. 696-707.
- Pankey, W.; Eberhart, H.; Cming, L.; Daggett, D.; Farsworth, J.; McDuff, K. 1984. Uptake on postmilking teat antiseptics. Canada .p.1336- 1353.

- Pedraza, C. 1991. Efecto de la mastitis clínica sobre la producción de leche. Agricultura técnica. Chile. Tomo 51, p. 298-305.
- Pérez, C.; Vásquez, D.; 1987. Procedimientos para laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. México. p. 27- 35
- Rothbaver, D.; Buchner, E, Well sj. 1988. Effect of vaccination with *E. coli* on the incidence of acute mastitis. p. 23:112-115.
- Zia, S.; Giri, N.; Cullor, J.; Emau, P.; Osburn, I.; Bushnell, R. 1987. Role of eicosanoids, histamine, and serotonin in the pathogenesis induced bovine mastitis. p.1617-1624.

XI. WEBGRAFIA

- Acebo M., 2006. Mastitis afecta a la producción y calidad de leche. (en línea). Intervet Ecuador S.A. Consultado 12 oct 2007. Disponible en http://www.intervet.com.ec/Binaries/63_74032.doc
- Avila T., S.; Gutiérrez C., A. Mastitis. 2004. Universidad Nacional Autónoma. (en línea).México. Consultado 8 sep 2007. Disponible en: <http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/24jul04/Mastitis%20en%20Ganado%20Bovino.doc>
- Agrobit Gestión Agropecuaria. 2004. Mastitis: Enfermedad y Transmisión. (en línea). Córdoba - Argentina. Consultado 9 mar. 2007. Disponible en http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009en.htm
- Cano, C. 2006. Nuevas alternativas en el diagnostico clínico de campo y en el tratamiento de mastitis. Boletín Técnico Virtual. (en línea). México. Consultado 9 mar. 2007. Disponible en www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCliC004.htm
- Correa, J. 2005. Código de buenas practicas de producción de leche de Colombia. (en línea).Colombia. Consultado 19 may. 2007. Disponible en hjcc_unal@hotmail.com.

- Cortés, D. 2001. Pruebas Bioquímicas de Identificación. (en línea). Consultado 19 jun. 2007. Disponible en <http://coli.usal.es/web/identificacion/AyudaPruebas.html>
- Díaz, R. 2006. Especialista de la Dirección Especialista de la Dirección de Crianzas. (en línea). Perú. Consultado 2 jun 2007. Disponible en: <http://www.portalagrario.gob.pe/dgpa1/ARCHIVOS/BPOrdeno.pdf>
- Faddin, J. 2007. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (en línea). Consultado 2 jun 2007. Disponible en <http://www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/index.htm>
- Gianini, J. 1952. Teoría de la Tinción Gram. Consultado 2 oct 2007. Disponible en www.microbelibrary.org/ASMOOnly/details.asp?id=1095&Lang=Spanish
- Jaramillo, M. 2007 .CODEGAR LTDA. Patógenos de la mastitis. (en línea). Consultado 12 jul 2007. Disponible en: http://www.codegar.com/index.php?option=com_content&task=view&id=38&Itemid=9
- Kirk, J. 1984. Nonclinical mastitis in a dairy herd. (en línea). Consultado 2 jul 2007. Disponible en <http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/24jul04/Mastitis%20en%20Ganado%20Bovino.doc>

- Kisser, A. 2007. Bacteriología. (en línea). Consultado 2 jun 2007. Disponible en: pathmicro.med.sc.edu/Spanish/chapter12.htm
- Kohard, L. 2004. History of the Gram Stain and How it Works. (en línea). Consultado 2 may 2007. Disponible en http://www.uphs.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/gram.htm
- Las Heras, A.; López, I.; Legaz, E.; Domínguez, L.; Fernández-Garayzábal, J. 2001. Pseudomonas aeruginosa: necesidad del diagnóstico. Universidad Complutense y Castellana de Ganaderos Sociedad Cooperativa. Madrid -España. (en línea). Consultado 27 feb 2007. Disponible en <http://www.e-campo.com/?event=news.print&id=8732F2CF-5904-4E9B-919BBB7FA43BB444&>
- López, J.; Higuera, J.; Ocho, A.; Chassin, O.; Valdez, J.; Bravo, A.; Baizabal, V. 2006. Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus spp.* asociados a mastitis bovina en Tarimbaro, Michoacán. Universidad Autónoma del Estado de México. (en línea). Consultado 29 jun 2007. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/613/61344108.pdf>.
- Mayberry, W. 2002. Coloración Gram. East Tennessee State University USA. (en línea). Consultado 2 oct 2007. Disponible en www.microbelibrary.org/ASMOOnly/details.asp?id=1095&Lang=Spanish

- Mellenberger, R; Roth, C. 2000. Dpto. de Ciencia Animal, Universidad del Estado de Michigan y Universidad de Wisconsin-Mádison. (en línea). Consultado 19 ago 2007. Disponible en <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/CMT%20spanish.pdf>.
- Pedrique, M. 2002. Determinación De La Sensibilidad De Las Bacterias A Los Antibioticos –Antibiograma. (en línea). Consultado 19 ago 2007. Disponible en www.ucv.ve/Farmacia/Micro_web/Catedras02/antibiog.pdf+procedimiento%2Bantibiograma&hl=es&ct=clnk&cd=1&gl=ec&lr=lang_es
- Pinzón, J. 1989. Mastitis Bovina I. Tipos, Agentes causales y Diagnósticos. (en línea). Consultado 7 may 2007. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd31/texto/mastitis.htm>
- Revista Veterinaria. 2006. Patógenos más comunes en la mastitis Bovina. . (en línea). Consultado 12 feb 2008. Disponible en www.infocarne.com
- San Martin, B.; Kruze, J.; Morales, M.A.; Agüero, H.; León, B.; Espinoza, S.; Iragüen, D.; Puga, J.; Borie, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. Universidad Austral de Chile. (en línea). Chile. Consultado 10 sep 2007. Disponible en <http://www.scielo.cl>.

- Stearn y Stearn. 1923. Teoría de la Tinción Gram. (en línea). Consultado 2 oct 2007.
Disponible en www.microbelibrary.org/ASMOOnly/details.asp?id=1095&Lang=Spanish
- Val, D., 2005. Presentación de la coloración Gram (en línea). Consultado 21 sep 2007.
Disponible en
<http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioTinciones.htm>
- Varela, B., 2002. Clasificación de la mastitis. (en línea). Consultado 2 oct 2007.
Disponible en
http://www.mastitis.com.ar/view_nota.php?id_nota=773&id_etapa=6&id_tema=86
- Vet-Uy laboratorio. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2004. Obtención de muestras para laboratorios de bacteriología. (en línea). Consultado 21 sep 2007.
Disponible en
<http://www.vet-uy.com/laboratorio/articulos/001/001.htm>
- Winterhalter, E. 2005. Rutina de Ordeño. (en línea). Uruguay. Consultado 2 abr 2007.
Disponible en <http://www.nuestroagro.com.ar/info/tematicas/tematicas.asp?id=409>

Anexo 2. Parámetros de calificación de las haciendas durante el proceso de ordeño

Hacienda Cadet

		Fecha	
		07/05/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,45
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,50
	Despunte	2	1,00
	Lavado de pezones	1	1,00
	Secado de ubres	2	2,00
	Ordeño	1	0,63
	Sellado	1,5	1,29
	Ambiente de ordeño	0,5	0,50
	Personal de ordeño	1,5	0,75
Manejo de leche ordeñada		4	0,73
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,20
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,57
VALOR		20	12,61

Hacienda "El Molino"

		Fecha	
		25/05/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,25
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	0
	Lavado de pezones	1	0,67
	Secado de ubres	2	0,86
	Ordeño	1	0,67
	Sellado	1,5	1,29
	Ambiente de ordeño	0,5	0,5
	Personal de ordeño	1,5	1,5
Manejo de leche ordeñada		4	4
Limpieza y desinfección del equipo		2	2
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,8
VALOR		20	15,03

Hacienda “San Luis Igtipungo”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	1,5
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1
	Lavado de pezones	1	0,8
	Secado de ubres	2	1
	Ordeño	1	1,5
	Sellado	1,5	1
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,5
Manejo de leche ordeñada		4	3
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,68
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	13,38

Hacienda “San Juan Escalera”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	0.66
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1
	Lavado de pezones	1	0,8
	Secado de ubres	2	1,34
	Ordeño	1	0,8
	Sellado	1,5	1
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,5
Manejo de leche ordeñada		4	3
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,68
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	11,52

Hacienda “Aychapicho”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	0.66
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1
	Lavado de pezones	1	0,8
	Secado de ubres	2	1,34
	Ordeño	1	0,6
	Sellado	1,5	1,2
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,5
Manejo de leche ordeñada		4	3
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,68
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	11,52

Hacienda “Sigsicunga”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	0.66
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1,5
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1,5
	Ordeño	1	0,8
	Sellado	1,5	1
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,3
Manejo de leche ordeñada		4	3,22
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,68
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	12,4

Hacienda “Gamboa”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	1
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1,5
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1
	Ordeño	1	0,8
	Sellado	1,5	1
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,3
Manejo de leche ordeñada		4	3
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,5
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	12,5

Hacienda “Santa Teresita”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,6
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1,85
	Lavado de pezones	1	0,09
	Secado de ubres	2	1,3
	Ordeño	1	0,7
	Sellado	1,5	1,3
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,3
Manejo de leche ordeñada		4	3
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,5
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	14,04

Hacienda “Maria Isabel”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	1,5
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1,95
	Lavado de pezones	1	0,09
	Secado de ubres	2	1,3
	Ordeño	1	1
	Sellado	1,5	1,2
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,3
Manejo de leche ordeñada		4	3
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,2
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	12,94

Hacienda “San Francisco”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	1,5
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1,3
	Ordeño	1	1
	Sellado	1,5	1
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,22
Manejo de leche ordeñada		4	3
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,46
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	12,88

Hacienda “El Consuelo”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,5
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	2
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1,3
	Ordeño	1	1
	Sellado	1,5	1,3
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,2
Manejo de leche ordeñada		4	2,8
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,5
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,8
VALOR		20	15,1

Hacienda “Particular”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	1,8
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	2
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1
	Ordeño	1	0,7
	Sellado	1,5	0,89
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,2
Manejo de leche ordeñada		4	2,8
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,5
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,8
VALOR		20	13,39

Hacienda “Los Cedros”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	1,8
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	2
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1
	Ordeño	1	0,7
	Sellado	1,5	0,89
	Ambiente de ordeño	0,5	0,2
	Personal de ordeño	1,5	0,2
Manejo de leche ordeñada		4	2,8
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,55
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,8
VALOR		20	13,44

Hacienda “Gitanilla”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	3
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	2
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1
	Ordeño	1	1
	Sellado	1,5	0,89
	Ambiente de ordeño	0,5	0,22
	Personal de ordeño	1,5	0,2
Manejo de leche ordeñada		4	3,8
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,55
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	1
VALOR		20	16,16

Hacienda “Relicario”

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	3
	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	2
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	1,48
	Ordeño	1	1
	Sellado	1,5	1,5
	Ambiente de ordeño	0,5	0,5
	BPO'S Personal de ordeño	1,5	1,5
Manejo de leche ordeñada		4	4
Limpieza y desinfección del equipo		2	2
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	1
VALOR		20	19,48

Hacienda “El Prado”

		Fecha	
		04/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,45
	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	2
	Ordeño	1	0,67
	Sellado	1,5	1,29
	Ambiente de ordeño	0,5	0,5
	BPO'S Personal de ordeño	1,5	1
Manejo de leche ordeñada		4	0,73
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,64
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,67
VALOR		20	13,44

Hacienda "Miraflores"

		Fecha	
		04/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,7
	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	0,8571429
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	2
	Ordeño	1	0,7142857
	Sellado	1,5	1,5
	Ambiente de ordeño	0,5	0,5
	BPO'S Personal de ordeño	1,5	0,75
Manejo de leche ordeñada		4	4
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,8
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,8
VALOR		20	17,12143

Hacienda "San Juan"

		Fecha	
		07/06/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,5
	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1,2
	Lavado de pezones	1	0,8
	Secado de ubres	2	1,2
	Ordeño	1	0,8
	Sellado	1,5	1,5
	Ambiente de ordeño	0,5	0,5
	BPO'S Personal de ordeño	1,5	0,8
Manejo de leche ordeñada		4	4
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,8
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	16,2

Hacienda “San Carlos Chaupi”

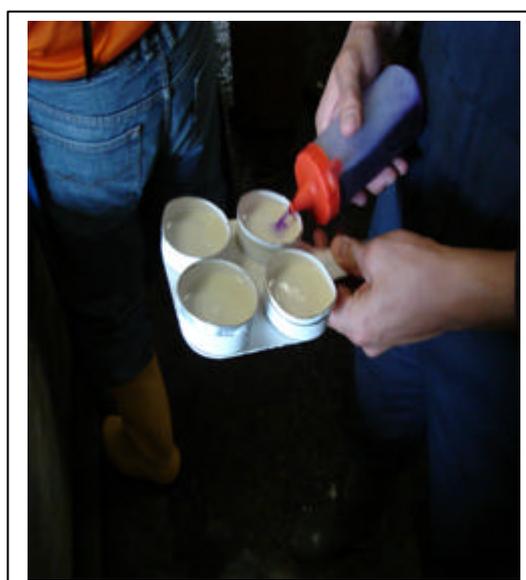
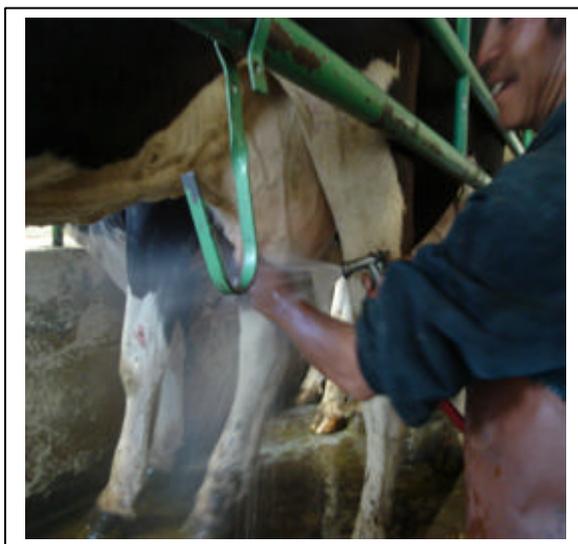
		Fecha	
		14/05/2007	
Higiene de instalaciones y equipos		3	1,7
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1
	Lavado de pezones	1	0,8
	Secado de ubres	2	1
	Ordeño	1	0,7
	Sellado	1,5	1,1
	Ambiente de ordeño	0,5	0,5
	Personal de ordeño	1,5	0,8
Manejo de leche ordeñada		4	2,7
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,5
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,7
VALOR		20	12,9

Hacienda “San Carlos”

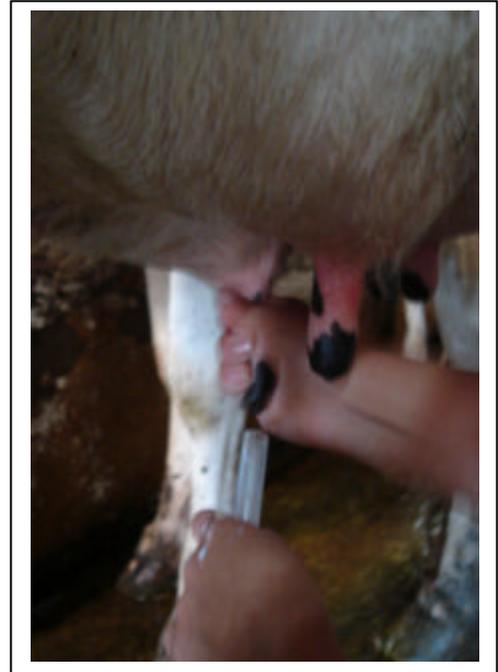
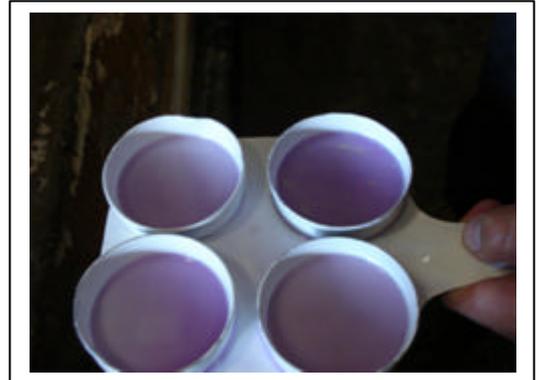
		Fecha	
		39231	
Higiene de instalaciones y equipos		3	2,25
BPO'S	Maltratan a las vacas	0,5	0,5
	Despunte	2	1,5
	Lavado de pezones	1	1
	Secado de ubres	2	2
	Ordeño	1	0,6666667
	Sellado	1,5	1,5
	Ambiente de ordeño	0,5	0,5
	Personal de ordeño	1,5	1
Manejo de leche ordeñada		4	4
Limpieza y desinfección del equipo		2	1,6363636
Limpieza y desinfección sala ordeño		1	0,8
VALOR		20	17,35303

Anexos 3. Fotografías

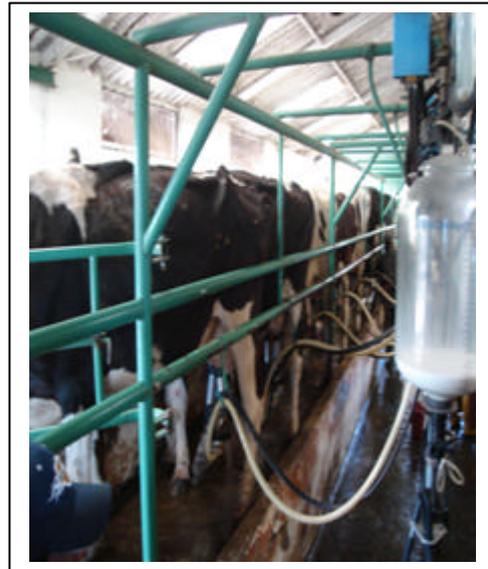
Anexo 3.1: Toma de Muestras



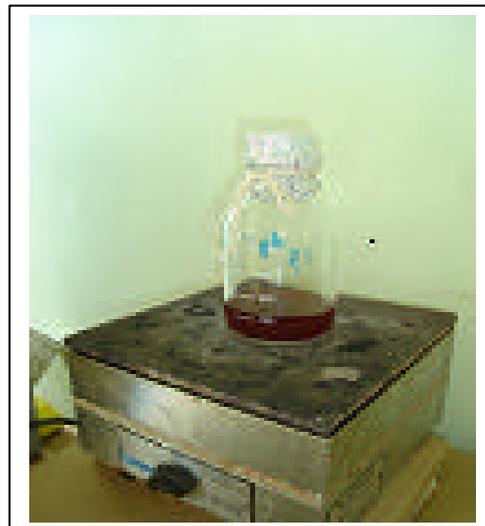
Anexo 3.2: Prueba de CMT



Anexos 3.3: Actividades de Ordeño



Anexo 3.4: Preparación de medios



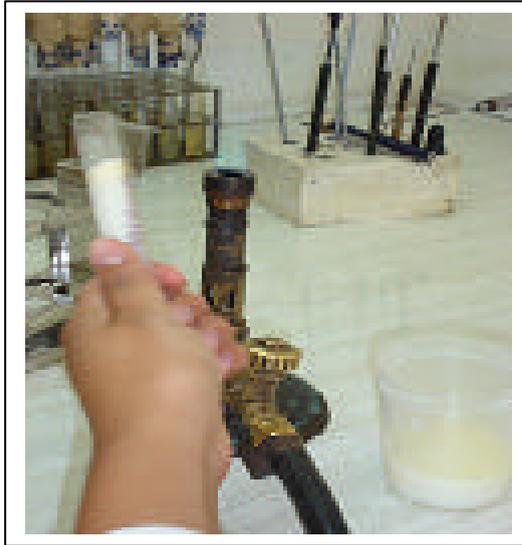
Anexos 3.5: Preparación Agar Sangre



Anexo 3.6: Procedimiento de las muestras en el laboratorio

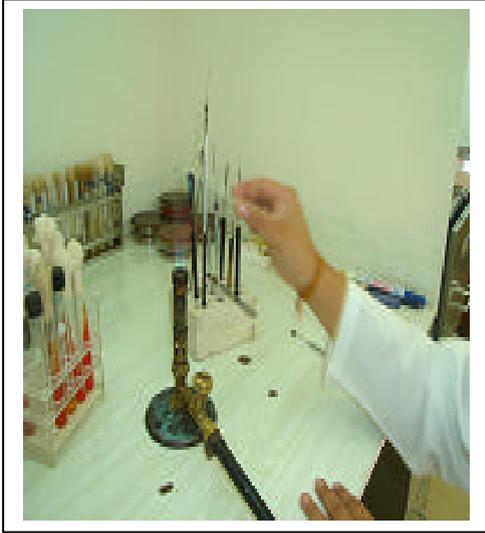


Anexo 3.7: Siembra de Muestras

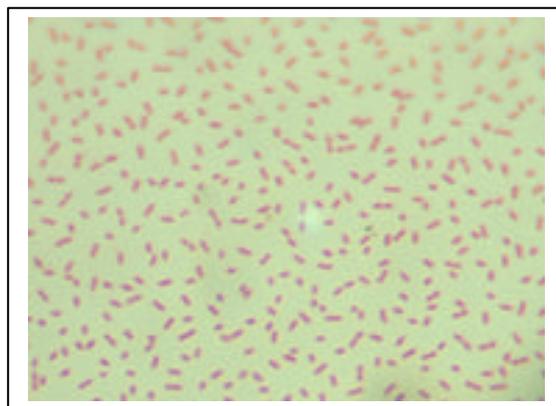
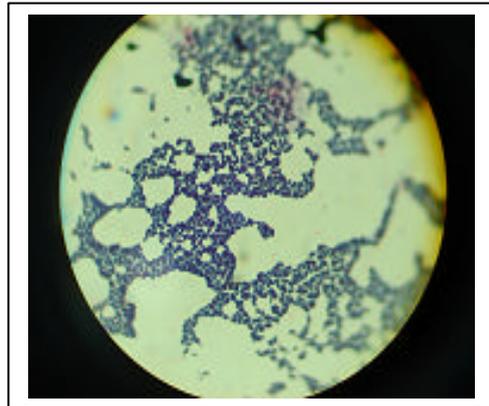
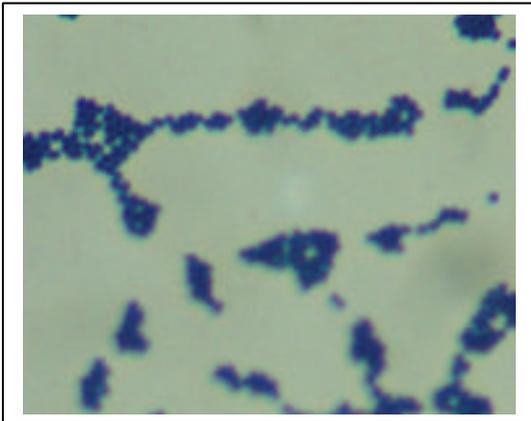
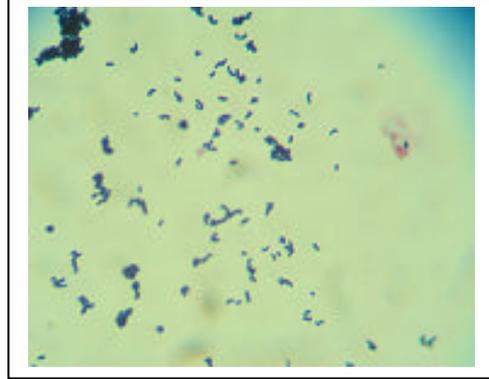
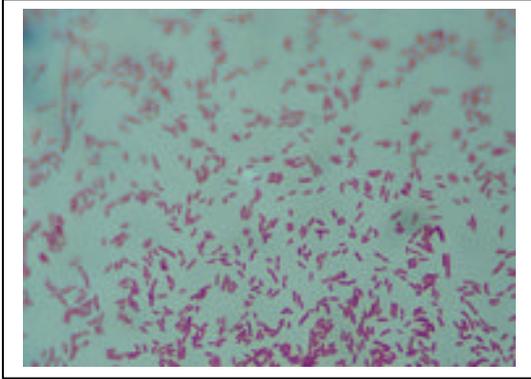




Anexo 3.8: Coloración de Placas

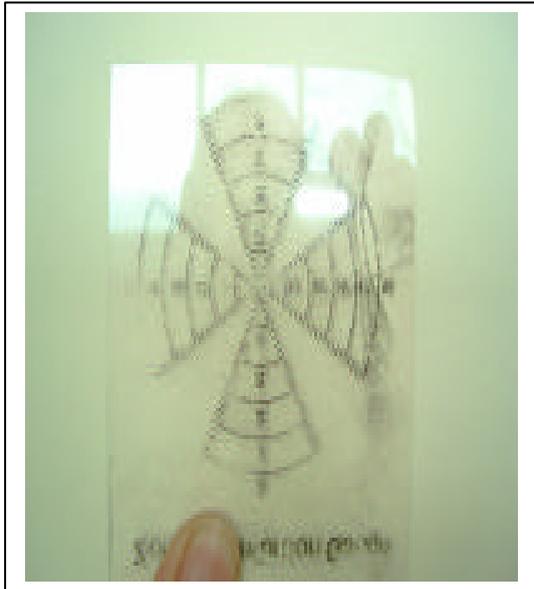


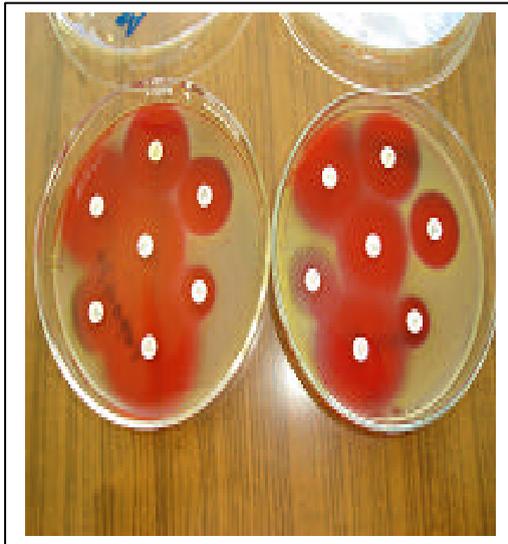
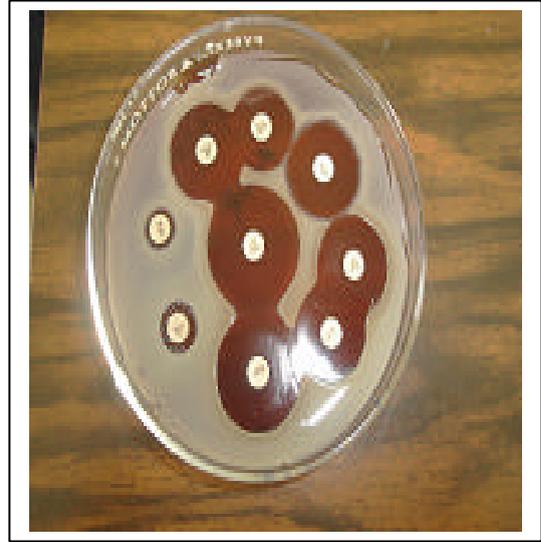
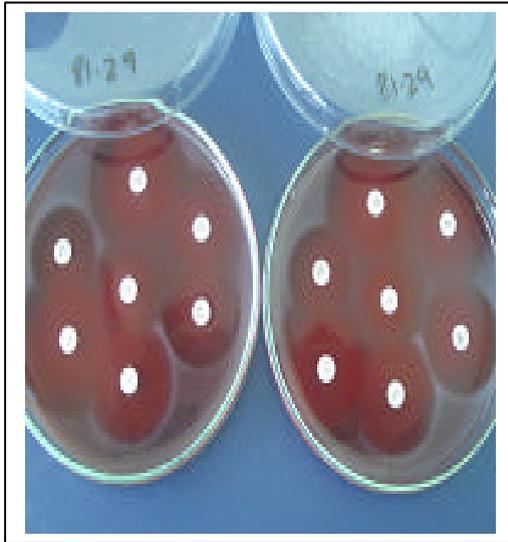
Anexo 3.9: Identificación de placas en el Microscopio



Anexo 3.10: Antibiogramas







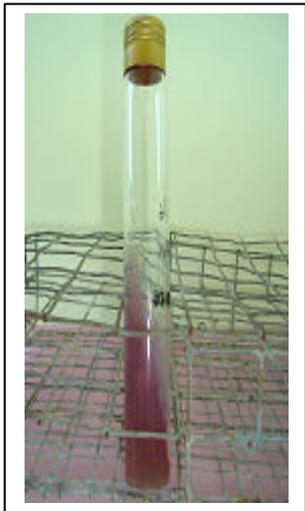
Anexo 3.11: Conservación de bacterias



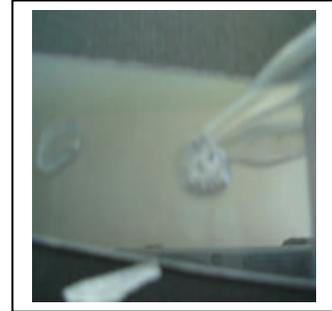
Anexo 3.12: Pruebas Bioquímicas Gram Negativas



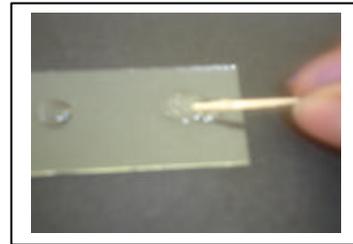
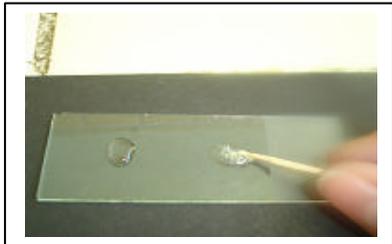
Anexo 3.13: Pruebas Bioquímicas Gram Negativas



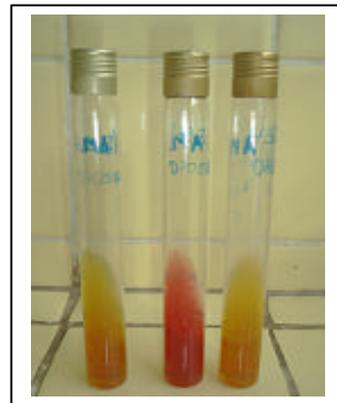
Anexo 3.14: Pruebas Bioquímicas Bacterias Gram Positivas



Prueba de oxidasa



Prueba de catalasa



Prueba de Manitol

