



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCION DEL TÍTULO  
DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: ESTUDIO CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO Y ESTIMACIÓN  
ECONÓMICA DE MASTITIS BOVINA, EN LA COOPERATIVA DE  
PRODUCCIÓN AGROPECUARIA “EL SALINERITO”, PROVINCIA  
BOLÍVAR – ECUADOR.**

**AUTORES: ANDRADE CERÓN, CRISTHIAN FABIÁN**

**SÁNCHEZ GALARZA, ALEX DAVID**

**DIRECTOR: DR. RON ROMÁN, JORGE WASHINTON Ph.D**

**SANGOLQUÍ**

**2018**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, *“ESTUDIO CLÍNICO, MICROBIOLÓGICO Y ESTIMACIÓN ECONÓMICA DE MASTITIS BOVINA, EN LA COOPERATIVA DE PRODUCCIÓN AGROPECUARIA “EL SALINERITO”, PROVINCIA BOLÍVAR – ECUADOR.”*, fue realizado por los señores *Andrade Cerón, Cristhian Fabián y Sánchez Galarza, Alex David*, el mismo que ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar a los señores para que lo sustenten públicamente.

Sangolquí, 9 de marzo del 2018

Dr. JORGE WASHINGTON RON ROMÁN Ph.D.

C.C. 1709505125



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Nosotros, *Andrade Cerón, Cristhian Fabián y Sánchez Galarza, Alex David*, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación, *Estudio clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar – Ecuador*, es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sido, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 9 de marzo del 2018

**Cristhian Fabián Andrade Cerón**

C.I. 172167810-8

**Alex David Sánchez Galarza**

C.I. 172151952-6



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORIZACIÓN**

Nosotros, *Andrade Cerón, Cristhian Fabián y Sánchez Galarza, Alex David*, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *Estudio clínico, microbiológico y estimación económica de mastitis bovina, en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, provincia Bolívar – Ecuador*, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 9 de marzo del 2018

**Cristhian Fabián Andrade Cerón**

C.I. 172167810-8

**Alex David Sánchez Galarza**

C.I. 172151952-6

## DEDICATORIA

A:

Mis padres Yolanda y Vinicio por ser un ejemplo de amor, cariño y apoyo durante toda mi educación y vida.

Mis hermanos Samantha, Miguel, Fernando y Henry por estar conmigo y apoyarme siempre.

Mis abuelos Galo y Elisa por quererme y aconsejarme siempre, esto también se los debo a ustedes.

A Alex que te has convertido como en un hermano para mí.

Cristhian.

A:

Mis padres por guiarme y aconsejarme en todos los momentos complicados de mi vida.

Mis hermanos por su apoyo en todo.

Mi abuelita por todo su amor incondicional.

Mi novia Angie por su amor y comprensión durante todo este tiempo.

Todas las personas que me ayudaron durante mi carrera universitaria.

Y a mi compañero de tesis.

Alex

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” por toda la apertura hacia nosotros durante la realización del Proyecto de Investigación.

A la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por los instalaciones, materiales y reactivos.

Al Dr. Jorge Ron Román PhD., gran maestro, y sobre todo un gran amigo.

A la Lic. Alma Koch MSc., por su guía, enseñanzas y consejos.

A la Dra. María Augusta Chávez MSc, por todo el apoyo que nos ha brindado.

A nuestros amigos José, Vivi, Diego, Luis, Alejandro, Carolina, Robin, que siempre estuvieron con nosotros durante la Carrera compartiendo grandes momentos.

A nuestras familias por todo el apoyo que nos han brindado durante toda nuestra vida estudiantil.

A Jenny y Angie por apoyarnos en este proceso, y comprender cada situación que hemos atravesado.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

### CARÁTULA

CERTIFICACIÓN .....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	ii
AUTORIZACIÓN .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii

### CAPÍTULO I

#### INTRODUCCIÓN

1.1	Justificación.....	2
1.2	El problema .....	3
1.2.1	Los Efectos .....	3
1.2.2	Las Causas .....	4
1.3	Objetivos .....	4
1.3.1	Objetivo general .....	4
1.3.2	Objetivos específicos.....	4
1.4	Hipótesis.....	4

### CAPÍTULO II

#### REVISIÓN DE LITERATURA

2.1	Mastitis Bovina.....	6
2.1.1	Definición.....	6
2.1.2	Importancia.....	6
2.1.3	Factores relacionados a mastitis.....	7
2.1.3.1	Factores físicos .....	7
2.1.3.2	Factores genéticos .....	8

2.2	Etiología .....	8
2.3	Patogenia .....	9
2.4	Cuadros clínicos, tipos y signos .....	10
2.5	Métodos de diagnóstico.....	12
2.5.1	Prueba California de Mastitis (CMT).....	12
2.6	Prevención y control.....	16

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1	Ubicación del lugar de investigación .....	21
3.1.1	Trabajo de campo .....	21
3.1.1.1	Ubicación geográfica.....	21
3.1.1.2	Ubicación geológica.....	21
3.1.2	Trabajo de laboratorio .....	22
3.2	Materiales .....	22
3.3	Métodos .....	22
3.3.1	Determinación de mastitis clínica y subclínica .....	23
3.3.1.1	Mastitis clínica .....	23
3.3.1.1.1	Prueba de fondo oscuro .....	23
3.3.1.1.2	Evaluación de la ubre .....	24
3.3.1.2	Mastitis subclínica.....	26
3.3.1.2.1	California mastitis test (CMT) .....	26
3.3.2	Identificación, titulación y antibiograma de los agentes etiológicos .....	27
3.3.2.1	Metodología para la toma de muestra de leche .....	30
3.3.2.2	Metodología para aislamiento de patógenos .....	31
3.3.2.2.1	Preparación de medios de cultivo .....	31
3.3.2.2.2	Siembra en caja Petri .....	32
3.3.2.2.3	Siembra en Petrifilm .....	33
3.3.2.2.4	Aislamiento de microorganismos .....	34
3.3.2.2.5	Tinción Gram .....	34
3.3.2.3	Pruebas para la identificación de patógenos .....	35

3.3.2.3.1	Pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas .....	35
3.3.2.3.2	Pruebas bioquímicas para bacterias Gram negativas .....	37
3.3.2.4	Metodología para la realización de antibiogramas .....	45
3.3.3	Metodología para medir la producción de la leche .....	46
3.3.4	Metodología para estimar las pérdidas económicas de las fincas en estudio .....	46
3.3.5	Productos obtenidos y beneficiarios .....	47

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Resultados .....	48
4.2	Discusión .....	56

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1	Conclusiones .....	64
5.2	Recomendaciones .....	65
5.3	Bibliografía .....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<i>Agentes patógenos etiológicos más importantes relacionados a mastitis</i> .....	9
<b>Tabla 2</b>	<i>Descripción de las etapas infecciosas en mastitis</i> .....	10
<b>Tabla 3</b>	<i>Tipos de mastitis clínica, descripción y signos visibles</i> .....	11
<b>Tabla 4</b>	<i>Grado de CMT para interpretación de resultados</i> .....	13
<b>Tabla 5</b>	<i>Condición y calificación de la condición de la piel del pezón</i> .....	14
<b>Tabla 6</b>	<i>Cuartos infectados, pérdidas de producción en porcentaje según el conteo de células somáticas</i> .....	15
<b>Tabla 7</b>	<i>Coordenadas geográficas donde se desarrolló la fase campo</i> .....	21
<b>Tabla 8</b>	<i>Predios escogidos para el estudio</i> .....	22
<b>Tabla 9</b>	<i>Grado de CMT, rango de células somáticas e interpretación</i> .....	27
<b>Tabla 10</b>	<i>Concentración en g/L de medios de cultivo en caja Petri</i> .....	31
<b>Tabla 11</b>	<i>Concentración en gramos/litro de medios de cultivo en tubos tapa rosca</i> .....	32
<b>Tabla 12</b>	<i>Concentración de los antibióticos y su disposición en las cajas Petri</i> .....	45
<b>Tabla 13</b>	<i>Interpretación de sensibilidad de bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras a diferentes agentes antibióticos</i> .....	46
<b>Tabla 14</b>	<i>Relación entre grado de CMT y porcentaje de disminución de la producción de leche en porcentaje</i> .....	47
<b>Tabla 15</b>	<i>Prevalencia de mastitis subclínica en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”</i> .....	48
<b>Tabla 16</b>	<i>Prevalencia de mastitis de cuartos positivos a CMT, relacionada con el nivel de sequedad de pezones, en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”</i> .....	49
<b>Tabla 17</b>	<i>Prevalencia de mastitis de cuartos positivos a CMT, relacionada con el nivel de surcos en los pezones, en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”</i> .....	49
<b>Tabla 18</b>	<i>Prevalencia de mastitis de cuartos positivos a CMT, relacionada con el nivel de callosidades en los pezones, en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”</i> .....	50

<b>Tabla 19</b> <i>Prevalencia de mastitis de acuerdo a la etapa de lactancia en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”</i> .....	50
<b>Tabla 20</b> <i>Resultados de la siembra de muestras de leche (n=34) en agar MacConkey, Sangre, Staphylococcus, Streptococcus y Eosin Methyl Blue; y tinción Gram.</i> .....	51
<b>Tabla 21</b> <i>Aislamiento de agentes microbianos de mastitis obtenidas de 34 muestras de leche en diferentes medios de cultivo selectivos.</i> .....	52
<b>Tabla 22</b> <i>Crecimiento en porcentaje de agentes microbianos de 34 muestras de leche en Petrifilms específicos para Staphylococcus y enterobacterias</i> .....	52
<b>Tabla 23</b> <i>Susceptibilidad y resistencia in vitro de microorganismos causantes de mastitis a antibióticos en vacas lecheras de cuatro fincas pertenecientes a la parroquia de Salinas, cantón Guaranda, Bolívar, Ecuador</i> .....	54
<b>Tabla 24</b> <i>Pérdida en litros y dólares estimada por mastitis en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”</i> .....	55
<b>Tabla 25</b> <i>Puntos críticos en común según la encuesta aplicada a las cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”</i> .....	55

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	Procedimiento para colocación de antibióticos. ....	18
<b>Figura 2</b>	Valoración para el color de pezón .....	24
<b>Figura 3</b>	Valoración para la hidratación del pezón (aspereza).....	25
<b>Figura 4</b>	Valoración para rajaduras horizontales en el pezón .....	25
<b>Figura 5</b>	Valoración para callosidades a nivel de pezón .....	26
<b>Figura 6</b>	Prueba de catalasa .....	36
<b>Figura 7</b>	Prueba de coagulasa.....	37
<b>Figura 8</b>	Prueba Citrato de Simmons .....	38
<b>Figura 9</b>	Prueba SIM .....	40
<b>Figura 10</b>	Prueba Ureasa .....	41
<b>Figura 11</b>	Prueba de MRVP .....	43
<b>Figura 12</b>	Prueba de TSI (Triple azúcar hierro).....	45

## RESUMEN

Dentro de las principales enfermedades que afectan al ganado lechero se encuentra la mastitis, causada por múltiples factores como: manejo, nutrición, ambiente y patógenos. El objetivo del estudio fue valorar el estado clínico, microbiológico y estimación de pérdidas económicas de mastitis en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”. El estudio se realizó en un total de 58 vacas en producción, evaluando todos los cuartos de cada animal (n=232) mediante parámetros clínicos, fondo obscuro y la prueba de California para mastitis (CMT). La prevalencia de mastitis por animal fue de 84,5%, (49/59), por cuarto fue 47, 8%(111/232). Se aislaron 68 patógenos en cinco diferentes medios de cultivo, de las cuales se distinguen: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., y levaduras. *Staphylococcus aureus*, *Sthaphylococcus* sp., *E. coli*, *Shigella* y *Bacillus* sp son resistentes a penicilina y ampicilina. Todos los microorganismos presentan susceptibilidad a cefotaxima; *Staphylococcus aureus*, *Sthaphylococcus* sp, *Enterobacter* sp., *Streptococcus* sp. son sensibles a bacitracina, oxitetraciclina y neomicina. *Bacillus* sp. es susceptible a varios antibióticos. La pérdida de leche por vaca promedio de las cuatro fincas del estudio fue 6,5 litros, la finca el Rosal fue la que más producción perdía y la finca Producoorp la que más pérdidas económicas presentó.

### Palabras clave:

- MASTITIS
- CMT
- PATÓGENOS
- PÉRDIDAS ECONÓMICAS

## ABSTRACT

Within the principal disease that affects dairy cattle it's found mastitis, caused by multiple factors such as: management, nutrition, environment and pathogens.

The objective of the study was to assess the clinical, microbiological status and economic loss estimates of mastitis in four farms of the Cooperativa de Producción Agropecuaria "El Salinerito". The study was conducted in a total of 58 cows in production, evaluating the quarters of each animal by clinical parameters, dark background and California test for mastitis (CMT).

The prevalence of mastitis per animal was 84.5% (49/58), per quarter was 47, 8% (111/232) in the four farms of the study. Sixty-eight pathogens were isolated in five different culture media, of which: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., and yeasts are distinguished. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp., *E. coli*, *Shigella* sp. and *Bacillus* sp are resistant to penicillin and ampicillin. All microorganisms have susceptibility to cefotaxime; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp, *Enterobacter* sp., *Streptococcus* sp. presented sensitivity to bacitracin, oxytetracycline and neomycin. *Bacillus* sp. presented resistance to various antibiotics.

Milk loss per average cow of the four farms of the study was 6.5 liters, El Rosal farm was the one that had most lost production and Producoop had the most economic losses.

### Keywords:

- **MASTITIS**
- **CMT**
- **PATHOGENS**
- **ECONOMIC LOSSES**

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La leche de origen vacuno es un producto cosmopolita de gran valor nutricional y comercial por su importancia como fuente de proteínas, y energía (Agudelo & Bedoya, 2005), es considerado un alimento esencial en la dieta de las personas.

De ésta se obtienen subproductos lácteos de alto costo y demanda poblacional; su industria se encuentra distribuida a nivel global, se enfrenta a un gran número de parásitos y enfermedades debido a diversos factores que constituyen el manejo, sanidad, nutrición y ambiente en el que se encuentra el ganado, generando un impacto económico negativo en la industria láctea y sus derivados (OMS; FAO, 2011).

La enfermedad más común, importante y costosa del ganado lechero es la mastitis (Wolter, y otros, 2015), que se define como la inflamación de la glándula mamaria debido a una infección provocada por bacterias Gram positivas o Gram negativas, hongos, algas y levaduras, o a su vez por traumas físicos, térmicos o químicos que predispone a la glándula a una infección intramamaria (IMI) (Harmon, 1994) (Zhao & Lacasse, 2014).

Como respuesta a la enfermedad, la composición de la leche se ve alterada debido la síntesis de caseína y lactosa decrece (Borato, y otros, 2014), la calidad de la leche disminuye repercutiendo de manera directa en la elaboración de subproductos lácteos (Tardy & Bouveron, 2002).

La consecuencia negativa más importante de la mastitis es la disminución del volumen de leche producido (Garbulio, y otros, 2010), estas principales alteraciones (composición, calidad y cantidad) en la leche son las responsables de las pérdidas económicas debido a la mastitis (Olivares, y otros, 2015).

Un correcto diagnóstico mediante el establecimiento de los factores de riesgo y agentes causales de la enfermedad, permite la elaboración de planes de control dentro del ganado lechero mejorando la capacidad de producción y el ingreso económico a través de protocolos de seguimiento de la enfermedad (NMC, 2007).

Existen métodos curativos y preventivos para el control de mastitis, dentro de los primeros se utilizan varios antibióticos intramamarios de origen sintético que tienen residualidad en la leche, afectando al consumidor. Para la prevención de la enfermedad existen procesos específicos dentro del ordeño (manual o mecánico), manejo, nutrición y selección genética que contribuye a minimizar los factores para el pareamiento o control de la mastitis en hatos lecheros (Wolter, y otros, 2015).

La Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” tiene como fin la elaboración de subproductos lácteos y se centra los de quesos de distintos tipos, por lo cual su materia prima es la leche ofertada por pequeños, medianos y grandes productores de la zona, sin que exista una correcta trazabilidad de la materia prima hasta su entrega.

## **1.1 Justificación**

Para el 2016 el ganado bovino lideró el sector pecuario del Ecuador, teniendo alrededor de 4,13 millones de cabezas entre ganado de carne y de leche, de donde aproximadamente 896.170 fueron vacas de ordeño que generó una producción de 5.319.288 litros (INEC, 2016); lo que indica que la producción láctea es un rubro muy importante para la industria láctea.

La mastitis siendo la enfermedad más común, costosa e importante a nivel mundial (Wolter, y otros, 2015) constituye una gran amenaza al sector lechero del país, por lo tanto el diagnóstico clínico, determinación de agentes causales y planes de control permitirá elevar los

parámetros de producción y calidad de la leche de pequeños medianos y grandes productores, aportando tecnologías de manejo, control y calidad de la materia prima.

En la Cooperativa Agropecuaria “El Salinerito”, la leche es la materia prima para la elaboración de quesos de varios tipos, de gran calidad y sabor; sin embargo ha reducido por los problemas sanitarios de cada productor de leche, de manera especial la mastitis lo que invita a realizar un diagnóstico de calidad en fincas de alta producción para obtener un esquema global de la distribución de los agentes causales y proyectar un correcto plan de control y manejo (Balarezo & Poveda, n.d.).

## **1.2 El problema**

Los productores de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” tienen como principal actividad económica la elaboración de quesos provenientes de la ganadería bovina de leche, por lo que es muy importante producir la materia prima en grandes cantidades y con parámetros de calidad.

Estudios preliminares (Balarezo & Poveda, n.d.) han determinado que el problema principal de los pequeños, medianos y grandes productores de la zona es la mastitis debido a diversos factores como manejo, desconocimiento de las buenas prácticas de ordeño y falta de asesoramiento técnico.

### **1.2.1 Los Efectos**

La producción de quesos en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” enfrenta una reducción en cantidad y calidad, resultado directo de la mastitis en el ganado lechero. En la planta de recolección de leche no se toman medidas en cuanto al rechazo del producto por el alto conteo de células somáticas y baja calidad, afectando al rendimiento económico de la empresa y del productor.

## **1.2.2 Las Causas**

El inadecuado manejo técnico de la mastitis, la falta de conocimiento sobre el proceso de ordeño y el ineficaz seguimiento y control de la enfermedad son las causas que generan el problema que enfrenta esta empresa.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Valorar el estado clínico, microbiológico y económico de mastitis bovina en cuatro predios de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, Bolívar – Ecuador.

### **1.3.2 Objetivos específicos.**

Determinar la prevalencia de mastitis clínica y subclínica, a través de la exploración de animales (glándula mamaria) y aplicación de pruebas diagnósticas (Prueba California de Mastitis CMT y Fondo oscuro).

Aislar, tipificar y realizar el antibiograma de agentes causales, en vacas con mastitis clínica y sub-clínica.

Estimar las pérdidas económicas por animal y predio, a través de la cuantificación del volumen de leche producida, según grado de mastitis diagnosticado.

Identificar puntos críticos relacionados a mastitis en cuatro predios de “El Salinerito”, y elaborar un manual de buenas prácticas de ordeño, como mecanismo de capacitación a los productores.

## **1.4 Hipótesis**

Ho: Los agentes causales aislados de vacas con mastitis clínica y subclínica en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” no presentan resistencia a antibióticos.

Hi: Los agentes causales aislados de vacas con mastitis clínica y subclínica en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” si presentan resistencia a antibióticos.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **2.1 Mastitis Bovina**

##### **2.1.1 Definición**

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria (Oliveira, Watts, Salmon, & Aarestrup, 2000) y de sus tejidos secretores, que reduce el volumen de leche, alterando su composición (incluso sabor) además de elevar su carga bacteriana normal (UACH, 2011). La mastitis es inducida por diversos factores como medio ambiente, manejo, germen causal, nutrición, ordeño o daños físicos de la glándula; por este motivo se la califica como una enfermedad multifactorial (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991).

##### **2.1.2 Importancia**

La leche de origen vacuno es un producto cosmopolita de gran valor nutricional y comercial por su importancia como fuente de proteínas, minerales y energía (Agudelo & Bedoya, 2005), por lo cual es considerado un alimento esencial en la dieta de las personas; además, de ésta se obtienen subproductos lácteos de alto coste y demanda poblacional (OMS; FAO, 2011)

Al ser la mastitis la enfermedad más común y costosa del ganado lechero (Wolter, y otros, 2015) se la considera la más importante enfermedad que enfrenta la industria por la alteración que sufre la leche tanto en producción como en calidad, generando pérdidas económicas considerables para la industria láctea.

Como respuesta a la enfermedad, la composición de la leche se ve alterada debido a que la síntesis de caseína y lactosa decrece (Borato, y otros, 2014), la calidad de la leche disminuye repercutiendo de manera directa en la elaboración de subproductos lácteos (Tardy & Bouveron, 2002).

La consecuencia negativa más importante es la disminución del volumen de leche producido (Garbulio, y otros, 2010), estas principales alteraciones (composición, calidad y cantidad) en la leche son las responsables de las pérdidas económicas que la industria láctea se enfrenta debido a la mastitis (Olivares, y otros, 2015).

### **2.1.3 Factores relacionados a mastitis**

#### **2.1.3.1 Factores físicos**

La ubre está expuesta a alteraciones físicas debido a que se encuentra en contacto directo con objetos cortos punzantes en campo como alambres de púas, vidrios rotos, y metales y otros que causan traumatismos en la ubre como laceraciones leves o graves.

Otro tipo de traumatismos son de origen medio ambiental, lo que se refiere al efecto de la lluvia, el barro, el fango o pisos sucios.

Estos traumatismos elevan la probabilidad de que los cuartos de la ubre adquieran mastitis, por el contacto directo de las heridas con el ambiente (Cebrián, Meseguer, Ramos, & Ferrer, 2013).

Los bovinos al ser transportados de un lugar a otro, los terneros, el ordeño mecánico o manual y objetos duros, golpean la ubre causando lesiones físicas y también producen una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria.

El manejo es una de las principales vías de transmisión de microorganismos patógenos de mastitis; dentro del ordeño se toma en cuenta la asepsia del lugar, el manejo de heces, asepsia del trabajador, regulación de maquinaria en caso de la mecanización del proceso (pérdidas de vacío de la pezonera y/o desinfección), limpieza de utensilios y los que favorecen o evitan la transmisión de microorganismos de vacas con cuartos enfermos a las que tienen sanos sus cuartos (Wattiaux & Howard, 2013).

### **2.1.3.2 Factores genéticos**

La selección genética dentro de un hato bovino es muy importante para el mejoramiento productivo de los animales, es una herramienta que puede ser utilizada para reducir la incidencia de mastitis clínica (MC) en la población bovina, la disminución en el recuento de células somáticas y a su vez mejorar la producción lechera.

El resultado del mejoramiento genético en la reducción de mastitis clínica es el cambio permanente en la composición genotípica de vacas lecheras (Shook, 1989).

Existen tres tipos de selecciones para incrementar la resistencia de crías a mastitis clínica, mediante selección directa frente a MC, mediante selección indirecta usando rasgos correlacionados, o la combinación de los dos anteriores (Bloemhof, De Jong, & De Haas, 2008).

Para la selección directa se debe medir la heredabilidad del factor genético en la vaca o sus parientes; este rasgo está debajo de los 0.05 estimado con modelos lineales (Heringstad, Chang, Gionala, & Klemetsdal, 2004).

En la selección indirecta se utilizan datos correlacionados con MC, el recuento de células somáticas es el factor genético más utilizado (Carlén, Strandberg, & Roth, 2004). La heredabilidad estimada de este parámetro está alrededor de 0,10 (Carlén, Strandberg, & Roth, 2004), (De Haas, Barkema, & Veerkamp, 2002).

La correlación entre el conteo de células somáticas y MC va de moderado a alto variando entre 0.2 a 0.7 (Carlén, Strandberg, & Roth, 2004).

## **2.2 Etiología**

La mastitis es causada por microorganismos infecciosos de diferentes especies como bacterias Gram positivas (Estafilococos, Estreptococos) y bacterias Gram negativas (Bedolla & Ponde de

León, Revista Veterinaria, 2008); algas, hongos y levaduras también causan mastitis pero son menos frecuentes (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991).

Los gérmenes patógenos específicos son la causa inmediata de la infección de la glándula mamaria, para que se desarrolle la infección dependen de la proliferación del microorganismo y de su capacidad de contagio (Bedolla & Castañeda, Revista Veterinaria, 2007).

Los agentes etiológicos más importantes de la mastitis son los *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., coliformes, *Pseudomonas* sp. y levaduras (Tabla 1).

**Tabla 1**

*Agentes patógenos etiológicos más importantes relacionados a mastitis*

<b>Patógeno</b>	<b>Tipo de microorganismo</b>	<b>Tipo de transmisión</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria Gram positiva	Infeccioso/Ambiental
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bacteria Gram positiva	Infeccioso
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Bacteria Gram positiva	Infeccioso
<i>Streptococcus uberis</i>	Bacteria Gram positiva	Infeccioso
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteria Gram negativa	Ambiental
Coliformes	Bacilos Gram negativos	Ambiental
<i>Pseudomonas</i> sp.	Bacilos Gram negativos	Ambiental
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Bacteria Gram positiva	Ambiental
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo Gram positivo	Ambiental

Fuente: Adaptado de (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991)

### 2.3 Patogenia

La infección de la glándula mamaria siempre ocurre a través del conducto glandular a partir de dos fuentes principales de contaminación: la ubre infectada y el medio (Bedolla & Ponde de León, Revista Veterinaria, 2008).

Los microorganismos al penetrar el canal del pezón se multiplican en la glándula mamaria (Wattiaux & Howard, 2013), la patogenia tiene cuatro etapas distintas (Tabla 2).

**Tabla 2***Descripción de las etapas infecciosas en mastitis*

<b>Etapas</b>	<b>Descripción</b>
Invasión	Los microorganismos pasan del exterior de la ubre hacia el conducto glandular ya sean infecciosos o ambientales.
Infección	Los gérmenes proliferan e invaden el tejido mamario causando daño al epitelio.
Inflamación	La infección produce la inflamación del tejido y mastitis subclínica o clínica dependiendo de la severidad de la infección
Terminal	Atrofia la glándula mamaria generando signos crónicos.

Fuente: Adaptado de (Wolter, y otros, 2015)

## 2.4 Cuadros clínicos, tipos y signos

Los signos que presenta la enfermedad son las manifestaciones de la inflamación, estos signos tienen diversa naturaleza y van desde: mayor conteo de células somáticas (SCC) de la leche a signos graves como fibrosis mamaria, hinchazón, dolor de ubre, fiebre, falta de apetito.

De acuerdo a la sintomatología pueden diferenciarse dos formas de mastitis: las mastitis subclínica y clínica (Bedolla & Ponde de León, Revista Veterinaria, 2008) (Dos Santos, Netto dos Santos, Gentilini, Sordelli, & de Freire Bastos, 2002) (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991).

### 2.4.1 Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es un tipo de inflamación sin signos inflamatorios externos y la más difícil de corregir, la vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación y la leche parece normal. Para la identificación de este cuadro clínico existen signos como el aumento en el conteo de células somáticas de la leche y la presencia de los patógenos causales en la ubre (Estafilococos y estreptococos de manera habitual).

La enfermedad se comprueba con un examen de conteo celular y un estudio microbiológico del caso (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991) (Mekonnen, y otros, 2017) (Wolter, y otros, 2015).

Las inflamaciones no visibles de la ubre (subclínicas) son más frecuentes y son las que mayor pérdidas económicas generan por la reducción en la producción de leche (Bedolla & Ponde de León, Revista Veterinaria, 2008), una forma especial de la mastitis subclínica es la alteración de la secreción (mastitis aséptica) que no es causada por microorganismos sino por la influencia de factores ambientales (golpes, presiones, manejo) (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991).

### 2.4.2 Mastitis clínica

En la mastitis clínica, los signos visibles son característicos y sus síntomas van desde disminución de la cantidad y alteración de la leche, pérdida de un cuarto, atrofia de la glándula mamaria y trastornos histológicos graves del bovino (Cicconi, Gamroth, Schukken, & Stiglbauer, 2013) (Heringstad, Klemetsdal, & Ruane, 2000) (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991).

El grado de sintomatología junto con el curso evolutivo de la enfermedad puede diferenciarse en tres tipos (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Tipos de mastitis clínica, descripción y signos visibles*

Tipo mastitis clínica	Descripción	Signos visibles		
		Vaca	Ubre	Leche
Subaguda	Etapa inicial del cuadro clínico, sin alteraciones visibles.	No hay cambios observables.	El cuarto afectado puede estar inflamado.	No se ven cambios pero se reduce la producción.
Aguda	Aparición súbita, leche de apariencia anormal, enrojecimiento, tumefacción.	No hay cambios observables.	Cuarto afectado se muestra duro, rojo e inflamado.	Purulenta, como suero y acuosa.
Crónica	Infección de la ubre de larga duración y leche anormal.	Muy enferma, puede morir, no tiene coordinación muscular.	Fibrosis mamaria, puede perder el cuarto.	Aguada y con manchas de sangre.

Fuente: Adaptado de (Bedolla & Ponde de León, Revista Veterinaria, 2008)

## **2.5 Métodos de diagnóstico**

El diagnóstico es el resultado de la interpretación de síntomas, signos y exploraciones evaluadas por un especialista, ayudado de diferentes métodos y técnicas de diagnóstico en campo y/o laboratorio con el fin de establecer un plan de acción adecuado en contra de la enfermedad. La lucha contra la mastitis es un esfuerzo a largo plazo (Sánchez, 2003).

Los métodos diagnósticos más utilizados a nivel de campo sirven para detectar mastitis subclínica (California Mastitis Test - CMT), y mastitis clínica (palpación de ubre, valoración de pezones, prueba de fondo negro). A nivel de laboratorio las pruebas que se realizan son el recuento de células somáticas a nivel de tanque, aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos mediante cultivos microbiológicos; este último constituye el principio del plan de prevención y control de la enfermedad (Borato, y otros, 2014) (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991) (Wolter, y otros, 2015).

### **2.5.1 Prueba California de Mastitis (CMT)**

El CMT es una prueba de campo, rápida, fácil y económica para la detección de infecciones subclínicas de cada cuarto de la ubre. Proporciona un indicador del número de células somáticas que se encuentran en la leche y sólo desencadenará una reacción visible con una concentración de 400.000 células/ml o más. El reactivo está compuesto de un detergente (lauril sulfato de sodio) y un indicador de pH; cuando este se mezcla con la cantidad adecuada de leche, produce una reacción y forma un gel viscoso dependiendo del número de células somáticas que se encuentren en la leche (Tabla 4) (CBMR, 2008).

**Tabla 4**  
*Grado de CMT para interpretación de resultados*

Grado de CMT	Rango de células somáticas	Interpretación	Gráfica
N (negativo)	0 – 200.000	No hay precipitado, por lo tanto no hay infección.	
T (Trazas)	200.000 – 500.000	Ligera precipitación, que desaparece al agitar.	
1	400.000– 1.500.000	Existe una ligera precipitación con algunos filamentos grumosos.	
2	800.000 – 5.000.000	Formación de gel perecida a una clara de huevo	
3	Más de 5.000.000	Formación de gel de una manera rápida, no pierde la forma a pesar de la agitación.	

Fuente: Adaptado de (CBMR, 2008)

### 2.5.2 Fondo oscuro

Es una prueba rápida y económica ya que solo necesita de una copa con fondo oscuro para su realización, esta práctica se la hace antes del ordeño extrayendo los tres primeros chorros de leche del pezón limpio en la copa. La evaluación de la leche permite diagnosticar el desarrollo de una mastitis clínica, la leche presenta decoloración, descamaciones, coágulos y pus. La leche del pre ordeño se la debe eliminar con cuidado y evitar salpicar a las patas, cola o ubre del animal, además esta práctica evita el contagio de patógenos de vaca a vaca (Wattiaux & Howard, 2013).

### 2.5.3 Palpación

Esta práctica solo tiene un resultado positivo cuando uno o varios cuartos de la glándula mamaria presentan o ha presentado algún tipo de mastitis clínica (Wattiaux & Howard, 2013). Los signos que se espera encontrar al momento de palpar la ubre son los siguientes: cuartos inflamados, temperatura elevada, dolor al tacto, presencia de engrosamientos o estrechamientos de algunos cuartos y pezones, alteraciones de la piel, lesiones traumáticas y tejido cicatrizal (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991).

### 2.5.4 Valoración de la piel del pezón

Los pezones del ganado lechero son afectados por el proceso de ordeño, factores físicos, ambientales y agentes etiológicos que producen signos visibles indicadores de la enfermedad. Los signos que se espera encontrar al momento de observar la condición del pezón son los siguientes: color del pezón, resequedad de la piel del pezón, rajaduras a nivel horizontal del pezón, y callosidades (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991) (NMC, 2007).

Los signos que se valoran para el diagnóstico de la enfermedad presentan varias condiciones visuales con puntuaciones específicas (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Condición y calificación de la condición de la piel del pezón*

Parámetro	Condición	Calificación/Simbología
Color de pezón	Normal rosado	N
	Morado	A
	Rojo Irritado	R
Hidratación de la piel del pezón	Normal	N
	Ligeramente áspero	LA
	Muy áspero	MA
Rajaduras longitudinales.	Ninguna	N
	Menor	M
	Extensa	E
Callosidades	Ninguna	N
	Anillo	A
	Moderada	M
	Extrema	E

Fuente: Adaptado de (NMC, 2007)

### 2.5.5 Recuento de células somáticas

Esta práctica por lo general se la realiza en el tanque de leche que genera un indicador de mastitis a nivel de todo el hato, en la actualidad las empresas de lácteos que compran la materia prima realizan esta prueba todos los días a todos los productores; estos valores son referenciales para definir el valor de la leche (Calvinho, 2004). El número de células somáticas deben ser menores a 200.000 por ml, para que en la leche pueda aprobar la prueba de mastitis cero, un alto conteo de células somáticas se asocia con la pérdida de la producción de leche y cuartos infectados (Tabla 6) (Wattiaux & Howard, 2013).

**Tabla 6**

*Cuartos infectados, pérdidas de producción en porcentaje según el conteo de células somáticas*

CCS/ml	Cuartos infectados (%)	Pérdidas de producción (%)
<200.000	6	0-5
200.000-500.000	16	6-9
500.000-1.000.000	32	10-18
>1.000.000	48	19-29

CCS/ml= Conteo de células somáticas por mililitros, %=porcentaje

Fuente: Adaptado de (Wattiaux & Howard, 2013)

### 2.5.6 Cultivos microbianos

Los cultivos microbianos constituyen un método de aislamiento y multiplicación de patógenos en condiciones controladas de laboratorio, permitiendo la conducción de investigaciones taxonómicas, medio ambientales, agrícolas, biomédicas e industriales (Arencibia, Rosario, & Gámez, 2008); aportando al crecimiento científico a nivel mundial.

Este tipo de cultivos en leche permiten el aislamiento, identificación y posterior evaluación de resistencia de microorganismos (antibiogramas) siendo una herramienta de suma utilidad e importancia para un correcto diagnóstico y futuro programa de control de mastitis (Sánchez, 2003), permitiendo elevar el rendimiento del hato lechero tanto en producción como en calidad de la materia prima.

### 2.5.7 Antibiograma

Los antibiogramas son métodos in vitro que permiten determinar la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de antibióticos y la evolución de las resistencias bacterianas, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas (Paredes & Roca, 2004).

En la elaboración de un correcto plan de control de mastitis con el uso de antibióticos, los antibiogramas representan una herramienta muy útil, porque proveen de la información necesaria para tratar a los agentes patógenos de manera adecuada y disminuyen el riesgo de que se genere resistencia a los antimicrobianos, reduciendo los costos del tratamiento y elevando la eficacia del programa de control (Paterna, y otros, 2014).

## 2.6 Prevención y control

La mastitis ambiental y contagiosa puede reducir su prevalencia en un 50%, si se siguen protocolos de prevención específicos muy singulares y fáciles para el ganadero, como lo son las buenas prácticas de ordeño (manuales y/o mecánicos). Reduciendo la exposición de vacas infectadas se puede controlar de manera adecuada la enfermedad dentro del hato (Merck, 2000).

Dentro de las buenas prácticas de ordeño para la prevención y control de la enfermedad se encuentran las siguientes:

- **Higiene:** el personal de ordeño manual o mecánico deben lavar y desinfectar sus manos, equipos y utensilios antes de manipular la ubre de la vaca. Es recomendable usar guantes de látex durante el proceso. Para comenzar el proceso de ordeño se debe lavar de manera correcta la ubre y los pezones, se recomienda usar una solución desinfectante de pre-

inmersión específica antes de la extracción de la leche, a continuación se secan los pezones con papel o toallas limpias y se procede al ordeño como tal. Al terminar con una vaca se debe nuevamente lavar el equipo de ordeño y/o las manos del manipulador de la ubre (CBMR, 2003).

- **Forma de ordeño:** en el ordeño mecánico las pezoneras deben estar unidas a la ubre durante 60 y máximo 120 segundos después de la primera estimulación; este tiempo permite que se produzca el reflejo del letargo y maximice el rendimiento del ordeño (CBMR, 2003). Los niveles de vacío de la unidad de ordeño debe estar entre 275 y 300 mm de mercurio y debe variar lo menos posible; un manejo adecuado de la unidad, maximiza el tiempo de ordeño y evita alguna alteración en la ubre.

Dentro del ordeño manual la forma adecuada de hacerlo es: la mano toma todo el largo del pezón, el pulgar y el índice comprimen la parte superior del pezón y al mismo tiempo los demás dedos aprietan hacia adentro y hacia abajo. La mayor presión dentro de la ubre hace que la leche pase por el esfínter (Wattiaux & Howard, 2013).

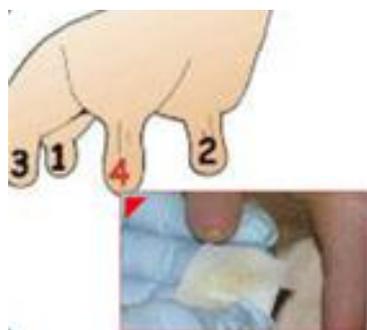
- **Sellado de pezones luego del ordeño:** una vez finalizado el ordeño, hay que sumergir los pezones en una solución desinfectante adecuada; las copas de inmersión deben estar limpias. Luego de cada ordeño hay que eliminar cualquier solución usada, limpiar bien el recipiente y prepare una solución fresca (CBMR, 2003).

El sellado de pezones post ordeño controla de forma efectiva a las bacterias más contagiosas productoras de mastitis, que son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (Wattiaux & Howard, 2013).

- **Control de vacas que entran en el período seco:** para reducir la incidencia de nuevas infecciones intramamarias durante el período seco de las vacas, se debe aplicar un

antibiótico en cada cuarto antes de secar al vacuno, este proceso sirve de igual manera para el control de la enfermedad; esta práctica reduce y controla la incidencia de infecciones (Wattiaux & Howard, 2013). Esta práctica se la realiza luego del ordeño, se desinfecta cada pezón con un hisopo con alcohol y se procede a colocar el antibiótico en el canal del pezón. Todo este procedimiento tiene un orden específico para evitar la contaminación entre cuartos (Figura 1 (CBMR, 2004)).

Orden de limpieza de pezones



Orden de colocación de antibiótico



**Figura 1** Procedimiento para colocación de antibióticos.

Fuente: (CBMR, 2003)

Al finalizar la operación se identifica la vaca y se sellan los pezones.

- **Tratamiento adecuado y a tiempo en todos los casos clínicos:** un programa de manejo adecuado de la mastitis evitará la proliferación de la enfermedad en el hato, este programa será direccionado por un técnico capacitado o por un veterinario (Wattiaux & Howard, 2013).
- **Descarte de vacas infectadas de forma crónicas:** este método es efectivo debido que en la mayoría de los hatos, solamente el 6 a 8 % de todas las vacas son responsables del 40 a 50% de todos los casos de mastitis, las vacas que se descartan tendrán un diagnóstico de mastitis clínica con pérdida de uno o varios cuartos (Wattiaux & Howard, 2013).

- **Buena nutrición mantiene la capacidad de la vaca para defenderse de las infecciones:** una dieta deficiente de selenio y vitamina E son asociadas a un incremento del grado de nuevas infecciones (Wattiaux & Howard, 2013).
- **Otras prácticas útiles de manejo:** hay que mantener un orden adecuado de las vacas que tengas diferentes condiciones, el orden es el siguiente:
  - a. Vacas sanas.
  - b. Vacas con estado de salud cuestionable: recién compradas, post tratamiento.
  - c. Vacas con mastitis crónica.
  - d. Vacas con infecciones causada por patógenos contagiosos

## 2.7 Pérdidas económicas

La principal pérdida por el efecto de mastitis clínica o subclínica es la reducción de la calidad y cantidad de leche que produce el bovino, sin embargo no existe una evidencia uniforme en cuanto a la forma de estimar la cantidad de leche que se pierde (Seegers, Fourichon, & Beaudeau, 2003).

Otros factores asociados a las pérdidas económicas son el costo del plan de control para la enfermedad, el diagnóstico veterinario, reducción de la vida útil de los animales y/o descarte, además del trabajo extra de los operadores (Halasa, 2012). El consumo de materia seca y la pérdida de peso también están asociadas a la enfermedad (Seegers, Fourichon, & Beaudeau, 2003).

Dentro del cálculo de pérdidas económicas se pueden realizar varias correlaciones entre el estado del animal, tipo de inflamación, severidad, conteo de células somáticas (CCS), grado de CMT y pruebas de laboratorio específicas a nivel de productor, tanque individual o el tanque de recolección. Cada técnica tiene sus procedimientos específicos y sirven en la estimación de pérdidas en grandes producciones (Agüero, Raspanti, Odierno, & Larriestra, 2015).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación del lugar de investigación

##### 3.1.1 Trabajo de campo

El presente estudio se realizó en la provincia de Bolívar, cantón Guaranda, parroquia Salinas, en cuatro fincas ganaderas pertenecientes a la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”.

##### 3.1.1.1 Ubicación geográfica

Los puntos de referencia de la fase de campo se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Coordenadas geográficas donde se desarrolló la fase campo*

Parámetro	Parroquia Salinas
Longitud	78° 58' 1" W
Latitud	1° 34' 8" S
Altitud	3550 m.s.n.m

##### 3.1.1.2 Ubicación geológica

Zona de vida: Páramo herbáceo.

Altitud: 3550 m.s.n.m.

Temperatura promedio anual: 13.5 °C

Precipitación: 845 mm/año

Humedad relativa: 90 %

### 3.1.2 Trabajo de laboratorio

Se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, sede Sangolquí.

### 3.2 Materiales

Los materiales reactivos y equipos serán descritos en la metodología de cada fase del estudio.

### 3.3 Métodos

La metodología para valorar el estado clínico, microbiológico y económico de mastitis bovina en la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, Bolívar – Ecuador se describirá a continuación.

El estudio se lo realizó en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, seleccionadas de acuerdo a un estudio previo en el cual se determinó la prevalencia de mastitis en todas las fincas (n=91) (Balarezo & Poveda, n.d.); a su vez determinaron que los posibles factores de riesgo son: manejo, razas, tipo de ordeño, alimentación, además de su ubicación, con estos datos se procedió a la selección de las granjas más grandes y que presentaban mastitis (Tabla 8).

**Tabla 8**

*Predios escogidos para el estudio*

Zona	Nombre Hacienda	Número de bovinos*	Tipo de ordeño
Pumin	Producoorp	70	Mecánico
Matiavi	Los Pinos	80	Mecánico
Garza Pamba	Garza Pamba	20	Mecánico
Matiavi	EL Rosal	10	Manual

\* Número de animales total de la finca

Fuente: (Balarezo & Poveda, n.d.)

### **3.3.1 Determinación de mastitis clínica y subclínica**

Esta fase del estudio se realizó en el campo, se usó el mismo procedimiento para los cuatro predios considerados en el estudio, a continuación se enlistan los materiales y reactivos.

- **Materiales y reactivos**
  - Botas de caucho
  - Overol
  - Registros de muestreo (Anexo 1 y 2 )
  - Encuestas (Anexo 4)
  - Guantes de látex desechables
  - Termómetro marca Fluke de pistola laser
  - Californian Mastitis Test marca Tecnilak
  - Paleta de CMT
  - Paleta de fondo oscuro

#### **3.3.1.1 Mastitis clínica**

##### **3.3.1.1.1 Prueba de fondo oscuro**

Fue la primera actividad que se realizó en el ordeño, para evaluar los efectos crónicos de la mastitis.

Se limpió con agua la ubre y se la secó con papel industrial, luego se procedió a ordeñar de forma manual cada pezón, descartando el primer chorro. Se tomaron los tres primeros chorros de leche en la paleta de fondo oscuro, considerando que no exista ningún anormalidad en la leche como formación de grumos, coloración, descamaciones, coágulos y pus (Wattiaux & Howard, 2013).

### 3.3.1.1.2 Evaluación de la ubre

Los signos de mastitis clínica o aguda incluyen cuartos inflamados, con temperatura elevada y dolor al tacto. Los cambios en el tamaño y la presencia de tejido cicatrizal pueden ser detectados más fácilmente luego del ordeño, cuando la ubre se encuentra vacía, sin embargo una evaluación previa permite conocer el estado pre ordeño del animal (Wattiaux & Howard, 2013).

La valoración de la ubre se la realizó antes del ordeño mediante evaluación visual y palpación de la ubre como se detalla a continuación:

Visualización: por cada pezón se verificaron cuatro parámetros zootécnicos básicos para la determinación de mastitis clínica: color de pezón (Figura 2), hidratación del pezón (aspereza o hidratación) (Figura 3), rajaduras longitudinales (Figura 4), e hiperqueratosis (callosidades a nivel de canal del pezón) (Figura 5).



**Figura 2** Valoración para el color de pezón

De izquierda a derecha: Normal (N), Azul/Rojo (A), Rojo irritado (R)

Fuente: (NMC, 2007)



**Figura 3** Valoración para la hidratación del pezón (aspereza)

De izquierda a derecha: Normal (N), Ligeramente áspero (LA), Muy áspero (MA)

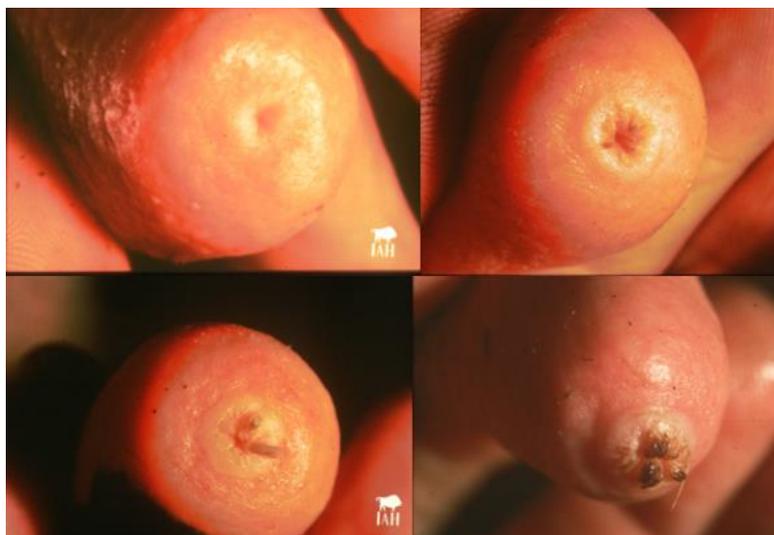
Fuente: (NMC, 2007)



**Figura 4.** Valoración para rajaduras horizontales en el pezón

De izquierda a derecha: Ninguna (N), Menor (M), Extensa (E)

Fuente: (NMC, 2007)



**Figura 5** Valoración para callosidades a nivel de pezón

De esquina superior izquierda a esquina inferior derecha: Ninguna (N), Anillo (A), Moderada (M), Extrema (E).

Fuente: (NMC, 2007)

- **Palpación:** con manos limpias se procedió a tocar toda la glándula mamaria en especial los pezones, con el objetivo de encontrar engrosamientos o inflamaciones que provoquen dolor al animal.
- **Temperatura:** Se tomó con un termómetro de pistola laser, en el centro de la ubre desde la parte posterior de la vaca.

### 3.3.1.2 Mastitis subclínica

#### 3.3.1.2.1 California mastitis test (CMT)

Esta prueba se realizó después de la prueba de fondo obscuro, se repitió la limpieza y secado de los pezones y luego se ordeñó la leche de cada pezón en la paleta de cuatro compartimentos para CMT, hasta obtener un volumen entre 3 a 5 mililitros en cada compartimento. A continuación se inclinó la bandeja en un ángulo de 60° para igualar la cantidad de leche (hasta que se encuentre en la señal del círculo externo del pocillo) y se colocó una cantidad igual del

reactivo (hasta que la mezcla quede entre la línea externa e interna del fondo del compartimento) y se mezcló suavemente durante 15 o 20 segundos, para finalizar se procedió a interpretar los resultados (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Grado de CMT, rango de células somáticas e interpretación*

Grado de CMT	Rango de Células Somáticas	Interpretación
N (negativo)	0 – 200.000	Cuarto Sano
T (Trazas)	200.000 – 500.000	Mínimamente positivo
1	400.000– 1.500.000	Poco positivo
2	800.000 – 5.000.000	Positivo
3	Más de 5.000.000	Muy positivo

Fuente: (Huijps, Hogeveen, Lam, & Oude Lansink, 2010)

### 3.3.2 Identificación, titulación y antibiograma de los agentes etiológicos

Esta fase del estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología que pertenece a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a continuación se enlistan los equipos, materiales y reactivos utilizados.

- **Materiales**
  - Frascos estériles para toma de muestra de leche
  - Guantes de látex desechables
  - Rollo de papel toalla
  - Torundas con alcohol
  - Termo
  - Gel frío
  - Cajas Petri de plástico 25 ml de capacidad
  - Cajas Petri de vidrio 30 ml de capacidad
  - Fundas ziploc
  - Placas porta objetos

- Asas de platino
- Mechero Bunsen, marca Selecta
- Probetas de 250 ml, 500 ml y 1000 ml marca, Boeco
- Frascos de vidrio, marca Boeco de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml
- Tubos de vidrio con tapa rosca
- Puntas de 1000  $\mu$ l para micropipeta
- Vasos de precipitación de 100 ml, 250 ml, 600 ml de capacidad marca Pyrex
- Gradillas plásticas.
- Parafilm
- Petrifilm 3M
- Registros de Laboratorio (Anexo 3)
- **Equipos**
  - Balanza electrónica marca Mettler Toledo, modelo PG203-S
  - Centrífuga marca Triac, modelo 420200
  - Microscopio marca Olympus Optical, modelo CH2OBIMF110
  - Incubadora marca Shell Lab. VWR, modelo 1545
  - Plancha de calor con agitación magnética
  - Autoclave marca All American modelo 25X
  - Micropipeta de rango 100  $\mu$ l a 1000  $\mu$ l, marca Boeco
- **Reactivos**
  - Agar nutriente marca Acumedia™
  - Agar sangre marca Bacto™

- Agar MacConkey marca Bacto™
- Agar Eosin Methylen Blue marca Bacto™
- Agar Streptococcus marca Bacto™
- Agar Staphylococcus marca Bacto™
- Agar Triple Sugar Iron (TSI) marca Bacto™
- Agar SIM marca BBL™
- Agar Muller Hinton marca Bacto™
- Agar Ureasa Himedia™
- Agar Methyl Red Vogues Proskauer (MRVP) Bacto™
- Agar Citrato de Simmons Bacto™
- Alcohol 70%
- Cristal violeta marca Merck®
- Lugol marca Merck®
- Alcohol cetona proporción 3 a 1 marca Merck®
- Reactivo de Kovac para prueba de Indol marca Bio-Kolor
- Safranina marca Merck®
- Rojo de metilo marca Merck®
- Alfa naftol marca Himedia™
- Rojo fenol marca Himedia™
- Peptona marca Bacto™

### 3.3.2.1 Metodología para la toma de muestra de leche

Para realizar una buena toma de muestra se preparó con anterioridad todos los materiales e instrumentos que van a ser utilizados en el procedimiento descrito por la (CBMR, 2004).

Los resultados de la prueba de CMT permitieron seleccionar la vaca y el cuarto, de donde se tomó la muestra, el pezón seleccionado debía tener un nivel de CMT de dos o tres como mínimo. La toma de la muestra se realizó de la siguiente manera:

En primer lugar se limpió el pezón con agua y alcohol de él se tomó la muestra dependiendo el grado de CMT, a continuación se secó el pezón con papel industrial.

A continuación, la persona que tomó las muestras, se colocó guantes de látex o nitrilo y procedió a realizar la desinfección localizada.

La desinfección consistió en esparcir sobre la piel del pezón alcohol al 70% utilizando una torunda humedecida de la solución, y con otra torunda se desinfectó el canal del pezón.

Posteriormente para la toma de muestra de leche, se abrió de manera cuidadosa un frasco estéril y se receptó la leche al menos un volumen aproximado de 5 ml, se repitió el proceso para cada pezón seleccionado para el análisis en laboratorio.

Se procedió a etiquetar cada frasco con el nombre o arete del animal, fecha, predio, y cuarto del que se tomó la leche. Para asegurar que la muestra no se riegue o contamine, en el traslado se la colocó en fundas con cierre hermético.

Finalmente las muestras se colocaron en un recipiente de espuma flex con gel frío para mantener una temperatura aproximada de 4 a 6 °C.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio inmediatamente.

### 3.3.2.2 Metodología para aislamiento de patógenos

#### 3.3.2.2.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo generales, específicos y pruebas bioquímicas fueron preparados entre cuatro a seis días antes de que las muestras sean llevadas al laboratorio.

- **Medios de cultivo en caja Petri**

Se procedió a medir un litro de agua destilada en una probeta graduada, luego se pesó el medio de cultivo en la balanza de precisión de acuerdo a la concentración indicada para cada uno (Tabla 10).

**Tabla 10**

*Concentración en g/L de medios de cultivo en caja Petri*

Medio de cultivo	g/ L
Agar sangre base	40
Agar MacConkey	50
Agar Eosyn Methyl Blue (EMB)	36
Agar Staphylococcus	149
Agar Streptococcus	79,4

gr/L: gramos por litro

El agua y el medio de cultivo se vertieron en un frasco de vidrio de tapa rosca BOECO, donde con un agitador magnético dentro del frasco se colocó en la plancha de calentamiento magnética con la tapa semi abierta y se procedió a hervir mezclando el agar.

Cuando el medio estaba listo (hervido durante 1 min) se lo esterilizarlo en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos junto a las cajas Petri, después se dispensaron los medios en presencia del mechero. Se dosifico aproximadamente 20 ml en cada caja Petri.

En la preparación de agar sangre se colocó un adicional de 80 ml de sangre humana por litro de medio de cultivo autoclavado, y en el agar *Staphylococcus* se colocó rojo de fenol a 0,025 gr en un litro de medio de cultivo antes de autoclavarlo.

- **Medios de cultivo en tubos con tapa rosca.**

Se procedió a medir un litro de agua destilada en una probeta graduada, luego se pesó el medio de cultivo en la balanza de precisión de acuerdo la concentración indicada para cada uno (Tabla 11).

**Tabla 11**

*Concentración en gramos/litro de medios de cultivo en tubos tapa rosca*

Medio de cultivo	g/ L
Agar nutriente	23
Agar citrato de Simmons	24,2
Agar Triple Sugar Iron	65
Agar SIM	30
Agar Urea	25
Agar MRVP	17

g/L: gramos por litro

El agua y el medio de cultivo se colocaron en un frasco de vidrio de tapa rosca BOECO, donde con un agitador magnético dentro del frasco se colocó en la plancha de calentamiento magnética y se procedió a hervir mezclando el agar.

Cuando el medio estaba listo (hervido durante 1 minuto) se procedió a dispensar en tubos con tapa rosca un aproximado de 2 ml en cada tubo, ya dispensados se los autoclavó durante 15 minutos a 121 °C de temperatura y 15 psi de presión.

Al salir del proceso, se cerró cada tubo para que los medios no se contaminen, se los enfrió de forma vertical (SIM y MRVP) y reposo a temperatura ambiente inclinados con un ángulo aproximado de 15 °C (Agar Nutriente, TSI, Urea, Citrato de Simmons).

Para finalizar se los guardó en una refrigeradora a 4°C.

### **3.3.2.2.2 Siembra en caja Petri**

El proceso para el sembrado de las muestras en caja Petri, frente del mechero fue el siguiente:

- Se diluyó cada muestra de leche en 99 ml de agua peptonada obteniendo una disolución 1:100, se agitó 25 veces para distribuir toda la muestra en el medio.
- Se tomó 0.1 ml de dilución con la micropipeta, y se lo colocó en el centro de cada medio de cultivo (Agar MacConkey, agar sangre, agar *Staphylococcus*, agar *Streptococcus* con rojo de fenol, agar EMB).
- Colocado el volumen de dilución en el medio de cultivo, se esparció con un asa de vidrio (esterilizada con alcohol al 70% y exposición breve al fuego), dentro de la caja Petri para la correcta homogenización de la dilución por todo el medio en forma circular por 20 veces.
- Se tapó la caja Petri, selló con parafilm y etiquetó.
- Se incubaron los medios a 38°C, y se observó si existió crecimiento microbiano a las 18, 24, 42 y 48 horas de incubación.

#### **3.3.2.2.3 Siembra en Petrifilm**

Para el complemento del análisis microbiológico en el laboratorio y como pruebas confirmatorias, se sembró cada muestra en medios de cultivo express y específicos llamados Petrifilms. Para el estudio se utilizó medios para *Staphylococcus* y entero bacterias, y se realizó el siguiente proceso en presencia del mechero:

- De la dilución preparada se tomó con micro pipeta 1 ml de muestra.
- Se abrió el Petrifilm con cuidado y se colocó el volumen en el centro del medio para distribuirlo de manera uniforme.
- De manera cuidadosa se cubrió el medio con la cinta (film) que incluye el medio específico.
- Con el esparcidor se distribuyó la muestra en todo el medio.

- Se incubó a 38°C durante 24 horas y observó.

#### **3.3.2.2.4 Aislamiento de microorganismos**

En presencia del mechero, una vez desinfectado el lugar de trabajo y seleccionados los medios de cultivo que presentaron crecimiento microbiano se aislaron los microorganismos. Se realizó el siguiente proceso en frente del mechero:

- Se obtuvo la muestra de la colonia que creció en el medio de cultivo con el asa de platino (esterilizada en el mechero y enfriada).
- En el tubo de tapa rosca con medio agar nutriente se sembró en zigzag de manera homogénea por todo el medio la muestra de la colonia, se cerró, flameó y etiquetó el tubo.
- Al tubo se lo colocó a incubación durante 24 horas a 38° C.

#### **3.3.2.2.5 Tinción Gram**

La primera prueba de identificación fue la tinción Gram, que permite diferenciar bacterias Gram positivas (azul o violetas) de Gram negativas (rosas o rojas), así como forma y agrupación. Se realizó primero el frotis del cultivo aislado de la siguiente manera:

- Se lavó un portaobjetos con agua, jabón y etanol al 70%, y se lo secó con papel.
- Se etiquetó el porta objetos de acuerdo al cultivo aislado.
- Se colocó una gota de agua.
- Se obtuvo poca muestra del cultivo sólido.
- Se mezcló y se esparció.
- Se secó y se fijó al calor del mechero.

Con el frotis realizado se procedió a realizar la tinción Gram de la siguiente manera:

- Mediante inundación se colocó violeta de genciana durante un minuto.
- Se desechó el colorante y se inundó con lugol o yodo Gram la placa.

- Se desechó el lugol y se decoloró con alcohol cetona la muestra mediante goteo de 5 a 10 gotas por placa sobre todo el frotis.
- Por último se colocó el colorante de contraste llamado safranina durante un minuto, se desechó, enjuagó la placa y se la secó sin quitar el frotis de la placa.

Las placas secas fueron llevadas al microscopio donde se observaron con el lente 100X y aceite de inmersión, para diferenciar bacterias Gram positivas de Gram negativas.

La forma y la agrupación de los microorganismos permitió diferenciarlas entre bacilos (forma alargada y cilíndrica), coco bacilos (forma rectangular con filos bordeados), cocos (forma circular), estreptococos (cocos agrupados en cadenas de al menos 7 unidades) y estafilococos (cocos agrupados en forma de racimos).

Este procedimiento se repitió para todas las cepas aisladas en tubos con agar nutriente.

### **3.3.2.3 Pruebas para la identificación de patógenos**

Para la identificación de los aislados obtenidos se realizaron pruebas bioquímicas de los patógenos de los tubos con agar nutriente purificados e identificados según la tinción Gram. Las claves sugeridas para la identificación de los microorganismos se detallan en los Anexos 11, 12, 13 y 14.

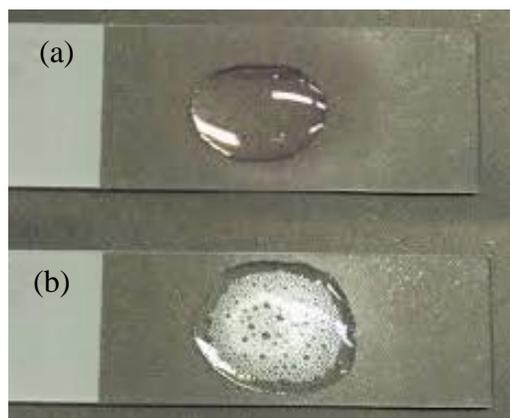
#### **3.3.2.3.1 Pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas**

- **Catalasa:** es una prueba que detecta la producción de la enzima catalasa y permite diferenciar *Staphylococcus* (reacción positiva con burbujeo) de *Streptococcus* (reacción negativa) (Figura 6) (Brown A. , 2007).

La prueba se la realizó de la siguiente manera:

- En una placa porta objetos se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.

- A continuación, en presencia del mechero se extrajo una muestra de un cultivo aislado con un asa de platino esterilizada, el asa con el cultivo bacteriano se mezcló con la gota de peróxido de hidrógeno y se observó.

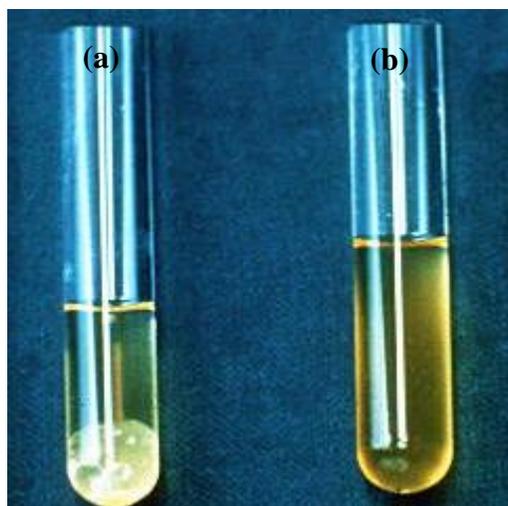


**Figura 6** Prueba de catalasa. (a) reacción negativa (b) reacción positiva

- **Coagulasa:** es una prueba para detectar la presencia de la proteína llamada coagulasa que al reaccionar con la protrombina de la sangre forma un complejo llamado estafilotrombina (reacción positiva) (Figura 7), permite diferenciar entre diferentes tipos de *Staphylococcus*, la reacción positiva indica la presencia de *S. aureus*. Se realizó la prueba de la siguiente manera:
  - Se tomó varios ml de sangre humana en tubos con anticoagulante EDTA, se extrajo el plasma de la muestra de sangre en centrífuga a 3000 rpm durante cinco minutos.
  - A continuación en presencia del mechero se tomó 0.5 ml de plasma para colocarlo en un tubo estéril de vidrio.
  - En el tubo estéril con 0.5 ml de plasma se colocó una muestra considerable de cultivo bacteriano, se mezcló y selló.

- Los tubos mezclados con el cultivo bacteriano y el plasma se los colocó en la incubadora a 38 °C y se observó en un período de cuatro horas.

Estas dos pruebas bioquímicas se repitieron para cada cepa de *Staphylococcus* Gram positivo.



**Figura 7** Prueba de coagulasa

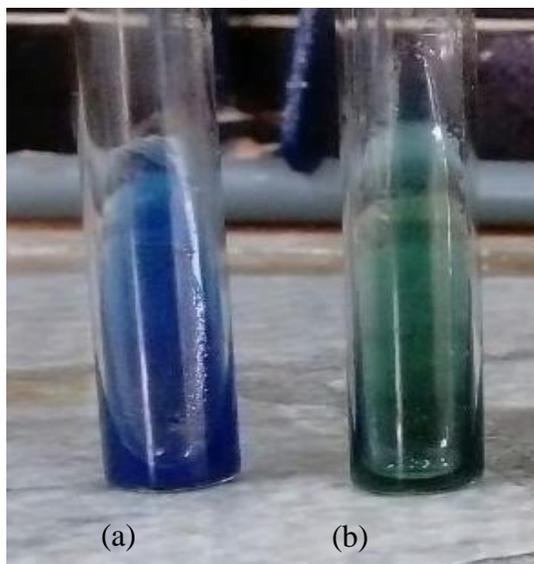
(a) resultado positivo (b) resultado negativo

### 3.3.2.3.2 Pruebas bioquímicas para bacterias Gram negativas

- **Citrato de Simmons:** El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces cambia al azul (Figura 8) y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa (Brown A. , 2007).

La prueba se realizó de la siguiente manera:

- En un tubo con agar citrato de Simmons, solidificado en posición inclinada, se sembró una muestra del cultivo bacteriano.
- La siembra consistió en tomar una muestra del cultivo puro y esparcirlo en el medio Citrato de Simmons (similar al proceso de siembra de cultivo puro), realizando una punción al fondo del agar. Todo en presencia del mechero.
- Para finalizar se incubó a 38 °C durante 24 horas, y se observarán los resultados.



**Figura 8** Prueba Citrato de Simmons

(a) resultado positivo, (b) resultado negativo

- **SIM:** Medio de cultivo en el cual la tripteína y la peptona aportan nutrientes para el desarrollo microbiano. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol.

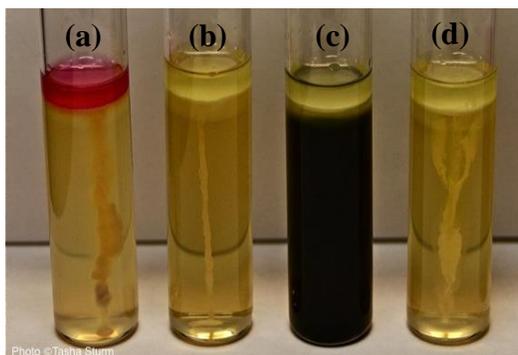
En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Ehrlich o de Kovac's, para originar un compuesto de color rojo (Figura 9<sup>a</sup>)

A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro (Figura 9<sup>c</sup>)

El agar es el agente solidificante y a esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio (Figura 9<sup>d</sup>) o por crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo y cuando el medio no es turbio y no se difunde más allá de la línea de siembra (Figura 9<sup>b</sup>).

- En el medio SIM preparado de manera previa se sembró por estocada una muestra de cultivo bacteriano de interés.
- La siembra por estocada consistió en tomar una muestra de cultivo bacteriano con un asa de platino con la punta en forma de aguja y estocar en medio del agar SIM sin tocar el fondo del tubo.

- Se incubó a 38 °C durante 24 horas y se observó los resultados.



**Figura 9** Prueba SIM

- (a) motilidad positiva, indol positivo
- (b) motilidad negativa, indol negativo
- (c) producción de ácido sulfhídrico
- (d) motilidad positiva, indol negativo

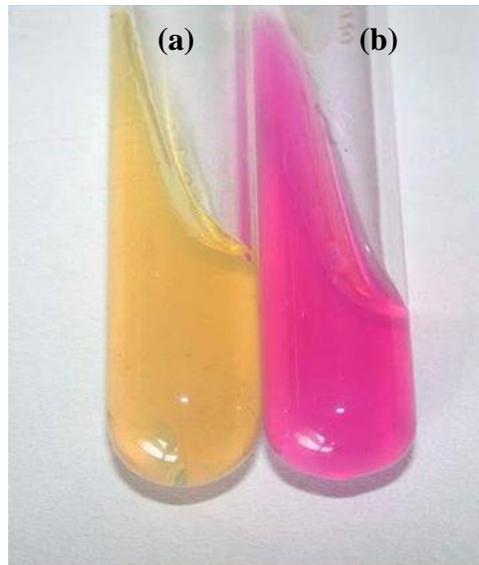
Fuente: (Brown A. , 2007)

- **Ureasa:** Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea, como especies de *Enterobacter* o *Klebsiella* (Brown A. , 2007).

La reacción positiva indica un cambio de color de amarillo a rojo, fucsia o rosado (Figura 10).

- En un tubo con agar ureasa, solidificado en posición inclinada, se sembró una muestra del cultivo bacteriano.

- La siembra consistió en tomar una muestra del cultivo puro y esparcirlo en el medio Ureasa (similar al proceso de siembra de cultivo puro), realizando una punción al fondo del agar. Todo en presencia del mechero.
- Para finalizar se incubó a 38 °C durante 24 horas; y se observarán los resultados.



**Figura 10** Prueba Ureasa

(a) resultado negativo (b) resultado positivo

Fuente: (Brown A. , 2007)

- **MRVP:** El medio de cultivo contiene pluripeptona que aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable.

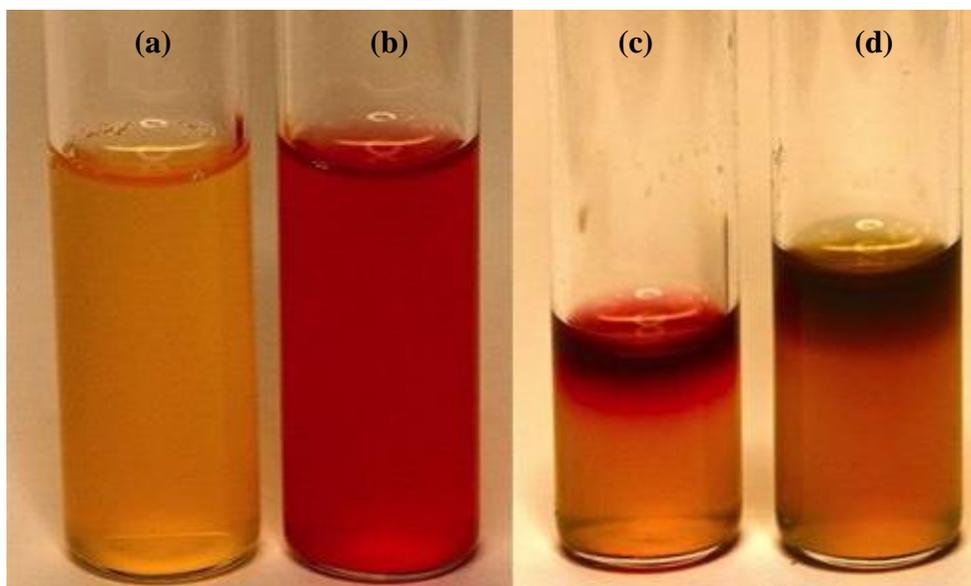
La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol) (Brown A. , 2007).

Esta diferencia en el metabolismo bacteriano puede ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo (Figura 11<sup>a,b</sup>), para revelar la presencia de productos

ácidos, y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros (Figura 11<sup>c,d</sup>).

Para esta prueba se realizó el siguiente proceso:

- En tubos con medio MRVP (medio líquido) se sembró el cultivo bacteriano de interés.
- La siembra consistió en tomar una muestra del cultivo bacteriano con el asa de platino esterilizada y enfriada, llevarla al tubo que contiene el medio, agitar y sellar. Todo el proceso en presencia del mechero, y dos veces por cada muestra, es decir dos tubos.
- Se procedió a incubar a 38°C durante 24 horas.
- Posterior a la incubación se añadió los reactivos: rojo de metilo en un tubo y alfa naftol en el otro tubo para interpretar resultados.



**Figura 11** Prueba de MRVP

(a) resultado negativo para indol, (b) resultado positivo para indol,  
 (c) resultado negativo para Voges Proskauer, (d) resultado positivo para Voges Proskauer

Fuente: (Brown A. , 2007)

- **Triple Sugar Iron:** En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano.

La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones  $Fe^{+3}$ , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante (Brown A. , 2007).

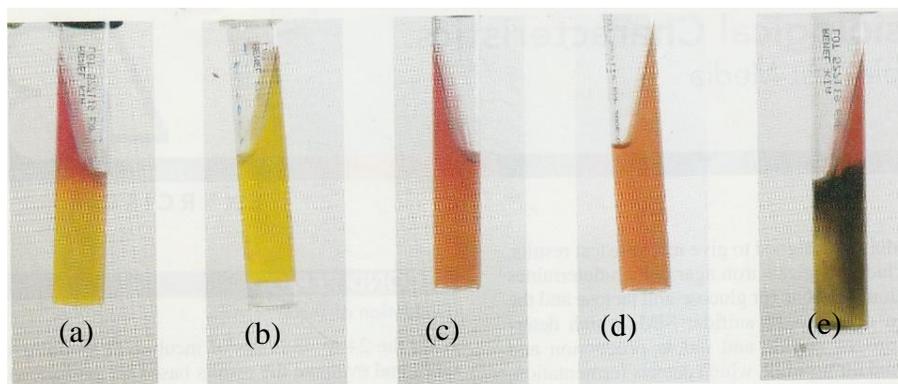
Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

Si existe fermentación de glucosa y no de lactosa el resultado se interpreta como alcalino/alcalino (A/A) (Figura 12<sup>a</sup>), cuando existe fermentación de glucosa y lactosa se fermentan se interpreta como ácido/ácido con gas (a/a) (Figura 12<sup>b</sup>), si no existe fermentación de azúcar ni lactosa ni glucosa se la interpreta como alcalino/sin cambio (K/0) (Figura 12<sup>c</sup>); si el medio no presentó cambios visuales observables se lo interpreta como sin inocular (0/0) (Figura 12<sup>d</sup>)

El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro (Figura 12<sup>e</sup>).

El proceso se realizó de la siguiente manera:

- En un tubo con agar TSI, solidificado en posición inclinada, se sembró una muestra del cultivo bacteriano.
- La siembra consistió en tomar una muestra del cultivo puro y esparcirlo en el medio TSI (similar al proceso de siembra de cultivo puro), realizando una punción al fondo del agar. Todo en presencia del mechero.
- Para finalizar se incubó a 38 °C durante 24 horas; y se observaron los resultados.



**Figura 12** Prueba de TSI (Triple azúcar hierro)

- (a) alcalino/alcalino; (b) ácido/ácido con gas;  
 (c) alcalino/Sin cambio; (d) sin inocular;  
 (e) producción de sulfuro de hidrógeno

Fuente: (Brown A. , 2007)

### 3.3.2.4 Metodología para la realización de antibiogramas

En agar Muller Hilton preparado 24 horas previo al procedimiento, se sembró las cepas asiladas de los microorganismos en dos cajas Petri cada cultivo puro, en presencia del mechero se colocó con pinzas metálicas tres sensidiscos con antibiótico dispuestos de manera uniforme (separadas la misma distancia formando un triángulo equilátero, y sin estar muy cerca al borde de la caja) dentro de la caja Petri. Las concentraciones de los sensidiscos se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12**

*Concentración de los antibióticos y su disposición en las cajas Petri*

Antibiótico	Concentración	Caja Petri
Ampicilina	10 µg	1
Bacitracina	10 UI	1
Neomicina	30 µg	1
Oxitetraciclina	30 µg	2
Cefotaxima	30 µg	2
Penicilina G	10 UI	2

µg: Micro gramos; UI: Unidades internacionales

Cada caja se selló con parafilm y se incubó durante 24 horas a 38 °C.

Se evaluó la resistencia o sensibilidad de cada agente microbiano de acuerdo al halo de inhibición que forma cada cultivo según la Tabla 13.

**Tabla 13**

*Interpretación de sensibilidad de bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras a diferentes agentes antibióticos.*

Antibiótico	Microorganismo	Diámetro de inhibición en mm		
		R	I	S
Bacitracina		≤8,0		≥9,0
Oxitetraciclina		≤11,0	12-14	≥15,0
Neomicina		≤12,0	13-16	≥17,0
Penicilina	<i>Staphylococcus</i> sp.	≤28,0		≥29,0
	Enterobacteriae	≤14,0		≥15,0
	<i>Streptococcus</i> sp.	≤23,0		≥24,0
Ampicilina	<i>Staphylococcus</i> sp.	≤28,0	14-16	≥29,0
	Enterobacteriae	≤13,0		≥17,0
	<i>Streptococcus</i> sp.			≥29,0
Cefotaxima	<i>Staphylococcus</i> sp.	≤14	15-22	≥23
	Enterobacteriae	≤22,0	23-28	≥29,0
	<i>Streptococcus</i> sp.	≤25,0	26-27	≥28,0

R: resistente, I: intermedio, S: sensible, mm: milímetros

Fuente: (CLSI, 2015)

La selección de los antibióticos se realizó de acuerdo a los principios activos más utilizados en la zona para el control de mastitis.

### 3.3.3 Metodología para medir la producción de la leche

Se promedió el volumen total entregado por el productor a la quesera “El Salinerito”, entre el número total de bovinos en producción el día de la toma de muestras.

### 3.3.4 Metodología para estimar las pérdidas económicas de las fincas en estudio

Se estimó las pérdidas económicas de acuerdo al volumen promedio que produjo cada animal por cuarto y mediante la disminución de producción de leche en porcentaje según el nivel de CMT (Tabla 14) en las cuatro fincas el día del muestreo, se multiplicó la pérdida diaria calculada por el precio que ofrece la empresa por cada litro de leche (44 centavos de dólar), se obtuvo la pérdida diaria y mensual de cada finca.

**Tabla 14**

*Relación entre grado de CMT y porcentaje de disminución de la producción de leche en porcentaje.*

Grado de CMT	CCS/ml*	Disminución de producción de leche en porcentaje
Negativo	0 – 200.000	5
Trazas	200.000 – 500.000	10
Grado 1	400.000– 1.500.000	22
Grado 2	800.000 – 5.000.000	33
Grado 3	Más de 5.000.000	45

CCS/ml: Concentración de células somáticas por mililitro

Fuente: (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991)

### **3.3.5 Productos obtenidos y beneficiarios**

Esta investigación fue difundida mediante charlas a todos los miembros y directivos de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”, los principales temas tratados fueron: la presencia de agentes etiológicos de mastitis infecciosos y/o medio ambientales, además del posible control preventivo o curativo que se debería aplicar.

Complementariamente se elaboró y entregó a los productores un manual enfocado en los puntos críticos de la enfermedad en el ordeño mecánico y manual (Anexo 5).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Resultados

El estudio contó con un total de 232 muestras de leche obtenidas de los cuartos de la ubre de 58 vacas en producción en cuatro diferentes fincas de la parroquia Salinas perteneciente al cantón Guaranda, Bolívar Ecuador. Los 232 cuartos fueron evaluados con CMT, prueba de fondo obscuro y parámetros clínicos.

La prevalencia de mastitis subclínica por animal en el área de estudio fue del 84,5%. La prevalencia en las diferentes fincas fue 96,2% en Producoorp, 81,8% en los Pinos, 61,5% en Garza Pamba y 87,5% en el Rosal (Tabla 15).

**Tabla 15**

*Prevalencia de mastitis subclínica en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”*

Finca	Vacac positivas		Vacac negativas		Total
	n	%	n	%	
Producoorp	25	96,2	1	3,8	26
Los Pinos	9	81,8	2	18,2	11
Garza Pamba	8	61,5	5	38,5	13
El Rosal	7	87,5	1	12,5	8

n: número de animales, %: porcentaje de animales

El color de pezón fue el primer parámetro clínico evaluado, todos los cuartos presentaron un color normal independiente de la prevalencia de mastitis.

En función de los niveles de sequedad del pezón, los cuartos con mastitis (n=111), el de mayor prevalencia fue muy áspero con el 82,9% ver detalle Tabla 16.

**Tabla 16**

*Prevalencia de mastitis de cuartos positivos a CMT, relacionada con el nivel de sequedad de pezones, en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”.*

Nivel de sequedad	Cuartos positivos	
	n	%
Normal	6	5,4
Ligeramente áspero	13	11,7
Muy áspero	92	82,9
Total	111	47,8

n: número de cuartos, %: porcentaje

La mayor prevalencia de mastitis para el parámetro rajaduras en los pezones fue para la calificación ninguna (84,7%), seguida de la calificación menor (8,1%) y al final la calificación extensa con 7,2% (Tabla 17).

**Tabla 17**

*Prevalencia de mastitis de cuartos positivos a CMT, relacionada con el nivel de surcos en los pezones, en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”*

Nivel de rajaduras	Pezones positivos	
	N	%
Ninguna	94	84,7
Menor	9	8,1
Extensa	8	7,2
Total	111	100

n: número de cuartos, %: porcentaje

El último parámetro clínico evaluado fue nivel de callosidades en el orificio del pezón; la mayor prevalencia de mastitis con CMT positivo en los cuartos fue para el nivel Ninguna con 97,3%; el siguiente fue el nivel Anillo con 1,2%; los niveles Moderada y Extrema presentaron 0% que fue el menor porcentaje (Tabla 18).

**Tabla 18**

*Prevalencia de mastitis de cuartos positivos a CMT, relacionada con el nivel de callosidades en los pezones, en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”*

Nivel de callosidades	Pezones positivos	
	N	%
Ninguna	108	97,3
Anillo	3	2,7
Moderada	0	0
Extrema	0	0
Total	111	100

n: número de cuartos, %: porcentaje

De todas los animales analizados (n=59), las que se obtuvieron de vacas en etapa de lactancia entre 4 a 8 meses (Etapa media) presentaron el más alto porcentaje de CMT positivo (59,2%); luego estuvieron las vacas entre 0 a 4 meses de lactación (etapa inicial) con 24,5% y al final las vacas en etapa de lactancia entre 8 a 12 meses (Etapa Final) (16,3%) que presentó el menor porcentaje (Tabla 19)

**Tabla 19**

*Prevalencia de mastitis de acuerdo a la etapa de lactancia en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”*

Etapa	Positivo	
	n	%
Lactancia		
Inicio	12	20,7
Medio	29	50,0
Final	8	13,8
Total	49	84,5

n: número de animales, %: porcentaje

Inicio: 0-3 meses de lactancia,

medio: 4-8 meses de lactancia,

final: 9-12 meses de lactancia.

Los resultados en la Tabla 20, muestran la diversidad de microorganismos responsables de generar mastitis subclínica en las vacas del estudio. De todos los medios de cultivo sembrados (n=170), el 60,6% no tuvo crecimiento mientras que en el 35,3% crecieron bacterias Gram positivas, en el 2,9% bacterias Gram negativas y el 1,2% levaduras.

De todos los microorganismos aislados (n=67) el 55,2% fue *Staphylococcus aureus*, 26,9% *Bacillus* sp., 6,0% *Staphylococcus* sp, 3,0 % de Levaduras y *Klebsiella* sp. 1,5% *Shigella* sp., *Streptococcus* sp, *Escherichia Coli* y *Enterobacter* sp. (Tabla 22).

Las pruebas realizadas a bacterias Gram negativas se muestran en el Anexo 10

**Tabla 20**

*Resultados de la siembra de muestras de leche (n=34) en agar MacConkey, Sangre, Staphylococcus, Streptococcus y Eosin Methyl Blue; y tinción Gram.*

Medio de cultivo	Sin crecimiento		Con crecimiento					
			Gram Positivas		Gram negativas		Levaduras	
	N	%	n	%	N	%	N	%
Agar MacConkey	32	18,8	1	0,6	1	0,6	0	0,0
Agar Sangre	14	8,2	17	10,0	2	1,2	1	0,6
Agar <i>Staphylococcus</i>	7	4,1	27	15,9	0	0,0	0	0,0
Agar <i>Streptococcus</i>	23	13,5	10	5,9	1	0,6	0	0,0
Agar Eosin Methyl Blue	27	15,9	5	2,9	1	0,6	1	0,6
Total medios sembrados	103	60,6	60	35,3	5	3,9	2	1,2

n= número de medios con o sin crecimiento, % porcentaje de crecimiento respecto al total de muestras sembradas

**Tabla 21**

*Aislamiento de agentes microbianos de mastitis obtenidas de 34 muestras de leche en diferentes medios de cultivo selectivos.*

Microorganismo Aislado	Medio de cultivo					Total	
	Agar MacConkey	Agar Sangre	Agar Staphylococcus	Agar Streptococcus	Agar Eosin Methyl Blue	n	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8	16	8	5	37	55,2
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	3	0	1	0	4	6,0
<i>Streptococcus sp.</i>	0	0	1	0	0	1	1,5
<i>Escherichia coli</i>	0	1	0	0	0	1	1,5
<i>Shigella sp.</i>	0	0	0	1	0	1	1,5
<i>Klebsiella sp.</i>	1	1	0	0	0	2	3,0
<i>Enterobacter sp.</i>	0	0	0	0	1	1	1,5
<i>Bacillus sp.</i>	1	6	10	1	0	18	26,9
Levaduras	0	1	0	0	1	2	3,0
Total	2	20	27	11	7	67	100,0

n: número de cepas aisladas, %: porcentaje de cepas aisladas

Además para todas las muestras se realizó una prueba complementaria de cultivo en Petrifilms selectivos tanto para *Staphylococcus* como para enterobacterias de cada muestra, el crecimiento que presentaron fue de 76,5% y 5,9% respectivamente (Tabla 22).

**Tabla 22**

*Crecimiento en porcentaje de agentes microbianos de 34 muestras de leche en Petrifilms específicos para Staphylococcus y enterobacterias*

Tipo de Petrifilm	Sin crecimiento		Con crecimiento		Total	
	N	%	n	%	n	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	23,5	26	76,5	34	50
Enterobacterias	32	94,1	2	5,9	34	50
Total	40	58,8	28	41,2	68	100

n: número de cultivos sin crecimiento o con crecimiento, %: porcentaje

La susceptibilidad o resistencia de los microorganismos patógenos causantes de mastitis frente a seis diferentes antibióticos se muestra en la (Tabla 23). Las bacterias Gram positivas mostraron sensibilidad para algunos antibióticos, las cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron una susceptibilidad a bacitracina, neomicina, cefotaxima y oxitetraciclina. Las cepas de *Staphylococcus sp.* también presentaron susceptibilidad a bacitracina, neomicina, cefotaxima y además para oxitetraciclina. Las cepas de *Bacillus sp.* fueron susceptibles a oxitetraciclina y a

cefatoxima, y por último la cepa de *Streptococcus* sp. fue susceptible para todo los antibióticos probados, pero no para oxitetraciclina

Las bacterias Gram negativas mostraron una susceptibilidad variada, *Enterobacter* sp. fue susceptible para todos los antibióticos; *Klebsiella* sp. fue susceptible para cefatoxima, oxitetraciclina, neomicina, y penicilina; *Shigella* sp. fue susceptible para bacitracina y Cefotaxima y por último *Escherichia coli* fue susceptible solo para ampicilina.

Existió resistencia de los microorganismos que producen la mastitis hacia los antibióticos evaluados, las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* fueron resistentes a penicilina y ampicilina; *Bacillus* sp. también fue resistente para los antibióticos antes mencionados, así como para bacitracina y además, *Staphylococcus* sp. solo fue resistente a penicilina.

Las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* fue resistente a bacitracina, oxitetraciclina, neomicina, penicilina; las dos cepas de *Klebsiella* sp. fueron resistentes a bacitracina, penicilina y ampicilina; la cepa de *Shigella* sp. fue resistente para oxitetraciclina, neomicina, penicilina y ampicilina.

**Tabla 23**

*Susceptibilidad y resistencia in vitro de microorganismos causantes de mastitis a antibióticos en vacas lecheras de cuatro fincas pertenecientes a la parroquia de Salinas, cantón Guaranda, Bolívar, Ecuador*

Microorganismo	Bacitracina	Oxitetraciclina	Neomicina	Penicilina	Ampicilina	Cefotaxima
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	S
<i>Staphylococcus</i> sp.	S	S	S	R	R	S
<i>Streptococcus</i> sp.	S	I	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	S	I
<i>Klebsiella</i> sp.	R	S	S	S	R	S
<i>Enterobacter</i> sp.	S	S	S	S	S	S
<i>Shigella</i> sp.	S	R	R	R	R	S
<i>Bacillus</i> sp.	R	S	I	R	R	S

S: Susceptible, I: Resistencia intermedia, R: Resistente

El detalle de cada uno de los antibiogramas por finca y agente patógeno se muestran en los Anexos 6, 7, 8 y 9, resultados que ayudaron a la determinación de la susceptibilidad de cada patógeno.

#### Pérdidas Económicas.

La mayor pérdida que generó la enfermedad medida en litros promedio por animal por día fue en Producoorp con 192,3 litros, le sigue El Rosal con 69,6 litros, a continuación Garza Pamba con 64,1 litros y al final Los Pinos con 53,94 litros (Tabla 24<sup>a</sup>).

De las cuatro fincas en estudio la que mayor pérdida económica fue Producoorp con 84,60 dólares, le sigue El Rosal con 30,61 dólares seguida de Garza Pamba con 28,21 dólares y al final Los Pinos con 23,73 dólares de pérdida al día (Tabla 24<sup>b</sup>)

**Tabla 24**

*Pérdida en litros y dólares estimada por mastitis en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”*

Finca	Pérdida en litros por día <sup>a</sup>		Pérdida en dólares <sup>b</sup>	
	Vaca promedio	Finca	Por día	Por mes
Producoop	7,4	192,27	84,60	2537,96
Los Pinos	4,9	53,94	23,73	712,01
Garza Pamba	4,9	64,11	28,21	846,25
El Rosal	8,7	69,57	30,61	918,32

Con la información levantada de la encuesta (Anexo 4), se elaboró un manual de buenas prácticas de ordeño de acuerdo a los puntos críticos que tenían en común cada finca en estudio, los puntos que se tomaron en cuenta fueron: tipo de ordeño, capacitación del personal, disponibilidad de agua potable, tipo de instalaciones, lavado y secado de pezones, despunte al inicio del ordeño, sellado de pezones y envase para el transporte de leche (Tabla 25).

**Tabla 25**

*Puntos críticos en común según la encuesta aplicada a las cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”*

Finca	Producoop	Los Pinos	Grazapamba	El Rosal
Animales en ordeño	26	25	13	8
Animales totales	70	80	20	10
Tipo de ordeño	Mecánico	Mecánico	Mecánico	Manual
Personal capacitado	No	No	No	No
Agua potable	No	No	No	No
Instalaciones	Ninguna	Ninguna	Establo	Ninguna
Lavado de ubre	No	Si	Si	Si
Secado de ubre	No	No	No	No
Despunte	No	No	No	No
Sellado	No	No	No	No
Tipo de envase que transporta la leche	Bidón acero inoxidable	Bidón acero inoxidable	Bidón acero inoxidable	Bidón acero inoxidable

## 4.2 Discusión

Dentro de los objetivos del presente estudio se realizó la valoración clínica, aislamiento, tipificación y antibiogramas de agentes causales de mastitis, además de la estimación de las pérdidas económicas que genera la enfermedad en cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito”

De un total de 58 animales, se evaluó mediante exploración clínica, fondo oscuro y prueba california de mastitis cada uno de los cuartos (n=232), de los cuales se tomaron muestras positivas a CMT, de grado 2 o 3 para el aislamiento, tipificación y antibiograma de agentes causales de mastitis. También se calcularon las pérdidas económicas de acuerdo al nivel de CMT que presentaron los cuartos de la ubre, y en base a los puntos críticos obtenidos en la encuesta se elaboró un manual de buenas prácticas de ordeño.

La valoración clínica de los cuartos contempló color, rajaduras horizontales y callosidades en la punta del canal de los pezones, junto a palpación, temperatura y posición de la ubre los cuales no mostraron mayor influencia en la prevalencia de mastitis, sin embargo la sequedad de los pezones presentó un 82,9% (92/111) de prevalencia, pero este resultado puede no deberse a una correlación directa entre la enfermedad y este parámetro de evaluación clínica, ya que las condiciones medio ambientales de las fincas en estudio son adversas; las bajas temperatura, baja humedad relativa y corrientes eólicas fuertes predisponen a los pezones a la resequead. La NMC, (2007) dispone estos parámetros de evaluación para la condición de la piel en pezones que presentan cuadros clínicos graves o crónicos de mastitis, por esta razón no se encontraron estudios específicos basados en este tipo de parámetros, ya que la mastitis se presenta mayormente de manera subclínica, resultados ya obtenidos por (Unnerstad, y otros, 2009).

En base a la prueba de CMT la prevalencia de mastitis por animal fue del 84,5% (49/58), siendo Producoorp la finca de mayor porcentaje en el estudio con 96,2% (25/26). Con respecto a los cuartos analizados el 47,8% (111/232) presentaron mastitis subclínica.

De todas las muestras analizadas (n=232), 47,8 % (111/232) fueron positivas a CMT. La finca que tuvo la mayor prevalencia de mastitis subclínica por animal fue Producoorp con 43,1% (25/58) en comparación con las demás fincas que la menor prevalencia la presentó Garza Pamba 13,8% (8/59).

Los resultados obtenidos muestran que la prevalencia de mastitis en el área de estudio es de origen contagioso. Dentro de la mastitis de origen contagioso *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. son los más importantes patógenos responsables de la inflamación (Baskaran, Kazmer, Hinckley, Andrew, & Venkitanarayanan, 2009). Sin embargo debido a diferentes razones la prevalencia en el área de estudio fue muy alta, las malas condiciones durante el proceso de ordeño, la escasa higiene de la ubre, el incorrecto uso de antibióticos, sellado de pezones, son algunos de los factores que afectan la prevalencia de la enfermedad, hallazgos ya observados por (Haltia, Honkanen-Buzalski, Spiridonova, Olkonen, & Mylly, 2006).

Los factores más importantes relacionados a mastitis como: período de secado (Green, Bradley, Medley, & Browne, 2007), sanidad de la ubre, carencia de buenas prácticas de ordeño (Mungube, y otros, 2005), etapa de lactancia (Regassa, Golicha, Tesfaye, Abunna, & Megersa, 2013) número de partos, raza (Almaw, Zerihun, & Asfaw, 2008), alimentación e índice de reemplazo de vacas (McDougall, 1999), así como pruebas de diagnóstico, indican que la alta prevalencia en el estudio se debe a la falta o escasa importancia que el productor le concede a estos factores, ya que dentro de la encuesta se pudieron observar las condiciones en la que la finca trabaja.

(Ahmad, y otros, 2012) expusieron que una alta prevalencia de mastitis se debe a un deficiente control en la higiene dentro del proceso de ordeño, esto se debe a la ausencia del lavado y secado de la ubre, deficiencias en el equipo de ordeño, aseo del personal, que pueden ser vectores de proliferación de la enfermedad, especialmente de la mastitis contagiosa.

La alta prevalencia (84,5%) de mastitis subclínica encontrada en el estudio es una muestra de los problemas en la salud de las ubres de los bovinos, que podría afectar de manera negativa la producción de leche además de la salud de los consumidores y producción de sus derivados.

Del 47,8% (111/232) de cuartos positivos a la prueba de CMT, se tomaron 34 muestras que presentaron un grado de mastitis subclínica de 2 o 3, y se los sembró en distintos medios de cultivo en el laboratorio. El 15,9% creció en agar *Staphylococcus*, 11,8% en agar sangre, 6,5% en agar *Streptococcus*, 4,1% en agar Eosin Methyl Blue y 1,2% en agar MacConkey. (Ruiz, y otros, 2011), reportaron un crecimiento del 61 %, (Persson, Nyman, & Grönlund-Andersson, 2011) un 88% de muestras con CMT positivo cultivadas en agar sangre, además (Islam, Samad, & Rahman, 2011) obtuvieron solo un 39% de crecimiento en agar sangre y 61% en EMB. (Olivares, y otros, 2015) en base del número total de muestras obtuvieron el 52,5% de crecimiento en agar sangre, 27,5% en MacConkey y solo el 20% en EMB.

En el presente estudio se utilizaron medios de crecimiento (agar *Staphylococcus* y *Streptococcus*) que no son comunes dentro de los estudios microbiológicos para detectar los agentes etiológicos de mastitis, por lo general se utilizan medios de cultivo como agar sangre, agar Eosin Methyl Blue (EMB) y agar MacConkey, medios ya utilizados por (Abebe R. , Hatiya, Abera, Mergersa, & Asmare, 2016) (Barlow, 2011) (Fagundes, Barchesi, Nader Filho, Ferreira, & Fernandes, 2010) (Jamali, Radmehr, & Ismail, 2014) (Persson, Nyman, & Grönlund-Andersson, 2011).

Comparados con otros estudios, los porcentajes de crecimiento de patógenos que provocan mastitis obtenidos durante el trabajo son bajos. Uno de los factores que pudo afectar el crecimiento fue la dilución de las muestras (1:100) antes de la siembra en los medios de cultivo (Brown A. , 2007), la dilución de la muestra se realizó para evitar el crecimiento masivo de los microorganismos así como evitar falsos positivos dentro del estudio.

A su vez todas las muestras (n=34) fueron cultivadas en Petrifilms 3M® específicos para *Staphylococcus aureus* y enterobacterias, que presentaron 76,5% y 5,9% de crecimiento respectivamente, estos resultados son mayores a los obtenidos mediante claves de identificación microbiológicas tradicionales ya que la sensibilidad de esta prueba diagnóstica es mayor, resultado ya obtenido por (McCarron, Keefe, McKenna, Dohoo, & Poole, 2009) (McCarron, Keefe, McKenna, Dohoo, & Poole, 2009) (Silva, Caraviello, Rodrigues, & Ruegg, 2005).

De los agentes aislados causantes de mastitis (n=67) el 89,6% (60/67) fueron bacterias Gram positivas. Estos resultados muestran que las causas prevalentes de mastitis subclínica en el área son mayormente causadas por patógenos contagiosos, resultados que concuerdan con los obtenidos por (Moser, Stephan, Ziegler, & Johler, 2013) que aislaron 122 cepas de bacterias Gram positivas de 177 animales y (Rüegsegger, y otros, 2014) que aislaron 3038 bacterias Gram positivas de 3954 muestras de leche, sin embargo los resultados obtenidos difieren de (Olivares, y otros, 2015) que reportaron el 97,5% de crecimiento de bacterias Gram negativas en similares condiciones de manejo pero en una zona tropical caliente.

*Staphylococcus aureus* fue la cepa más común aislada en el estudio causante de mastitis en vacas en producción de las fincas seleccionadas, este patógeno contagioso es el más reportado a nivel mundial como agente infeccioso de la enfermedad (Abebe R. , Hatiya, Abera, Mergersa, & Asmare, 2016), (Ahmad, y otros, 2012), (Boerlin, Kuhnert, Hussy, & Schaellibaum, 2003),

(Haltia, Honkanen-Buzalski, Spiridonova, Olkonen, & Myllys, 2006), (Persson, Nyman, & Grönlund-Andersson, 2011), (Regassa, Golicha, Tesfaye, Abunna, & Megersa, 2013); y está relacionado con el manejo en el proceso de ordeño, clima, altura, incluyendo la resistencia antimicrobiana.

Habiendo identificado los patógenos causantes de mastitis subclínica en el estudio, se procedió a determinar la resistencia de estos microorganismos a 6 diferentes antibióticos seleccionados de acuerdo al uso dentro de la zona de estudio.

Se determinó que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp., *E. coli* y *Shigella* sp. son muy resistentes a penicilina y ampicilina. *Bacillus* sp. fué la cepa que presentó mayor resistencia a la mayoría de antibióticos (bacitracina, neomicina, penicilina y ampicilina). Todos los microorganismos tienen una alta sensibilidad a cefotaxima, principio activo no utilizado dentro del área de estudio; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp, *Enterobacter* sp., *Streptococcus* sp. presentaron sensibilidad a bacitracina, oxitetraciclina y neomicina.

(Rüegsegger, y otros, 2014) reportaron un 45,5% (1799/3954) de sus cepas aisladas resistentes a penicilina y un 26,7% (1056/3954) a ampicilina, (Moser, Stephan, Ziegler, & Johler, 2013) reportaron el 39% (47/120) resistentes a ampicilina y penicilina; además (Overesch, Stephan, & Perreten, 2013) reportaron que *Staphylococcus* spp. fue resistente a penicilina confirmando los resultados obtenidos en el estudio, aunque (Olivares, y otros, 2015), reporta una resistencia muy alta de *Staphylococcus* y *E. coli* a cefotaxima difiriendo con los resultados obtenidos en el estudio, sin embargo coincide con la resistencia a ampicilina.

La resistencia frente a antibióticos puede resultar por el incremento de los niveles de exposición a los microorganismos (Jamali, Radmehr, & Ismail, 2014); por lo tanto el uso prudente de antibióticos junto a estrategias que minimicen el desarrollo de resistencia microbiana

deben ser seguidas de manera estricta. Los productores deben trabajar de la mano con profesionales y/o técnicos para elaborar un plan de manejo y control adecuado, sin olvidar el prudente uso de los antibióticos (Barlow, 2011).

Para el control de mastitis, los productores utilizan antibióticos para el período seco y período de lactancia del animal, que en muchos casos el costo beneficio es satisfactorio (Islam, Samad, & Rahman, 2011), sin embargo la falta de conocimiento de muchos productores conlleva a que administren fármacos sin un adecuado programa de administración pudiendo controlar la enfermedad, pero con efectos adversos a largo plazo consecuencias descritas por (Sears, González, Wilson, & Han, 1993).

Se debe considerar que la falta de conocimiento sobre buenas prácticas de ordeño y uso irregular de antibióticos puede ser otra razón para mostrar susceptibilidad o resistencia de los microorganismos (Agüero et al., 2015)

Pérdidas económicas.

Siguiendo con el orden de los objetivos planteados, la estimación de las pérdidas económicas que genera la mastitis en las cuatro fincas de la Cooperativa de Producción Agropecuaria “El Salinerito” fue el último en ser analizado y de acuerdo a varios estudios, las pérdidas económicas que produce la mastitis generara un efecto significativo en varios rubros de la actividad ganadera como: perdidas por reducción de la producción de litros de leche, descarte de vacas, gastos en medicamentos y veterinario (Nielsen, 2009), (Huijps, Hogeveen, Lam, & Oude Lansink, 2010).

En Argentina un estudio reportó que la pérdida de producción de leche por el efecto mastitis subclínica en establecimientos lecheros en Córdoba fue de 2,8 litros/vaca/día en fincas

que tienen más de 100 bovinos en producción lechera (Agüero, Raspanti, Odierno, & Larriestra, 2015).

En un estudio similar al anterior se determinó una pérdida menor que fue de 1,60 litros/vaca/día. Esta pérdida de producción de leche se la calculo en una finca de 65 animales en un establecimiento ganadero lechero en la Unión Europea (Huijps, Lam, & Hogeveen, 2008).

Es importante mencionar que en los estudios mencionados al igual que en este existieron todos los casos de CMT, el cual es la base para el cálculo de pérdidas económicas.

En cambio el presente estudio se encontró que la mastitis subclínica genera un perdida mayor en comparación a las investigaciones antes mencionadas, en la finca Producoop existió una pérdida de 7,4 litros/vaca/día, en la finca Los Pinos fue de 4,9 litros/vaca/día, siendo de la misma forma en la finca Garzapamba, por ultimo cabe destacar que la finca perdió más fue la finca el Rosal con 8,7 litros/vaca/día. Es importante mencionar que las fincas en estudio tenían entre 8 y 26 vacas en producción, en comparación con los estudios mencionados donde eran fincas más grandes y por ende más tecnificadas.

Ningún reporte fue encontrado en el área de estudio con respecto a la valoración clínica, aislamiento, sensibilidad, resistencia de agentes causales de mastitis y estimación económica por consecuencia de la enfermedad. Para conocimiento general, existe una limitada información disponible sobre la susceptibilidad de agentes etiológicos de mastitis a antibióticos en Ecuador. Sin embargo se han citado solo estudios de diferentes regiones, países e incluso especies. La variabilidad de la susceptibilidad a los antibióticos entre especies se debe a diferentes razones. Las condiciones edafológicas, geográficas (clima, altitud) tienen un impacto considerable en la prescripción farmacológica de la enfermedad.

Las diferencias de nuestro estudio con los citados (Abebe et al., 2016; Ahmad et al., 2012; Almaw et al., 2008; Barlow, 2011; Baskaran et al., 2009; Boerlin et al., 2003; CLSI, 2015; Fagundes et al., 2010; Halasa et al., 2009; Haltia et al., 2006; Islam et al., 2011; Jamali et al., 2014; McDougall, 1999; Moser et al., 2013; Mungube et al., 2005; Overesch et al., 2013; Persson et al., 2011; Regassa et al., 2013; Ruiz et al., 2011; Sears et al., 1993; Silva et al., 2005; Unnerstad et al., 2009) son las condiciones medio ambientales, protocolo en la toma de muestras, distintos agentes etiológicos de mastitis con diferentes niveles de resistencia, prácticas de manejo, uso de antibióticos y muchos otros factores.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Se constató el alto porcentaje de mastitis por vaca (84,5%) y por cuarto (47,8%) en las fincas del estudio.

Las vacas que se encontraban en la etapa media de lactancia (4-8 meses) presentaron el más alto porcentaje (50%) de presencia de mastitis por cuarto.

EL nivel de sequedad muy áspero de los pezones se asoció a un mayor porcentaje de prevalencia de mastitis entre los varios factores medidos en el estudio (84,7%).

Los agentes patógenos contagiosos de la zona de estudio son: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus p.*, *Streptococcus* sp, *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., y levaduras.

La susceptibilidad de las bacterias fue la siguiente: *Staphylococcus aureus* a bacitracina, neomicina, cefotaxima y oxitetraciclina; *Bacillus* sp. a oxitetraciclina y cefatoxima; *Staphylococcus p.* a bacitracina, neomicina, cefotaxima y oxitetraciclina; *Streptococcus* sp. a para todo los antibióticos probados, pero no para oxitetraciclina; *Enterobacter* sp. a todos los antibióticos; *Klebsiella* sp. a cefatoxima, oxitetraciclina, noemicina, y penicilina; *Shigella* sp. a bacitracina y Cefotaxima; *Escherichia coli* a ampicilina.

Existió resistencia de varias bacterias a los antibióticos, *Staphylococcus aureus* fue resistente a penicilina y ampicilina; *Bacillus* sp. a penicilina, ampicilina, y bacitracina; *Staphylococcus* sp. solo fue a penicilina; *Escherichia coli* fue resistente a bacitracina, oxitetraciclina, neomicina y penicilina; *Klebsiella* sp. fue resistente a bacitracina, penicilina y ampicilina; *Shigella* sp. fue resistente a oxitetraciclina, neomicina, penicilina y ampicilina.

La pérdida promedio de leche por día y por vaca de toda la población del estudio fue de 6,47 litros, la finca que más litros de leche perdía fue El Rosal con 8,7 litros/ vaca promedio.

La finca Producoorp tuvo mayores pérdidas económicas por efecto de la mastitis con \$ 2537,96 al mes, con 26 animales en producción.

## **5.2 Recomendaciones**

Se recomienda realizar diariamente buenas prácticas de ordeño para reducir la prevalencia de mastitis y así evitar las pérdidas económicas por esta enfermedad, especialmente a los productores ganaderos de leche de la Cooperativa de Producción Agropecuaria El Salinerito.

Se recomienda realizar métodos de control, principalmente pruebas de diagnóstico rápidas como el CMT y Fondo oscuro, las cuales permiten diagnosticar mastitis subclínica y clínica respectivamente.

Para el control efectivo de mastitis es de suma importancia hacer exámenes de laboratorio como pruebas bioquímica para identificación, antibiogramas para resistencia y susceptibilidad de antibióticos. Esto permitirá conocer que agente causal es y hacia que antibióticos es resistente o susceptible, permitiendo hacer una efectiva dosificación de antibióticos para el control de la enfermedad

Se recomienda el uso de Cefotaxima como antibiótico para el control de mastitis en el área de estudio con un plan de manejo adecuado por la sensibilidad mostrada de los microorganismos a este fármaco.

Se debe finalizar el uso exagerado e indiscriminado de antibióticos en las vacas por cualquier enfermedad, ya que esto genera que los agentes causales de las enfermedades sean resistentes hacia los antibióticos usados, es muy importante buscar una orientación profesional y calificada para el uso de los mismos.

Para próximos estudios se recomienda realizar la siembra de la muestra de leche en la caja Petri de forma directa sin ninguna dilución de la misma, ya que esto permitirá aumentar la probabilidad de crecimiento de las bacterias más débiles en los diferentes medios que podrían estar produciendo mastitis.

Se recomienda seguir haciendo estudios similares en la zona y en todo el país, que permitan conocer la situación real de la mastitis, y su efecto en la economía de los ganaderos.

### 5.3 Bibliografía

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 1-11.
- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Mergersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk, factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 1-11.
- Acuña, V., & Rivadeneira, A. (abril de 2008). Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. *Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha*. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Agudelo, D., & Bedoya, O. (2005). *Composición nutricional de la leche de ganado vacuno*. Recuperado el 24 de Febrero de 2018, de redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>
- Agüero, D., Raspanti, C., Odierno, L., & Larriestra, A. (2015). Perdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 7-14. Recuperado el 8 de Febrero de 2018, de [https://www.academia.edu/23391774/P%C3%A9rdidas\\_productivas\\_y\\_econ%C3%B3micas\\_diarias\\_ocasionadas\\_por\\_la\\_mastitis\\_y\\_erogaciones\\_derivadas\\_de\\_su\\_control\\_en\\_establecimientos\\_lecheros\\_de\\_C%C3%B3rdoba\\_Argentina](https://www.academia.edu/23391774/P%C3%A9rdidas_productivas_y_econ%C3%B3micas_diarias_ocasionadas_por_la_mastitis_y_erogaciones_derivadas_de_su_control_en_establecimientos_lecheros_de_C%C3%B3rdoba_Argentina)
- Ahmad, S., Yaqoob, M., Bilal, M. Q., Muhammad, G., Yang, L.-G., Khan, M. K., & Tariq, M. (2012). Risk factors associated with prevalence and major bacterial causes of mastitis in dromedary camels (*Camelus dromedarius*) under different production systems. *Tropical Animal Health and Production*, *44*(1), 107-112.
- Almaw, G., Zerihun, A., & Asfaw, Y. (2008). Bovine mastitis and its association with selected risk factors in smallholder dairy farms in and around Bahir Dar, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, *40*(6), 427-432.

- Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. (2008). *Métodos Generales de Conservación de Microorganismos*. Liorad.
- Balarezo, K., & Poveda, M. (n.d.). Determinación del perfil sanitario del ganado bovino en la Cooperativa de Producción Agropecuaria "El Salinerito", Bolívar - Ecuador. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Barlow, J. (2011). Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 383-407.
- Baskaran, S., Kazmer, G., Hinckley, L., Andrew, S., & Venkitanarayanan, K. (2009). Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *Journal of Dairy Science*, 1423-1429.
- Bedolla, C., & Castañeda, V. (2007). *Revista Veterinaria*. Recuperado el 2 de Noviembre de 2017, de Métodos de detección de la mastitis bovina ( Methods of detection of the bovine mastit <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907.html%0A>
- Bedolla, C., & Ponde de León, M. (2008). *Revista Veterinaria*. Recuperado el 01 de Noviembre de 2017, de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408.html%0A>
- Bloemhof, S., De Jong, G., & De Haas, Y. (2008). Genetic parameters for clinical mastitis in the first three lactations of Dutch Holstein cattle. *Veterinary Microbiology*, 24-30.
- Boerlin, P., Kuhnert, P., Hussy, D., & Schaellibaum, M. (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 767-771.
- Borato, B., Cortinhas, C., Dibbern, A., Felipe, L., Benites, N., & Veiga, M. (2014). *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 1(47), 61-66.
- Brown, A. (2007). *Benson's Microbiological Applications* (8 ed.). New York: McGraw-Hill.
- Brown, A. (2007). *Benson's Microbiological Applications*. New York.
- Calvinho, L. (2004). *Diagnóstico bacteriológico de mastitis y su importancia en los programas de control*. Rafaela: INTA.
- Carlén, E., Strandberg, E., & Roth, A. (2004). Genetic Parameters for Clinical Mastitis, Somatic Cell Score, and Production in the First Three Lactations of Swedish Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 3062-3070.

- CBMR. (2003). *Canadian Bovine Mastitis Research*. Recuperado el 2 de Noviembre de 2017, de [http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF\\_AN/Toolbox/Factsheets/Milking\\_procedure\\_pro.pdf](http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Toolbox/Factsheets/Milking_procedure_pro.pdf)
- CBMR. (2004). *Canadian Bovine Mastitis Research*. Recuperado el 3 de Noviembre de 2017, de [http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF\\_AN/Toolbox/Factsheets/AdministrationTreatmentPro.pdf](http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Toolbox/Factsheets/AdministrationTreatmentPro.pdf)
- CBMR. (2008). *Canadian Bovine Mastitis Research*. Recuperado el 02 de Noviembre de 2017, de [http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF\\_AN/Toolbox/Factsheets/CMTProENG.pdf](http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Toolbox/Factsheets/CMTProENG.pdf)
- Cebrián, L., Meseguer, J., Ramos, J., & Ferrer, L. (2013). *Exploración Clínica del Ganado Vacuno*. Servet.
- Cicconi, K., Gamroth, J., Schukken, Y., & Stiglbauer, K. (2013). Risk factors for clinical mastitis, ketosis, and pneumonia in dairy cattle on organic and small conventional farms in the united States. *Journal of Dairy Science*, 4269-4285.
- CLSI. (2015). *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Recuperado el 30 de Febrero de 2018, de <http://vet01s.edaptivedocs.info/GetDoc>.
- De Haas, Y., Barkema, H. W., & Veerkamp, R. F. (2002). The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 85(5), 1314-1323.
- Dos Santos, J., Netto dos Santos, K., Gentilini, E., Sordelli, D., & de Freire Bastos, M. (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 133-144.
- Fagundes, H., Barchesi, L., Nader Filho, A., Ferreira, L. M., & Fernandes, C. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 376-380.
- Garbulio, A., Amaku, M., Melville, P., Dias, R., Sakata, S., & Benites, N. (2010). Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. *Journal of Dairy Research*, 63-70.

- Green, M. J., Bradley, A. J., Medley, G. F., & Browne, W. J. (2007). Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. *Journal of dairy science*, 90(8), 3764-3776.
- Halasa, T. (2012). Bioeconomic modeling of intervention against clinical mastitis caused by contagious pathogens. *Journal of Dairy Science*, 5740-5749.
- Haltia, L., Honkanen-Buzalski, T., Spiridonova, I., Olkonen, A., & Myllys, V. (2006). A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta veterinaria Scandinavica*, 22.
- Harmon, R. (1994). SYMPOSIUM: MASTITIS AND GENETIC EVALUATION FOR SOMATIC CELL COUNT, Physiology of Mastitis and Factor Affecting. *Journal of Dairy Science*, VII(77), 2103-2112.
- Heringstad, B., Chang, Y., Gionala, D., & Klemetsdal, G. (2004). Multivariate threshold model analysis of clinical mastitis in multiparous norwegian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 38.46.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., & Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle : a review with focus on the situation in the Nordic countries. 95-206.
- Huijps, K., Hogeveen, H., Lam, M., & Oude Lansink, A. (2010). Costs and efficacy of management measures to improve udder health on Dutch dairy farms . *Journal of Dairy Science*, 115-124.
- Huijps, K., Lam, T., & Hogeveen, H. (2008). Costs of Mastitis: Facts and Perception. *Journal of Dairy Research*, 75(1), 113-120.
- INEC. (2016). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua*. Quito.
- Islam, M. A., Samad, M. A., & Rahman, A. K. (2011). BACTERIAL PATHOGENS AND RISK FACTORS ASSOCIATED WITH MASTITIS IN BLACK BENGAL GOATS IN BANGLADESH. *Bangladesh. Journal Vet. Med*, 9(2), 155-159.
- Jamali, H., Radmehr, B., & Ismail, S. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2226-2230.
- Kleinschroth, E., Rabold, K., & Deneke, J. (1991). *La Mastitis*. Bilbao: Ediciones medicas.
- MAGAP. (2013). Estudio de cadenas pecuarias de Ecuador. Quito, Pichincha, Ecuador.

- McCarron, J., Keefe, G., McKenna, S., Dohoo, I., & Poole, D. (2009). Evaluation of the University of Minnesota Tri-plate and 3M Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* species from clinically mastitic milk samples. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5326-5333.
- McCarron, J., Keefe, G., McKenna, S., Dohoo, I., & Poole, D. (2009). Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2297-2305.
- McDougall, S. (1999). Prevalence of clinical mastitis in 38 Waikato dairy herds in early lactation. *New Zealand Veterinary Journal*, 47(4), 143-149.
- Mekonnen, S., Koop, G., Melkie, S., Getahun, C., Hogeveen, H., & Lam, T. (2017). Prevalence of subclinical mastitis and associated risk factors at cow and herd level in dairy farms in North-West Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 145.
- Merck. (2000). *El manual Merck de veterinaria*. Barcelona: Océano grupo editorial.
- Moser, A., Stephan, R., Ziegler, D., & Johler, S. (2013). Species distribution and resistance profiles of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 155(6), 333-338.
- Mungube, E. O., Tenhagen, B. A., Regassa, F., Kyule, M. N., Shiferaw, Y., Shiferaw, Y., . . . Baumann, M. P. (2005). Reduced milk production in udder quarters with subclinical mastitis and associated economic losses in crossbred dairy cows in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 37(6), 503-512.
- Nielsen, C. (2009). *Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows*. Uppsala.
- NMC. (2007). *Guidelines for evaluating teat skin condition*. Minneapolis. Recuperado el 20 de Septiembre de 2017, de <https://www.nmconline.org/fact-sheets/>
- Olivares, J., Kholif, A., Rojas- Hernandez, S., Zeidan, A., Salem, M., Bastida, Z., & Dilorenzo, N. (2015). Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antiiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropicla refion of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 1497-1504.
- Oliveira, A., Watts, J., Salmon, S., & Aarestrup, F. (2000). Antimicrobial Susceptibility of *Sthaphyloccocus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and United States. *Journal of Dairy Science*, 83, 855-862.
- OMS; FAO. (2011). *FAO*. Recuperado el 20 de 11 de 2017, de <http://www.fao.org/3/a-i2085s.pdf>

- Overesch, G., Stephan, R., & Perreten, V. (2013). Antimicrobial susceptibility of gram-positive udder pathogens from bovine mastitis milk in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 155(6), 339-350.
- Paredes, F., & Roca, J. (2004). *Ámbito Farmacéutico Farmacología*.
- Paterna, A., Contreras, A., Gomez-Martín, A., Amores, J., Tatay-Dualde, J., Prats-van der Ham, M., & De la Fe, C. (2014). The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 36-41.
- Persson, Y., Nyman, A.-K. J., & Grönlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta veterinaria Scandinavica*, 53(1), 36.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine Mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of Bacteria and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science*, 2433-2441.
- Regassa, A., Golicha, G., Tesfaye, D., Abunna, F., & Megersa, B. (2013). Prevalence, risk factors, and major bacterial causes of camel mastitis in Borana Zone, Oromia Regional State, Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 45(7), 1589-1595.
- Research, C. B. (2004). Recuperado el 2 de Noviembre de 2017, de [http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF\\_AN/Toolbox/Factsheets/AdministrationTreatmentPro.pdf](http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/dynamiques/PDF_AN/Toolbox/Factsheets/AdministrationTreatmentPro.pdf)
- Rüegsegger, F., Ruf, J., Tschuor, A., Sigrist, Y., Roskopf, M., & Hässig, M. (2014). Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens of dairy cows in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 156(10), 483-488.
- Ruiz, A. K., Ponce, P., G, G., Sampaio, E., Lucena, E. R., & Benone, S. (2011). PREVALENCIA DE MASTITIS BOVINA SUBCLÍNICA Y MICROORGANISMOS ASOCIADOS: COMPARACIÓN ENTRE ORDEÑO MANUAL Y MECÁNICO, EN PERNAMBUCO, BRASIL. *Rev. Salud Animal*, 33(1), 57-64.
- Sánchez, C. (2003). *Cría y mejoramiento del ganado vacuno lechero*. Lima: Ripalme.
- Sears, P. M., González, R. N., Wilson, D. J., & Han, H. R. (1993). Procedures for mastitis diagnosis and control. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 9(3), 445-468.

- Seegers, H., Fourichon, C., & Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds . *Veterinary Research*, 475-491.
- Shook, G. (1989). Selection for disease resistance. *Journal of Dairy Science*, 49-62.
- Silva, B., Caraviello, D., Rodrigues, A., & Ruegg, P. (2005). Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 3000-3008.
- Tardy, F., & Bouveron, C. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*, 219-226.
- UACh, U. A. (2011). *Bovinos 2011*. Santiago de Chile.
- Unnerstad, H., Lindberg, A., Persson Waller, K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., & Bengtsson, B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology*, 137, 90-97.
- Wattiaux, M., & Howard, W. (2013). Mastitis: Prevención y detección. Wisconsin: Esenciales Lecheras.
- Wolter, W., Castañeda, V., Kloppert, B., Zschoeck, M., Estatal, I., & Hesse, D. (6 de Agosto de 2015). *Infolactea*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2017, de <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/608.pdf>
- Zhao, X., & Lacasse, P. (2014). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of Animal Sicience*, 57-65.