



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN Y ANTIBIOGRAMA DE PATÓGENOS RELACIONADOS
CON MASTITIS BOVINA EN SEIS COMUNIDADES DE PEQUEÑOS
PRODUCTORES

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor guía
Nadia López MVZ

Autora
Laura Sofía Gómez Díaz

Año
2015

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Nadia López

MVZ

C.I. 1712538691

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Laura Sofía Gómez Díaz

C.I. 1715551212

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por hacer de mi todo lo que soy y darme todo lo que tengo.

A mi padre Álvaro, mi madre Luz y mi hermano Juan David por creer en mí y apoyarme siempre. A mi amiga Michelle por ser incondicional.

A mis profesores y a los técnicos del Programa de Ganadería del INIAP por su guía y respaldo durante esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios, que hizo posible este trabajo por encima de cualquier adversidad.

A mi familia, en especial a mi padre que ha sido mi apoyo, mi ejemplo y mi inspiración como médico veterinario desde que era una niña, enseñándome que esta profesión debe complementar la ciencia con el amor y el respeto por los animales.

Resumen

La mastitis es una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción láctea bovina a nivel mundial. La mastitis subclínica es la forma de presentación más común de esta afección y también la más costosa, ya que al no observarse signos clínicos evidentes de enfermedad, no se toman las medidas sanitarias adecuadas y el animal no sólo baja su producción de leche sino que se convierte en un foco de infección para todo el hato. El objetivo general de la presente investigación fue identificar los patógenos relacionados con mastitis bovina y determinar su sensibilidad antibiótica, en seis comunidades de pequeños productores de Pichincha e Imbabura. Se estimó además la prevalencia aparente de mastitis tanto clínica como subclínica por animal y por cuarto. Mediante el California Mastitis Test se muestrearon un total de 211 animales pertenecientes a las 6 comunidades de pequeños productores asociados con el INIAP en Pichincha y en Imbabura. Se reporta un 74,41% de prevalencia aparente de mastitis por animal y un 51,54% de prevalencia aparente de mastitis por cuarto. Se aislaron patógenos de la familia Enterobacteriaceae (0,62%), y de los géneros *Staphylococcus* spp. (50,00%) y *Streptococcus* spp. (35,80%). Los microorganismos predominantes fueron *Streptococcus* spp.: 27,16% y *Staphylococcus* spp.: 23,46%, seguidos de *Staphylococcus intermedius*: 14,81%, *Streptococcus agalactiae*: 8,64%, estafilococos coagulasa positivo: 6,17%, *Staphylococcus aureus*: 5,56% y *Escherichia coli*: 0,62%. La sensibilidad de los patógenos a los diferentes antibióticos varía según género, especie y lugar. El análisis estadístico de chi cuadrado indica que la prevalencia de mastitis difiere entre las comunidades en estudio.

Abstract

Mastitis is one of the main causes for economic losses in the bovine dairy industry around the world. Subclinical mastitis is the most common form of presentation for mastitis and also the most expensive because there are no obvious clinical signs of sickness, no measures are taken for correcting the problem and the animal not only produces a lower quantity of milk, but the animal itself becomes a focus of infection for all the herd. The main objective of the present research was to identify mastitis associated pathogens, and determine the antimicrobial susceptibility in six communities of small dairy producers associated with INIAP in Pichincha and Imbabura. The apparent prevalence of mastitis per animal was 74,41% and 51,54% per quarter. The isolated pathogens were Enterobacteriaceae (0,62%), *Staphylococcus* spp. (50,00%) and *Streptococcus* spp. (35,80%). The predominant microorganisms were *Streptococcus* spp.: 27,16% and *Staphylococcus* spp.: 23,46%, followed by *S. intermedius*: 14,81%, *Streptococcus agalactiae*: 8,64%, *Staphylococcus* coagulase positive: 6,17%, *S. aureus*: 5,56% and *Escherichia coli*: 0,62%. The antibiotic sensitivity varies with the gender, species and location. The chi-square statistical analysis indicates that the prevalence of mastitis differs between the studied communities.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Objetivos e hipótesis	5
3.1. Objetivos	5
3.1.1. Objetivo General.....	5
3.1.2. Objetivos Específicos	5
3.2. Hipótesis	5
4. Marco Teórico.....	6
4.1. Generalidades	6
4.2. Patogenia	7
4.3. Clasificación de la mastitis	9
4.3.1. Hiperaguda	10
4.3.2. Aguda.....	10
4.3.3. Subaguda.....	10
4.3.4. Crónica.....	10
4.3.5. Subclínica	10
4.4. Principales microorganismos relacionados con mastitis	11
4.4.1. Enterobacteriaceae.....	13
4.4.2. Estafilococos	15
4.4.3. Estreptococos.....	19
4.4.4. Otros microorganismos causantes de mastitis	22
4.5. Microorganismos implicados en la salud pública	22
4.6. Métodos de detección de la mastitis.....	23

4.6.1.	Recuento de células somáticas (RCS)	23
4.6.2	Prueba de California para Mastitis (C.M.T.).....	23
4.6.3	Conductividad eléctrica.....	24
4.6.4	Otros indicadores de mastitis subclínica.....	25
4.6.5	Detección de mastitis clínica	25
4.7.	Tratamiento y control.....	26
4.7.1.	Período seco	26
4.7.2.	Control de patógenos contagiosos	26
4.7.3.	Control de mastitis ambiental	27
4.7.4.	Terapia antimicrobiana específica	27
4.7.5.	Control de la mastitis en el ordeño	29
5.	Materiales y Métodos.....	30
5.1.	Materiales.....	30
5.1.1.	Experimental.....	30
5.1.2.	Laboratorio	30
5.1.3.	Campo.....	30
5.2.	Metodología	30
5.2.1.	Características del sitio experimental	30
5.2.2.	Factores en estudio	31
5.2.3.	Unidad experimental.....	31
5.2.4.	Análisis estadístico	32
5.2.5.	Variables y métodos de evaluación	33
5.2.6.	Manejo específico del experimento	34
6.	Resultados y discusión	46
6.1	Resultados del C.M.T. en las seis comunidades en estudio	46

6.2	Prevalencia de aparente de mastitis por animal	47
6.2.1	Análisis de las comunidades en estudio	48
6.3	Prevalencia aparente de mastitis por cuarto.....	50
6.3.1	Análisis del resumen general.....	50
6.3.2	Análisis de las 6 comunidades en estudio	50
6.4	Análisis estadístico según la prueba de Chi cuadrado para la comparación de la prevalencia aparente de mastitis entre las seis comunidades en estudio	51
6.5	Microorganismos patógenos relacionados con mastitis bovina	53
6.5.1	Resumen general de las seis comunidades	55
6.5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	56
6.5.3	<i>Staphylococcus intermedius</i>	56
6.5.4	<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	56
6.5.5	<i>Staphylococcus</i> spp.....	57
6.5.6	<i>Streptococcus agalactiae</i>	57
6.5.7	<i>Streptococcus</i> spp.....	57
6.5.8	<i>Escherichia Coli</i>	57
6.6	Antibiograma de patógenos relacionados con mastitis	58
6.6.1	Antibiograma de <i>Staphylococcus</i>	59
6.6.2	Antibiograma de <i>Streptococcus</i>	63
6.6.3	Antibiograma de enterobacterias	66
6.7	Otras discusiones.....	66
7.	Conclusiones y recomendaciones.....	69
7.1	Conclusiones.....	69

7.2 Recomendaciones.....	69
Referencias Bibliográficas	70
Anexos	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formas de mastitis	11
Tabla 2. Correlación entre el C.M.T. y la cantidad de células somáticas	24
Tabla 3. Ubicaciones geográficas de las localidades en estudio.....	31
Tabla 4. Código de muestreo	34
Tabla 5. Lectura del C.M.T.....	36
Tabla 6. Antibióticos utilizados en el antibiograma de cada género bacteriano	45
Tabla 7. Resultados del C.M.T. en las 6 comunidades en estudio.....	46
Tabla 8. Prevalencia aparente de mastitis por animal en las 6 comunidades en estudio.....	47
Tabla 9. Prevalencia aparente de mastitis por cuarto en las 6 comunidades en estudio.....	50
Tabla 10. Análisis del chi cuadrado mediante el programa estadístico “Statistix”	52
Tabla 11. Microorganismos patógenos relacionados con mastitis bovina	55
Tabla 12. Resultados del antibiograma del género <i>Staphylococcus</i>	58
Tabla 13. Resultados del antibiograma del género <i>Streptococcus</i>	59

1. Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2014) establece que más de un billón de personas a nivel mundial dependen del sector ganadero y que el 70% de las personas que viven en zonas rurales, se encuentran en situación de pobreza, con un ingreso diario menor a UDS 1.00; dependen, al menos parcialmente de la ganadería para su subsistencia.

En el Ecuador se considera que “La leche es un producto de primera necesidad en la alimentación de la población ecuatoriana y constituye, por sus propiedades, un producto básico e indispensable en la canasta familiar” (Correa, 2008) (Acuerdo ministerial #1042). Se considera a la leche como una importante fuente de proteínas y grasas en la dieta, ya que aporta fuentes importantes de energía y aminoácidos esenciales para los humanos (FAO, 2013, p.106)

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2013) la producción total en litros de leche a nivel nacional, fue aproximadamente de 6´262.408,00 con un número total de vacas ordeñadas de 1´127.627,00. En la región sierra la producción fue de 4´810.551,00 litros de leche provenientes de 730.956,00 vacas ordeñadas, representando aproximadamente el 76.81% de la producción total del país; el resto se reparte entre Costa y Amazonía. En el año 2013, del total nacional productivo en litros de leche, Imbabura aportó con un 2.4% y Pichincha con un 13.9% respectivamente.

La producción de leche en el ganado bovino involucra los factores genética, nutrición y manejo (López et al., 1993, p.88). Si no se tiene un manejo higiénico adecuado, especialmente durante la rutina de ordeño, el hato puede adquirir patologías que disminuyen la cantidad y calidad de la producción láctea tales como la mastitis (Kruze, 1998).

La mastitis (del griego mastos = glándula mamaria y del sufijo itis = inflamación) es una afección de alta prevalencia cosmopolita. Puede ser el producto de procesos no infecciosos, como por ejemplo procesos traumáticos, aunque más

frecuentemente es el resultado de una infección intramamaria (Brightling, Mein, Malmo, & Ryan, 1998, p.3), (Gasque, 2008, p.176), (Smith, 2010, p.1115). Sin importar el origen de la mastitis, el proceso patológico se caracteriza por una respuesta inflamatoria como mecanismo de protección en la glándula mamaria, ya sea en uno o en varios cuartos (Bedolla & Ponce de León, 2008, p.2,3), (Smith, 2010, pp.1114-1115).

El cuadro clínico de la mastitis varía desde casos asintomáticos (mastitis subclínica), únicamente detectados con pruebas diagnósticas especiales, hasta casos de inflamación sobreaguda con toxemia y muerte del animal (mastitis clínica) (Castillo et al., 2009, p.41). La mastitis subclínica puede convertirse en mastitis clínica y de acuerdo con el curso evolutivo de la enfermedad y el grado de sintomatología, esta última puede diferenciarse en subaguda, aguda y crónica (Kleinschroth, Rabold, & Deneke, 1991, p.13). Mayoritariamente, la mastitis está presente en su forma subclínica (FAO, 1989). Existen varios estudios realizados en los principales países que se dedican a la producción láctea, los cuales indican que un 50% de todas las vacas tienen mastitis, principalmente en su forma subclínica (Bedolla & Ponce de León, 2008, p.10,11).

La mastitis es una de las causas más importantes en cuanto a pérdidas económicas; puesto que baja la calidad de la leche y disminuye su producción en un rango del 4 al 30%. Como costos directos de la mastitis, en la ganadería bovina se consideran: la leche desechada y los gastos por atenciones veterinarias, además de los medicamentos involucrados. Mientras que como costos indirectos se consideran la disminución en la producción láctea, la mano de obra adicional, las penalizaciones por calidad de leche, los porcentajes mayores de sacrificio y reposición, entre otros (Blowey & Edmondson, 1995, p.3).

La mastitis no puede ser erradicada (Blowey & Edmondson, 1995, p.1) pero las pérdidas económicas causadas por esta afección se pueden disminuir con programas de prevención y manejo (Pech, Carvajal, & Montes, 2007, p.127).

2. Antecedentes

Según el artículo 6.9.7. del capítulo 6.9 del código sanitario para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2014) un médico veterinario debe ser el responsable de supervisar un plan de control para mastitis en las explotaciones lecheras. Lastimosamente es común que pequeñas explotaciones no tengan acceso a este tipo de controles, por lo que sus explotaciones son más susceptibles a presentar patologías como la mastitis. “En el Ecuador la producción agropecuaria, en su gran mayoría, está en manos de pequeños y medianos productores. De manera general, los pequeños y medianos productores, casi siempre han estado relegados de los servicios del estado, como crédito y de programas sostenibles y continuos de transferencia de tecnología y capacitación, a más de presentar un débil sistema de organización de productores” (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, [INIAP], 2009, p.2)

Torres & López (1984, p.16) investigan a la mastitis subclínica en el proyecto de Queserías Rurales del Ecuador y establecen que las infecciones subclínicas de la glándula mamaria, basadas en aislamiento e identificación, obedecen predominantemente a los gérmenes *Staphylococcus* spp. y en menor importancia a coliformes.

Flor y Vásquez (1987) determinaron un 52,12% de mastitis subclínica y un 1,17% de mastitis clínica en Cayambe, Ecuador (citado por (Espinoza & Mier, 2013, p.8))

Acuña & Rivadeneira (2008, p.95-97) determinaron un 10.67% de vacas con mastitis, (con 141 vacas en ordeño), encontrando los siguientes patógenos como más representativos: *Pseudomonas* spp. (2.13%), *Escherichia coli* (1.42%) y *Enterobacter* spp. (1.42%) dentro de los Gram negativos y *Staphylococcus aureus* (34.64%), *Corynebacterium* spp. (20.92%) y *Streptococcus* spp. (16.34%) dentro de los Gram positivos. Los antibiogramas fueron variables.

Espinoza & Mier (2013, p.60), determinaron la prevalencia de mastitis en ganaderías de Napo (Ecuador) mediante la prueba California Mastitis Test (C.M.T.). Los autores identificaron patógenos como *Klebsiella* spp. y *Citrobacter* spp., además de los microorganismos mencionados previamente por Acuña & Rivadeneira (2008, p.95-97). Se estableció que la sensibilidad a los antibióticos fue variable de acuerdo al género y especie bacteriana.

La mastitis puede detectarse mediante diferentes pruebas que evalúan el estado sanitario de la glándula mamaria, basándose en la presencia de células somáticas. Los análisis que siguen este principio son el C.M.T. (Dodecil sodio sulfato) y el recuento de células somáticas (RCS), siendo este último mucho más exacto que el C.M.T. (Echeverri, Jaramillo, & Restrepo, 2010, P.55).

3. Objetivos e hipótesis

3.1. Objetivos

3.1.1. Objetivo General

- Identificar los patógenos relacionados con mastitis bovina y determinar su sensibilidad antibiótica, en seis comunidades de pequeños productores de Pichincha e Imbabura.

3.1.2. Objetivos Específicos

- Estimar la prevalencia aparente de animales con cuadros de mastitis clínica y subclínica en seis comunidades de las provincias de Pichincha e Imbabura.
- Identificar los patógenos relacionados con mastitis clínica y subclínica en las comunidades en estudio.
- Evaluar la sensibilidad de los patógenos involucrados en mastitis clínica y subclínica a los diferentes antibióticos.

3.2. Hipótesis

Ho: El análisis de la prevalencia aparente de mastitis, microorganismos asociados y antibiogramas no difiere en las comunidades en estudio.

4. Marco Teórico

4.1. Generalidades

“La mastitis es la enfermedad más común de las vacas de alto rendimiento de producción lechera” (Kleinschroth et al., 1991, p.7). Esta afección es una de las causas más importantes en cuanto a pérdidas económicas en el ámbito de la producción láctea bovina (Blowey y Edmondson, 1999, p.3), (Gasque, 2008, p.176). “La mastitis es uno de los principales problemas sanitarios que afecta la calidad de la leche” (Velásquez & Vega, 2012, p. 66).

La mastitis es considerada como una afección que involucra diversos factores tales como: animal, ambiente y germen causal; todos estos influyen sobre el riesgo de infección. Este último viene determinado por el número de agentes patógenos, la patogenicidad de los mismos, la frecuencia de contacto de la ubre con los microorganismos y el sistema inmunológico del animal (Kleinschroth et al., 1991, P.7-9).

La mastitis (del griego mastos = glándula mamaria y del sufijo itis = inflamación) es una inflamación de la glándula mamaria que puede ser el producto de procesos no infecciosos como lesiones traumáticas, aunque más frecuentemente es el resultado de una infección intramamaria (Brightling, Mein, Malmo, & Ryan, 1998, p.3), (Smith, 2010, p.1115), (Gasque, 2008, p.176). A pesar de que la mastitis puede ser causada por agentes físicos o químicos, la mayor parte de los casos son consecuencia de infecciones bacterianas (Markey, Leonard, Archambault, Cullinane, & Maguire, 2013, P.433).

Si un microorganismo patógeno ingresa en un animal, su sistema inmune debe ser capaz de reconocer y eliminar la amenaza antes de que esta cause daños. El organismo puede utilizar los mecanismos inmunes innatos de respuesta rápida como primera línea de defensa, entre estos la inflamación aguda. La inflamación es vital porque garantiza que las células y las moléculas de defensa se concentren rápidamente donde hay daño tisular o invasión microbiana (Tizard, 2009, p.11); sin embargo la glándula mamaria es un órgano

en el cual la respuesta inflamatoria suele ser perjudicial para su función (Cunningham & Klein, 2009, p.14).

El organismo reconoce la invasión gracias a moléculas comunes que expresan los microorganismos en su superficie: patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o por sus ácidos nucleicos. El organismo también puede reconocer alarminas: moléculas liberadas de los tejidos dañados que son multifuncionales y tienen propiedades antimicrobianas. Los PAMP son reconocidos por los receptores tipo Toll (TLR), presentes en las superficies celulares y por otros receptores a nivel intracelular. Dichos receptores se encuentran en varios tipos de células. Las más importantes son las células centinela: macrófagos, las células dendríticas (DC) y los mastocitos (Tizard, 2009, p.11).

Las señales generadas por los PAMP en sus receptores activan señales para rutas metabólicas intracelulares e inducen en las células centinela la producción de diversas moléculas como citoquinas, las mismas que están involucradas directamente en el proceso de la inflamación (Tizard, 2009, p.12).

4.2. Patogenia

En un proceso de mastitis se afecta el tejido glandular, disminuye el volumen de la producción de leche y se altera su composición, además de elevar su carga bacteriana normal (Gasque, 2008, p.176).

Comúnmente los patógenos son transmitidos durante el ordeño de una glándula mamaria infectada a una sana a través de las manos del ordeñador, las máquinas de ordeño, y demás utensilios; esto debido a que la glándula mamaria afectada actúa como reservorio de los microorganismos existentes en la leche. La infección puede iniciarse también por el contacto de la glándula mamaria con el suelo contaminado, paja, insectos y demás. Muchos de los procesos de mastitis se pueden producir durante el período seco, si no se tiene un manejo adecuado del mismo (Kleinschroth et al., 1991, p.9).

Una vez que las bacterias atacan las células del interior de la glándula mamaria, el sistema inmunitario responde enviando leucocitos para neutralizar

los patógenos. Estos glóbulos blancos son las denominadas células somáticas (García, 2004, p.1). Los neutrófilos son las principales células involucradas en eliminar las bacterias de la glándula mamaria. Los factores del huésped, que afecten la cantidad y velocidad de la respuesta neutrofílica a la infección, son importantes al momento de determinar la severidad de la enfermedad (Markey et al., 2013, p. 433).

El grado de incremento celular tiene relación directa con la gravedad del proceso que afecta a la glándula mamaria, es por esto que el examen del contenido celular de la leche puede indicar el estado funcional de la glándula (Kleinschroth et al., 1991, p.25). El conteo celular de la leche viene a ser un factor que ayuda a conocer el estado sanitario de la ubre. Un recuento alto indica enfermedad, menor producción de leche, alteración de su composición y la consecuente pérdida económica (Kleinschroth et al., 1991, pp. 24,25).

Las células del organismo están sometidas a un proceso normal de envejecimiento. Las células alteradas o gastadas son reemplazadas por otras nuevas, gracias al proceso de regeneración celular. Este proceso, como en muchos lugares, se produce en la glándula mamaria; las células inservibles se eliminan con la leche (Kleinschroth et al., 1991, p. 24). Los procesos de regeneración y respuesta inmune celular son constantes, esto determina en la leche la presencia de un cierto número normal de células. Se observan varios tipos celulares, entre estos leucocitos cuya función de protección la ejercen directamente en la glándula mamaria.

Más del 85% de todas las células somáticas presentes en la leche de un cuarto infectado son glóbulos blancos (macrófagos 60%, linfocitos 25%, neutrófilos 15%), mientras que menos del 15% son células de descamación que provienen de los tejidos mamaros (Porporatto & Felipe, 2013).

El contenido celular no siempre es el mismo debido a múltiples variaciones en la glándula mamaria, por ejemplo la fase de lactancia (Kleinschroth et al., 1991, pp. 24-25). Las influencias nocivas sobre la ubre como traumatismos y patógenos genera un incremento considerable y rápido del número de células

de la leche, principalmente leucocitos que son enviados por el sistema inmunitario para defensa y protección de la glándula mamaria (Kleinschroth et al., 1991, p. 25), (Brightling et al., 1998, p. 6).

El contenido de células en una muestra de leche se realiza por contaje directo (con el microscopio o equipos de medición automática) o de forma indirecta (métodos fisicoquímicos) (Porporatto & Felipe, 2013).

El criterio para definir la presencia de mastitis ha cambiado con el paso de los años, el límite actual es de 100 000 células por ml aunque varía según el país y la industria que procesa la leche (Harman, 2005) citado por (Markey et al., 2013, p. 433).

La infección de la glándula mamaria casi siempre se produce a través del canal del pezón; en bovinos, generalmente esto ocurre cuando el esfínter del pezón está abierto por un período de veinte minutos a dos horas luego del ordeño (Markey et al., 2013, p. 433). Luego de la invasión del agente infeccioso, se produce la infección y la inflamación. En la invasión los microorganismos pasan del exterior de la ubre al conducto glandular. En la infección, se produce una proliferación de los patógenos en el tejido mamario; como producto de lo anterior se daña el tejido, se crea una inflamación y se produce la mastitis clínica (Gasque, 2008, p. 176).

Dependiendo del desarrollo de la mastitis, en uno o varios cuartos se puede encontrar edema inflamatorio y atrofia del tejido mamario (etapa terminal de la mastitis crónica). En casos graves pueden observarse abscesos y gangrena (Gasque, 2008, pp. 176-177). Una de las consecuencias adversas de un proceso de mastitis es el desarrollo de tejido conjuntivo dentro de la ubre, en un intento de la glándula de bloquear la infección; este tejido reduce el potencial de producción de leche en la mama por ocupación de espacio donde deberían proliferar alveolos y conductos (Cunningham & Klein, 2009, p. 514).

4.3. Clasificación de la mastitis

Dependiendo del agente causal, de la reacción del huésped y de otros factores, la mastitis puede presentarse de varias formas.

Markey et al. (2013, p. 433) clasifican a la mastitis como se describe a continuación:

4.3.1. Hiperaguda:

Hinchazón, dolor, calor y secreción anormal en la glándula mamaria, acompañados de signos sistémicos como fiebre, depresión, anorexia, debilidad, y un pulso rápido y débil. Los signos son los de una toxemia o una septicemia. En esta categoría se incluye la mastitis gangrenosa.

4.3.2. Aguda:

Los cambios en la glándula mamaria son similares a los de la mastitis hiperaguda pero los signos sistémicos son mucho menos severos.

4.3.3. Subaguda:

No hay reacción sistémica y los cambios en la glándula mamaria son menos evidentes.

4.3.4. Crónica:

No se aprecian signos sistémicos y los signos externos de algún cambio en la ubre son muy pocos. De manera intermitente se observa secreción anormal en la glándula mamaria.

4.3.5. Subclínica:

La infección en la glándula mamaria es detectada únicamente mediante cultivo bacteriano o mediante pruebas que demuestran un alto contenido de leucocitos en leche.

Tabla 1. Formas de mastitis

Forma de mastitis	Vaca	Ubre	Leche
Mastitis clínica severa	Extremadamente enferma y deprimida, riesgo de muerte	Puede convertirse en gangrenosa (mastitis negra)	Al inicio puede tener apariencia normal aunque la vaca está claramente enferma; pronto se torna anormal, comúnmente acuosa y con sangre.
Mastitis clínica aguda	Puede o no estar enferma	Caliente, hinchada y dolorosa	Anormal, puede ser descolorida y contener coágulos y sangre.
Mastitis clínica	No se observan cambios	Se manifiesta un ligero cambio	Se observan anomalías
Mastitis clínica leve	No se observan cambios	No se manifiestan anomalías	Pocos coágulos o escamas
Mastitis crónica	No se observan cambios	Se pueden sentir bultos	Cambios leves como acuosidad
Mastitis subclínica	No se observan cambios	No se observan cambios	No hay cambios observables, pero sí cambios significativos en la composición de la leche.

Modificado de: (Brightling et al., 1998, p. 5)

4.4. Principales microorganismos relacionados con mastitis

La mayoría de los casos de mastitis son de origen microbiano (Porporatto & Felipe, 2013). “Los microorganismos patógenos de la mastitis se han clasificado en “contagiosos” o “ambientales” en función del reservorio primario de la infección y del modo de transmisión”. Actualmente este método de clasificación es demasiado simplista puesto que ahora existen nuevos métodos para tipificación de cepas; sin embargo, esta clasificación puede funcionar como una base para investigar factores de riesgo y establecer programas de

control en explotaciones con problemas, siempre y cuando se obtengan resultados significativos (Smith, 2010, p. 1116).

La mastitis contagiosa involucra microorganismos que viven dentro de la ubre o en la piel del pezón (Brightling et al., 1998, p. 3). El origen de la infección para patógenos contagiosos es la glándula mamaria de los animales infectados; la piel del pezón tiene menor importancia. La propagación de estos patógenos generalmente se da durante el proceso de ordeño por el contacto con leche infectada ya sea por la máquina o por las manos del ordeñador (Markey et al., 2013, p. 433). Como microorganismos representativos se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*; estos suelen producir una elevación persistente del RCS y una reducción en la producción láctea. *Corynebacterium bovis* es considerado como un microorganismo patógeno menos importante de la mastitis contagiosa y además presenta menor influencia en el RCS. Especies como *Mycoplasma* suelen considerarse como patógenos contagiosos a pesar de colonizar sitios corporales diferentes a la glándula mamaria, debido a que una vez establecida la infección intramamaria este microorganismo se propaga entre las vacas y ubres de manera contagiosa (Smith, 2010, p. 1116). La adherencia al epitelio de la glándula mamaria es un factor de virulencia importante en patógenos contagiosos mientras que no es esencial en la patogénesis de coliformes (Markey et al., 2013, p. 433).

“En la mastitis ambiental, el reservorio predominante es el ambiente.” (Smith, 2010, p. 1117). Los microorganismos causantes de esta mastitis se encuentran de manera general en los alrededores de la vaca: camas, suelo, majada, agua, entre otros. Se encuentran también en determinadas áreas del cuerpo del animal distintas a glándula mamaria. Las vacas en estabulación tienen mayor riesgo de desarrollar este tipo de mastitis, a diferencia de las vacas en pastoreo (Brightling et al., 1998, p. 4). Debido a que en estabulación la contaminación del segmento caudal del pezón es más común que en pastoreo, frecuentemente dicha contaminación puede resultar en infección (Markey et al., 2013, p. 433). Una vez que los microorganismos ambientales se encuentran en la piel del pezón, la glándula mamaria esta predispuesta a la infección,

particularmente cuando los sistemas de defensa se encuentran afectados (Smith, 2010, p. 1117). Como microorganismos representativos de mastitis ambiental están: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Pseudomonas* spp. (Brightling et al., 1998, p. 4). También se encuentra una flora oportunista o patógenos menores como los estafilococos coagulasa negativo (Porporatto & Felipe, 2013).

Los microorganismos ambientales no se encuentran adaptados completamente para vivir en la ubre a diferencia de los contagiosos (Brightling et al., 1998, p. 4).

Se han aislado más de 130 diferentes microorganismos de muestras de leche con mastitis, pero los patógenos más comunes son *Staphylococcus aureus*, estreptococos y enterobacterias, tanto en vacas como en otras especies (Markey et al., 2013, p. 433).

La identificación del agente causal de una infección sólo puede realizarse mediante un estudio bacteriológico, asociado a cultivo y/o la demostración microscópica. El cultivo del microorganismo se realiza en el medio adecuado y con determinadas condiciones como temperatura, humedad, entre otros (Kleinschroth et al., 1991, p. 28). Luego de realizar diferentes pruebas bioquímicas, se recomienda evaluar la sensibilidad del patógeno aislado a los diferentes antibióticos mediante un antibiograma. Esta información permitirá al médico veterinario brindar un tratamiento específico y tomar las medidas de control adecuadas.

4.4.1. Enterobacteriaceae

4.4.1.1. Características generales

Esta familia de bacterias entéricas tiene representantes que provocan enfermedades tanto en animales productores de alimentos, como en animales de compañía (Biberstein & Chung, 1994, p. 105).

La mayor parte de los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae son bacilos Gram negativos de un tamaño de 0.4-0.6 x 2-3 μm . Son inmóviles o

tienen arreglos de flagelos peritricos en caso de ser móviles. Son anaerobios facultativos, fermentan la glucosa, son catalasa positivos y oxidasa negativos (Markey et al., 2013, p. 239).

4.4.1.2. *Hábitat natural*

Los miembros de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos a nivel geográfico y muchos habitan en tierra, agua y plantas, así como en el intestino de animales y humanos (Markey et al., 2013, p. 239).

4.4.1.3. *Patogénesis y patogenia*

Todas las bacterias Gram negativas, incluyendo a los miembros de esta familia tienen lipopolisacáridos en la membrana externa de la pared celular, que son potentes endotoxinas (Markey et al., 2013, p. 245).

Los productos celulares de interés médico comunes a la mayoría de representantes son las endotoxinas lipopolisacárido (LPS); de este la fracción más importante es el lípido A, responsable de las consecuencias fisiológicas de la endotoxemia y varios sideróforos (moléculas que separan el hierro de las proteínas fijadoras de hierro del hospedador) (Biberstein & Chung, 1994, p. 107).

La bacteria debe morir y sufrir un proceso de lisis para que se liberen las endotoxinas; los efectos de las mismas en el cuerpo del animal incluyen fiebre y leucopenia, seguida de leucocitosis e hiperglucemia; posteriormente se produce hipoglucemia y luego de un período latente se puede presentar un shock letal (Markey et al., 2013, p. 245).

4.4.1.4. *Enterobacterias y mastitis*

Enterobacterias como *Escherichia coli* son consideradas como patógenos ambientales en lo que respecta al desarrollo de mastitis (Brightling et al., 1998, p. 4), (Porporatto & Felipe, 2013).

A diferencia de los microorganismos contagiosos, los ambientales no están adaptados completamente para vivir en la ubre; es por esto que a menudo las infecciones no persisten en ubres en producción. Comúnmente se observan

casos de mastitis ambiental cuando el sistema inmunitario de la vaca no puede responder de forma adecuada, por ejemplo en épocas de parto (Brightling et al., 1998, p. 4).

Este tipo de mastitis generalmente se presenta de forma clínica y puede comprometer la vida del animal, también se observan casos con infecciones de tipo subclínico (Markey et al., 2013, p. 436).

4.4.1.5. *Escherichia Coli*

Es la principal especie bacteriana Gram negativa facultativa que forma parte de la flora gastrointestinal y que puede ser agente causal de varias enfermedades en animales de granja. En casi todas las especies animales este patógeno se puede comportar como patógeno oportunista. *E. coli* produce por lo menos dos hemolisinas: α y β (Biberstein & Chung, 1994, p. 112).

Las cepas de *E. coli* capaces de producir enfermedades se encuentran en el último tramo del tubo intestinal y abundan en ambientes ocupados por animales; la transmisión tiene lugar por la vía fecal-oral (Biberstein & Chung, 1994, p. 112).

4.4.1.6. *Susceptibilidad antibiótica*

A pesar de que muchas enterobacterias son sensibles a antimicrobianos de amplio espectro, no se puede predecir con seguridad su sensibilidad, pudiendo modificarse rápidamente mediante la adquisición de plásmidos R (Biberstein & Chung, 1994, p. 107).

4.4.2. Estafilococos

4.4.2.1. *Características generales*

Existen alrededor de 30 especies de estafilococos. Se considera que estas bacterias constituyen la mayor parte de la microflora normal de animales y de humanos. Pocos llegan a ser dañinos, por lo que son considerados como patógenos oportunistas. Las infecciones causadas por estafilococos generalmente son agudas y piógenas (Markey et al., 2013, p. 105).

Son bacterias Gram positivas de forma redonda que forman agrupaciones irregulares (en los exudados forman racimos, parejas, tétradas o cadenas cortas), su diámetro va de 0,5 a 1,5 μm . Los estafilococos carecen de flagelos y la presencia de cápsula es inconstante (Biberstein & Chung, 1994, p. 167), pudiendo tener una cantidad limitada de esta última. Las colonias generalmente son de color blanco con bordes regulares. Estos microorganismos son inmóviles, no esporulantes, y en su mayoría son anaerobios facultativos con un metabolismo fermentativo. Generalmente son catalasa positivos y oxidasa negativos (Markey et al., 2013, P. 105).

4.4.2.2. *Hábitat natural*

Es posible que se localicen en el tracto respiratorio alto y en otras superficies revestidas de epitelio de animales de sangre caliente (Biberstein & Chung, 1994, p. 167). Pueden encontrarse de manera transitoria en el tracto intestinal (Markey et al., 2013, p. 105). Las especies de interés veterinario son las siguientes: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, y *S. hyicus* (Biberstein & Chung, 1994, p. 167).

Las especies coagulasa positivos como *S. aureus* y *S. intermedius* habitan en la ubre de las vacas, entre otros lugares (Biberstein & Chung, 1994, p. 169).

Los estafilococos se transmiten tanto por contacto directo como por contacto indirecto. La prolongada supervivencia de estos microorganismos en el medio ambiente (resistencia al calor, NaCl y ciertos desinfectantes) permite la transmisión indirecta. Es probable que algunas infecciones se produzcan por cepas residentes (origen endógeno) (Biberstein & Chung, 1994, p. 169), (Markey et al., 2013, p. 105).

4.4.2.3. *Patogénesis y patogenicidad*

El mecanismo predominante en la patogenicidad de los estafilococos es la supuración y la formación de abscesos. En un absceso el pus está rodeado por leucocitos y por hebras de fibrina; a menos que el pus tenga alguna salida, poco a poco se formará una cápsula fibrosa alrededor del mismo (Biberstein & Chung, 1994, pp. 169-170).

Los estafilococos patógenos producen una serie de toxinas y enzimas pero la significancia de muchas de estas en la patogénesis de la enfermedad, no está bien definida. Una leucocidina producida tiene la capacidad de matar neutrófilos y macrófagos del ganado, conejos y humanos. La proteína A, un componente de superficie de la mayoría de cepas virulentas de *S. aureus*, se une al fragmento cristalizable (Fc) de las IgG y puede tener una parte en la patogénesis de las enfermedades estafilocócicas (Markey et al., 2013, pp. 106-107).

La toxina alfa (una hemolisina) se asocia con mastitis gangrenosa en el ganado. Esta es una toxina formadora de poros y causa un daño a nivel lisosomal en los leucocitos. Afecta además al músculo liso, lo que lleva a la constricción, parálisis y finalmente necrosis del músculo liso en los vasos sanguíneos (Markey et al., 2013, pp. 106).

La eliminación de estafilococos depende principalmente de procesos de fagocitosis aunque se considera importante la inmunidad humoral. Una vez que un individuo se cura de una infección causada por estafilococos, adquiere una resistencia temporal (Biberstein & Chung, 1994, p. 171).

4.4.2.4. *Estafilococos y mastitis*

En algunas ocasiones la mastitis bovina es producida por estafilococos coagulasa negativos, principalmente por *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. xilosus* y *S. sciuri* (Biberstein & Chung, 1994, p. 170).

Es posible que los estafilococos penetren en la glándula mamaria durante el ordeño, por lo que las prácticas de manejo como la higiene en el ordeño influyen de forma importante en su presentación (Biberstein & Chung, 1994, p. 171).

Si bien la vacunación no se usa de manera rutinaria en los hatos lecheros, en la actualidad se encuentra en el mercado una vacuna contra *S. aureus* específicamente en mastitis. A pesar de que la vacuna no previene la aparición de la mastitis, reduce la gravedad de las infecciones tanto clínicas como subclínicas (Markey et al., 2013, p. 117).

4.4.2.5. *Staphylococcus aureus*

Uno de los principales agentes implicados en la mastitis bovina es *S. aureus*. La infección se produce a través del canal del pezón. El curso de la infección viene determinado por la resistencia del huésped, la cepa infectante y la dosis de esta última. El curso puede variar desde una infección subclínica a una aguda supurativa, gangrenosa o crónica (Biberstein & Chung, 1994, p. 170).

El *S. aureus* es coagulasa positivo. Generalmente la prueba de coagulasa tiene una buena correlación con la patogenicidad (Markey et al., 2013, p. 105). Esta especie excreta varias toxinas con actividad biológica, como por ejemplo enzimas, leucocidina y toxinas hemolíticas (*alfa, beta, delta, gamma*). Estas últimas bien pueden presentarse de manera aislada, en combinación o no estar presentes. Se diferencian antigénicamente, bioquímicamente, y por su efecto sobre los eritrocitos de varias especies animales (Biberstein & Chung, 1994, pp. 167-168).

4.4.2.6. *Susceptibilidad antibiótica*

Los estafilococos adquieren resistencia a los antibióticos rápidamente. La resistencia a los antibióticos betalactámicos es frecuente debido a la presencia de un plásmido codificado para penicilinasas (betalactamasas). La tolerancia es una forma menos común de resistencia a la penicilina (Markey et al., 2013, p. 117). La resistencia a este antibiótico puede darse por la producción de β -lactamasas o por alteración de las PBP (proteínas ligadoras de penicilina).

La resistencia frente a la oxacilina se conoce como meticilinorresistencia (MR), la presencia de esta última, generalmente se acompaña de resistencia a gentamicina, eritromicina, cloranfenicol y tetraciclinas. Esta multirresistencia a los antibióticos llega a ser un grave problema de salud pública (Stanchi, 2007, p.193).

La resistencia a otros agentes antimicrobianos también es común entre los estafilococos (Markey et al., 2013, p. 117).

4.4.3. Estreptococos

4.4.3.1. *Características generales*

Estas bacterias manifiestan una gran variedad ecológica, fisiológica, serológica y genética. Son cocos Gram positivos aunque en cultivos viejos (de más de 18 horas), las bacterias se pueden teñir como Gram negativos. (Biberstein & Chung, 1994, p. 175). Se disponen solos, en pares, o en cadenas de diversa longitud (Markey et al., 2013, p. 121). La formación de cadenas es variable aunque algunas especies de estreptococos siempre forman cadenas (Biberstein & Chung, 1994, p. 175). Cada coco tiene menos de 2 μm de diámetro y puede aparecer de forma esférica u ovoide. Los estreptococos son inmóviles, anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativos. Para su cultivo necesitan medios enriquecidos con sangre o suero. Son susceptibles a la desecación y comúnmente no sobreviven mucho tiempo fuera de su hospedador (Markey et al., 2013, p. 121).

Los efectos que producen los estreptococos sobre el agar sangre permiten clasificarlos en tres grupos de acuerdo al grado de hemólisis:

- (α) Alfa-hemólisis: no hay destrucción de los eritrocitos pero sí originan un halo de tono verdoso alrededor de las colonias bacterianas. En los animales, la mayoría de los estreptococos comensales son de este tipo.
- (β) Beta-hemólisis: existe destrucción de los eritrocitos por lo que se distingue una zona clara de hemólisis alrededor de la colonia. La mayoría de estos estreptococos son patógenos para los animales.
- (γ) Gamma-hemólisis: no se aprecia hemólisis, es decir son anhemolíticos. La mayoría de estos estreptococos no son patógenos.

(Biberstein & Chung, 1994, p. 176).

Los estreptococos pueden clasificarse serológicamente de acuerdo a los grupos de Lancefield. Esto se basa en la presencia de polisacáridos de la pared celular específicos de grupo (Biberstein & Chung, 1994, p. 175). Estos grupos van desde la "A" hasta la "H" y de la "K" a la "V". Algunos aislamientos

no pueden ser clasificados en estos grupos. El método más común para clasificar a los estreptococos según su grupo de Lancefield, es la prueba de aglutinación en látex. Existen kits disponibles a nivel comercial para clasificar estreptococos en los Grupos "A", "B", "C", "D", "F" y "G" (Markey et al., 2013, p. 121).

4.4.3.2. *Hábitat natural*

Los animales de sangre caliente tienen varios estreptococos que residen en las mucosas de las vías respiratorias altas y del tracto genital inferior (Biberstein & Chung, 1994, p. 175).

4.4.3.3. *Patogénesis y patogenia*

Los estreptococos provocan fenómenos inflamatorios que pueden originar supuración y formación de abscesos. El proceso patológico básico es parecido al de la infección estafilocócica (Biberstein & Chung, 1994, p. 179).

La infección se produce a través del conducto del pezón. La multiplicación bacteriana en los conductos galactóforos y alvéolos de la glándula mamaria produce una inflamación aguda seguida de cierto grado de fibrosis. Sucesivos procesos inflamatorios van dando lugar a la sustitución del tejido secretor de la glándula por tejido conjuntivo fibroso. Si el proceso avanza, con el tiempo podría desaparecer la totalidad de la glándula mamaria. Durante las fases activas del proceso infeccioso crónico, la secreción láctea disminuye (Biberstein & Chung, 1994, p. 180-181).

Las cápsulas de polisacáridos de *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* y algunas cepas de *S. equi* subsp. *equi* y *S. agalactiae* son antifagocíticas (Markey et al., 2013, p. 121); otros constituyentes celulares antifagocíticos y las citotoxinas de los estreptococos son posibles factores de virulencia (Biberstein & Chung, 1994, p. 179).

Biberstein & Chung (1994, p. 181), plantean que en la mastitis los animales no desarrollan una inmunidad eficaz y que a menos que se traten, las vacas permanecen infectadas.

4.4.3.4. *Streptococcus y mastitis*

Streptococcus dysgalactiae subsp. *dysgalactiae* es un patógeno oportunista que causa casos esporádicos de mastitis aguda o subclínica. Se ha reportado que las picaduras de insectos y otros daños al epitelio del pezón facilitan la infección de la glándula mamaria (Markey et al., 2013, p. 122).

Streptococcus uberis es un organismo comensal encontrado en las tonsilas, tracto gastrointestinal y genital de la vaca, y en el medio ambiente. Este puede causar mastitis a través de una infección ascendente del canal del pezón. Se lo asocia con infecciones intramamarias tanto clínicas como subclínicas en animales estabulados o en pastoreo (Markey et al., 2013, pp. 122-125).

Se considera que *S. Pyogenes* puede llegar a producir mastitis, aunque estos casos son raros al igual que *S. pneumoniae*, *S. zooepidermicus* y *S. bovis*. (Biberstein & Chung, 1994, p. 180), (Markey et al., 2013, p. 123).

4.4.3.5. *Streptococcus agalactiae*

Se lo conoce bien por ser un agente causal de mastitis crónica contagiosa. Este patógeno ingresa a través del orificio del pezón y se adhiere al epitelio de la glándula mamaria, para luego colonizar los conductos lactíferos. La inflamación y fibrosis de la glándula lleva a la formación de un tapón de fibrina en los conductos, involución del tejido glandular y agalactia. Si el animal no recibe un tratamiento con agentes antimicrobianos, la infección se puede volver crónica (Markey et al., 2013, p. 122).

Este patógeno presenta el factor de CAMP que intensifica la hemólisis de la toxina beta (esfingomielinasa). Este factor es citotóxico y letal para los cultivos celulares, posiblemente también es citotóxico para el tejido mamario (Markey et al., 2013, P. 126).

4.4.3.6. *Sensibilidad antibiótica*

Los patrones de resistencia de estreptococos varían dependiendo de la especie y de la región (Markey et al., 2013, P. 133). Por lo general son sensibles frente a los antibióticos, actualmente se recomienda probar con penicilina o ampicilina y eritromicina. La resistencia que presentan algunas cepas de estreptococos a

los β -lactámicos, está asociada a ciertos fenotipos y viene determinada por la modificación de su sitio blanco, PBP (proteínas ligadoras de penicilina) de baja afinidad, lo que causa que el β -lactámico no se pueda unir y ejercer su acción. La producción de la enzima β -lactamasa es otro mecanismo de resistencia (Stanchi, 2007, p. 182).

4.4.4. Otros microorganismos causantes de mastitis

Enterococcus faecalis, *E. faecium* y *E. durans* se encuentran en el tracto intestinal de muchos animales. Los enterococos son patógenos oportunistas capaces de causar mastitis bovina, entre otras infecciones (Markey et al., 2013, p. 124)

4.5. Microorganismos implicados en la salud pública

Staphylococcus aureus y *Streptococcus* spp. son algunos de los patógenos más frecuentes que se encuentran en la leche cruda. Los niveles y la composición de la microbiota inicial de la leche son influenciados por muchos factores, entre los que se incluyen enfermedades de la ubre. Los patógenos tienden a estar presentes en la leche cruda pero se pueden mantener bajos niveles de los mismos, si se implementan programas de higiene adecuados para controlar la contaminación inicial. Entre estos programas debe estar uno específico para el control de la mastitis (International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF], 2011, pp. 305, 306).

La resistencia bacteriana y fúngica a las drogas antimicrobianas constituye un problema creciente en medicina humana y veterinaria. Con frecuencia, el desarrollo de resistencia a un fármaco confiere resistencia cruzada a otros agentes (Markey et al., 2013, p. 99). “La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos no puede ser vista como un problema local, ni siquiera nacional, se trata de un problema global que requiere de una estrategia común” (Sánchez, 2003, p. 59).

4.6. Métodos de detección de la mastitis

4.6.1. Recuento de células somáticas (RCS)

El recuento de células somáticas (RCS) se refiere al número de células presentes en leche. Las células somáticas están constituidas por leucocitos y células epiteliales (Blowey & Edmondson, 1995, p. 135). Una observación constante en la mastitis subclínica es un aumento del RCS en leche. Un RCS mayor a 100 000/ml indica inflamación pero no necesariamente infección. El umbral más utilizado para sugerir la presencia de mastitis subclínica es de 200 000 o 250 000/ml en el ganado bovino. El RCS puede cuantificarse a través de la observación microscópica directa o con otros métodos, por ejemplo un contador de Coulter (Smith, 2010, p. 1115).

4.6.2 Prueba de California para Mastitis (C.M.T.)

El California Mastitis Test es una prueba sencilla que permite detectar la presencia de mastitis subclínica (Blowey & Edmondson, 1995, p. 137). Esta prueba refleja de manera indirecta la cantidad de células somáticas presentes en muestras de leche individuales. El C.M.T. puede utilizarse en campo o laboratorio y se basa en la cantidad de ADN presente en la leche, y por lo tanto en el número de leucocitos y otras células presentes. Se deposita un chorro de leche en cada pocillo de la paleta de C.M.T. (cada cuarto tiene su pocillo respectivo), se añade la misma cantidad de reactivo a cada pocillo. Se agita la paleta cuidadosamente y en movimientos circulares, en un plano horizontal. (Markey et al., 2013, p. 441-442). La reacción ocurre en pocos segundos y se evalúa según la tabla 2.

Tabla 2. Correlación entre el C.M.T. y la cantidad de células somáticas

Puntaje C.M.T.	Interpretación	Reacción visible	Contaje celular total (/ml)
0	Negativo	Leche fluida y normal	0 - 200 000 0 - 25% neutrófilos
T	Trazas	Ligera precipitación	150 000 - 500 000 30 – 40% neutrófilos
1 (+)	Positivo débil	Se distingue precipitación pero no hay formación de gel.	De 400 000 - 1 500 000 40 – 60% neutrófilos
2 (++)	Positivo evidente	La mezcla se espesa, existe formación de gel.	800 000 - 5 000 000 60 – 70% neutrófilos
3 (+++)	Positivo Fuerte	Viscosidad considerablemente aumentada. Gel sólido que es cohesivo con una superficie convexa.	\geq 5 000 000 70 – 80% neutrófilos

Tomado de: (Markey et al., 2013, p. 442)

4.6.3 Conductividad eléctrica

Esta prueba es una alternativa para detectar la presencia de mastitis subclínica. La base de este método es que en presencia de mastitis aumenta la conductividad eléctrica en leche como consecuencia de elevados niveles de iones sodio y cloro (Markey et al., 2013, p. 443). Una ventaja de este método es que puede medirse la conductividad eléctrica durante el ordeño y es adaptable a sistemas de ordeño robóticos lo que permite detectar cambios sugerentes de mastitis de forma precoz (Smith, 2010, pp. 1115-1116). Sin embargo, el nivel de conductividad eléctrica natural en leche varía mucho entre

vacas y en diferentes momentos durante el ordeño para cada animal. Para encontrar un cuarto enfermo es mejor comparar entre cuartos de la misma vaca al mismo tiempo, que buscar un nivel de conductividad eléctrica absoluto; el cuarto que posea niveles significativamente más altos que los otros es el cuarto afectado (Brightling et al., 1998, p. 9).

4.6.4 Otros indicadores de mastitis subclínica

Cuando existe un proceso de mastitis, se evidencian numerosos cambios a nivel de la glándula mamaria además del aumento de las células somáticas; entre estos se describen: reducción de los niveles de caseína, lactosa y α -lactoalbúmina. Las concentraciones de proteínas de fase aguda amilode A en leche también indican presencia de mastitis subclínica. Este tipo de pruebas se utilizan básicamente en investigación ya que no se ha demostrado que sean más precisas o prácticas que el RCS (Smith, 2010, p. 1116). Otros autores plantean que la haptoglobina (otra proteína de fase aguda) es un potencial indicador de mastitis que permitiría detectar casos de esta afección incluso antes que otros indicadores como el RCS (González, Martínez Subiela, & Cerón, 2007, p. 9)

4.6.5 Detección de mastitis clínica

La mastitis clínica se reconoce por la presencia de signos evidentes de inflamación (Kleinschroth et al., 1991, p. 13). En casos de mastitis clínica leve, la leche presenta alteraciones en el color, viscosidad (acuosa, espesa) o la consistencia (presencia de escamas o de material inflamatorio). En casos moderados la glándula mamaria está inflamada (tumefacta, caliente, enrojecida, dolorosa) y puede disminuir la producción láctea. En la mastitis clínica grave los cambios en la leche y glándula mamaria se acompañan de signos sistémicos (Smith, 2010, p. 1116). Un método bastante común para detección de mastitis clínica es la utilización de un jarro de fondo oscuro; las anomalías de la leche se observan con mayor claridad en este recipiente (Carrión, 2001; citado por (Bedolla & Catañeda, 2007, p. 4)).

4.7. Tratamiento y control

Según el artículo 6.9.7. del capítulo 6.9 del código sanitario para los animales terrestres de la OIE (2014) un médico veterinario debe ser el responsable de supervisar un plan de control para mastitis en las explotaciones lecheras.

El control de la mastitis requiere conocimiento de los agentes causales que interactúan con el medio ambiente y el huésped (Porporatto & Felipe, 2013).

Según Blowey & Edmondson (1995, p. 163), el tratamiento de la mastitis se puede administrar en dos fases diferentes durante el ciclo de lactación de la vaca:

- Terapia a vacas lactantes
- Terapia a vacas secas

4.7.1. Período seco

El riesgo de infección aumenta en las fases temprana y tardía del período seco, cuando la secreción se acumula en la glándula y se ven alterados los mecanismos de defensa. El tratamiento antibiótico general de las vacas secas es la manera más eficaz de solucionar una mastitis contagiosa una vez que aparece. El tratamiento antibiótico al final de la lactancia puede reducir la mastitis ambiental estreptocócica, al resolver infecciones existentes y evitar nuevas al inicio del período seco; pero al final del mismo la concentración de antibióticos es demasiado baja y no actúa frente a este tipo de infecciones. Es importante tomar en cuenta que el tratamiento antibiótico del final de la lactación generalmente no evita ni resuelve infecciones causadas por coliformes u otros patógenos ambientales (Smith, 2010, pp. 1117-1118).

4.7.2. Control de patógenos contagiosos

La infección por *S. agalactiae*, *S. aureus* y *Corynebacterium bovis* (patógenos contagiosos) puede manejarse poniendo en marcha un programa de control de mastitis basado en 5 puntos:

1. Desinfección del pezón con germicida luego del ordeño.

2. Tratamiento antibiótico de todos los cuartos de todas las vacas en el período seco.
3. Sacrificio de animales con infecciones crónicas.
4. Reconocimiento y tratamiento temprano de los casos de mastitis clínica.
5. Uso adecuado y mantenimiento de la máquina de ordeño.

Adicionalmente se recomienda utilizar paños o toallas de papel individuales, es decir una por animal al momento de preparar los pezones para el ordeño. El personal de ordeño debe utilizar guantes. Las vacas con problemas de mastitis deben ser ordeñadas al final (Smith, 2010, p. 1117).

4.7.3 Control de mastitis ambiental

Es importante tomar en cuenta que los cinco puntos del programa de control de la mastitis no controlan de manera eficaz la mastitis ambiental. En este caso el control se basa en reducir la exposición de los pezones a los patógenos ambientales y esto se logra al limpiar con frecuencia el estiércol de corrales y pasillos, entre otros. Se debe limitar el acceso a zonas húmedas y embarradas y evitar el hacinamiento (Smith, 2010, p. 1117).

4.7.4 Terapia antimicrobiana específica

Muchos casos de mastitis se resuelven por sí solos, ya que la infección es eliminada de modo natural por la vaca sin necesidad de tratamiento; existen varias opiniones al respecto, tanto a favor como en contra, debido a los diversos factores involucrados como el tipo y gravedad de mastitis, el microorganismo que está causando la mastitis y la rentabilidad del tratamiento, entre otros (Blowey & Edmondson, 1995, p. 166).

El fármaco de elección al momento de tratar un caso de mastitis depende de la sensibilidad de los patógenos y depende del tipo de antimicrobiano que alcance altas concentraciones en la glándula mamaria, sin provocar cambios en el tejido. La formulación de los antimicrobianos, incluyendo la cantidad de fármaco presente y las propiedades físicas del vehículo, tienen influencia en la distribución y persistencia del mismo en el tejido mamario (Markey et al., 2013, pp. 451,452).

En el mercado existen diferentes opciones de antimicrobianos intramamarios para el tratamiento de la mastitis, ya que esta vía de administración usualmente resulta práctica y conveniente (Markey et al., 2013, p. 451). En ocasiones se puede combinar la terapia con antibióticos sistémicos. El tratamiento debe enfocarse en lo posible a cada patógeno de manera individualizada, respondiendo al correspondiente antibiograma.

Generalmente, *S. agalactiae* es muy sensible a la penicilina y otros antibióticos de infusión intramamaria. En explotaciones con casos frecuentes de mastitis por *S. agalactiae* y pérdidas económicas significativas, se acepta un tratamiento en masa tipo “blitz”. Este tratamiento se lleva a cabo al tratar a todas las vacas en período de lactación o cultivando la leche de todas las vacas en periodo de lactación y tratando a las que tengan una infección por *S. agalactiae* (Blowey & Edmondson, 1995, p. 171), (Smith, 2010, p. 1121).

El tratamiento de casos de mastitis producida por estafilococos es más complicado que el de estreptococos, ya que generalmente no se obtienen los resultados esperados (Kleinschroth et al., 1991, p. 19), (Blowey & Edmondson, 1995, p. 166) y por esto, comúnmente sólo se tratan en el período de lactancia las mastitis clínicamente detectables; las de tipo subclínico suelen tratarse en el secado (Kleinschroth et al., 1991, p. 19).

Varios factores del animal influyen en la respuesta de *S. aureus* al tratamiento antibiótico durante la lactación o en el período seco, por ejemplo: el número de partos, la fase de lactación, el RCS y el cuarto afectado. Vacas con más de dos partos, vacas en la primera fase a la mitad de la lactación, cuartos con un RCS superior a 1×10^6 /ml y los cuartos posteriores, tienen mayor riesgo de fracaso terapéutico. Los antibióticos intramamarios son los de elección y se recomienda que sean resistentes a la β -lactamasa como la cefapirina, el ceftiofur o la cloxacilina (Smith, 2010, pp. 1121-1122).

Fracasos en el tratamiento de vacas con mastitis clínica se deben a alteraciones en el tejido glandular y conductos galactóforos. La formación de abscesos, edema y necrosis tisular, entre otros, causan una mala distribución

del fármaco. La resistencia bacteriana, dosificación insuficiente o la escasa duración del tratamiento son otras causas de fracasos en el tratamiento de la mastitis clínica (Kleinschroth et al., 1991, pp. 17,22).

Es importante tomar en cuenta que la falta de desinfección adecuada de los extremos del pezón antes de tratar a las vacas y el uso de antibióticos y equipos de infusión intramamarios contaminados, pueden dar lugar a la aparición de brotes significativos de mastitis ambiental (Smith, 2010, p. 1121).

4.7.5 Control de la mastitis en el ordeño

Tomando en cuenta que el proceso de ordeño es un factor determinante para la presentación de mastitis, Porporatto & Felipe (2013) mencionan los puntos críticos en una rutina de ordeño:

1. Adecuación del ambiente y trato del animal: óptima higiene, evitar el estrés en los animales.
2. Higiene del pezón: utilización de guantes, solución desinfectante pre-dipping, toallas individuales, no utilizar agua (únicamente en casos que lo amerite y solo en los pezones).
3. Despunte o eliminación de los primeros chorros: detección de mastitis clínica y estimular la bajada de la leche.
4. Colocación de la unidad de ordeño: colocar la unidad luego de una adecuada estimulación de los pezones, evitar entradas de aire, mantenimiento adecuado.
5. Retiro de la unidad ordeño: cortar el vacío, evitar el sobre ordeño.
6. Sellado de pezones: productos desinfectantes de buena calidad que limiten el contagio y protejan la piel del pezón.
7. Destino de los animales: luego del ordeño los animales deben permanecer parados para permitir que se cierre el esfínter del pezón, antes de que la ubre entre en contacto con microorganismos; para tal efecto se debe ofrecer alimento al animal.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Experimental

Muestras de leche bovina para análisis de células somáticas, cultivo y antibiograma.

5.1.2. Laboratorio

Autoclave, refrigeradora, microscopio, incubadora bacteriológica, asas de siembra bacteriológica, cajas Petri, porta objetos, hisopos estériles, tinción Gram, aceite de inmersión, medios de cultivo (diferentes tipos de agar), peróxido de hidrógeno.

5.1.3. Campo

Guantes de látex, toallas de papel descartables, recipiente de fondo oscuro, paletas para análisis de C.M.T., reactivo C.M.T., alcohol etílico (70%), frasco rociador, gasas, recipientes estériles, nevera portátil, gel refrigerante, cámara fotográfica, cuaderno, bolígrafo, libreta, fundas para basura, overol, botas.

5.2. Metodología

5.2.1. Características del sitio experimental

5.2.1.1. Ubicación

La investigación se realizó en explotaciones lecheras de pequeños productores en seis comunidades de dos provincias:

- Provincia: Imbabura, cantón: Otavalo, parroquia: González Suarez comunidad: El Cajas.
- Provincia: Pichincha, cantón: Cayambe, parroquia: Olmedo, comunidades Contadero, Pesillo, San Pablo Urco y El Chaupi.
- Provincia: Pichincha, cantón: Quito, parroquia: Pintag, comunidad: Ubillus.

Las características geográficas de estas zonas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Ubicaciones geográficas de las localidades en estudio

Provincia	Cantón	Parroquia	Comunidad	Altitud	Latitud	Longitud
Imbabura	Otavaló	González Suárez	El Cajas	3091 m	0°08'0,8" N	78°11'10" O
Pichincha	Cayambe	Olmedo	Contadero	3271 m	0°08'01,8" N	78°02'14,1" O
Pichincha	Cayambe	Olmedo	Pesillo	3173 m	0°08'44,4" N	78°03'11,3" O
Pichincha	Cayambe	Olmedo	San Pablo Urco	3108 m	0°08'09,4" N	78°04'33,4" O
Pichincha	Cayambe	Olmedo	El Chaupi	3062 m	0°06'56,6" N	78°05'19,5" O
Pichincha	Quito	Pintag	Ubillus	3260 m	0°27'02,5" S	78°22'23,4" O

Tomado de: (INIAP, 2013)

5.2.2. Factores en estudio

- F1: Comunidades productoras de leche
 - En Pichincha: Contadero, Pesillo, San Pablo Urco, El Chaupi, Ubillus
 - En Imbabura: El Cajas

- F2: Cuadros de mastitis
 - Mastitis clínica
 - Mastitis subclínica

- F3: Patógenos asociados a procesos de mastitis
 - *Staphylococcus*
 - *Streptococcus*
 - *Escherichia*

5.2.3. Unidad experimental

La unidad experimental estaba constituida por un bovino en producción de las comunidades en estudio.

5.2.4. Análisis estadístico

5.2.4.1. *Determinación de la población y muestra:*

La investigación se realizó en predios seleccionados de pequeños productores; en la provincia de Pichincha se trabajó con cinco comunidades y en la de Imbabura con una comunidad.

Se determinó como población objetivo la siguiente: Productores con animales en producción de las comunidades seleccionadas por el INIAP. En este caso se procedió a muestrear el 100% de la población objetivo, constituida por 211 animales.

5.2.4.2. *Análisis de datos*

a) *Análisis de prevalencia aparente de mastitis*

El análisis estadístico se realizó con base en los resultados obtenidos, manejando por separado los casos de mastitis clínica y los de mastitis subclínica.

Para obtener la prevalencia aparente de mastitis (clínica y subclínica) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{número de casos}}{\text{número total de animales}} = \text{Prevalencia aparente} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Los datos para hallar la prevalencia aparente de mastitis clínica fueron obtenidos mediante un examen físico de la glándula mamaria y de la leche (recipiente de fondo oscuro).

Para evaluar la prevalencia aparente de mastitis subclínica los datos fueron obtenidos mediante la prueba de C.M.T. Una vez determinada la prevalencia aparente por comunidad, se procedió a comparar los datos entre las comunidades en estudio.

b) *Análisis de prevalencia aparente de microorganismos*

Se estimó la prevalencia aparente de microorganismos por comunidad. Para tal efecto se utilizaron las fórmulas planteadas anteriormente.

c) Análisis de χ^2 para frecuencias observadas y esperadas

Se realizó un análisis mediante la distribución χ^2 (chi-cuadrado ó ji-cuadrado) con el fin de analizar la frecuencia observada en la investigación y la esperada. Se determinó la concordancia o no de ambas frecuencias. Para tal efecto se utilizó el programa estadístico “Statistix”.

d) Análisis de la sensibilidad antibiótica: antibiogramas

Se realizó un estudio estadístico de tipo descriptivo mediante tablas y gráficos para analizar los datos obtenidos de los antibiogramas.

5.2.5. Variables y métodos de evaluación

5.2.5.1. Prevalencia aparente de mastitis por comunidad

Para estimar la prevalencia aparente de mastitis por comunidad, se procedió a la recolección de muestras de leche bovina antes del ordeño, de todos los animales en estudio.

Para estimar la prevalencia aparente de mastitis clínica por comunidad se evaluó la glándula mamaria y la leche; para esta última se utilizó un recipiente de fondo oscuro y los primeros chorros de leche. Posteriormente se procedió a tomar las muestras para realizar el C.M.T., según el protocolo modificado de: Procedimiento operativo estándar: Toma y envío de muestras al laboratorio. Manual de procedimientos. LVX/POE/020-01.2014. Los resultados del análisis se interpretaron en base a la tabla 5.

- Con los resultados obtenidos de las comunidades en estudio se procedió a identificar las áreas de mayor prevalencia tanto para mastitis clínica como para mastitis subclínica. Se manejaron los datos de cada tipo de mastitis por separado.

5.2.5.2. Prevalencia aparente de microorganismos relacionados con mastitis por comunidad

Se procedió a tomar otra muestra de leche bovina de cada cuarto según el protocolo modificado de: Procedimiento operativo estándar: Toma y envío de muestras al laboratorio. Manual de procedimientos. LVX/POE/020-01.2014.

Con dichas muestras se realizó un pool por animal que tuviera uno o más cuartos positivos a mastitis según el C.M.T., posteriormente se envió cada pool al laboratorio para su respectivo análisis (cultivo y antibiograma). Si se determinaba la existencia de mastitis clínica, el cultivo y aislamiento de esta muestra se realizaba por separado (sin pertenecer a ningún pool).

Con los resultados obtenidos de cada cultivo bacteriano se procedió a:

–Estimar la presencia del microorganismo por comunidad, manejando de manera individual cada patógeno.

5.2.5.3. Sensibilidad antibiótica de microorganismos

Luego de realizar los procesos descritos anteriormente y de enviar las muestras al laboratorio para el análisis respectivo, se evaluaron los resultados obtenidos en cuanto a sensibilidad y resistencia de los microorganismos según los correspondientes antibiogramas. Con esta información se procedió a realizar un análisis estadístico de tipo descriptivo el cual se manejó mediante tablas y gráficos.

5.2.6. Manejo específico del experimento

5.2.6.1. Codificación de las muestras

Para identificar las muestras se le asignó un código específico a cada una de ellas basado en números que siguen una secuencia lógica. Este código se basa en los siguientes datos:

Tabla 4. Código de muestreo

Comunidad	Productor	Animal	Cuarto
1	1	1	1

El primer número de cada código indica a qué comunidad pertenece, el segundo número indica a qué productor, el siguiente a qué animal y el último a qué cuarto pertenece cada una de las muestras en estudio. El número que se asignó de “Productor” y “Animal” varía según cada comunidad, mientras que el número asignado para “Comunidad” sólo puede ir del 1 al 6 (puesto que hay 6 comunidades en estudio), en el caso de “Cuarto” va del 1 al 4, siendo el 1: cuarto anterior izquierdo, 2: cuarto anterior derecho, 3: cuarto posterior izquierdo y 4: cuarto posterior derecho. En el caso de las muestras pertenecientes al pool, estas llevaban únicamente las tres primeras categorías para su codificación. De esta manera cada una de las muestras tenía un código único para su análisis.

5.2.6.2. Toma de datos y evaluación de la glándula mamaria

Utilizando guantes de látex se realizó un examen físico a la glándula mamaria mediante inspección buscando engrosamientos, estrechamientos, alteraciones de la piel, pezones y lesiones traumáticas. A continuación se realizó la palpación de la ubre y del pezón tratando de localizar zonas dolorosas o engrosadas (Kleinschroth et al., 1991, p. 27).

En caso de que el animal presentara signos clínicos sistémicos, se realizaría un examen físico completo.

5.2.6.3. Toma de muestras de leche

El siguiente proceso se lo realizó en cada animal previo al proceso de ordeño:

5.2.6.3.1. Toma de muestras y determinación de mastitis clínica (Recipiente de fondo oscuro)

Para evaluar la leche se extrajeron los primeros chorros en un recipiente de fondo oscuro que permite una mejor visualización de las alteraciones físicas de la misma, tales como: grumos, coágulos, tolondrones y secreciones anormales, entre otros (Gasque, 2008, pp. 179,178).

5.2.6.3.2. *Toma de muestras y determinación de mastitis subclínica (C.M.T)*

1. Limpiar la ubre con una toalla de papel seca, (si se encuentra muy sucia se procede a limpiarla con el papel toalla ligeramente humedecido).
2. Introducir 2-3 ml leche de cada cuarto en su pocillo correspondiente de la paleta.
3. Agregar igual cantidad del reactivo C.M.T.
4. Agitar la paleta en forma circular hasta mezclar muy bien la leche y el reactivo.
5. Realizar la lectura según la tabla 5.

Protocolo modificado de: Procedimiento operativo estándar: Toma y envío de muestras al laboratorio. Manual de procedimientos. LVX/POE/020-01.2014.

Tabla 5. Lectura del C.M.T.

Hallazgo	Descripción
Negativo	El estado de la solución permanece inalterado. La mezcla sigue en estado líquido.
Trazas	Se forma un precipitado en el piso de la paleta que desaparece pronto.
1 (+)	Hay mayor precipitado pero no se forma gel
2 (++)	El precipitado se torna denso y se concentra en el centro.
3 (+++)	Se forma un gel muy denso que se adhiere a la paleta.

Tomado de: (Laboratorios Industriales Farmacéuticos Ecuatorianos [LIFE], 2012)

5.2.6.3.3. *Toma de muestras para Cultivo y aislamiento*

1. Desinfectar las manos del operador con alcohol al etílico 70% y utilizar guantes de látex
2. Desinfectar cuidadosamente la ubre con alcohol etílico al 70%
3. Desinfectar la punta del pezón con una gasa empapada en alcohol etílico al 70%

4. Dejar actuar el desinfectante durante dos minutos
5. Tomar la muestra de leche en envases estériles cuidando de no tocar los bordes
6. Identificar cuidadosamente cada una de las muestras con un marcador permanente (Identificación por animal, por productor y por zona)
7. Transportar las muestras al laboratorio en una nevera portátil con hielo artificial para su análisis en el menor tiempo posible.

No se deben tomar muestras de animales que hayan recibido tratamiento antibiótico en los últimos 10 días,

Protocolo modificado de: (LIVEXLAB, 2014, pp. 4, 5, 9)

5.2.6.4. *Determinación del agente etiológico*

El siguiente procedimiento es el que se realiza en el laboratorio de diagnóstico veterinario VETELAB, según la Lcda. Sánchez M. (Comunicación personal, 17 de octubre de 2014):

De manera general se reporta el género de los microorganismos encontrados y únicamente se reporta la especie de los siguientes patógenos:

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus intermedius*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*

5.2.6.4.1. Ingreso de las muestras al laboratorio

1. Asignar un código específico a cada una de las muestras
2. Mantener las muestras en refrigeración (4-8°C), si el análisis no va a ser inmediato, pero sí en el mismo día de la entrega de muestras. Si el procesamiento no se va a realizar en ese día, congelar las muestras para su análisis posterior.

5.2.6.4.2. Siembra

3. Encender el mechero de Bunsen
4. Homogenizar la muestra de leche
5. Sumergir un hisopo estéril en la muestra de leche
6. Verificar que el agar a utilizar no tenga ningún tipo de desarrollo microbiano
7. Sembrar la muestra en agar sangre de cordero
8. Pasar el asa bacteriológica previamente esterilizada por donde se sembró la muestra (raspado) con el fin de obtener colonias aisladas.
9. Incubar en un ambiente rico en CO₂ a 37°C máximo durante 96 horas; si pasado este tiempo no crecen microorganismos, el resultado se reportará como sin desarrollo.
10. En caso de que se considere necesario se procede a una resiembra del desarrollo presente (crecimiento escaso). Esto en caso de tener cultivos puros.
11. Si se observan hasta dos tipos de colonias, se realizan las pruebas de identificación para cada una de manera independiente. Si se encuentran tres o más tipos de colonias, la muestra se considera contaminada y se solicita el envío de una nueva muestra.

5.2.6.4.3. Tinción Gram

12. Tomar una colonia del cultivo puro (simetría en color y forma) con un hisopo estéril.
13. Distribuir la muestra en un portaobjetos mediante movimientos rotatorios.
14. Fijar la muestra con fuego
15. Cubrir el portaobjetos con cristal violeta (1 minuto)

16. Enjuagar con agua
17. Cubrir el porta objetos con lugol (1 minuto)
18. Enjuagar con agua
19. Cubrir el porta objetos con alcohol acetona (15 segundos)
20. Enjuagar con agua
21. Cubrir el portaobjetos con safranina (1 minuto)
22. Enjuagar con agua
23. Dejar secar
24. Observar al microscopio con aceite de inmersión y objetivo de 100x (analizar la presencia de cocos o de bacilos tanto Gram positivos como Gram negativos).

5.2.6.4.4. *Presencia de cocos Gram positivos*

1. Se realizaron dos pruebas: catalasa que permite diferencial *Staphylococcus* de *Streptococcus*.

5.2.6.4.4.1. *Prueba de catalasa*

2. Colocar una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
3. Con el asa previamente esterilizada tomar una colonia del microorganismo en estudio y mezclarla con la gota de H₂O₂. Si aparecen burbujas en dentro de unos pocos segundos, la reacción se considera positiva y se clasifica al microorganismo como perteneciente al género *Staphylococcus* (a), caso contrario al no haber reacción el microorganismo será clasificado como *Streptococcus* (b).
4. Para clasificar al microorganismo también se toman en cuenta factores como la presencia o no de hemólisis y el tipo de la misma.

a) *Staphylococcus*

Si el organismo es considerado dentro del género *Staphylococcus*, se realizarán dos pruebas: manitol y coagulasa.

Manitol

1. Con el asa bacteriológica previamente esterilizada tomar una colonia del microorganismo en estudio y sembrar en el agar manitol salado.
2. Incubar a 37°C por 24 horas en un ambiente rico en CO₂.
3. En caso se observarse fermentación de azúcares (el agar cambia de color rojizo a color amarillo) se considera como reacción positiva.

Coagulasa

1. Con la micropipeta tomar 200 microlitros de plasma y colocarlos en un tubo de ensayo.

El plasma a utilizar debe ser de un donante que no tenga ningún tipo de alteración en su sistema de coagulación sanguínea

2. Con el asa bacteriológica previamente esterilizada tomar una colonia del microorganismo en estudio y disolver la misma en el plasma.
3. Incubar a 37°C por 24 horas.
4. En caso se observarse la presencia de un coágulo se considera como reacción positiva.
5. Siempre es importante manejar una muestra de control con una cepa de *S. aureus* ATCC.

Si el microorganismo en estudio da positivo para la prueba de coagulasa y para la fermentación de azúcares en el agar manitol, es considerado como *S. aureus*. Si el patógeno es coagulasa negativo y manitol positivo, se considera como *S. intermedius*. Si ambas pruebas son negativas, el microorganismo en estudio se reporta como *Staphylococcus* spp. Si la prueba de manitol es

negativa y la de coagulasa es positiva, el patógeno se reporta como *Staphylococcus* coagulasa positivo.

b) *Streptococcus*

Si el organismo es considerado dentro del género *Streptococcus*, se realizará la prueba de CAMP.

Prueba de CAMP

1. Con un asa previamente esterilizada tomar una colonia de *Staphylococcus aureus* ATCC y sembrarla siguiendo una línea recta en agar sangre de cordero.
2. Con un asa previamente esterilizada tomar una colonia del microorganismo en estudio y sembrar en línea recta, perpendicular a la siembra de *Staphylococcus aureus* ATCC.
3. Incubar en una atmósfera rica en CO₂ a 37°C durante 24h.
4. Si se observa una reacción positiva (hemólisis completa en forma triangular, apariencia de punta de flecha entre las dos siembras), el microorganismo es considerado como *Streptococcus agalactiae*. Caso contrario se reporta el microorganismo en estudio como *Streptococcus* spp.

5.2.6.4.5. *Presencia de bacilos Gram negativos*

5.2.6.4.5.1. *Prueba de oxidasa*

Con el asa previamente esterilizada se toma una colonia del microorganismo en estudio y se la frota en el disco de "Taxo N", si el disco toma un color rosado o fucsia, la prueba es positiva, caso contrario es negativa, es decir que la bacteria no tiene la enzima citocromo C-oxidasa por lo que se considera anaerobia.

5.2.6.4.5.2. Prueba TSI (*Triple sugar iron agar*)

1. Con el asa previamente esterilizada se toma una colonia del microorganismo en estudio y se siembra en el medio TSI picando en el fondo y extendiendo sobre la superficie.
2. Incubar a 37°C por 24 horas.

Si el medio no cambia de color, es decir se mantiene rojo, la prueba es negativa. Si el medio cambia a un tono amarillo la prueba es positiva. Los resultados se reportan de la siguiente manera:

- Pico alcalino (color rojo)/fondo ácido (color amarillo): el microorganismo solamente fermenta glucosa.
- Pico ácido (color amarillo)/fondo ácido (color amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Pico alcalino (color rojo) /fondo alcalino (color rojo): el microorganismo no tiene la capacidad de fermentar azúcares.

En el primer caso, se reporta como K/A, siendo K: alcalino y A: ácido. En el segundo caso A/A y en el último caso K/K.

Si se observa una ruptura del medio de cultivo o burbujas en el mismo, el microorganismo en estudio tiene la capacidad de producir gas.

Si el medio adquiere un tono negruzco indica que el microorganismo en estudio produce sulfuro de hidrógeno (H₂S).

5.2.6.4.5.3. Prueba de citrato

3. Con el asa previamente esterilizada se toma una colonia del microorganismo en estudio y se siembra en el medio de citrato picando en el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo.
4. Incubar a 37°C por 24 horas.

Si el medio adquiere una coloración azulada, la prueba es positiva, caso contrario (el medio mantiene la tonalidad verdosa) es negativa, es decir

que el microorganismo en estudio no utiliza el citrato como única fuente de carbono.

5.2.6.4.5.4. Prueba de Urea

5. Con el asa previamente esterilizada se toma una colonia del microorganismo en estudio y se la introduce en el medio de urea agitando cuidadosamente.
6. Incubar a 37°C por 24 horas.

Si el medio adquiere una coloración rojiza, la prueba es positiva, caso contrario (mantiene la coloración amarilla) es negativa, lo que indica que el microorganismo en estudio no posee la enzima ureasa que permite degradar la urea en nitrógeno.

5.2.6.4.5.5. Prueba de SIM (Sulphide indole motility)

7. Con el asa bacteriológica previamente esterilizada tomar una colonia del microorganismo en estudio y se pica en el fondo.
8. Incubar a 37°C por 24 horas.
9. Agregar el reactivo de Kovac's en la superficie del medio

Si se observa un ennegrecimiento del medio de cultivo, el microorganismo es capaz de producir sulfuro de hidrógeno.

Si se aprecia turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra, la prueba para motilidad es positiva, caso contrario es negativa.

Si al agregar el reactivo de Kovac's se observa una tonalidad rojiza, la prueba de indol es positiva, caso contrario (no se observan cambios) es negativa, es decir que el microorganismo en estudio no es capaz de metabolizar el triptófano para formar indol.

Según los resultados obtenidos de cada prueba, se reporta la clase de enterobacteria. En caso de que las pruebas indiquen un microorganismo oxidasa: negativo, TSI: positivo sin producción de sulfuro de hidrógeno, citrato:

negativo, urea: negativo y SIM: movilidad e indol positivo sin producción de sulfuro de hidrógeno, se considera al mismo como *Escherichia Coli*.

5.2.6.5. *Antibiograma*

1. Con el asa bacteriológica previamente esterilizada tomar de 1-3 colonias y disolver las mismas en 5 ml de BHI (brain heart infusion) hasta lograr una turbidez de 0,5 Mcfarland.
2. Con la solución antes preparada, inundar todo el agar Mueller-Hinton en caso de estafilococos y enterobacterias, o el agar sangre en caso de estreptococos.
3. Colocar las cajas con el agar inundado al revés sobre papel absorbente para eliminar el exceso de solución.
4. Según el patógeno aislado, colocar los diferentes discos de antibióticos (tabla 6) en el agar. Estos deben colocarse dejando un espacio aproximado de 2 cm entre cada uno para permitir la correcta visualización de los halos de inhibición.
5. Incubar a 37°C por 24 horas y realizar la lectura de los halos de inhibición según la literatura correspondiente. En caso de tratarse de estreptococos, el cultivo debe realizarse en un ambiente rico en CO₂.

Tabla 6. Antibióticos utilizados en el antibiograma de cada género bacteriano

<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	Enterobacteriaceae
Amoxicilina + Ác.	Amoxicilina + Ác.	Amoxicilina + Ác.
Clavulánico	Clavulánico	Clavulánico
Cefalexina	Ampicilina	Cefalexina
Cefquinome	Cefalexina	Cefquinome
Cloxacilina	Cefquinome	Enrofloxacina
Gentamicina	Lincomicina	Gentamicina
Lincomicina	Penicilina	Lincomicina
Sulfatrimetoprim	Sulfatrimetoprim	Neomicina
Tetraciclina		

Tomado de: (Sánchez M., Comunicación personal, 17 de octubre de 2014)

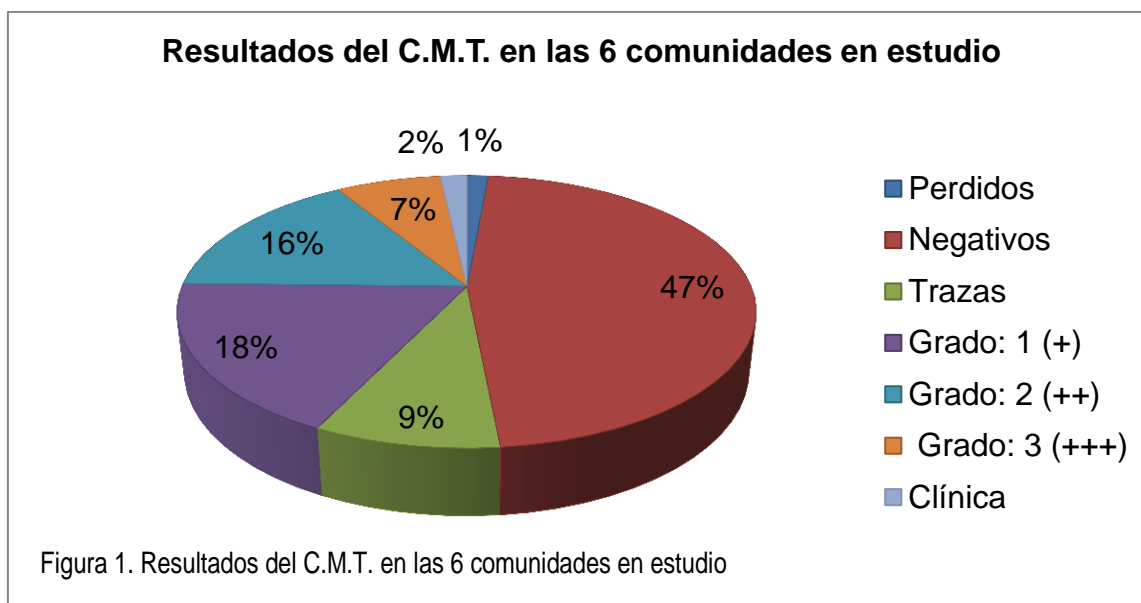
6. Resultados y discusión

6.1 Resultados del C.M.T. en las 6 comunidades en estudio

Tabla 7. Resultados del C.M.T. en las 6 comunidades en estudio

Categorías	Contadero		Pesillo		San Pablo Urco		El Chaupi		El Cajas		Ubillis		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Cuartos	160	100	160	100	168	100	200	100	52	100	104	100	844	100
Perdidos	1	0,63	2	1,25	1	0,60	6	3,00	1	1,92	1	0,96	12	1,42
Negativos	51	31,88	48	30,00	111	66,07	127	63,50	18	34,62	42	40,38	397	47,04
Trazas	16	10,00	28	17,50	8	4,76	7	3,50	1	1,92	14	13,46	74	8,77
Grado: 1 (+)	36	22,50	32	20,00	20	11,90	27	13,50	19	36,54	19	18,27	153	18,13
Grado: 2 (++)	32	20,00	35	21,88	19	11,31	24	12,00	11	21,15	13	12,50	134	15,88
Grado: 3 (+++)	19	11,88	11	6,88	9	5,36	8	4,00	2	3,85	10	9,62	59	6,99
Clínica	5	3,13	4	2,50	0	0,00	1	0,50	0	0,00	5	4,81	15	1,78

De los 844 cuartos en estudio, el 1,42% estaban perdidos, el 47,04% eran negativos, el 8,77% correspondían a Trazas, el 18,13% al grado 1, el 15,88% al grado 2 y el 6,99% al grado 3. El 1,78% de los cuartos presentaban mastitis clínica. Estos datos se relacionan con los establecidos por Espinoza & Mier (2013, p. 56), quienes encontraron un 50,02% de cuartos normales, un 8,20% de cuartos con grado 3 (+++) y un 1,60% de cuartos con mastitis clínica, al muestrear 174 fincas del cantón El Chaco. El resto de datos difiere entre cada estudio.



6.2 Prevalencia aparente de mastitis por animal

Tabla 8. Prevalencia aparente de mastitis por animal en las 6 comunidades en estudio

Prevalencia aparente de mastitis por animal									
COMUNIDAD	POSITIVOS						NEGATIVOS		TOTAL DE ANIMALES
	Mastitis clínica		Mastitis subclínica		Total mastitis		Total		
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	
Contadero	4	10,00	32	80,00	36	90,00	4	10,00	40
Pesillo	2	5,00	32	80,00	34	85,00	6	15,00	40
San Pablo Urco	0	0,00	23	54,76	23	54,76	19	45,24	42
El Chaupi	1	2,00	30	60,00	31	62,00	19	38,00	50
El Cajas	0	0,00	12	92,31	12	92,31	1	7,69	13
Ubillus	2	7,69	19	73,08	21	80,77	5	19,23	26
General 6 comunidades	9	4,27	148	70,14	157	74,41	54	25,59	211

6.2.1 Análisis del resumen general

Del total de animales en estudio, 157 presentaban mastitis en su forma clínica o subclínica, ya sea en uno o varios cuartos. Estos datos reflejan un 74,41% de prevalencia aparente de mastitis por animal, siendo esta menor a la encontrada por Espinoza & Mier (2013, p. 50) y mayor a la establecida por Acuña &

Rivadeneira (2008, p. 90), al muestrear 20 haciendas en la provincia de Pichincha. La prevalencia aparente de ambos estudios fue de 80,00% y de 10,67% respectivamente; también fue mayor a la que reportan Proaño & Vásconez (2013, p. 49) en 28 vacas criollas de la comunidad Llanos de Albas en Cayambe, siendo esta del 39,00%.

Del total de animales en el presente estudio, el 4,27% presentó mastitis clínica, el 70,14% mastitis subclínica y el 25,59% de los animales fueron negativos; estos porcentajes son mayores a los encontrados por Flor y Vásconez (1987) en Cayambe, según citan Espinoza & Mier (2013, p. 57), y se relacionan con los establecidos por Valdivieso (2007, p. 41) en los hatos lecheros de la unidad productiva Tunshi de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, donde se encontró que el 5,30% de los animales presentaban mastitis clínica y el 68,40% mastitis subclínica.

Estos datos se relacionan con lo establecido por Kleinschroth et al. (1991, p. 13) quienes aseguran que los procesos de mastitis clínica constituyen apenas un 2-3% de las inflamaciones de la ubre mientras que las de tipo subclínico representan un 97-98%. En este caso de los 157 animales con mastitis, 9 presentaban un cuadro clínico y 148 un cuadro subclínico, lo que corresponde al 5,73% y 94,26% respectivamente. Es probable que la cantidad de cuadros de mastitis clínica sea más alta de lo que se menciona en la literatura debido a las condiciones de manejo a nivel de pequeños productores que no siempre son las más adecuadas, principalmente por falta de conocimientos básicos sobre un adecuado proceso de ordeño en los animales. Otro aspecto que contribuye a una mayor presentación de casos de mastitis es la falta de atención oportuna por parte de un médico veterinario, al cual no siempre se tiene acceso en las comunidades por factores económicos, políticos, geográficos, entre otros.

6.2.2 Análisis de las comunidades en estudio

La comunidad de El Cajas presentó la prevalencia aparente de mastitis por animal más elevada: 92,31%, sin embargo en este caso el número de muestras fue mucho menor al de las otras comunidades en estudio lo que explica tan

elevada prevalencia pues se muestrearon apenas 13 animales, pertenecientes a 3 productores. Lamentablemente la mayor parte de pequeños productores que mantenían relaciones con el INIAP en la comunidad El Cajas, decidieron no continuar con este acuerdo ya que actualmente otro organismo institucional se encuentra brindándoles asesoría en el área ganadera, por esta razón no se logró la colaboración de más personas al momento del muestreo.

Contadero es la segunda comunidad con la prevalencia aparente de mastitis por animal más elevada: 90,00%, a esta le sigue Pesillo con 85,00%, Ubillus con 80,77%, El Chaupi con 62,00% y San Pablo Urco con 54,76%. La prevalencia de San Pablo Urco guarda relación con lo establecido por Bedolla & Ponce de León (2008, pp. 10,11) quienes afirman que según varios estudios un 50% de todas las vacas presenta mastitis, principalmente en su forma subclínica. Tomando en cuenta que San Pablo Urco es la comunidad con la menor prevalencia de mastitis, y que no se encontraron casos de mastitis clínica, se podría presumir que los pequeños productores de esta comunidad tienen un mejor manejo en su ganado, especialmente durante el proceso de ordeño.

La comunidad de Contadero presentó la mayor prevalencia aparente de mastitis clínica por animal: 10,00%, seguida por Ubillus y Pesillo con 7,69% y 5,00% respectivamente, finalmente El Chaupi presentó la menor prevalencia: 2,00%. No se encontraron casos de mastitis clínica en las comunidades de San Pablo Urco y El Cajas.

Las comunidades de El Chaupi y Ubillus presentaron prevalencias cercanas de mastitis subclínica, siendo estas del 60,00% y 73,08% respectivamente, mientras que Contadero y Pesillo se relacionan a su vez con un 80,00% de prevalencia. La comunidad con menor cantidad de mastitis subclínica es San Pablo Urco con 54,76% y difiere notoriamente de El Cajas con 92,31%.

6.3 Prevalencia aparente de mastitis por cuarto

Tabla 9. Prevalencia aparente de mastitis por cuarto en las 6 comunidades en estudio

Prevalencia aparente de mastitis por cuarto											
COMUNIDAD	POSITIVOS						NEGATIVOS		PERDIDOS		TOTAL CUARTOS
	Clínica		Subclínica		Total		Total		Total		
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	
Contadero	5	3,13	103	64,38	108	67,50	51	31,88	1	0,63	160
Pesillo	4	2,50	106	66,25	110	68,75	48	30,00	2	1,25	160
San Pablo Urco	0	0,00	56	33,33	56	33,33	111	66,07	1	0,60	168
El Chaupi	1	0,50	66	33,00	67	33,50	127	63,50	6	3,00	200
El Cajas	0	0,00	33	63,46	33	63,46	18	34,62	1	1,92	52
Ubillus	5	4,81	56	53,85	61	58,65	42	40,38	1	0,96	104
General 6 comunidades	15	1,78	420	49,76	435	51,54	397	47,04	12	1,42	844

6.3.1 Análisis del resumen general

El total de cuartos en el presente estudio fue de 844, de los cuales 435 presentaban mastitis en su forma clínica o subclínica. Estos datos reflejan un 51,54% de prevalencia aparente de mastitis por cuarto; esta es ligeramente más elevada que la establecida por Espinoza & Mier (2013, p. 51) quienes al evaluar 5940 cuartos reportan un 49,98% de prevalencia aparente.

Del total de cuartos, el 1,78% corresponde a mastitis clínica y el 49,76% a mastitis subclínica. El 47,04% de los cuartos fueron negativos y el 1,42% eran cuartos perdidos o no funcionales.

6.3.2 Análisis de las 6 comunidades en estudio

La comunidad con la mayor prevalencia aparente de mastitis por cuarto fue Pesillo con un 68,75%, seguida por Contadero con 67,50%; continúa El Cajas con 63,46% y Ubillus con 58,65%. Las comunidades con menor prevalencia fueron El Chaupi y San Pablo Urco con 33,50% y 33,33% respectivamente.

La comunidad de Ubillus presentó la mayor prevalencia aparente de mastitis clínica por cuarto, siendo esta del 4,81%, seguida por Contadero con 3,13%, Pesillo con 2,50% y El Chaupi con 0,50%. San Pablo Urco y Cajas no presentaron casos de mastitis clínica.

Las comunidades de Pesillo, Contadero y El Cajas presentaron la mayor prevalencia aparente de mastitis subclínica por cuarto con 66,25%, 64,38% y 63,46% respectivamente; después continúa Ubillus con 53,85%. San Pablo Urco y El Chaupi tienen prevalencias similares siendo estas del 33,33% y 33,00% respectivamente.

6.4 Análisis estadístico según la prueba de Chi cuadrado para la comparación de la prevalencia aparente de mastitis entre las seis comunidades en estudio

Ho: La prevalencia aparente de mastitis no difiere entre las comunidades en estudio.

H1: La prevalencia aparente de mastitis difiere entre las comunidades en estudio.

Tabla 10. Análisis del chi cuadrado mediante el programa estadístico "Statistix"

Statistix 8.0			Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence		
Case			Variable		
			Negativos	Positivos	
1	Observed		4	36	40
	Expected		10.24	29.76	
	Cell Chi - Sq		3.80	1.31	
2	Observed		6	34	40
	Expected		10.24	29.76	
	Cell Chi - Sq		1.75	0.60	
3	Observed		19	23	42
	Expected		10.75	31.25	
	Cell Chi - Sq		6.33	2.18	
4	Observed		19	31	50
	Expected		12.80	37.20	
	Cell Chi - Sq		3.01	1.03	
5	Observed		1	12	13
	Expected		3.33	9.67	
	Cell Chi - Sq		1.63	0.56	
6	Observed		5	21	26
	Expected		6.65	19.35	
	Cell Chi - Sq		0.41	0.14	
			54	157	211
Overall Cell Chi-square			22.76		
P-Value			0.0004		
Degrees of Freedom			5		

Se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de chi cuadrado con el programa estadístico "Statistix". Según los datos analizados, se observa que el resultado obtenido: 22,76 es mayor que el de la tabla del chi cuadrado: 11,0705 con 95% de confiabilidad y 5 grados de libertad, por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, la misma que establece que el análisis de la prevalencia aparente de mastitis difiere entre las comunidades en estudio.

Tomando en cuenta que "la formación de una mastitis depende de diversos y numerosos factores (animal, medio ambiente y germen causal)" (Kleinschroth et al., 1991, p.7), no es posible determinar de manera concreta porqué existe diferencia significativa entre las comunidades en estudio, sin embargo hay ciertos aspectos que de manera general influyen en la presencia de mastitis en el hato bovino. El principal factor es el proceso de ordeño ya que la falta de higiene en el mismo predispone a cuadros de mastitis (Espinoza & Mier, 2013, p. 1), especialmente para patógenos contagiosos (Kleinschroth et al., 1991, p. 36).

6.5 Microorganismos patógenos relacionados con mastitis bovina

En el presente estudio se analizaron muestras de leche de 211 animales, de las cuales 162 fueron seleccionadas para su envío al laboratorio. En los casos de mastitis clínica, todas las muestras fueron enviadas para cultivo y antibiograma, mientras que para mastitis subclínica la selección se hizo con base en los resultados del C.M.T. (uno o más cuartos positivos). Debido a que el grado trazas en el C.M.T. tiene un rango aproximado de 150 000 a 500 000 células somáticas (Gasque, 2008, p. 179), (Markey et al., 2013, p. 442), es posible que el animal presente o no una infección de la glándula mamaria, esto tomando como base lo establecido por Smith, Hillerton, & Harmon (2001), Smith (2010, p. 1115) y Markey et al. (2013, p. 442) quienes consideran 200 000 células somáticas como el límite por encima del cual se considerará una muestra representativa de mastitis subclínica. Es por esta razón que si bien al momento del análisis de prevalencia aparente de mastitis se tomó en cuenta al grado trazas como positivo, sólo se enviaron muestras de 1 grado o más para cultivo y antibiograma ya que una muestra de grado trazas podía o no tener

mastitis y se tomó la decisión de priorizar recursos para los casos más seguros y significativos de mastitis subclínica.

De los 162 cultivos en estudio, 81 presentaron desarrollo microbiano del género *Staphylococcus* spp., 58 del género *Streptococcus* spp. y 1 del género *Escherichia* sp., mientras que 22 de los cultivos no presentaron desarrollo bacteriano hasta las 96 horas de incubación. Estos datos indican que el 50,00% de los cultivos corresponden a Estafilococos, el 35,80% a Estreptococos y el 0,62% a enterobacterias, mientras que en el 13,58% de los cultivos no se presentó desarrollo bacteriano hasta las 96 horas de incubación.

Álvarez, et al., (1965) investigan sobre mastitis en los cantones Cayambe, Mejía, Quito y Rumiñahui. Los autores reportan los mismos patógenos hallados en el presente estudio pero con diferente porcentaje de aislamiento: 70,00% para *Staphylococcus*, 10,00% para *Streptococcus* y 2,00% para Coliformes (citado por (Espinoza & Mier, 2013, p. 62)).

Los animales que se encuentran en pastoreo tienen menor riesgo de desarrollar problemas de mastitis de tipo ambiental que los animales en estabulación (Brightling et al., 1998, p. 4). Esto podría explicar que apenas en el 0,62% de los cultivos se presentó desarrollo de un patógeno ambiental como es *Escherichia coli*. Sin embargo, tomando en cuenta que en el laboratorio donde se realizaron los análisis se reportan principalmente géneros bacterianos y sólo determinadas especies, es posible que algunos microorganismos ambientales como *Streptococcus uberis* no hayan sido identificados pero sí formen parte de la prevalencia correspondiente al género *Streptococcus* spp.

Tabla 11. Microorganismos patógenos relacionados con mastitis bovina

COMUNIDAD	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus intermedius</i>		<i>Staphylococcus coagulasa positivo</i>		<i>Staphylococcus spp.</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Streptococcus spp.</i>		<i>Escherichia coli</i>		Sin desarrollo		Total cultivos
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	
Contadero	3	7,69	5	12,82	3	7,69	7	17,95	2	5,13	16	41,03	0	0,00	3	7,69	39
Pesillo	1	2,94	5	14,71	1	2,94	3	8,82	3	8,82	16	47,06	0	0,00	5	14,71	34
San Pablo Urco	4	17,39	3	13,04	4	17,39	6	26,09	2	8,70	2	8,70	0	0,00	2	8,70	23
El Chaupi	0	0,00	4	12,90	0	0,00	15	48,39	2	6,45	6	19,35	0	0,00	4	12,90	31
El Cajas	1	8,33	1	8,33	0	0,00	3	25,00	0	0,00	2	16,67	0	0,00	5	41,67	12
Ubillus	0	0,00	6	26,09	2	8,70	4	17,39	5	21,74	2	8,70	1	4,35	3	13,04	23
General 6 comunidades	9	5,56	24	14,81	10	6,17	38	23,46	14	8,64	44	27,16	1	0,62	22	13,58	162

6.5.1 Resumen general de las seis comunidades

El total de cultivos en el presente estudio fue de 162, en los cuales los microorganismos predominantes fueron *Streptococcus spp.*: 27,16% y *Staphylococcus spp.*: 23,46%, seguidos de *S. intermedius*: 14,81%, estafilococos coagulasa positivo: 6,17%, *Streptococcus agalactiae*: 8,64%, *S. aureus*: 5,56% y *Escherichia coli*: 0,62%. La cantidad de cultivos que presentó desarrollo de *Staphylococcus spp.*, y de *Streptococcus agalactiae* se relaciona con lo establecido por Espinoza & Mier (2013, pp. 61, 62), quienes reportan un 22,56% y 8,00% respectivamente; el resto de datos varía según cada estudio. Los porcentajes de cultivos con crecimiento de estafilococos coagulasa positivo obtenidos por Acuña & Rivadeneira (2008, p. 97), son similares a los de la presente investigación; el resto de datos difieren según cada estudio. Estos autores no reportan casos específicos de *Streptococcus agalactiae* ni de *Staphylococcus intermedius*.

Además de aislar patógenos como *Escherichia coli*, géneros como *Staphylococcus* y *Streptococcus*; Acuña & Rivadeneira (2008), Espinoza & Mier (2013) y Proaño & Vásquez (2013) reportan diferentes microorganismos relacionados con mastitis bovina, que no se encontraron en el presente estudio; entre otros se reportan aislamientos de *Bacillus cereus*, *Klebsiella*, y

Arcanobacterium pyogenes. Valdivieso (2007) realizó el aislamiento de *Staphylococcus epidermidis*.

Es posible que los microorganismos aislados en esta investigación difieran de los que reportan otros estudios, por varios factores, entre estos el manejo de cada explotación.

El 13,58% de los cultivos no presentó desarrollo bacteriano hasta las 96 horas de incubación. Tomando en cuenta que algunos microorganismos de lento crecimiento como hongos y *Nocardia asteroides* necesitan hasta 120 horas de incubación para su crecimiento, es posible que algunos animales presentaran cuadros de mastitis por estos patógenos y sin embargo no se lograra la identificación de los mismos por falta de tiempo suficiente para su desarrollo, al momento de incubarlos en el laboratorio.

6.5.2 *Staphylococcus aureus*

San Pablo Urco presentó el mayor porcentaje de *S. aureus*: 17,39%, seguido de El Cajas: 8,33%, Contadero: 7,69% y Pesillo: 2,94%. Las comunidades de El Chaupi y Ubillus no presentaron cultivos con *S. aureus*.

6.5.3 *Staphylococcus intermedius*

La comunidad de Ubillus presentó la mayor cantidad de cultivos con *Staphylococcus intermedius*: 26,09%, seguida de Pesillo: 14,71%. San Pablo Urco, Contadero y El Chaupi presentaron porcentajes similares con 13,04%, 12,82% y 12,90% respectivamente. La comunidad con menor cantidad de *S. intermedius* fue El Cajas: 8,33%.

6.5.4 *Staphylococcus coagulasa positivo*

San Pablo Urco presentó el mayor porcentaje de estafilococos coagulasa positivo: 17,39%. A esta comunidad le siguen Ubillus, Contadero y Pesillo con 8,70%, 7,69% y 2,94% respectivamente. Las comunidades de El Chaupi y El Cajas no presentaron desarrollo de *Staphylococcus coagulasa positivo*.

6.5.5 *Staphylococcus* spp.

La comunidad de El Chaupi presentó la mayor cantidad de *Staphylococcus* spp.: 48,39%, seguida de San Pablo Urco y El Cajas con 26,09% y 25,00% respectivamente. Contadero y Ubillus presentaron porcentajes similares: 17,95% y 17,39% respectivamente. Pesillo obtuvo el porcentaje más bajo: 8,82%.

6.5.6 *Streptococcus agalactiae*

Ubillus presentó el porcentaje más alto de *Streptococcus agalactiae*: 21,74%, el mismo que difiere de manera significativa del resto de comunidades. A este porcentaje le siguen Pesillo, San Pablo Urco, El Chaupi y Contadero con 8,82%, 8,70%, 6,45% y 5,13% respectivamente. La comunidad de El Cajas no presentó desarrollo bacteriano de *S. agalactiae*.

6.5.7 *Streptococcus* spp.

Las comunidades de Pesillo y Contadero presentaron los porcentajes más elevados de *Streptococcus* spp., siendo estos del 47,06% y 41,03% respectivamente. A estos le siguen las comunidades de El Chaupi y El Cajas con 19,35% y 16,67% respectivamente. San Pablo Urco y Ubillus presentaron ambas un 8,70% de *Streptococcus* spp.

6.5.8 *Escherichia Coli*

Ubillus fue la única comunidad que presentó desarrollo de *Escherichia coli* representando el 4,35% del total de cultivos para esa comunidad.

6.6 Antibiograma de patógenos relacionados con mastitis

Tabla 12. Resultados del antibiograma del género *Staphylococcus*

Microorganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>						<i>Staphylococcus intermedius</i>						<i>Staphylococcus coagulasa</i> +						<i>Staphylococcus spp.</i>					
	TOTAL CULTIVOS																							
ANTIBIÓTICO	Sensible		Med. Sensible		Resistente		Sensible		Med. Sensible		Resistente		Sensible		Med. Sensible		Resistente		Sensible		Med. Sensible		Resistente	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Amoxicilina + ácido clavulánico	7	77,78	2	22,22	0	0,00	21	87,50	3	12,50	0	0,00	10	100,00	0	0,00	0	0,00	34	89,47	4	10,53	0	0,00
Cloxacilina	3	33,33	1	11,11	5	55,56	2	8,33	0	0,00	22	91,67	1	10,00	0	0,00	9	90,00	8	21,05	0	0,00	30	78,95
Cefalexina	9	100,00	0	0,00	0	0,00	24	100,00	0	0,00	0	0,00	10	100,00	0	0,00	0	0,00	38	100,00	0	0,00	0	0,00
Cefquinome	9	100,00	0	0,00	0	0,00	24	100,00	0	0,00	0	0,00	9	90,00	0	0,00	1	10,00	38	100,00	0	0,00	0	0,00
Gentamicina	9	100,00	0	0,00	0	0,00	24	100,00	0	0,00	0	0,00	10	100,00	0	0,00	0	0,00	33	86,84	5	13,16	0	0,00
Lincomicina	8	88,89	1	11,11	0	0,00	18	75,00	5	20,83	1	4,17	10	100,00	0	0,00	0	0,00	27	71,05	8	21,05	3	7,89
Sulfatrimetoprim	9	100,00	0	0,00	0	0,00	22	91,67	2	8,33	0	0,00	9	90,00	0	0,00	1	10,00	33	86,84	4	10,53	1	2,63
Tetraciclina	8	88,89	0	0,00	1	11,11	24	100,00	0	0,00	0	0,00	9	90,00	0	0,00	1	10,00	31	81,58	2	5,26	5	13,16

Tabla 13. Resultados del antibiograma del género *Streptococcus*

Microorganismo	<i>Streptococcus agalactiae</i>						<i>Streptococcus</i> spp.					
TOTAL CULTIVOS	14						44					
	Sensible		Med. Sensible		Resistente		Sensible		Med. Sensible		Resistente	
ANTIBIÓTICO	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Amoxicilina + ácido clavulánico	14	100,00	0	0,00	0	0,00	43	97,73	1	2,27	0	0,00
Penicilina	9	64,29	2	14,29	3	21,43	17	38,64	15	34,09	12	27,27
Ampicilina	0	0,00	5	35,71	9	64,29	9	20,45	12	27,27	23	52,27
Cefalexina	10	71,43	3	21,43	1	7,14	42	95,45	0	0,00	2	4,55
Cefquinome	14	100,00	0	0,00	0	0,00	44	100,00	0	0,00	0	0,00
Sulfatrimetoprim	6	42,86	0	0,00	8	57,14	27	61,36	4	9,09	13	29,55
Lincomicina	12	85,71	1	7,14	1	7,14	39	88,64	3	6,82	2	4,55

6.6.1 Antibiograma de *Staphylococcus*

6.6.1.1 Amoxicilina con ácido clavulánico

El 77,78% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus* presentó sensibilidad a la amoxicilina con ácido clavulánico y el 22,22% presentó sensibilidad media. No se encontró resistencia bacteriana. Esto de un total de 9 cultivos.

El 87,50% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus intermedius* presentó sensibilidad a la amoxicilina con ácido clavulánico y el 12,50% presentó sensibilidad media. No se encontró resistencia bacteriana. Esto de un total de 24 cultivos.

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus coagulasa* positivo presentó sensibilidad a la amoxicilina con ácido clavulánico. Esto de un total de 10 cultivos.

El 89,47% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus* spp. presentó sensibilidad a la amoxicilina con ácido clavulánico y el 10,53% presentó sensibilidad media. No se encontró resistencia bacteriana. Esto de un total de 38 cultivos.

Estos datos contrastan con lo establecido por Espinoza & Mier (2013, p. 64) quienes reportan diferentes porcentajes de resistencia bacteriana para *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus coagulasa positivo* y para *Staphylococcus* spp. Dichos autores no reportan porcentajes de resistencia bacteriana por parte de *Staphylococcus aureus* frente a la amoxicilina + ácido clavulánico; en la presente investigación tampoco se encontró resistencia bacteriana, pero sí se reportan patógenos medianamente sensibles a diferencia del estudio anterior donde se reportan únicamente las categorías de sensible o de resistente.

6.6.1.2 Cloxacilina

El 33,33% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus* presentó sensibilidad a la cloxacilina, el 11,11% presentó sensibilidad media, y el 55,56% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 9 cultivos.

El 8,33% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus intermedius* presentó sensibilidad a la cloxacilina mientras que el 91,67% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 24 cultivos.

El 10,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus coagulasa positivo* presentó sensibilidad a la cloxacilina mientras que el 90,00% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 10 cultivos.

El 21,05% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus* spp. presentó sensibilidad a la cloxacilina mientras que el 78,95% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 38 cultivos.

Acuña & Rivadeneira (2008, p. 99) establecen que todas las bacterias Gram positivas presentaron resistencia a la cloxacilina; esto guarda relación con lo encontrado en la presente investigación y en la de Espinoza & Mier (2013). En ambos estudios se reportan varios porcentajes de aislamientos bacterianos, con resistencia a la cloxacilina para diferentes especies del género *Staphylococcus* spp. Esto podría atribuirse a que la cloxacilina es utilizada comúnmente para el período de secado de las vacas. De manera general una

mala administración del antibiótico al momento del secado podría explicar los altos porcentajes de resistencia bacteriana.

6.6.1.3 Cefalexina

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus coagulasa positivo* y *Staphylococcus* spp. presentó sensibilidad a la cefalexina. Esto de un total de 9, 24, 10 y 38 cultivos respectivamente. Estos resultados difieren de los establecidos por Espinoza & Mier (2013, p. 64) quienes reportan diferentes porcentajes de cultivos con resistencia bacteriana.

6.6.1.4 Cefquinome

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus* spp. presentó sensibilidad al antibiótico cefquinome. Esto de un total de 9, 24, y 38 cultivos respectivamente.

El 90,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus coagulasa positivo* presentó sensibilidad al antibiótico cefquinome mientras que el 10,00% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 10 cultivos.

6.6.1.5 Gentamicina

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus coagulasa positivo* presentó sensibilidad a la gentamicina. Esto de un total de 9, 24, y 10 cultivos respectivamente.

El 86,84% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus* spp. presentó sensibilidad a la gentamicina mientras que el 13,16% presentó sensibilidad media. No se encontró resistencia bacteriana. Esto de un total de 38 cultivos.

Esto contrasta con lo establecido por Espinoza & Mier (2013, p. 64) quienes reportan diferentes porcentajes de cultivos con resistencia bacteriana frente a la gentamicina, a excepción de *Staphylococcus intermedius* que en concordancia con la presente investigación no presentó resistencia bacteriana.

6.6.1.6 *Lincomicina*

El 88,89% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus* presentó sensibilidad a la lincomicina y el 11,11% presentó sensibilidad media. No se encontró resistencia bacteriana. Esto de un total de 9 cultivos.

El 75,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus intermedius* presentó sensibilidad a la lincomicina, el 20,83% presentó sensibilidad media y el 4,17% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 24 cultivos.

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus coagulasa positivo* presentó sensibilidad a la lincomicina, esto de un total de 10 cultivos.

El 71,05% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus spp.* presentó sensibilidad a la lincomicina, el 21,05 presentó sensibilidad media y el 7,89% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 38 cultivos.

Espinoza & Mier (2013) encontraron diferentes porcentajes de cultivos con resistencia bacteriana a la lincomicina por parte de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa positivo*, *Staphylococcus spp.*, al igual que en la presente investigación.

6.6.1.7 *Sulfatrimetoprim*

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus* presentó sensibilidad a sulfatrimetoprim. Esto de un total de 9 cultivos.

El 91,67% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus intermedius* presentó sensibilidad a la sulfatrimetoprim y el 8,33% presentó sensibilidad media. No se encontró resistencia bacteriana. Esto de un total de 24 cultivos.

El 90,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus coagulasa positivo* presentó sensibilidad a la sulfatrimetoprim mientras que el 10,00 % presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 10 cultivos.

El 86,84% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus spp.* presentó sensibilidad a sulfatrimetoprim, el 10,53% presentó sensibilidad media y el 2,63% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 38 cultivos.

Los resultados de la presente investigación no coinciden con los encontrados por Espinoza & Mier (2013), quienes establecen diferentes porcentajes de cultivos con resistencia bacteriana, para los patógenos mencionados anteriormente.

6.6.1.8 Tetraciclina

El 88,89% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus aureus* presentó sensibilidad a la tetraciclina, mientras que el 11,11% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 9 cultivos.

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus intermedius* presentó sensibilidad a la tetraciclina. Esto de un total de 24 cultivos.

El 90,00% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus* coagulasa positivo presentó sensibilidad a la tetraciclina mientras que el 10,00% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 10 cultivos.

El 81,58% de los cultivos con desarrollo de *Staphylococcus* spp. presentó sensibilidad a la tetraciclina, el 5,26% presentó sensibilidad media y el 13,16% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 38 cultivos.

Los resultados de la presente investigación en los géneros de *S. aureus* y *S. spp.* se relacionan con los encontrados por Espinoza & Mier (2013) quienes encontraron porcentajes similares de cultivos con resistencia bacteriana. A su vez, los resultados de este estudio contrastan con los de Acuña & Rivadeneira (2008 p. 105) quienes establecen que únicamente una especie de *Staphylococcus* presentó resistencia a la tetraciclina.

6.6.2 Antibiograma de Streptococcus

6.6.2.1 Amoxicilina con ácido clavulánico

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus agalactiae* presentó sensibilidad a la amoxicilina con ácido clavulánico. Esto de un total de 14 cultivos.

El 97,73% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus* spp. presentó sensibilidad a la amoxicilina con ácido clavulánico y el 2,27% presentó sensibilidad media. No se encontró resistencia bacteriana. Esto de un total de 44 cultivos.

Estos resultados contrastan con los establecidos por Espinoza & Mier (2013) quienes reportan resistencia bacteriana a la amoxicilina con ácido clavulánico. Por otro lado, Acuña & Rivadeneira (2008, pp. 104,105) establecen que todos los cultivos de *Streptococcus* fueron sensibles para este antibiótico, resultados que se relacionan más con la presente investigación.

6.6.2.2 *Penicilina*

El 64,29% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus agalactiae* presentó sensibilidad a la penicilina, el 14,29% presentó sensibilidad media y el 21,43% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 14 cultivos.

El 38,64% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus* spp. presentó sensibilidad a la penicilina, el 34,09% presentó sensibilidad media y el 27,27% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 44 cultivos.

En la presente investigación algunos cultivos tanto de *Streptococcus agalactiae* como de *Streptococcus* spp. presentaron resistencia bacteriana al igual que en el estudio realizado por Espinoza & Mier (2013).

6.6.2.3 *Ampicilina*

Ninguno de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus agalactiae* presentó sensibilidad a la ampicilina, el 35,71% presentó sensibilidad media y el 64,29% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 14 cultivos.

El 20,45% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus* spp. presentó sensibilidad a la ampicilina, el 27,27% presentó sensibilidad media y el 52,27% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 44 cultivos.

Estos resultados coinciden con lo encontrado por Espinoza & Mier (2013) quienes no reportan cultivos de *Streptococcus agalactiae* sensibles a la ampicilina.

6.6.2.4 Cefalexina

El 71,43% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus agalactiae* presentó sensibilidad a la cefalexina, el 21,43% presentó sensibilidad media y el 7,14% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 14 cultivos.

El 95,45% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus* spp. presentó sensibilidad a la cefalexina, mientras que el 4,55% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 44 cultivos.

Espinoza & Mier (2013) reportan varios cultivos tanto con sensibilidad como con resistencia bacteriana, sin embargo los porcentajes varían con los del presente estudio.

6.6.2.5 Cefquinome

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus agalactiae* presentó sensibilidad al antibiótico cefquinome, esto de un total de 14 cultivos.

El 100,00% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus* spp. presentó sensibilidad al antibiótico cefquinome, esto de un total de 44 cultivos.

6.6.2.6 Sulfatrimetoprim

El 42,86% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus agalactiae* presentó sensibilidad a sulfatrimetoprim y el 57,14% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 14 cultivos.

El 61,36% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus* spp. presentó sensibilidad a sulfatrimetoprim, el 9,09% presentó sensibilidad media y el 29,55% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 44 cultivos.

Espinoza & Mier (2013) reportan varios cultivos tanto con sensibilidad como con resistencia bacteriana, sin embargo los porcentajes varían con los del presente estudio.

6.6.2.7 Lincomicina

El 85,71% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus agalactiae* presentó sensibilidad a la lincomicina, el 7,14% presentó sensibilidad media y este

mismo porcentaje presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 14 cultivos.

El 88,64% de los cultivos con desarrollo de *Streptococcus* spp. presentó sensibilidad a la lincomicina, el 6,82% presentó sensibilidad media y el 4,55% presentó resistencia bacteriana. Esto de un total de 44 cultivos.

Espinoza & Mier (2013) reportan varios cultivos tanto con sensibilidad como con resistencia bacteriana, sin embargo los porcentajes varían con los del presente estudio.

6.6.3 Antibiograma de enterobacterias

La única enterobacteria encontrada en este estudio fue *Escherichia coli*, la misma que corresponde a un único cultivo. Este cultivo presentó sensibilidad a amoxicilina + ácido clavulánico, cefalexina, cefquinome, enrofloxacin, gentamicina y neomicina, mientras que la resistencia bacteriana fue para la lincomicina.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Espinoza & Mier (2013), ya que dichos autores no reportan sensibilidad bacteriana a la lincomicina para *Escherichia coli*.

6.7 Otras discusiones

Los coliformes presentan sensibilidad variable a los antibióticos (Blowey & Edmondson, 1995, p. 168). El cultivo con desarrollo de *E. coli* sólo presentó resistencia a la lincomicina. Este patógeno resultó sensible a la neomicina tal como lo establece Blowey & Edmondson (1995, p. 167). El autor menciona además que este antibiótico tiene escasa penetración en el tejido de la ubre por lo que comúnmente se asocian aminoglucósidos con penicilinas, las cuales tienen un mejor efecto sobre el tejido. Es muy importante tomar en cuenta estos factores al momento de establecer un esquema de tratamiento ya que si bien el antibiograma ofrece resultados confiables sobre sensibilidad y resistencia, es necesario conocer el mecanismo de acción de cada antibiótico para obtener resultados óptimos, y esto debe realizarlo un médico veterinario.

Blowey & Edmondson (1995, p. 167) establecen que aproximadamente el 70% de las cepas mastíticas de *S. aureus* son penicilinoresistentes por producción de betalactamasas, y que antibióticos como la cloxacilina son eficaces en presencia de dicha enzima ya que hasta ese momento, no se encontraron casos de estafilococos resistentes a estos antibióticos. Por esta razón la cloxacilina es un antimicrobiano muy común para la terapia de vacas secas. En contraste con lo establecido por dichos autores, en el presente estudio se encontró resistencia a la cloxacilina en varios aislamientos bacterianos, por lo cual esta terapia específica de vacas secas no tendría una adecuada acción antimicrobiana.

Las cefalosporinas son activas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo estafilococos productores de betalactamasas, aunque no tienen buena penetración en la ubre como las penicilinas (Blowey & Edmondson, 1995, p. 165).

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* pueden permanecer en estado de latencia bacteriana, pudiendo activarse cuando el animal presenta inmunodepresión (Blowey & Edmondson, 1995, p. 170). Esto podría explicar que en algún momento, el número de bacterias eliminadas por la leche disminuyó a tal punto de no ser suficiente la cantidad de las mismas para desarrollarse en el cultivo bacteriano. Otro factor importante es la capacidad que tiene *S. aureus* para formar abscesos; es común que este patógeno se encuentre encapsulado en los mismos y que no se aislen bacterias de las muestras de leche sino hasta que el microorganismo se libere de dicho absceso (Blowey & Edmondson, 1995, p. 171). Es por esto que se recomienda interpretar los resultados del cultivo bacteriano junto al RCS o al C.M.T., ya que pueden pasarse por alto infecciones al evaluar al paciente con base solamente en el cultivo de leche, además en muchos casos se requiere más de un cultivo para identificar el agente causal, mucho más aún si el patógeno es el mencionado anteriormente (Smith, 2010, p. 1117).

Es probable que algunos casos de mastitis bovina no hayan sido detectados al momento del estudio. Según Blowey & Edmondson (1995, p. 178) muchos

animales infectados durante la lactación no manifiestan signos clínicos. Algunas vacas pueden tener un proceso infeccioso pero no presentan un número de células somáticas constantemente elevado; esto se observa en casos de infecciones bacterianas producidas por *Staphylococcus aureus* e infecciones crónicas producidas por *Streptococcus uberis*.

Se observaron numerosas verrugas en los pezones de varios animales que conformaron la presente investigación, estas lesiones podrían deberse a un proceso de papilomatosis cutánea bovina. Tomando en cuenta que la superficie de la piel normalmente intacta puede estar bajo riesgo por la presencia de cortes, grietas, fisuras y verrugas, entre otros, los microorganismos patógenos pueden multiplicarse en estas lesiones y convertirse en reservorio de infecciones que producen mastitis. Esto sucede especialmente en microorganismos como *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus aureus* (Blowey & Edmondson, 1995, p. 21).

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

El 50,00% de los cultivos presentó desarrollo de *Staphylococcus* spp., el 35,80% presentó desarrollo de *Streptococcus* spp. y el 0,62% presentó desarrollo de *E. coli*, lo cual representa un potencial riesgo zoonótico debido a la presencia de estos patógenos y de sus toxinas en la leche, especialmente en el caso de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*.

Se encontró resistencia bacteriana a diferentes antibióticos lo cual constituye un problema de salud pública debido a la posible transmisión de cepas bacterianas resistentes del bovino al hombre, así como la transferencia de resistencias bacterianas entre diferentes microorganismos.

La mayor parte de *Staphylococcus* spp. presentó resistencia a la cloxacilina, por lo que su utilización durante la terapia del secado no sería adecuada. Varios *Streptococcus* presentaron resistencia a betalactámicos como la penicilina y la ampicilina, por lo que se recomienda manejar una terapia junto con inhibidores de las betalactamasas como por ejemplo el sulbactam.

La prevalencia aparente de mastitis por animal en las seis comunidades en estudio fue del 74,41%, lo cual sugiere bajos niveles de calidad de leche ya que la mayor parte de esta proviene de animales con procesos de mastitis. Esto representa pérdidas económicas importantes para los pequeños productores, tanto por el elevado recuento de células somáticas, como por los cambios en la composición de la leche.

7.2 Recomendaciones

Realizar análisis periódicos en las mismas comunidades para analizar la incidencia de mastitis tanto clínica como subclínica y tener un mejor diagnóstico, especialmente en el caso de patógenos como *S. aureus*.

Continuar realizando investigaciones sobre la prevalencia de mastitis y microorganismos relacionados especialmente a nivel de pequeños productores.

Capacitar de manera continua a las comunidades de pequeños productores en temas de sanidad animal y especialmente de salud de la glándula mamaria.

Asignar un profesional para elaborar y supervisar un plan de control para la mastitis según cada explotación lechera, ya que el diagnóstico y terapéutica antimicrobiana de los casos de mastitis bovina deben estar a cargo de un médico veterinario, y sustentados con análisis de laboratorio.

Referencias

- Acuña, V., & Rivadeneira, A. (2008). *Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de pichincha*. Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador. Recuperado el 8 de mayo de 2014 de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA%20I-003435.pdf>
- Bedolla, C., & Catañeda, V. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina (Methods of detection of the bovine mastitis), *VIII*(9), 1-17. Recuperado el 18 de julio de 2014 de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Bedolla, C., & Ponce de León, M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera - Economic causalties inflicted by the bovine mastitis in the milk industry). *REDVET*, *IX*, 10,11. Recuperado el 2 de octubre de 2014 de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>
- Biberstein, E., & Chung, Y. (1994). *Tratado de microbiología veterinaria*. España: ACRIBIA.
- Blowey, R., & Edmondson. (1995). *Control de la Mastitis en Granjas de Vacuno de Leche*. España: ACRIBIA.
- Brightling, P., Mein, G. A., Malmo, J., & Ryan, D. P. (1998). *Countdown Downunder: Farm Guidelines for Mastitis Control*. Melbourne Australia: Dairy Research an Development Corporation.
- Castillo, M., Suniaga, J., Rojas, G., Hernández, J., Caamaño, J., Urbina, A., & Tobar, L. (2009). Estudio de prevalencia de mastitis subclínica en la zona alta del estado de Mérida. *Agricultura Andina*, *XVI*, 39-48. Recuperado el 4 de abril de 2014 de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30234/1/articulo3.pdf>
- Correa, R. (2008). Acuerdo ministerial #1042. Recuperado el 4 de febrero de 2014 de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/index.php/normativa-leche/file/146-acuerdo-ministerial-1042-23-abril-del-2008>
- Cunningham, J., & Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria* (4.^a ed.). ELSEVIER.
- Echeverri, J. J., Jaramillo, M. G., & Restrepo, L. F. (2010). Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*, *VII*, 49-57. Recuperado el 6 de junio de 2014 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69514965007>

- Espinoza, M. G., & Mier, J. P. (2013). *Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California Mastitis Test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del cantón El Chaco, provincia del Napo*. Universidad Central del Ecuador. Recuperado el 6 de junio de 2014 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1281>
- García, A. D. (2004). Células somáticas y alto recuento bacteriano ¿ Cómo controlarlos ? Recuperado 23 de enero de 2014 de http://pubstorage.sdstate.edu/AgBio_Publications/articles/ExEx4031-S.pdf
- Gasque, R. (UNAM). (2008). *Mastitis bovina* (1.^a ed.). México: Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 12 de marzo de 2014 de http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/Indice.pdf
- González, F., Martínez Subiela, S., & Cerón, J. (2007). Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas, 23, 5-17. Recuperado el 25 de enero de 2014 de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3933977>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2011). *Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance*. (p.305,306) Nueva York: Springer.
- Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). (2009). SOBERANÍA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA BASADA EN LA PRODUCCIÓN SANA DE ALIMENTOS. Ecuador: INIAP. Recuperado el 23 de agosto de 2014 de [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/proyectos_inversio_n_iniap/priorizados_senplades/produccion_limpia/SeguridadySoberaniaAlimentaria\(ECU-VEN\).DOC](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/proyectos_inversio_n_iniap/priorizados_senplades/produccion_limpia/SeguridadySoberaniaAlimentaria(ECU-VEN).DOC)
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2013). Visualizador de estadísticas agropecuarias del Ecuador ESPAC. Recuperado el 12 de agosto de 2014 de http://www.inec.gob.ec/estadisticas/?option=com_content&view=article&id=103&Itemid=75
- Kleinschroth, E., Rabold, K., & Deneke, J. (1991). *La Mastitis* (2.^a ed.). España: EDIMED.
- Kruze, J. (1998). La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile*, 30(2), 7-16. <http://doi.org/10.4067/S0301-732X1998000200001>
- Laboratorios Industriales Farmacéuticos Ecuatorianos (LIFE). (2012). C.M.T. California Mastitis Test. [Etiqueta del envase plástico de 1000 ml]. Ecuador.

- LIVEXLAB. (2014). Procedimiento operativo estándar: Toma y envío de muestras al laboratorio. Manual de procedimientos. LVX/POE/020-01. Recuperado el 2 de febrero de 2014 a partir de <http://www.livex.com.ec/uploads/documentos/2014/LVX-POE020-01.pdf>
- López, L., Ramírez, P., Estupiñán, R., Herrera, P., Vera, W., Muñoz, M., & Jumbo, C. (1993). *Proceso de análisis y mejoramiento de sistemas de producción agropecuario-forestales de pequeños y medianos productores*. (L. López, F. Espinoza, G. Simón, & S. Cordero, Eds.) (1.ª ed.). Quito: PROFOGAN.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology* (2.ª ed.). China: ELSEVIER.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (1989). *Milking, milk production hygiene and udder health*. Roma: FAO. Recuperado el 7 de junio de 2014 de <http://www.fao.org/docrep/004/t0218e/T0218E00.htm#TOC>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2013). *Milk and dairy products in human nutrition*. (E. Muehlhoff, A. Bennett, & D. McMahon, Eds.) (p. 106). Roma: FAO. Recuperado el 11 de agosto de 2014 de <http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2014). Ganadería. Recuperado 18 de enero de 2014 de <http://www.fao.org/americas/perspectivas/ganaderia/es/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2014). *Código Sanitario para los Animales Terrestres. Uso responsable y prudente de productos antimicrobianos en medicina veterinaria*. Recuperado 8 de diciembre de 2014 de http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_antibio_use.htm
- Pech, V., Carvajal, M., & Montes, R. (2007). *Impacto económico de la mastitis subclínica en hatos bovinos de doble propósito de la zona centro del estado de yucatán*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, VII, 127-131. Recuperado el 15 de febrero de 2014 de <http://www.uady.mx/~veterina/publicaciones/journal/2007-2/178-mastitis.pdf>
- Porporatto, C., & Felipe, V. (2013). *Mastitis, confort y calidad de leche: Jornada lechera 2010* (1.ª ed.). Argentina: EDUVIM.
- Proaño, S. M., & Vásquez, C. del P. (2013). *Determinación de mastitis bovina mediante California Mastitis Test, recuento de células somáticas y cultivo bacteriológico en la comunidad de Llanos de Albas del Cantón Cayambe* -

Provincia de Pichincha. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado el 5 de enero de 2015 de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/22000/5683/1/T-PUCE-5833.pdf>

Sánchez, G. (2003). *Perspectivas de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Una nueva barrera a la globalización?*, 57-59. Recuperado el 17 de agosto de 2014 de <http://www.bdigital.unal.edu.co/42184/1/28022-99287-1-PB.pdf>

Smith, B. (2010). *Medicina Interna de Grandes Animales* (4.^a ed.). España.

Smith, L., Hillerton, E., & Harmon, R. (2001). *National Mastitis Council Guidelines on Normal and Abnormal Raw Milk Based on Somatic Cell Counts and Signs of Clinical Mastitis*. Recuperado el 2 de junio de 2014 de <https://nmconline.org/docs/abnmilk.htm> el

Stanchi, N. O. (2007). *Microbiología Veterinaria*. (P. E. Martino, E. Gentilini, E. H. Reinoso, M. G. Echeverría, N. A. Leardini, & J. A. Copes, Eds.) (1.^a ed.). Argentina: Inter-médica.

Tizard, I. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria* (8.^a ed.). España: ELSEVIER.

Torres, H., & López, M. (1984). *Mastitis Subclínica en el Proyecto Queserías Rurales del Ecuador*. Quito: Proyecto queserías rurales del Ecuador.

Valdivieso, K. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de nano plata sobre mastitis subclínica bovi a en la unidad productiva Tunshi*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Recuperado el 26 de febrero de 2015 de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/210/1/56T00182.pdf>

Velásquez, C., & Vega, J. (2012). *Calidad De La Leche Y Mastitis Subclínica En Establos De La Provincia De Huaura, Lima*. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(1), 65-71. <http://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.883>

Anexos



Anexo 1. Sujeción de los animales



Anexo 2. Preparación de la ubre para la toma de muestras



Anexo 3. Prueba de fondo oscuro



Anexo 4. Toma de muestras para el C.M.T.



Anexo 5. Adición del reactivo con la muestra de leche durante el C.M.T.



Anexo 6. Procesamiento del C.M.T.



Anexo 7. Muestra positiva para el C.M.T.



Anexo 8. Limpieza del pezón con papel secante



Anexo 9. Limpieza del pezón con una torunda impregnada de alcohol



Anexo 10. Toma de muestra de leche para cultivo y antibiograma



Anexo 11. Siembra de las muestras de leche de animales con mastitis



Anexo 12. Desarrollo de colonias bacterianas en agar sangre de cordero



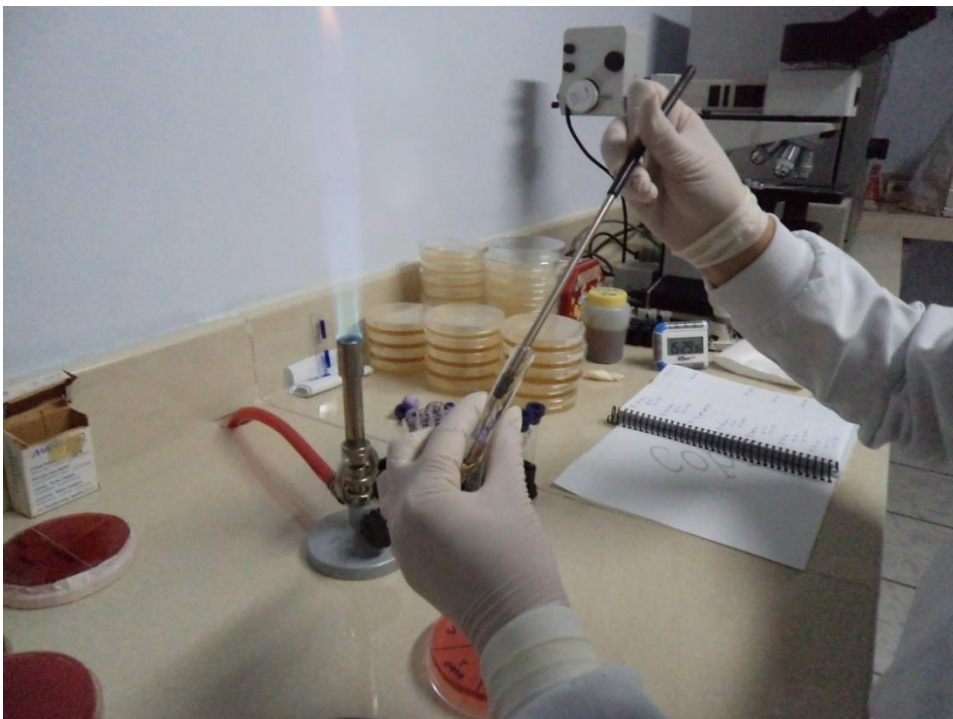
Anexo 13. Análisis de la tinción de Gram



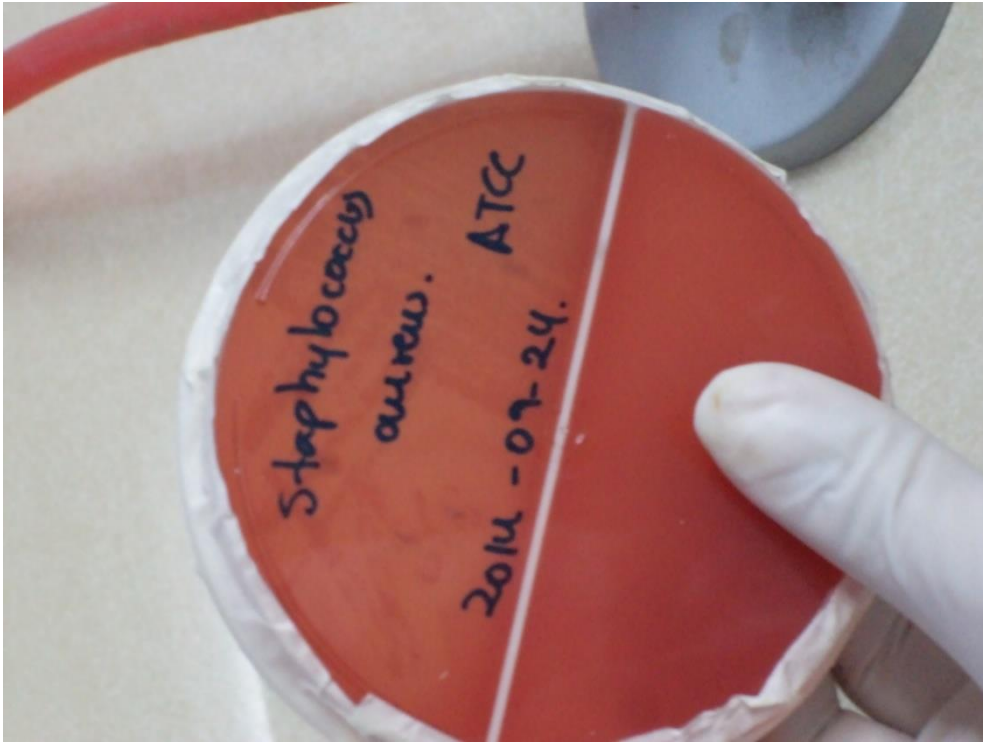
Anexo 14. Prueba de catalasa



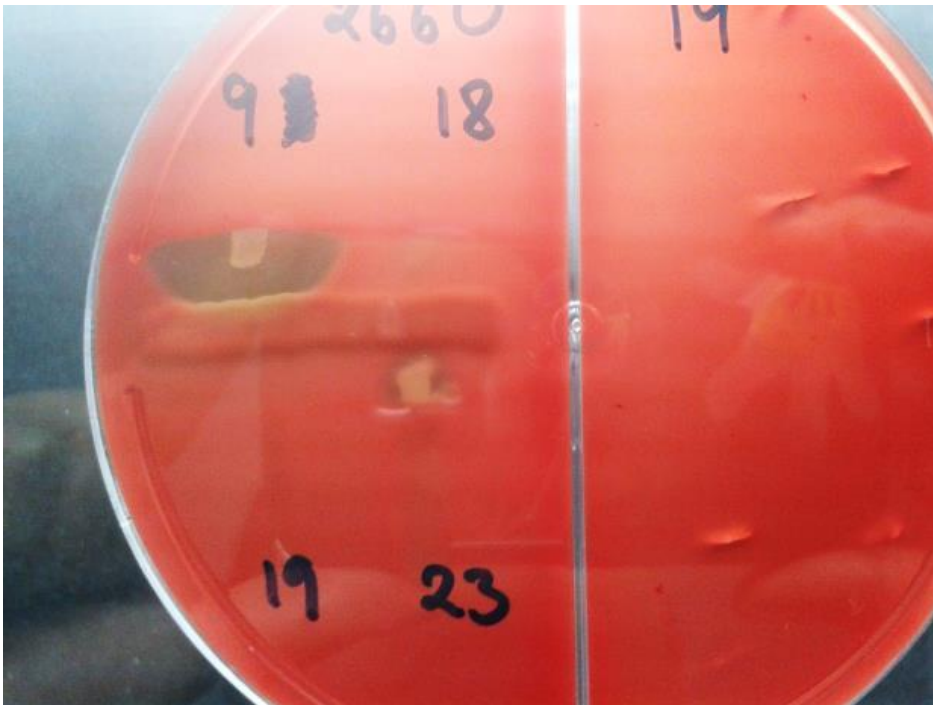
Anexo 15. Toma de plasma para realizar la prueba de coagulasa



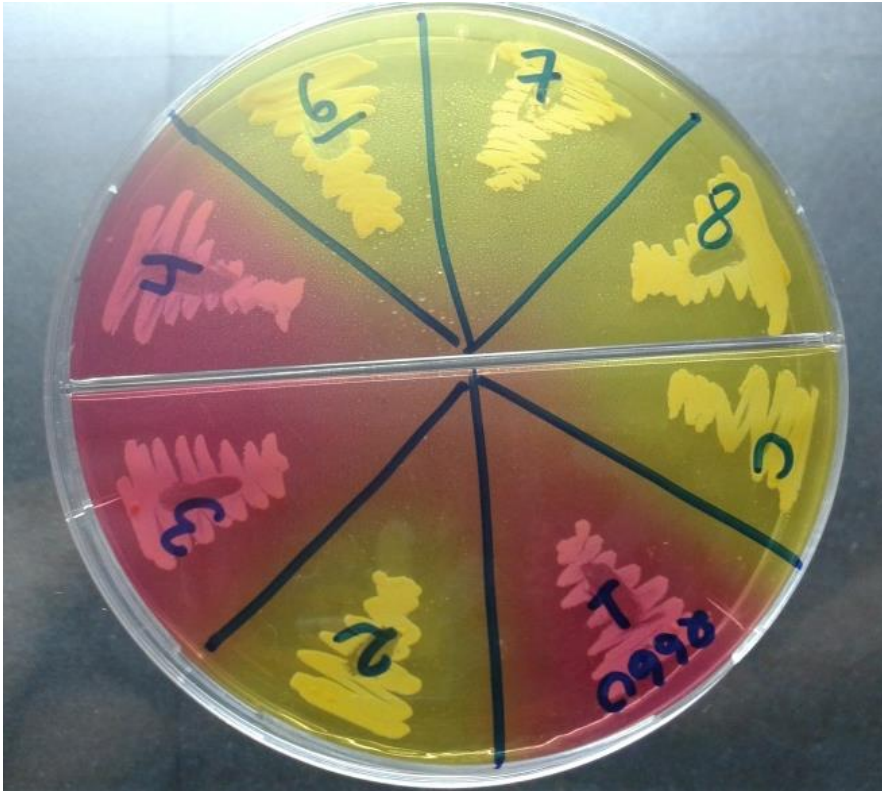
Anexo 16. Prueba de coagulasa



Anexo 17. Cepas de control ATCC: *Staphylococcus aureus*



Anexo 18. Prueba de CAMP positiva



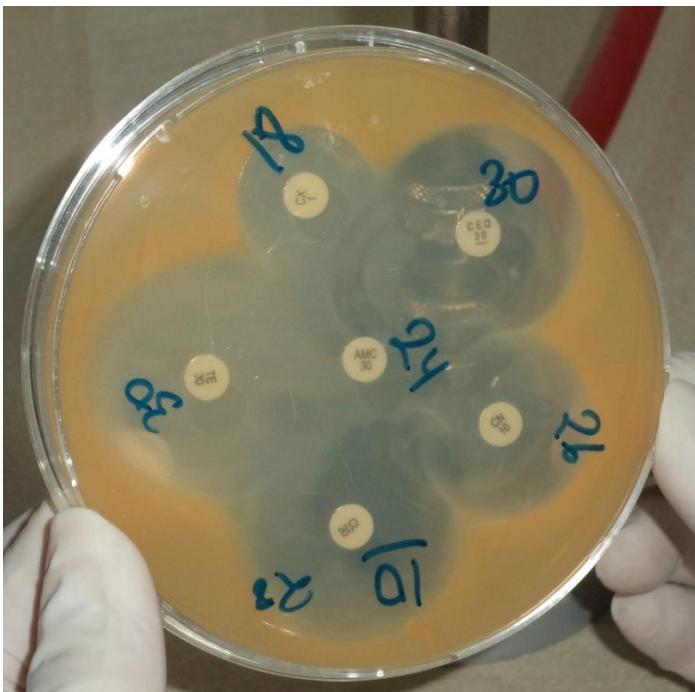
Anexo 19. Resultados positivos y negativos de la prueba de fermentación de azúcares en el agar manitol salado



Anexo 20. Bioquímica correspondiente a *Escherichia coli*: TSI (A/A), Citrato (negativo), Urea (negativo), SIM (movilidad e indol positivo sin producción de SH₂).



Anexo 21. Antibiograma en agar sangre



Anexo 22. Antibiograma en agar Mueller-Hinton