

Secado

Duración del secado.

Medicamentos para secar:

Tipo de secado:

Procedimiento (inmediato, lento, etc.):



Condiciones de manejo / higiene

Sistema de manejo:

Capacidad de vacas:

Higiene del establo:

Condiciones de las superficies de camas:

Limpieza de la cama en el área de las ubres:

Estado de cuidados de las vacas:

Observaciones:





Alimentación

Aprovisionamiento de agua / calidad:

Alimento base, Tipo de alimentos:

Calidad del alimento:

Sistema de alimentación:

Tipo de concentrado:

Frecuencia de la repartición del concentrado:

Alimentación por producción de leche/grupos según rendimiento:

Análisis del alimento base:

cálculo de la ración:

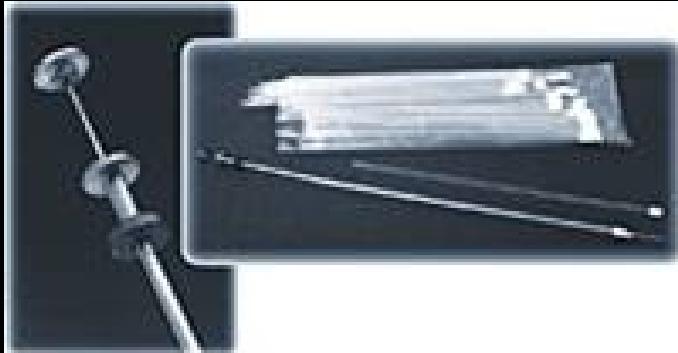
Consumo de alimento básico/llenado del rumen:

Sales minerales utilizadas, cantidad/vaca/día:

Estado corporal:

Consistencia de las heces:

Observaciones



Manejo del hato

Número de la vaca:

Inseminación/ apareamiento normal:

Fecha de apareamiento (sí, no, estimado, tipo de registro):

Diagnóstico de gestación (si, no, periodo):

Periodo entre partos:

Promedio de lactaciones/vaca:



Aplicación de medicamentos

Aplicación de medicamentos (descripción):

Quien aplica los medicamentos:

Tipo del tratamiento (local, parenteral):

Sustancia activa utilizada / nombre de los medicamentos:

Cantidad del medicamento aplicado:

Duración del tratamiento

Manejo del tiempo de eliminación:

Estado de salud de los animales en general

Vacas lecheras (parto, periodo posparto, etc.):

Parásitos:

Enfermedades infecciosas:

Vaquillas:

Becerros:

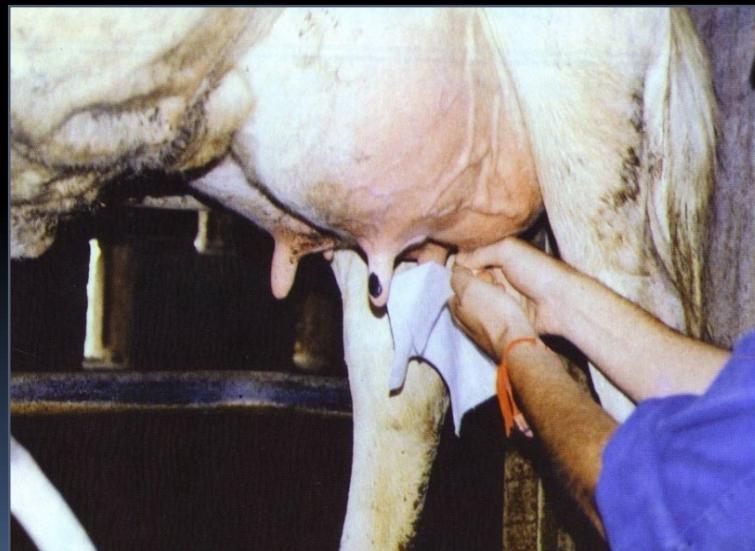
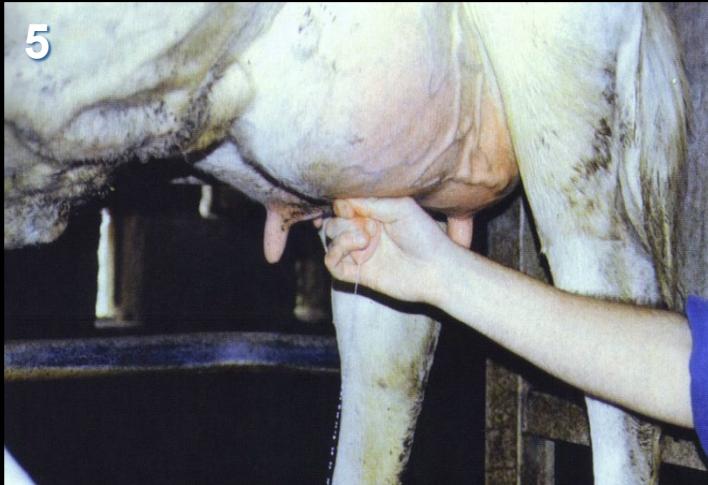
Manejos de rutina del hato (vacunaciones, etc.):

TOMA CORRECTA DE MUESTRAS DE LECHE

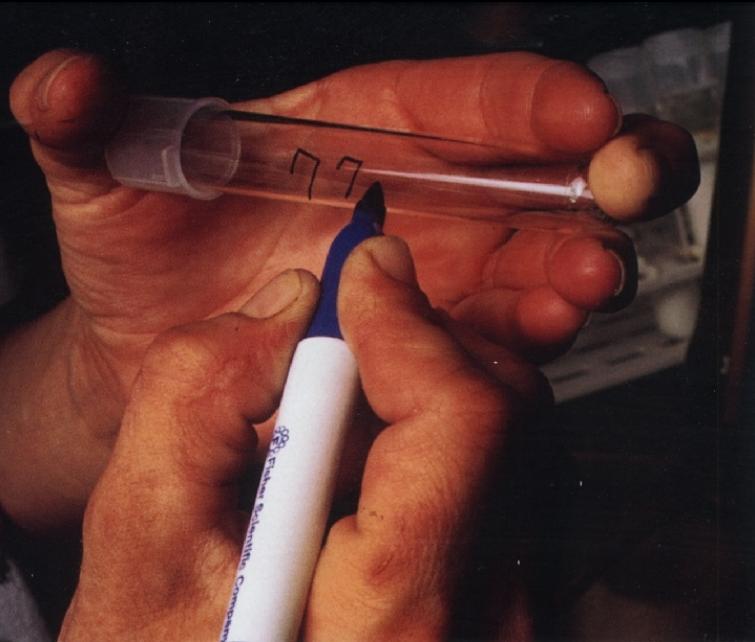
PROCESO

LIMPIEZA DE LOS PEZONES E HIGIENE DE LA UBRE





Toma de Muestra para el Cultivo Bacteriano



Se numeran los tubos

Se limpia y desinfecta el pezón





Toma de muestra

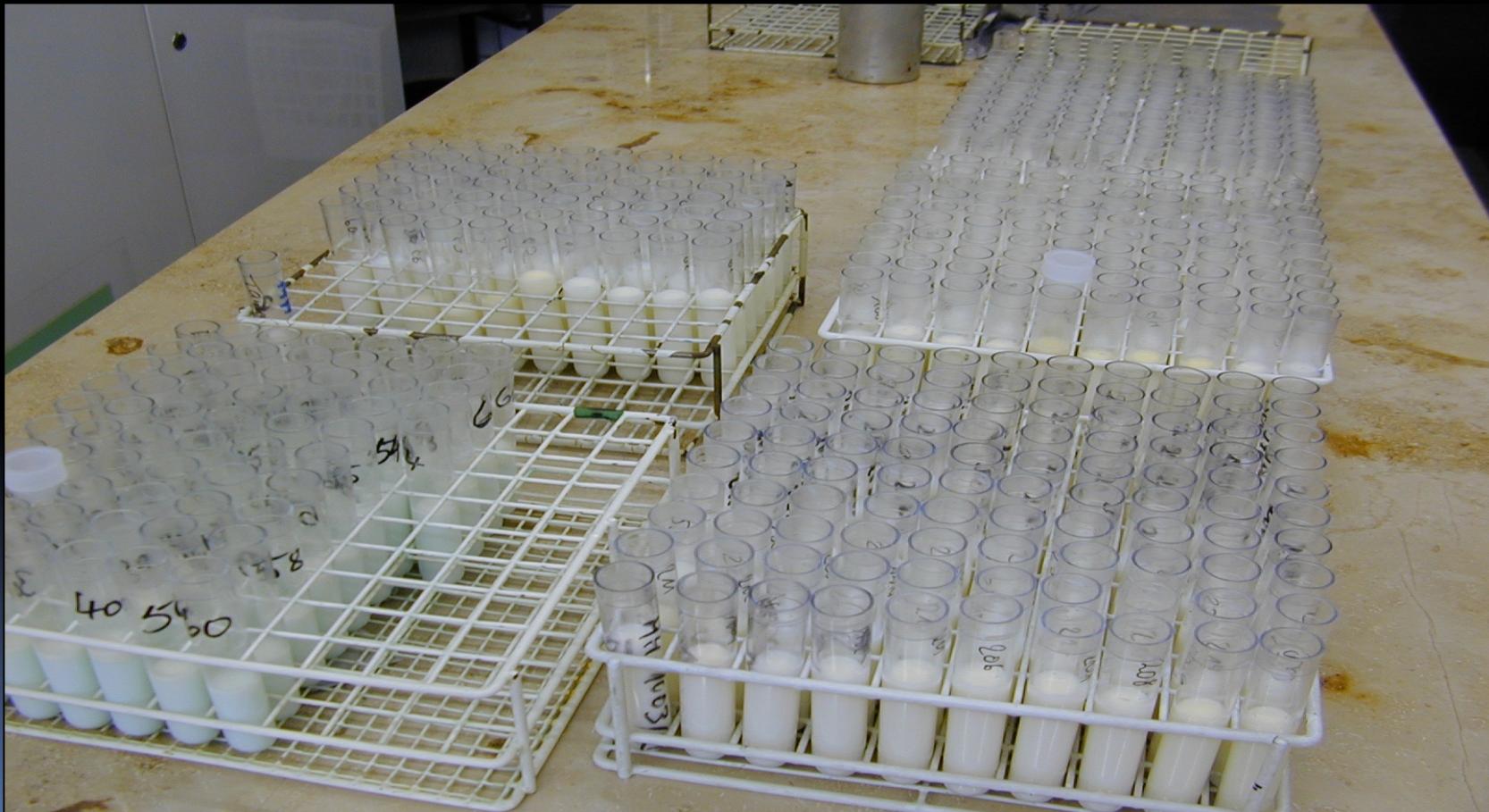


**Se coloca en gradillas
y se refrigerá**

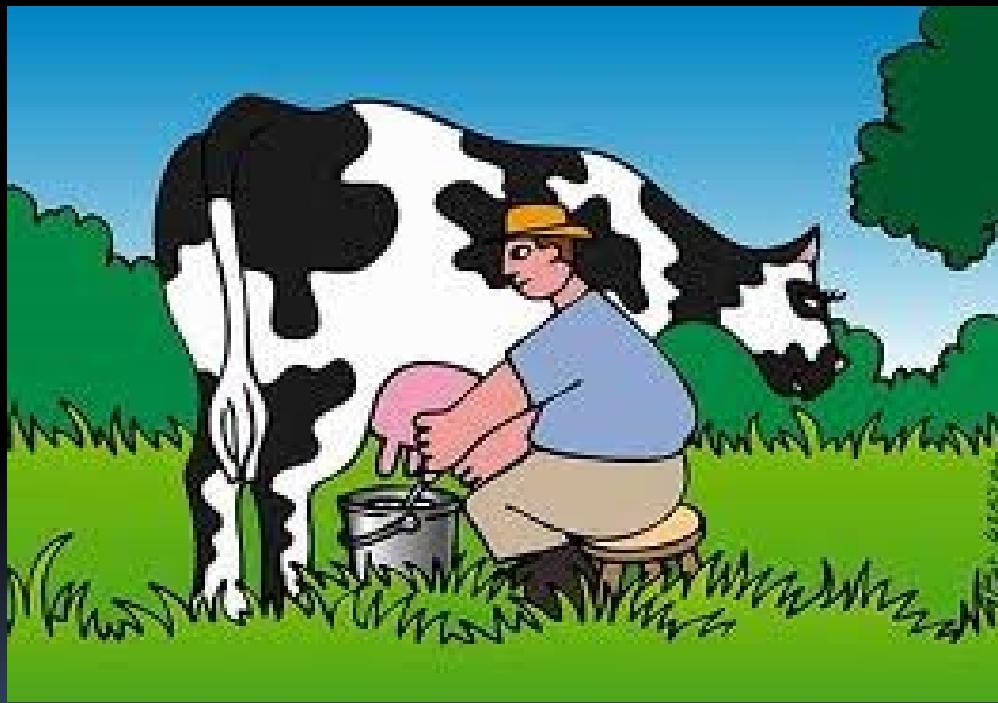


Una vez hecho lo anterior, se procede a realizar la prueba de California (CMT), asimismo, se utiliza una hoja de registro de la prueba para control de mastitis.

Traslado de las muestras al laboratorio para su procesamiento



GRACIAS POR SU ATENCIÓN



TOMA CORRECTA DE MUESTRAS DE LECHE Y PRUEBA DE CALIFORNIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MASTITIS

Bedolla Cedeño, C^{1*}., Lucio Domínguez, R¹., Cruz Hernández, A. R¹., Bedolla García, J. C¹., Castañeda Vázquez, H²., Valladares Carranza, B³., y Velázquez Ordoñez, V³.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Acueducto y Tzintzuntzan s/n. Colonia. Matamoros. CP. 58000. Morelia, Michoacán. México. bedollajl@yahoo.com.mx

²Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Km 15.5 Carretera a Nogales, Predio las agujas, Zapopan, Jalisco, México.

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca. México.

INTRODUCCIÓN

Al realizar procedimientos de diagnóstico microbiológico, la toma correcta de muestra de leche de vacas durante la lactancia es necesaria para el aislamiento e identificación de los agentes patógenos causantes de mastitis en los hatos lecheros. Este procedimiento de diagnóstico se lleva a cabo a partir de muestras al realizar la prueba de California, la cual es determinante en el monitoreo del grado de infección en las vacas y los patógenos presentes en el hato relacionados con la ocurrencia de la mastitis en las distintas etapas de producción.

La calidad de las muestras tomadas para cualquier procedimiento de diagnóstico es extremadamente importante, sin embargo, la calidad de las muestras para el diagnóstico de la mastitis es en muchos aspectos más crítica que la de muchas otras enfermedades. Una técnica aséptica en la recolección de muestras para cultivo

bacteriano es una necesidad absoluta. No sólo hay organismos que son contaminantes, sino que también estos mismos organismos tienen el potencial de causar la enfermedad. Las muestras contaminadas conducen a diagnósticos erróneos, aumento del trabajo, la confusión y la frustración por lo que se debe de llevar a cabo una toma correcta de las muestras para obtener buenos resultados (Waldner, 2004).

El objetivo del presente artículo consistió en describir el procedimiento que se debe seguir para llevar a cabo la toma correcta de muestras de leche para su procesamiento en el laboratorio y los pasos que se deben seguir para realizar adecuadamente la prueba de California para diagnóstico de mastitis.

TOMA DE MUESTRAS

El aislamiento de agentes patógenos de mastitis u otros microorganismos a partir de muestras tomadas de la glándula mamaria en forma aséptica, no indica necesariamente que estos provengan de una infección intramamaria; así como la falta de aislamiento no indica la ausencia de una infección intramamaria. La glándula mamaria sana es estéril, pero como no es posible obtener condiciones de esterilidad dentro de la sala de ordeño u otros lugares que se dispongan para realizar el muestreo, la leche obtenida manualmente de una glándula sana contendrá casi siempre contaminantes del canal del pezón, lesiones del pezón, piel de la ubre o de las manos de quien realiza el muestreo (Calvinho, 2001).

Partiendo de la premisa que no es posible contar con un ambiente estéril, el objetivo será utilizar métodos de muestreo asépticos que eviten contaminación que podría interferir con el diagnóstico de infecciones intramamarias. El grado de contaminación obtenido al realizar un cultivo de leche es generalmente una medida de la idoneidad en la toma de muestras.

Sin embargo, el número de organismos contaminantes detectados no depende solamente del cuidado en la toma de las muestras, sino también del volumen de leche examinado y del método de análisis utilizado (Calvinho, 2001).

¿Qué tipo de muestras debemos tomar y porqué?

Al trabajar con hatos con problemas de mastitis, es necesario conocer cuáles son los patógenos de la glándula mamaria predominantes. Para este fin pueden tomarse muestras de los cuartos, generalmente con mastitis clínicas o leche de los cuatro cuartos de una vaca de un porcentaje de las vacas. En algunos casos puntuales en los que se establezcan programas de control especiales; planes de segregación, terapia blitz contra *S. agalactiae*, puede realizarse el muestreo de todas las vacas en ordeño.

Materiales para la toma de muestras

Tubos estériles con tapa a rosca o desechables con tapón a presión. Normalmente se utilizan tubos de 15 a 25 ml de capacidad debido a la facilidad para manipular los mismos. Sin embargo, se pueden utilizar viales o tubos de menor capacidad (Sudhan y Sharma, 2010). Tubos de vidrio o plástico estériles pueden obtenerse en laboratorios dedicados al procesamiento de muestras de leche.

En caso de que se desee utilizar material de vidrio propio, se debe limpiar cuidadosamente y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos con las tapas ligeramente flojas. Las mismas deberán ajustarse luego de la esterilización. Se recomienda colocar cinta testigo o similar a cada tubo para posibilitar la identificación de cada muestra utilizando bolígrafo o marcador permanente. Esta práctica es preferible a escribir directamente sobre el tubo de vidrio ya que facilita el lavado del material en el laboratorio. Es conveniente identificar los tubos cuando están secos antes del muestreo. Los viales de plástico se pueden identificar con marcador permanente. Los tubos deberán posteriormente ubicarse en gradillas adecuadas para su manipuleo y almacenamiento.

Momento de la toma de muestras

Las muestras para cultivo bacteriológico pueden ser tomadas antes o después del ordeño, así como en el intervalo entre ordeños. La toma de muestras ya sea pre o post-ordeño no presenta diferencias respecto de la posibilidad de aislamiento de organismos patógenos, aunque se considera que la especificidad aumenta en el muestreo post ordeño. Sin embargo, si se desea practicar en forma concomitante un recuento de células somáticas (RCS), se debe tener en cuenta que en la leche post-ordeño los valores de células somáticas son mayores a los obtenidos en la leche pre-ordeño. El momento elegido dependerá entonces del objetivo del muestreo, así como de las condiciones de manejo de cada establecimiento.

Datos anamnésicos

Antes de llevar a cabo la recolección de las muestras de leche, se debe incluir información sobre el tipo de muestra (de cuarto, compuesta), así como datos sobre la vaca: identificación, número de lactancia, tiempo de lactancia, tratamientos antibióticos (Calvinho, 2001).

PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE LECHE

Procedimientos estrictamente asépticos deben utilizarse en la recolección de muestras de leche, con el fin de evitar la contaminación con la gran cantidad de microorganismos presentes en la piel de los flancos de la vaca, la ubre y los pezones, en las manos de las personas que toman las muestras y en el medio ambiente de la granja. Los siguientes procedimientos ayudan a reducir la contaminación durante la recogida de la muestra.

1. Etiquetar los viales o tubos

Etiquetar los viales o tubos de vidrio o plástico antes de realizar el muestreo con la fecha de recolección, nombre de la granja, identificación de la vaca, cuarto, con un marcador indeleble.

2. Limpieza y secado de los pezones

Se pueden obtener muestras de leche adecuadas si la piel de la ubre y especialmente la de los pezones está limpia y seca. Con la mano o con una toalla de papel desechable seca, quitar la suciedad suelta, el material de la cama, el pelo de la glándula y de los pezones.

No se recomienda lavar la ubre si está limpia y seca de los pezones. Solamente que los pezones estén sucios, deben lavarse con agua y una toalla de papel desechable y eventualmente con una solución antiséptica. Una vez lavados, estos deben ser secados con otra toalla desechable. En algunos casos, se sumergen los pezones en una solución antiséptica eficaz o presellador, que se deja actuar por 20 a 30 segundos antes de higienizar los pezones con una toalla desechable (Bewley y Harmon, 2010; Wolter *et al.*, 2004; Bedolla *et al.*, 2013).

3. Despuntar

Desechar los primeros 2 o 3 chorros de leche del pezón y observar la leche y la glándula para detectar signos de mastitis clínica. Anotar todas las observaciones de los signos clínicos (Bewley y Harmon, 2010; Bedolla *et al.*, 2013; Nova Scotia, s/f.).

4. Frotar con alcohol la punta de los pezones

La punta de cada pezón se debe frotar vigorosamente con un algodón o una toalla desechable humedecida en alcohol etílico o isopropílico al 70% durante 10 a 20 segundos; utilizando un trozo de algodón o toalla de papel desechable para cada pezón a muestrear. Este procedimiento debe realizarse hasta notar que la punta del pezón esté visiblemente limpia (Bewley y Harmon, 2010). Dependiendo de la suciedad; en

algunos casos se deberá usar más de un trozo de algodón o toalla de papel desechable por pezón.

Se deben comenzar a desinfectar en primer término los pezones de la ubre más alejados, es decir, los del lado opuesto del operador, finalizando por los más cercanos al mismo. El alcohol al 70% es el antiséptico ideal para tal efecto ya que se evapora rápidamente y no deja residuos en la muestra de leche que podrían inhibir el desarrollo bacteriano en el laboratorio (Nova Scotia, s/f.; Bedolla *et al.*, 2013).

5. Recolección de la muestra

Para recolectar las muestras de leche de cuartos individuales y disminuir la contaminación involuntaria de los pezones durante la toma, se debe de comenzar con la recolección de las muestras de los pezones más cercanos al operador, finalizando con los más alejados. Es decir, en orden inverso al de la limpieza.

Para la toma de la muestra, se debe retirar primero la tapa del tubo o vial, colocando ésta hacia abajo, evitando tocar con los dedos la superficie interna de la misma. Enseguida se deberán eliminar los primeros dos o tres chorros de leche y se mantendrá el tubo en posición oblicua (aproximadamente en ángulo de 45°) sin permitir que la boca del tubo de la muestra entre en contacto con la punta del pezón. El pezón se llevará asimismo a una posición oblicua y se dirigirá el chorro de leche dentro del tubo. Al ubicar tubos y pezones en esta posición se minimiza la posibilidad de contaminación por partículas que se desprendieran de la piel de la ubre. La celeridad en el procedimiento también disminuye la posibilidad de contaminación (Bewley y Harmon, 2010; Sudhan y Sharma, 2010).

Una vez que se colecta la muestra, se debe colocar inmediatamente de manera correcta la tapa del tubo o vial.

Los tubos o viales de la muestra no deben ser llenados más de 3/4 de su capacidad. Muestras de gran volumen no se requieren ya que aumentan el riesgo de contaminación. Dos a tres ml de leche es generalmente un tamaño de muestra suficiente para los análisis bacteriológicos (Bewley y Harmon, 2010; Sudhan y Sharma, 2010; Bedolla *et al.*, 2013).

Recolección de muestras compuestas

Para recolectar una muestra compuesta de leche de los cuatro cuartos de la ubre de una vaca en el mismo tubo, el procedimiento de higiene previa es similar. Luego se deben recolectar cantidades aproximadamente similares de cada uno de los cuartos en el tubo. Para ello, se comenzará la recolección de las muestras de los pezones del lado de la ubre más cercanos al operador (Waldner, s/f.).

Conservación y transportación de las muestras al laboratorio

Luego de la recolección de las muestras y ubicación de los tubos en gradillas, las mismas deben mantenerse en conservación a aproximadamente 5°C. Las muestras deben remitirse al laboratorio para su cultivo preferiblemente dentro de las 24 hs de extraídas (Sudhan y Sharma, 2010). En casos en que por la distancia o dificultades en el transporte no puedan remitirse dentro de las siguientes 24 hs, es necesario mantenerlas refrigeradas o congeladas a -20°C por un breve tiempo (Bewley y Harmon, 2010). La refrigeración a 4°C por una semana no afecta ostensiblemente la capacidad de aislamiento de la mayoría de las especies de estafilococos y estreptococos. Sin embargo, la refrigeración o congelación puede disminuir la posibilidad de aislamiento de otros microorganismos como *Nocardia spp.* y *Escherichia coli*, dependiendo del tiempo de almacenamiento. Asimismo, debe tenerse en cuenta que las muestras que han sido congeladas no pueden usarse para conteo de células somáticas (Calvinho, 2001; Wolter *et al.*, 2004).

MUESTREO DE LECHE DE TANQUE

El número de muestras a tomar puede ser variable. En algunos casos muestras múltiples recolectadas varios días seguidos arrojan resultados más confiables que una muestra individual. Hay microorganismos como el *S. aureus* que presentan variaciones diarias en el índice de eliminación. En casos como este, las variaciones pueden superarse tomando muestras por tres o cuatro días consecutivos o en semanas consecutivas.

La leche del tanque debe estar homogeneizada en el momento de la toma de la muestra, lo cual se logra con el funcionamiento de los agitadores mecánicos existentes en los tanques. Un buen momento para obtener la muestra es inmediatamente después del ordeño ya que la agitación durante el proceso de enfriado produce una homogeneización adecuada.

La muestra debe tomarse con materiales estériles: frascos desechables, pipetas de inseminación artificial acopladas por medio de un tubo de goma a una jeringa, etc. En casos particulares en los que no sea posible contar con material estéril se puede higienizar cuidadosamente el muestreador de acero inoxidable, luego sumergirlo en alcohol de 96% dejando un pequeño volumen en su interior y posteriormente flamearlo. El muestreador así tratado deberá ser utilizado inmediatamente luego del flameado. No se recomienda tomar muestras del grifo de salida de los tanques ya que esta área normalmente tiene un alto contenido de bacterias.

La muestra tomada con el muestreador o con pipeta debe ser transferida inmediatamente a un recipiente estéril, manteniéndola refrigerada hasta su procesamiento dentro de las 24 hs. Asimismo, cuando se realizan muestreos seriados es posible congelar las muestras a -20°C y mantenerlas de esta forma hasta por cuatro semanas antes de su envío al laboratorio. En caso que la muestra se congele, no se podrá practicar el recuento de células somáticas (Calvinho, s/f.).

PRUEBA DE CALIFORNIA PARA MASTITIS (CMT)

La Prueba de California para Mastitis (CMT, por sus siglas en inglés) ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Morresey, 1999; Radostits *et al.*, 2000; Medina y Montaldo, 2003; Erskine, 2001; Bedolla, 2004).

Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Blowey y Edmonson, 1995; Bedolla, 2004).

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California para Mastitis

1. Se desecha la leche del preordeño.
2. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta.
3. Se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche.
4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo.
5. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción de gelificación. Antes de continuar con la vaca siguiente se debe enjuagar la placa.

Los resultados pueden interpretarse en cinco clases: desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifica. Esto se determina en relación a la reacción de gelificación (Cuadro 1) (Pérez, 1986; Blowey y Edmonson, 1995; Bedolla, 2004).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquil-aryl sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se

convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003). A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto, mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Smith, 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

Desafortunadamente esta prueba es muy subjetiva y tiene que hacerse al lado de la vaca durante el ordeño (lo que interfiere con el manejo del ordeño) (Pérez, 1986).

La Prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%. Sus ventajas principales son:

1. Es una técnica muy sensible y se puede utilizar tanto en una muestra de cuartos, como una muestra del tanque enfriador. En una muestra de tanque, los resultados de grado 2 y 3, indican un alto porcentaje de vacas infectadas.
2. El material extraño no interfiere con la prueba (pelo u otro material).
3. La prueba es simple y no requiere de equipo costoso.
4. La paleta es fácil de limpiar después de cada uso (Báez, 2002).

A pesar de sus ventajas, la técnica presenta los siguientes inconvenientes:

1. Los resultados pueden ser interpretados de forma variable, entre los individuos que realicen la prueba, por lo que resulta necesario uniformizar el criterio de casos positivos y su categorización en grados.

2. Pueden presentarse falsos positivos en leche de animales con menos de diez días de partos o en vacas próximas a secarse.
3. La mastitis clínica aguda da resultados negativos, debido a la destrucción de los leucocitos por las toxinas provenientes de los microorganismos presentes (Báez, 2002).

Cuadro 1. Interpretación de resultados de la Prueba de California para Mastitis

Escala de CMT	Rango relativo del nivel de células somáticas (células/ml)
Negativo	<200.000
Trazas	150.000 - 500.000
1	400.000 - 1.500.000
2	800.000 - 5.000.000
3	>5.000.000

Fuente: NMC, 1999; Saran y Chaffer, 2000.

CONCLUSIÓN

El diagnóstico e identificación de los agentes patógenos causantes de mastitis en las diferentes etapas de producción del hato lechero realizado mediante procedimientos bacteriológicos requiere de una correcta toma de muestras de leche en forma compuesta de los cuatro cuartos de la glándula mamaria de la vaca o de manera individual. Dicho muestreo es recomendable efectuarlo al momento de realizar la prueba de California y así determinar el estado de salud que guarda la glándula mamaria.

REFERENCIAS

- Báez, G. J. J. 2002. Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Téjaro, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México. pp 27-28.
- Bedolla, C. C. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. Vol. VIII No. 9. 17 pp. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Bedolla, C. C., Wolter, W. y Castañeda, V. H. 2013. Prevención, tratamiento y control de la mastitis bovina. Monografias.com <http://www.monografias.com/trabajos96/prevencion-tratamiento-y-control-mastitis-bovina/prevencion-tratamiento-y-control-mastitis-bovina.shtml>
- Bewley, J. M. y Harmon, R. J. 2010. Collection and Preparation of Milk Samples for Microbiological Culturing. Cooperative Extension Service • University of Kentucky College of Agriculture, Lexington, KY. 4pp.
- Blowey, R. y Edmonson, P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Acribia. Zaragoza. 208 pp.
- Calvinho, L. F. 2001. Diagnóstico bacteriológico de mastitis y su importancia en los programas de control. Disponible desde Internet en http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/diagnostico_de_mastitis.htm.pdf (Brasil)(con acceso 2/09/2018). 15 pp.
- Erskine, R. J. 2001. Mastitis Control in Dairy Herds. In: Radostits OM, editor. Herd Health Food Animal Production Medicine. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp 397-433.
- Medina, C. M., y Montaldo, V. H. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo.
- Morresey, P. R. 1999. Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editors. Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co, 563-568.

National Mastitis Council (NMC), INC. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Revised Edition Walton Commons West Madison.

Nova Scotia, s/f. Procedure for the Collection of Mastitis Samples. Department of Agriculture Agriculture & Food Operations Laboratory Services. <http://www.gov.ns.ca/agri/qe/labserv> [Consultado 20.08.2013].

Pérez, D. M. 1986. Manual sobre ganado productor de leche. Edit. Villicaña S.A., México. pp 710-744.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. 2000. Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Hourses. 9th ed. London, GB: WB Saunders Co.

Saran, A. y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. 194 pp.

Smith, B. P. 1990. Large Animal Internal Medicine. St Louis, Missouri: The C. V. Mosby Co.

Sudhan, N. A. y Sharma, N. 2010. Mastitis - An Important Production Disease of Dairy Animals. SMVS' Dairy Year Book. pp. 72-88.

Waldner, D. N. 2004. Bovine Mastitis: Milk Sample Collection and Handling. Oklahoma Cooperative Extension Service. Oklahoma State University.

Wolter, W., Castañeda, V. H., Kloppert, B. y Zschöck, M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. México. 146 pp.



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



XVI Curso Internacional Diagnóstico y Control de la Mastitis

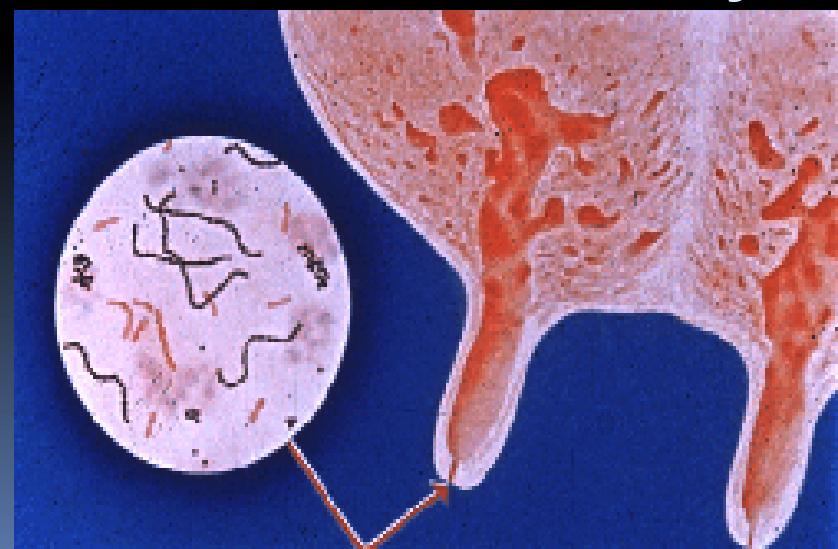
PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA MASTITIS BOVINA

**Bedolla-Cedeño, C.*, Lucio-Domínguez, R., Cruz
Hernández, A. R., Bedolla-García, J. C., Castañeda-
Vázquez, H., Valladares-Carranza, B. y Velázquez
Ordoñez, V.**

MAYO DE 2019.

LA MASTITIS

- Es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria normalmente causada por bacterias. Se caracteriza por cambios físicos y químicos de la leche, y por alteraciones patológicas en la glándula mamaria.
- Factores que predisponen la infección: procedimientos de ordeño precarios, maquina de ordeño defectuosa, agentes ambientales y



Tipos de mastitis

- **Mastitis clínica**
- Se caracteriza por la tumefacción o dolor en la ubre, enrojecimiento, la leche presenta una apariencia anormal y en algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además las bacterias están presentes en la leche, el rendimiento es muy reducido, y su contenido está alterado considerablemente.
- Bacterias involucradas
- *Escherichia coli*, *Streptococcus* ambientales, y *Staphylococcus aureus*



Mastitis clínica

- La mastitis clínica es un proceso infeccioso de la glándula mamaria con signos visibles.

Se caracteriza por la inflamación o dolor en la ubre, enrojecimiento, fiebre, cambios en la leche (arumos).



Mastitis subclínica

- **Es un proceso infeccioso que sufre la glándula mamaria, no presenta cambios visibles en la leche o ubre, pero que es posible conocerlo al realizar algunas pruebas a la leche. Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche, composición alterada de la leche y la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche.**



Pruebas para el Diagnóstico de mastitis en vacas individuales

Examen físico de la ubre

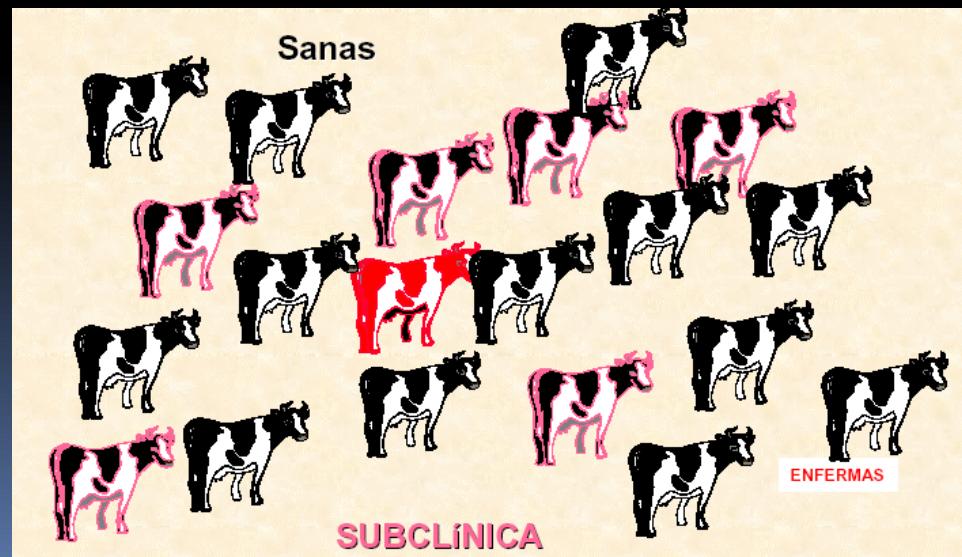
Aspecto de la leche

Conteo de células somáticas

Cultivo bacteriano

En mastitis clínica

La mastitis causa pérdidas muy grandes a los ganaderos, ya que por cada caso de mastitis clínica pueden encontrarse de 15 a 40 casos de mastitis subclínica.



Examen físico de la ubre



Al realizarlo podremos encontrar:

- **Cuartos inflamados con temperatura elevada.**
- **Dolor al tacto.**
- **Piel enrojecida**
- **Cambios en el tamaño**
- **Presencia de tejido cicatrizal**

Aspecto de la leche

La observación de los primeros chorros de leche permite la detección de leche anormal. La leche anormal puede mostrar decoloración (aguado), descamaciones, coáculos, pus.



***Prueba del paño negro**

***Tasa probadora o de fondo oscuro**

- Estas pruebas se realizan durante la preparación de la vaca para la ordeña. Consiste en la detección de grumos, tolondrones, descamaciones, sangre, etc., en la leche. Es recomendable realizar este procedimiento en todos los ordeños ya que además de detectar leche anormal, se eliminan bacterias que normalmente se encuentran en mayor cantidad en estos primeros chorros y además se estimula la “bajada” de la leche (Bedolla et al, 2007).

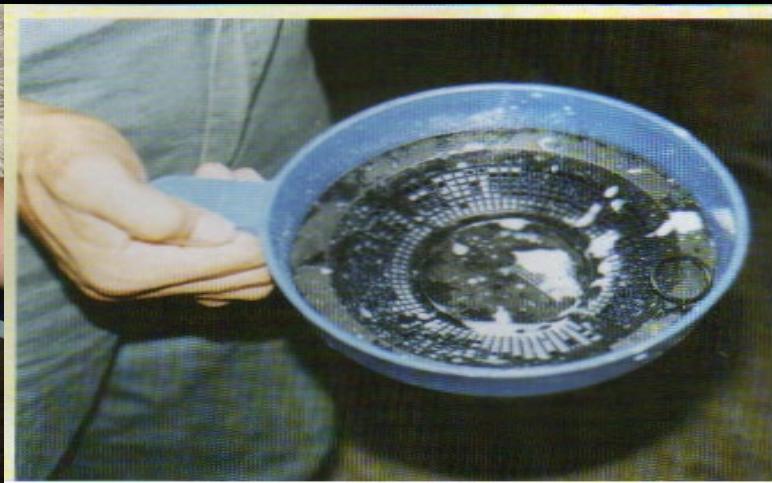
*Prueba del paño negro

- Esta se realiza durante la preparación de la vaca para la ordeña. Consiste en la detección de grumos en la leche (tolondrón) haciendo pasar los primeros chorros a través de una malla negra o bien utilizando una cubetilla especialmente diseñada para eso.



*Tasa probadora o de fondo oscuro

- Examine los primeros chorros de leche de cada ordeño sobre un recipiente (strip cup) de fondo oscuro. Los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas, o color anormal indican que la leche no es normal y que hay problemas probables. En la mastitis crónica la leche no tiene apariencia visible anormal en todos los ordeños (Bedolla et al, 2007).



Prueba de la “Manilla negra”



En mastitis clínica y subclínica

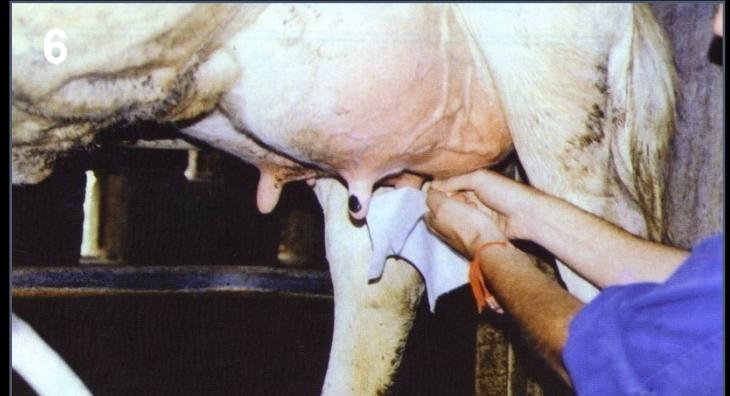
**Prueba de California para detectar Mastitis
(CMT)**

***Conteo de células somáticas con equipos
electrónicos***

Cultivo Bacteriano

Prueba de California para Diagnóstico de Mastitis





Una vez hecha la limpieza e higiene de la ubre se procede a realizar la prueba de California (CMT) antes de la ordeña. Asimismo, se utiliza una hoja de registro de la prueba de California para control de mastitis.



Conteo de células somáticas para Interpretación de resultados

Negativo

0 – 200 000



Traza

150 000 – 500 000

Uno o +

400 000 – 1 500 000





Dos o ++

800 000 – 3 000 000



3 o +++

Mas de 5 000 000



Mastitis clínica

INTERPRETACION DE LA PRUEBA DE CALIFORNIA PARA MASTITIS

Interpretación	Reacción	Núm. células por ml.
Negativo	Sin evidencia	0 - 200 000
Traza	Precipitación leve	150 000- 500 000
1 +	Sin formación de gel	400 000-1500 000
2 +	Mezcla espesa	800 000-5000 000
3 +	Formación de pico central	más de 5000 000

Conteo de Células Somáticas con Fossomatic



Fossomatic, es un equipo electrónico automatizado, que tiene la ventaja de ser muy exacto, además de permitir el análisis de varios cientos de muestras al día.

Baño María (27°C)



Fossomatic 360



Monitor con
resultados

CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS CON EL APARATO



DeLaval Cell Counter

Conteo de células somáticas

Análisis de leche del bote



Análisis de leche del tanque

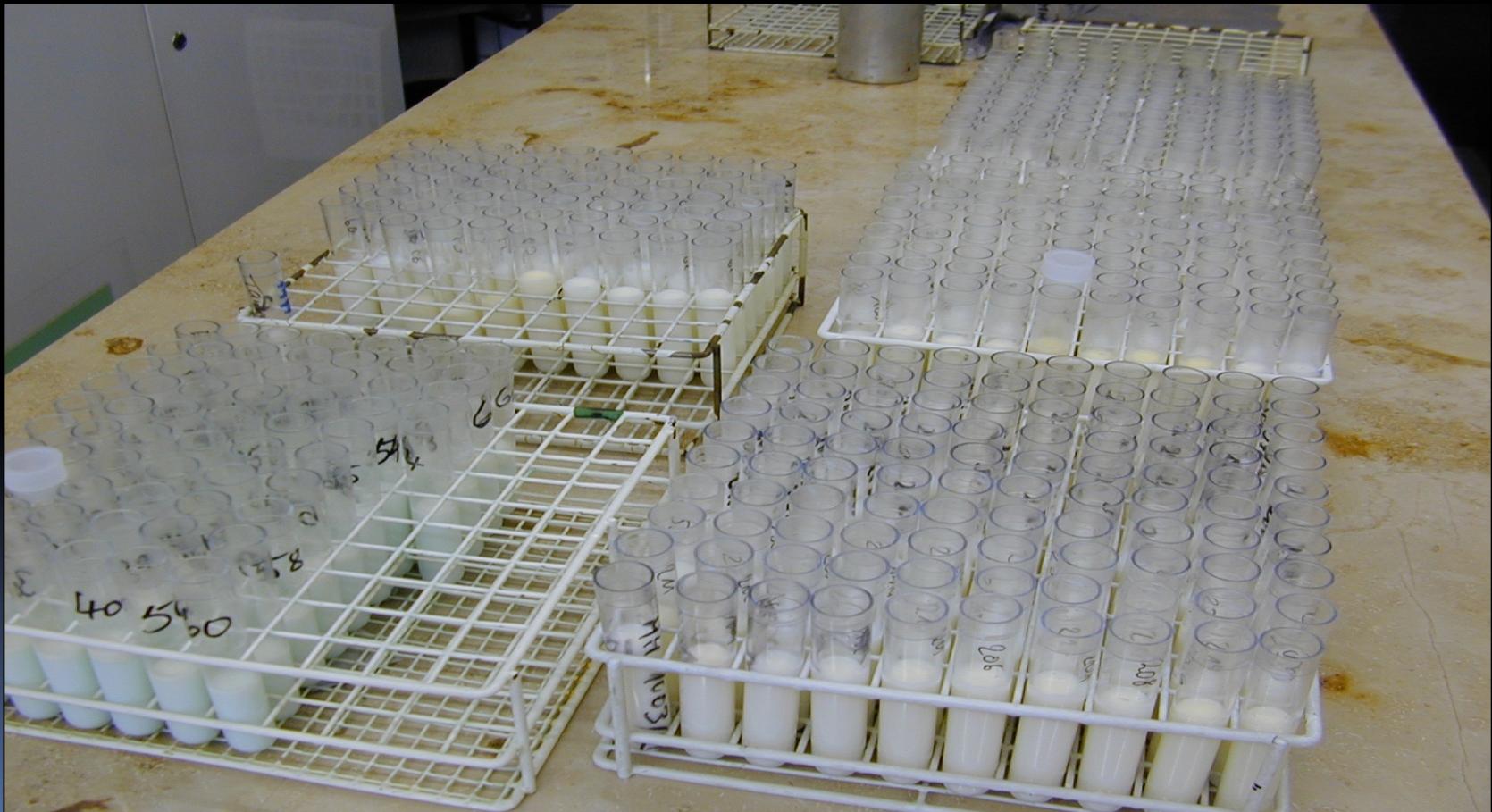
Con este equipo se hace el conteo de células somáticas por medio del principio de microscopía de fluorescencia, ya que el núcleo de la célula es teñido con un colorante fluorescente que se hace visible por medio de una lámpara de xenón.

El resultado aparece en un monitor y puede imprimirse.

Cultivos bacteriológicos

Procesamiento de las muestras en el laboratorio

Preparación de las muestras



Inoculación de los medios

Las muestras de leche se inoculan en agar sangre con esculina (Bioxon), y agar 110 (Bioxon).



Incubación



Incubación de los cultivos (37°C) 24 a 48 hs

Interpretación



¡GRACIAS POR SU ATENCIÓN!



**IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS
BACTERIOLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA
MASTITIS BOVINA Y ANTIBIOGRAMA**



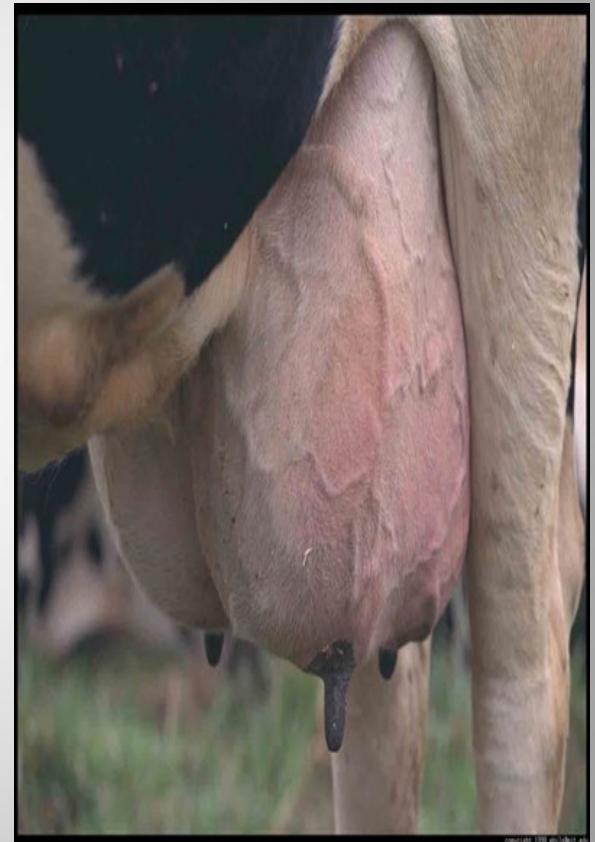
Dra. Martha Alicia Castañeda Vazquez, Dr. Hugo Castañeda Vazquez, Biol. Erika P. Salas C.
M.C. Carlos Bedolla Cedeño

Importancia en el valor higiénico de la leche y de sus subproductos.

- 1. Algunos agentes causales de Mastitis son patógenos en humanos.
- 2. Puede haber residuos de antibióticos o químicos en la leche por el tratamiento de la ubre.
- 3. Perdidas para el ganadero; por disminución en la producción de leche, costos en el tratamiento y/o eliminación del animal.
- 4. Para la industria de lácteos; transformaciones causadas a la leche y sus subproductos por la mastitis (el tiempo de cuajado aumenta y la cantidad de queso disminuye)

Perdidas causadas por mastitis clínica

- Baja producción del animal enfermo.
- Perdida de producción por la duración de la eliminación del medicamento.
- Costos de medicamentos y del Médico Veterinario.
- Aumento en los costos de la mano de obra.



Perdidas causadas por mastitis subclínica

- Reducción en la producción diaria de leche.
- Cambios en la composición de la leche.
- Disminución en el valor higiénico de la leche.



CLASIFICACION DE PATOGENOS DE MASTITIS

	Patógenos mayores Asociados a la ubre (Contagiosos)	Patógenos mayores Asociados al medio ambiente	Patógenos menores Secundarios (Contagiosos)
Agente Patógeno	<p>Estreptococo esculina negativo</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>G – Scc</i></p> <p><i>L-Scc</i></p>	<p>Estreptococo esculina positivo</p> <p>Estafilococo coagulasa negativo</p> <p>Cepas coliformes</p>	<p>Estafilococos coagulasa positivos</p> <p><i>Corynebacterium bovis</i></p>
Reservorio	La ubre	Medio ambiente Piel de la ubre	Piel de la ubre Canal lineal

ENFERMEDADES TRANSMISIBLES AL HOMBRE A TRAVÉS DE LA LECHE

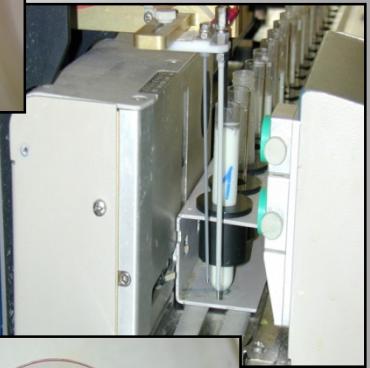
<u>BACTERIANAS</u>	<u>VIRALES</u>
Ántrax	Adenovirus
Botulismo	Virus de la fiebre aftosa
Brucelosis	Virus de hepatitis infecciosa
Cólera	Virus de la encefalitis (garrapatas)
Intoxicación Alimentaria por <i>E. coli</i>	
Intoxicación por enterotoxina de <i>Staphylococcus</i>	<u>RICKETTSIAS</u>
Gastroenteritis por <i>Streptococcus</i>	Fiebre Q
Tuberculosis	
Tifoidea	
Listeriosis	
Leptospirosis	<u>OTROS MICROORGANISMOS</u>
Intoxicación por <i>Clostridium perfringens</i>	Protozoos
Difteria	Amibas
Paratifoidea	Toxoplasmas
Shigelosis	
Salmonelosis	
Campilobacteriosis	

METODOS DE INVESTIGACION

1. Pba. de California



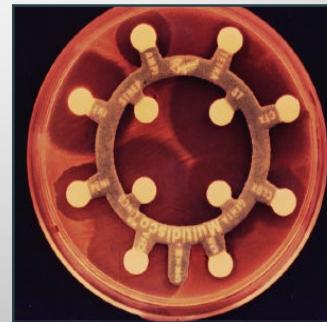
2. Conteo celulas somáticas



3. Examen bacteriologico



4. Antibiogramas

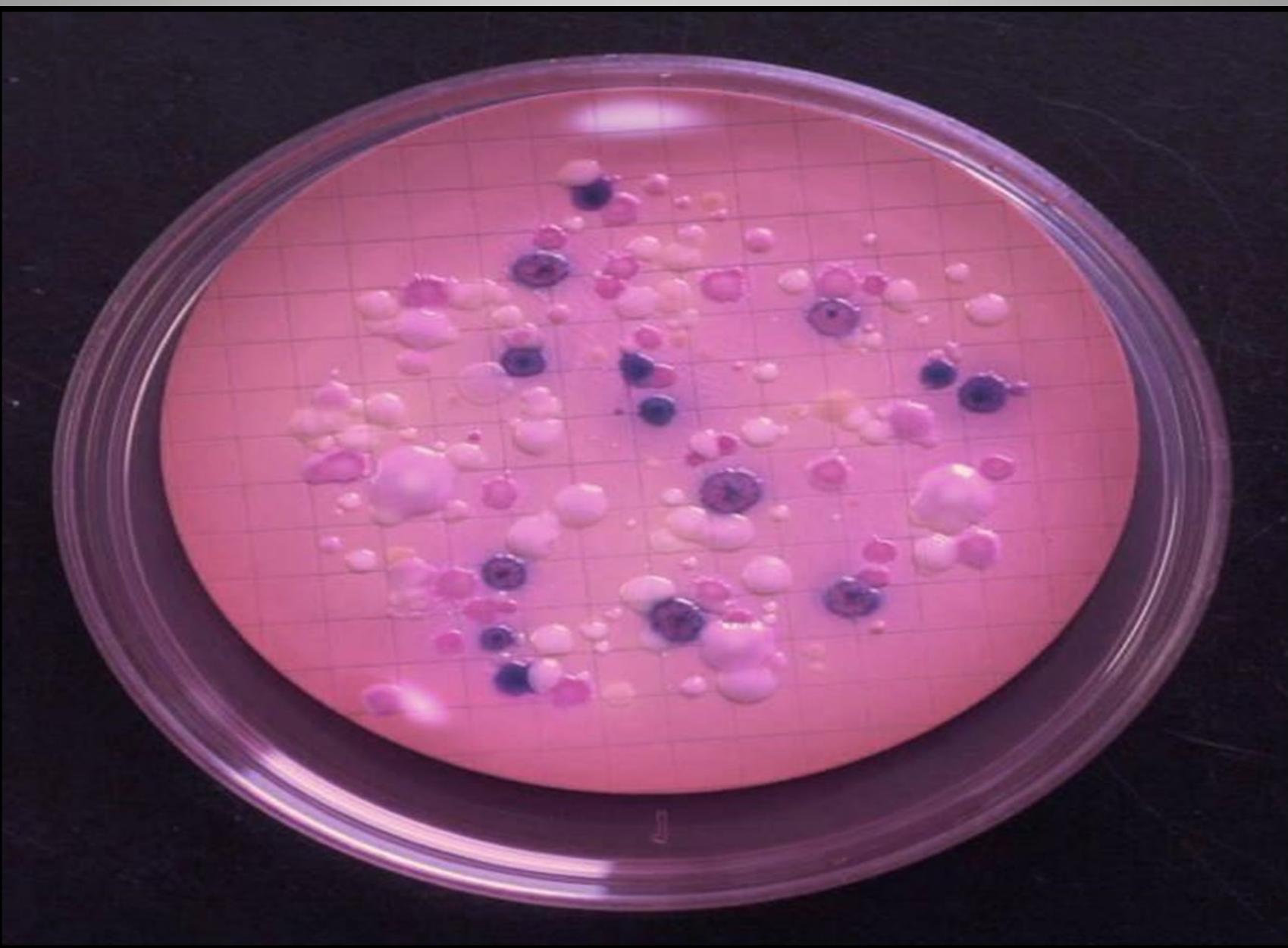


CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS

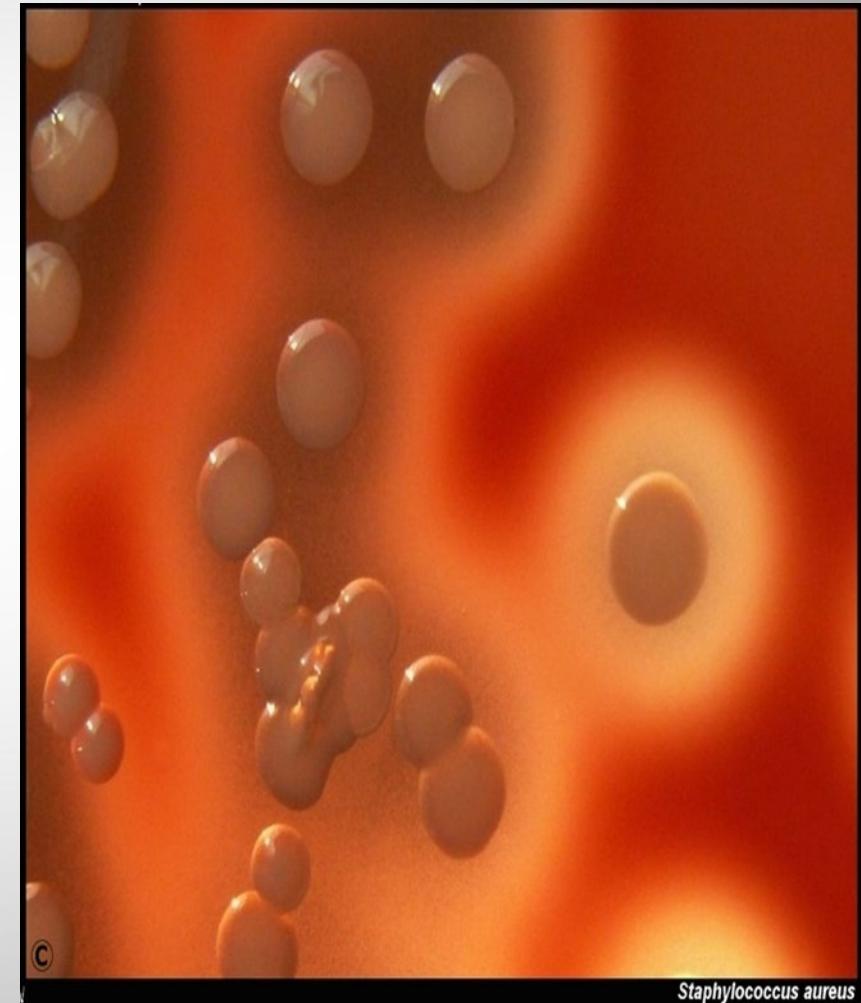
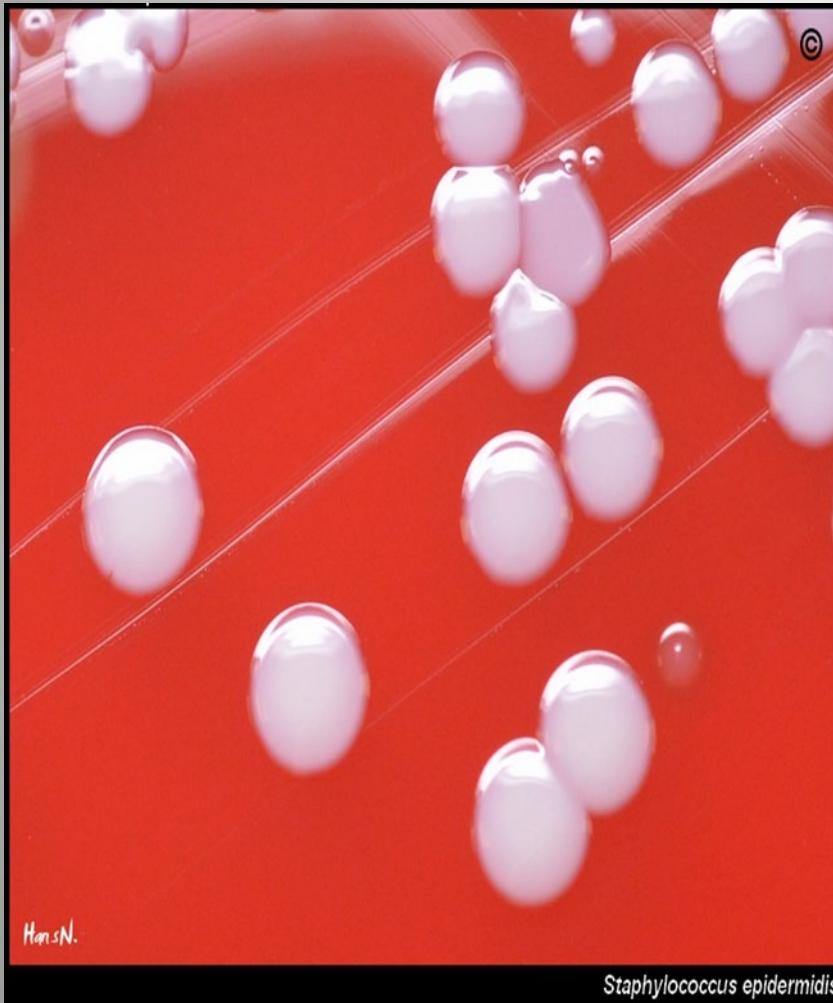
- Aislamiento e identificación del agente patógeno
- Factores de patogenicidad
- Resistencia bacteriana
- Tratamiento
- Medidas de prevención





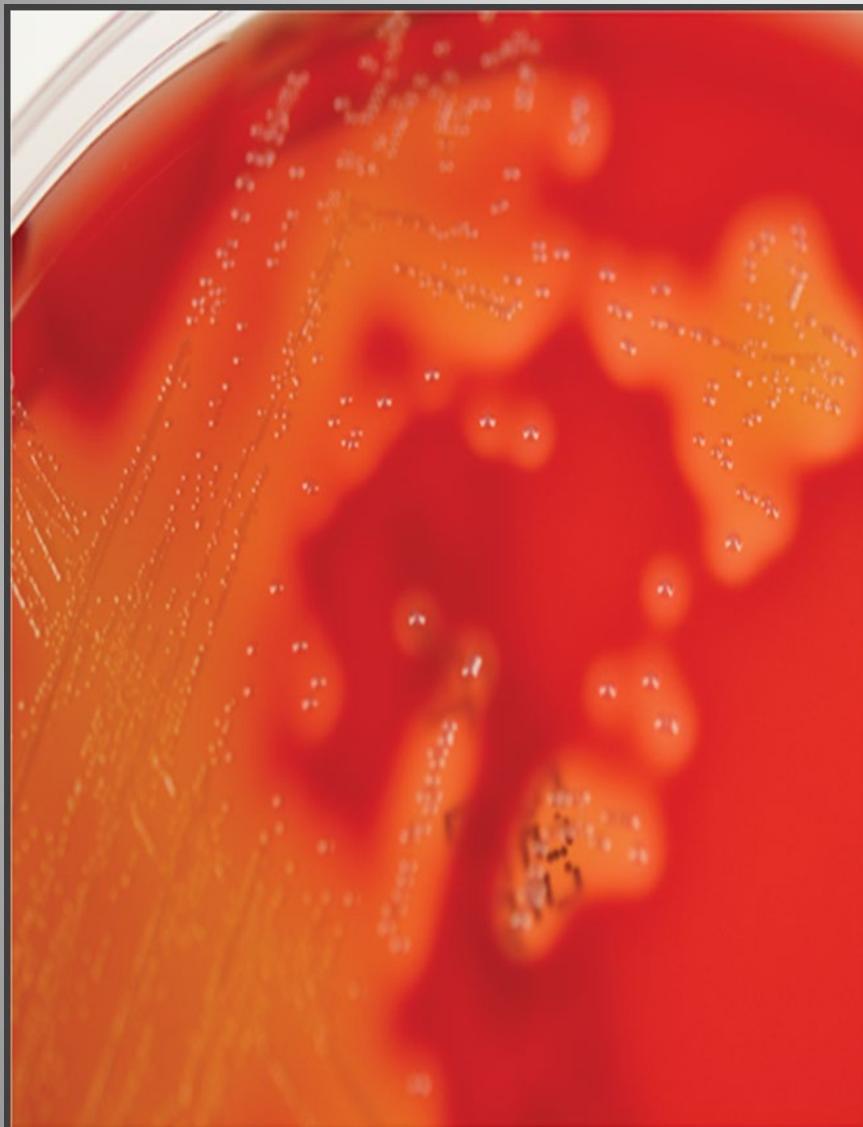


Staphylococcus





Streptococcus agalactiae y disgalactiae



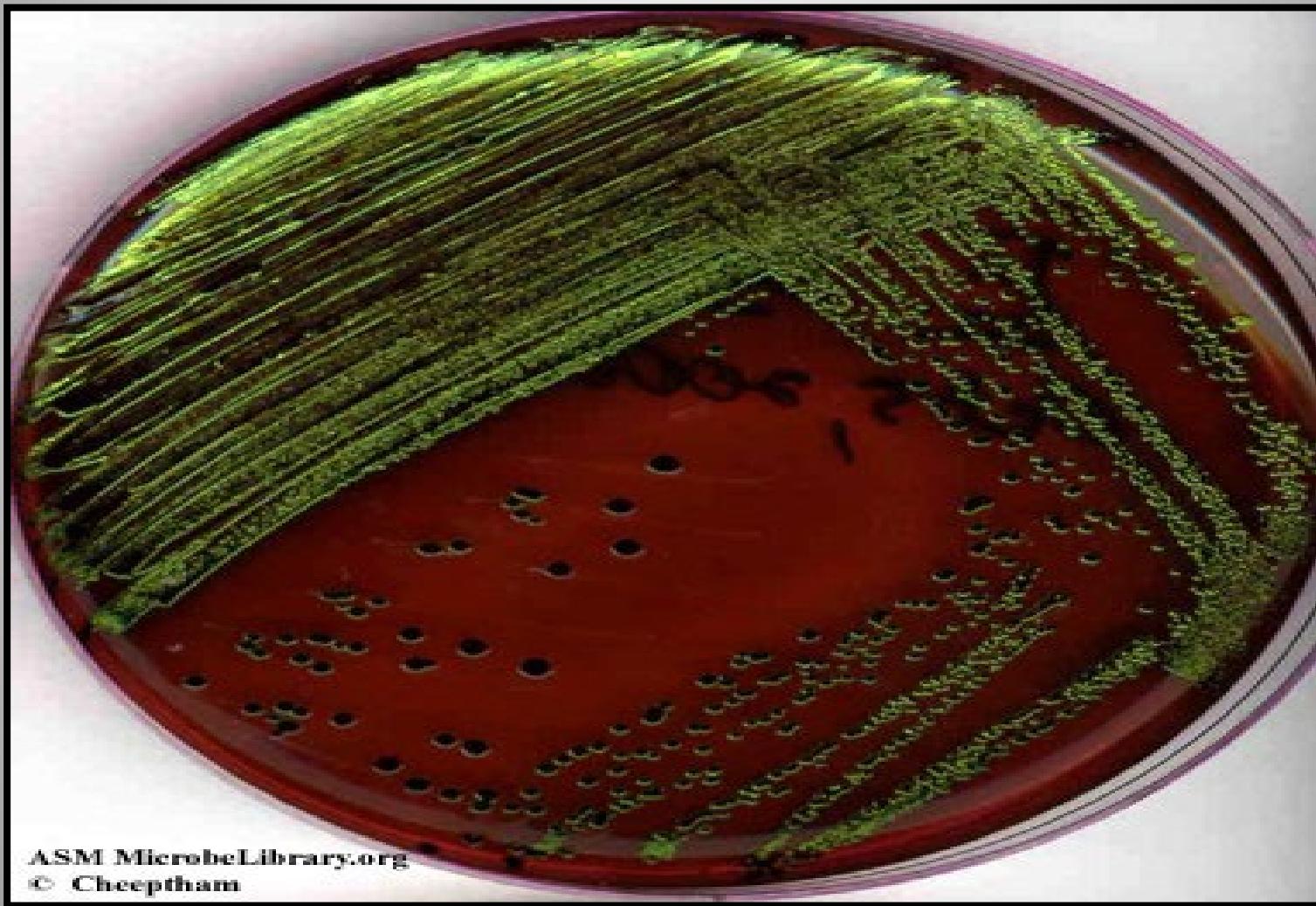
**Estreptococos
esculina negativo**
S. agalactiae



**Estreptococos
esculina positivos**
S. uberis



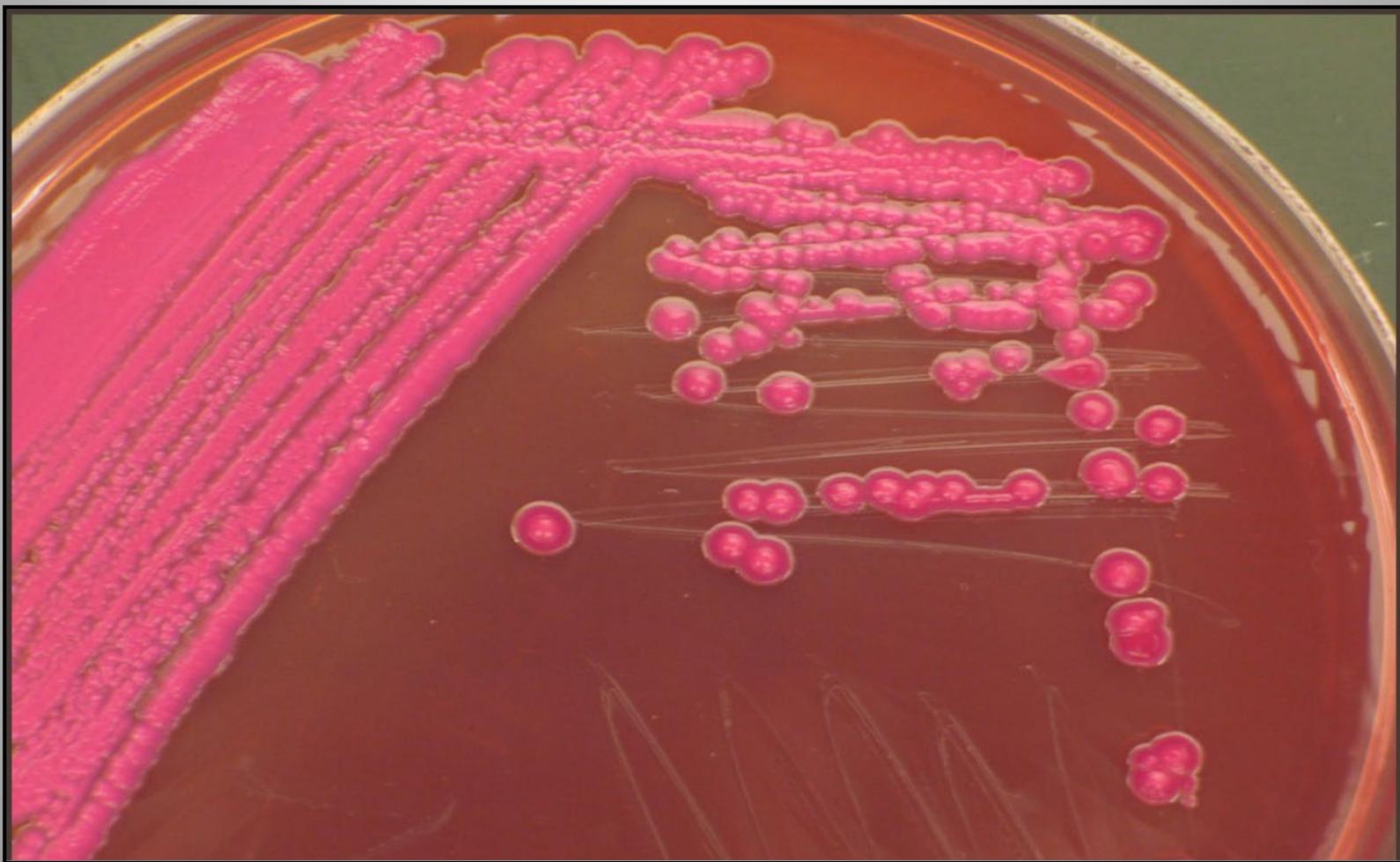
Escherichia coli



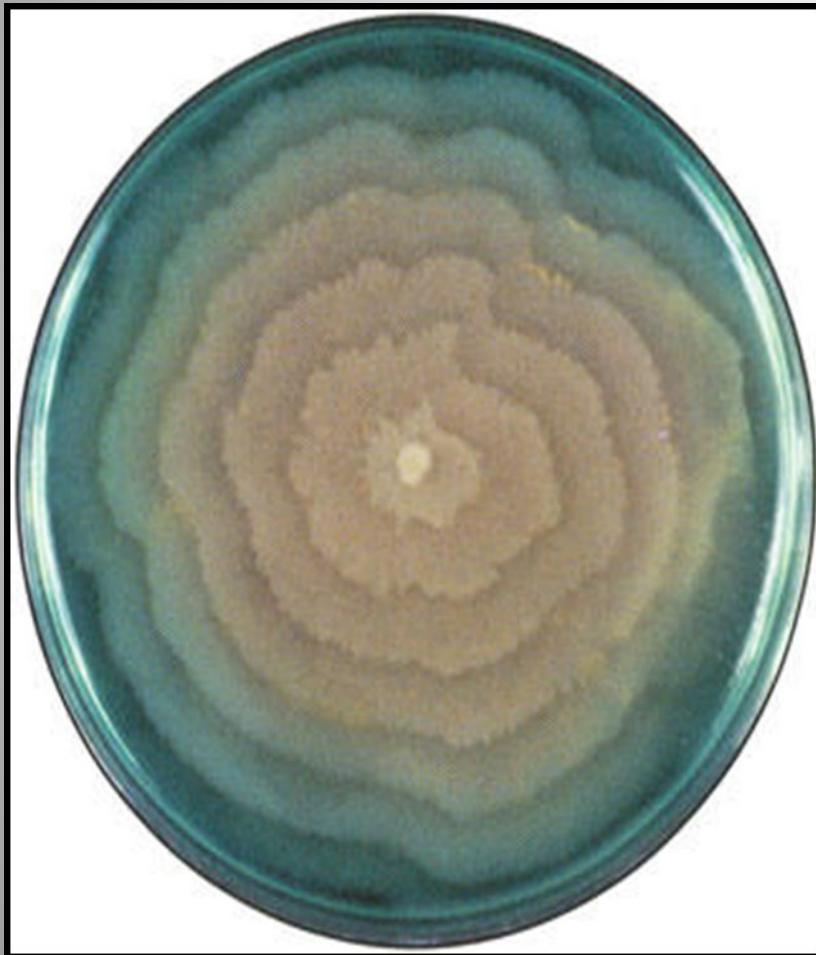
Mycobacterium paratuberculosis



Klebsiella oxytoca

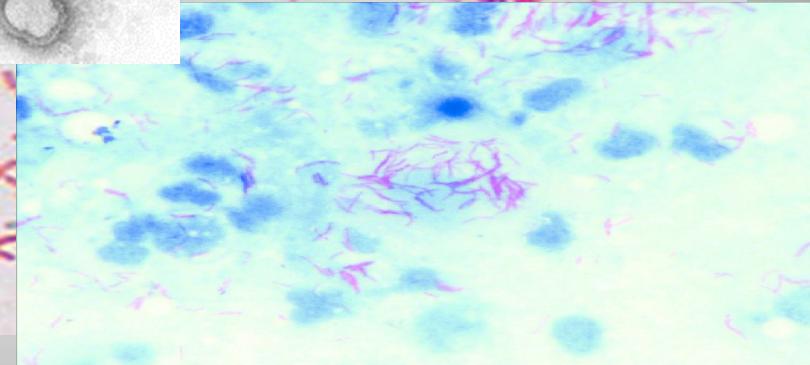
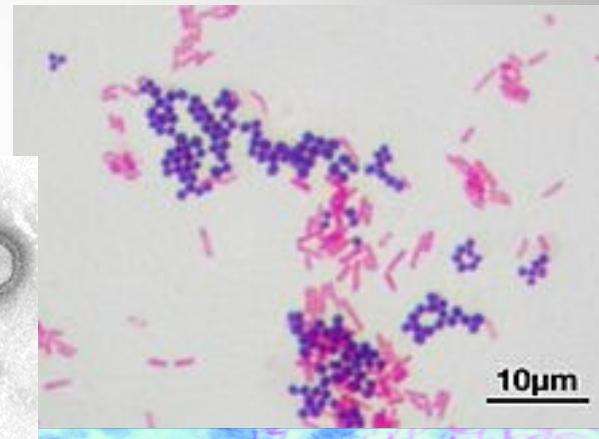
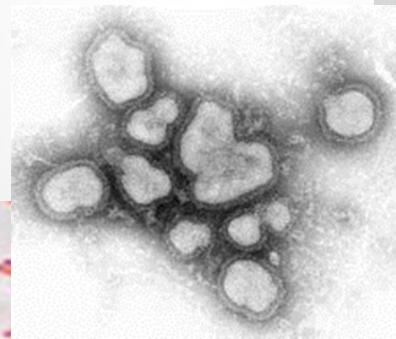


Proteus

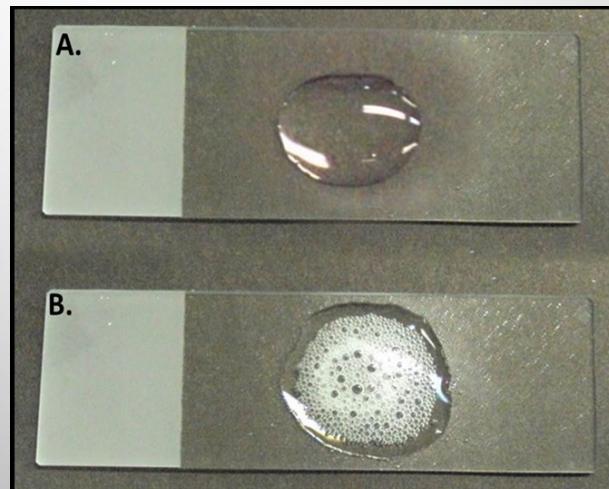
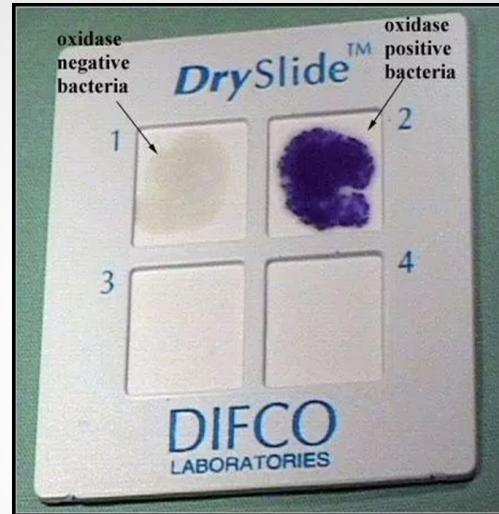
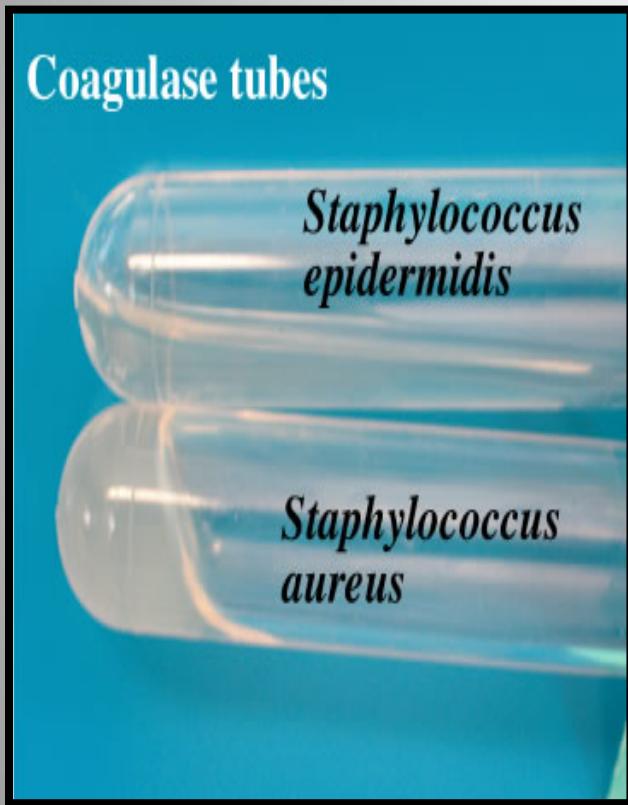


TINCIONES

- **Gram**; morfología bacteriana
- **Ziehl Neelsen**; para bacterias acido-alcohol resistentes
- **Schaeffer Fulton**; esporas
- **Azul de metileno**; flagelos
- **Tinta china**; esporas



Pruebas Bioquímicas



ANTIBIOGRAMA

Método para la determinación del espectro de susceptibilidad o resistencia de un microorganismo a diversos antimicrobianos.

Permiten al clínico hacer una elección del tratamiento más apropiado.

Permite seguir la evolución de las resistencias bacterianas (seguimiento epidemiológico).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA IN VITRO

Método de dilución en caldo (macrodilución y microdilución)

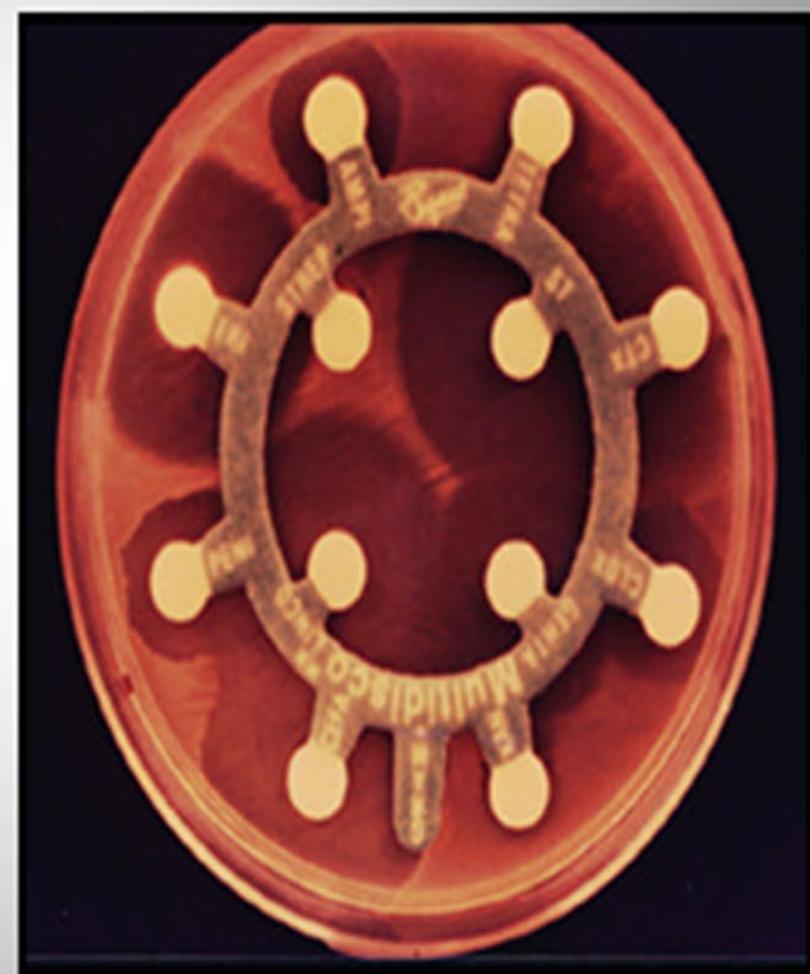
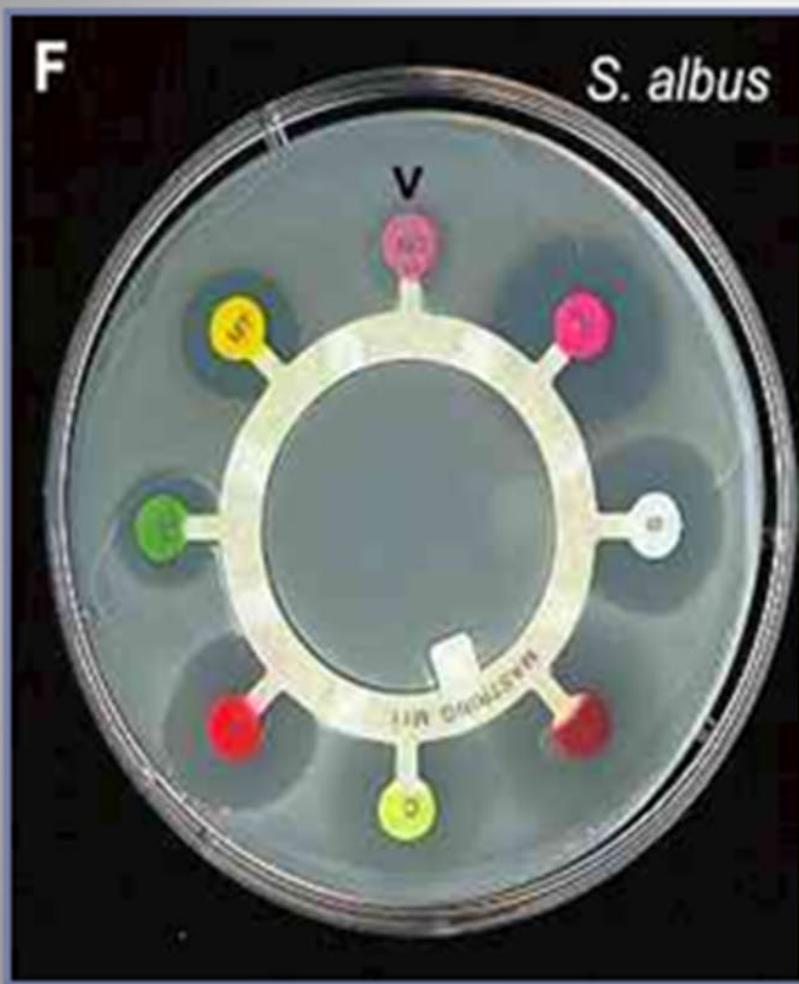
Método de dilución del antibiótico en agar

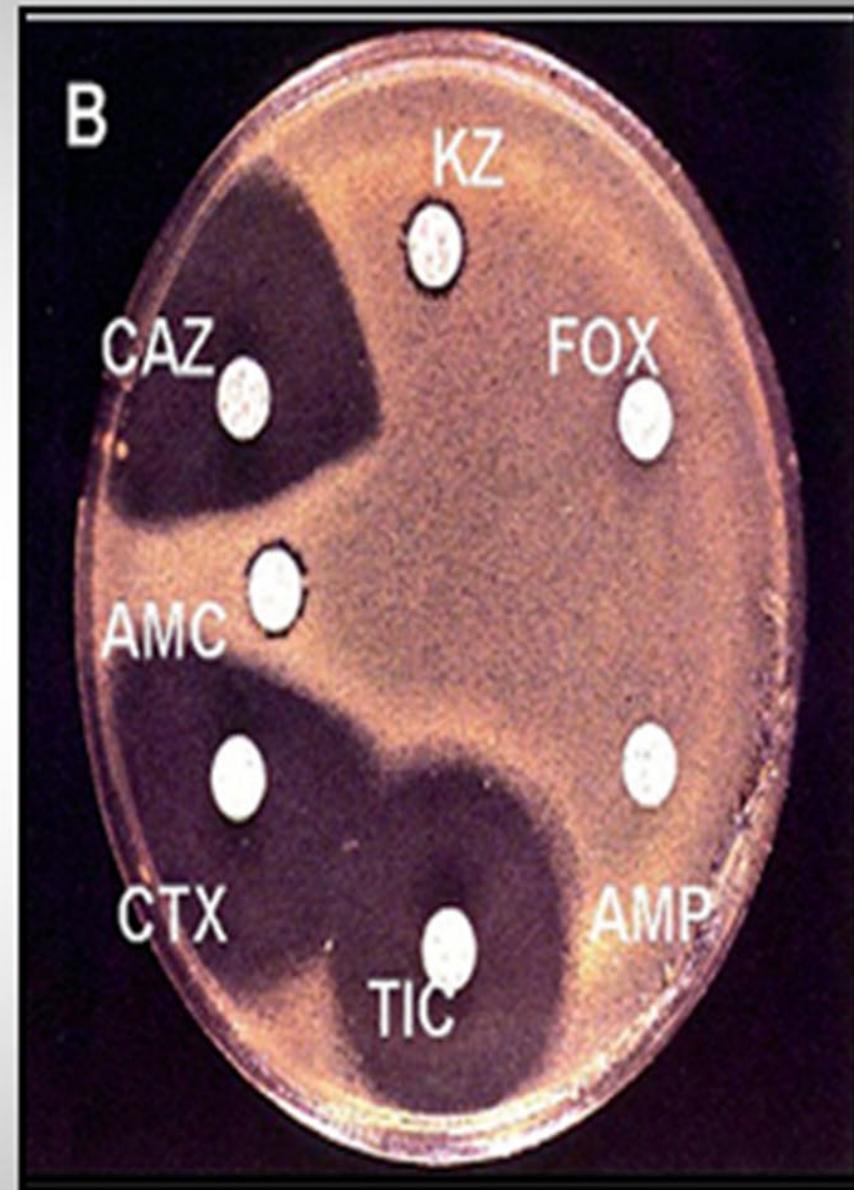
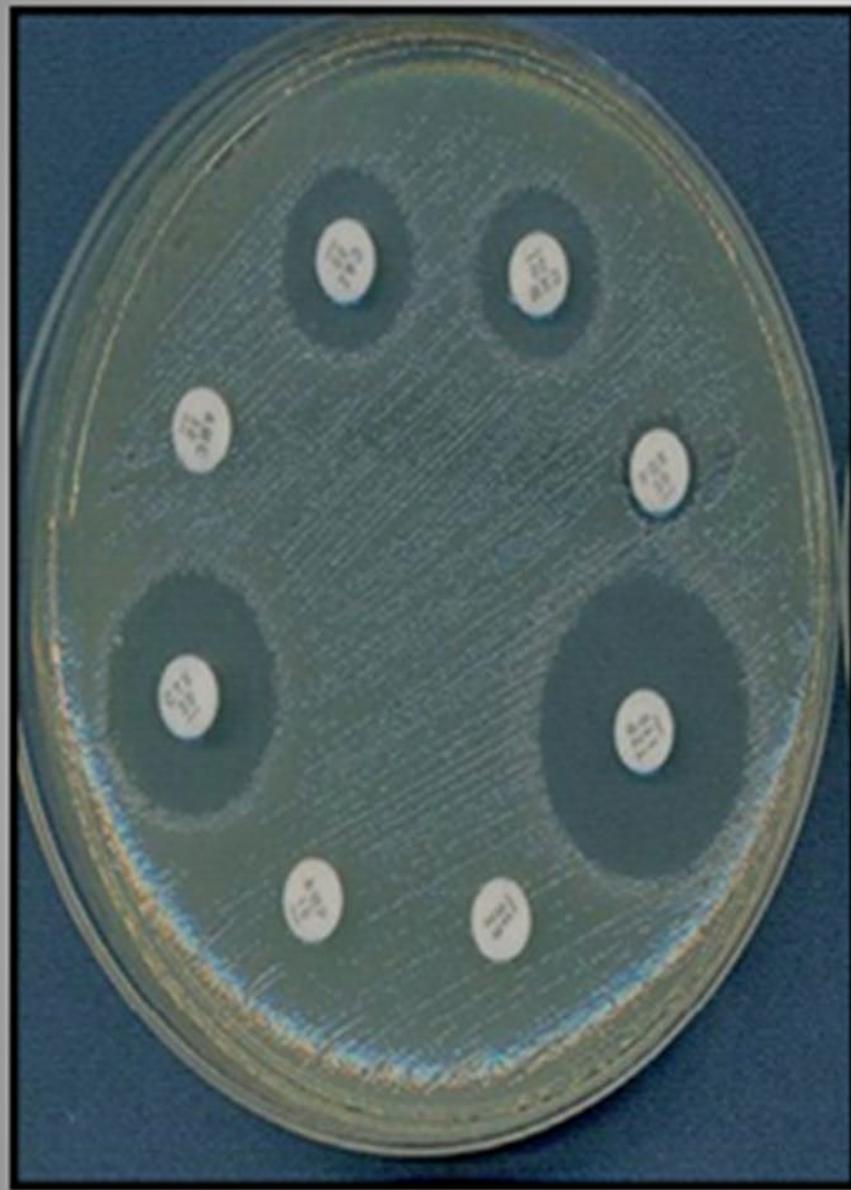
Método de difusión del antibiótico en agar (Kirby-Bauer)

E-Test (Epsilon Test)

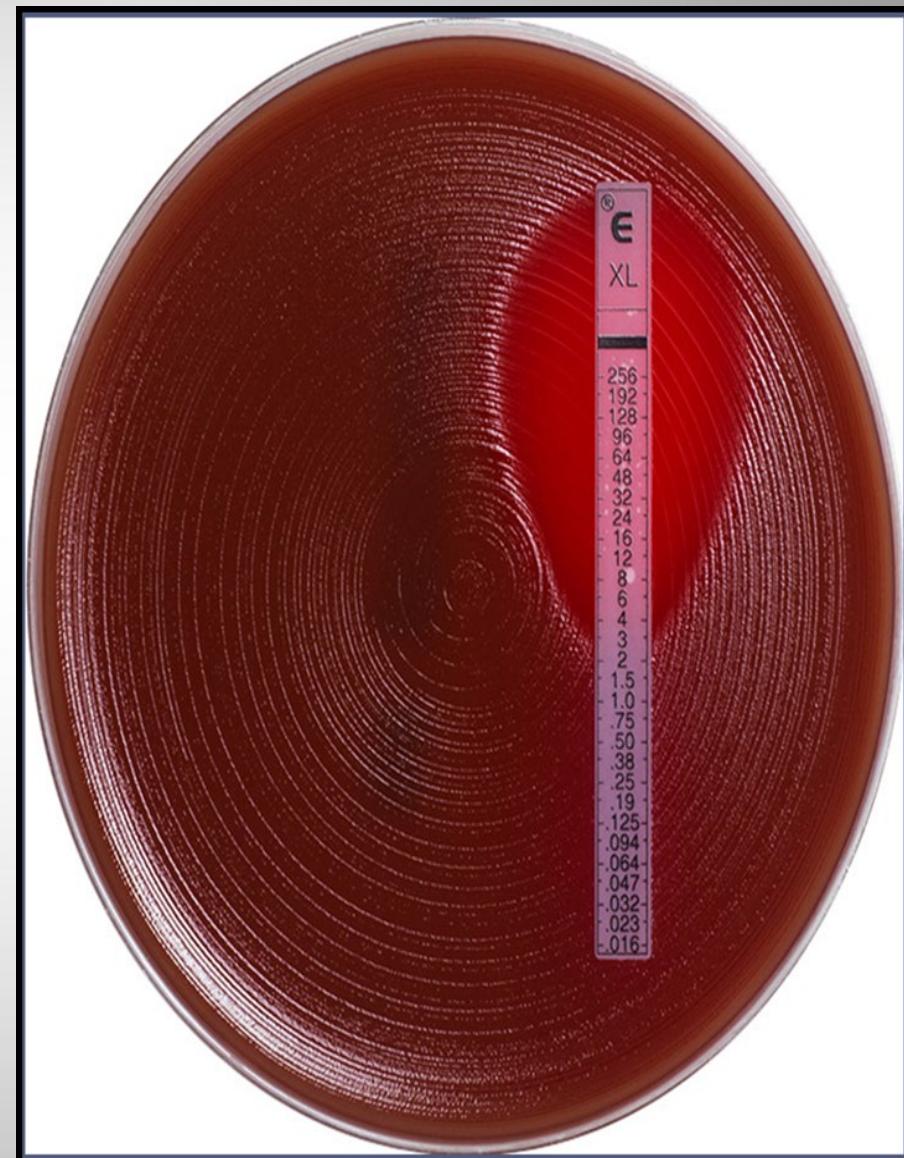
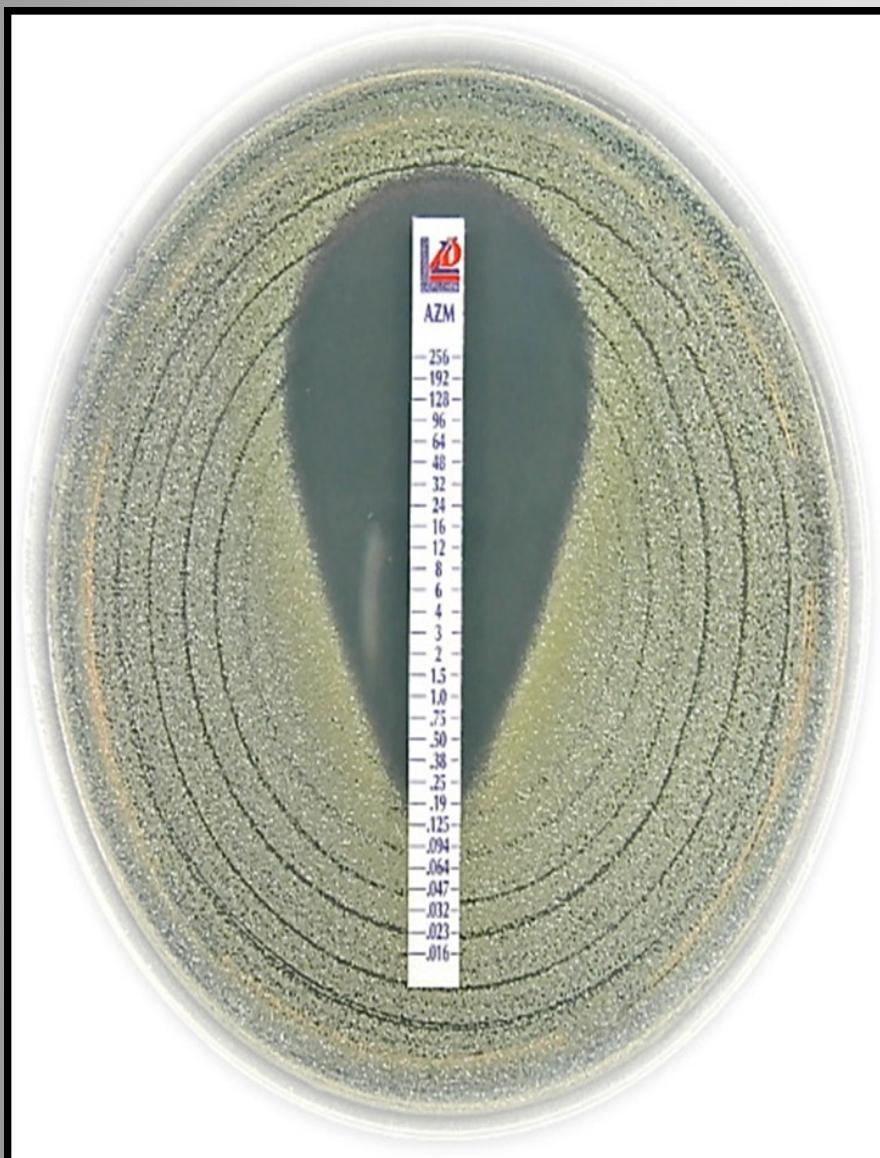
Métodos Automatizados (MicroScan)

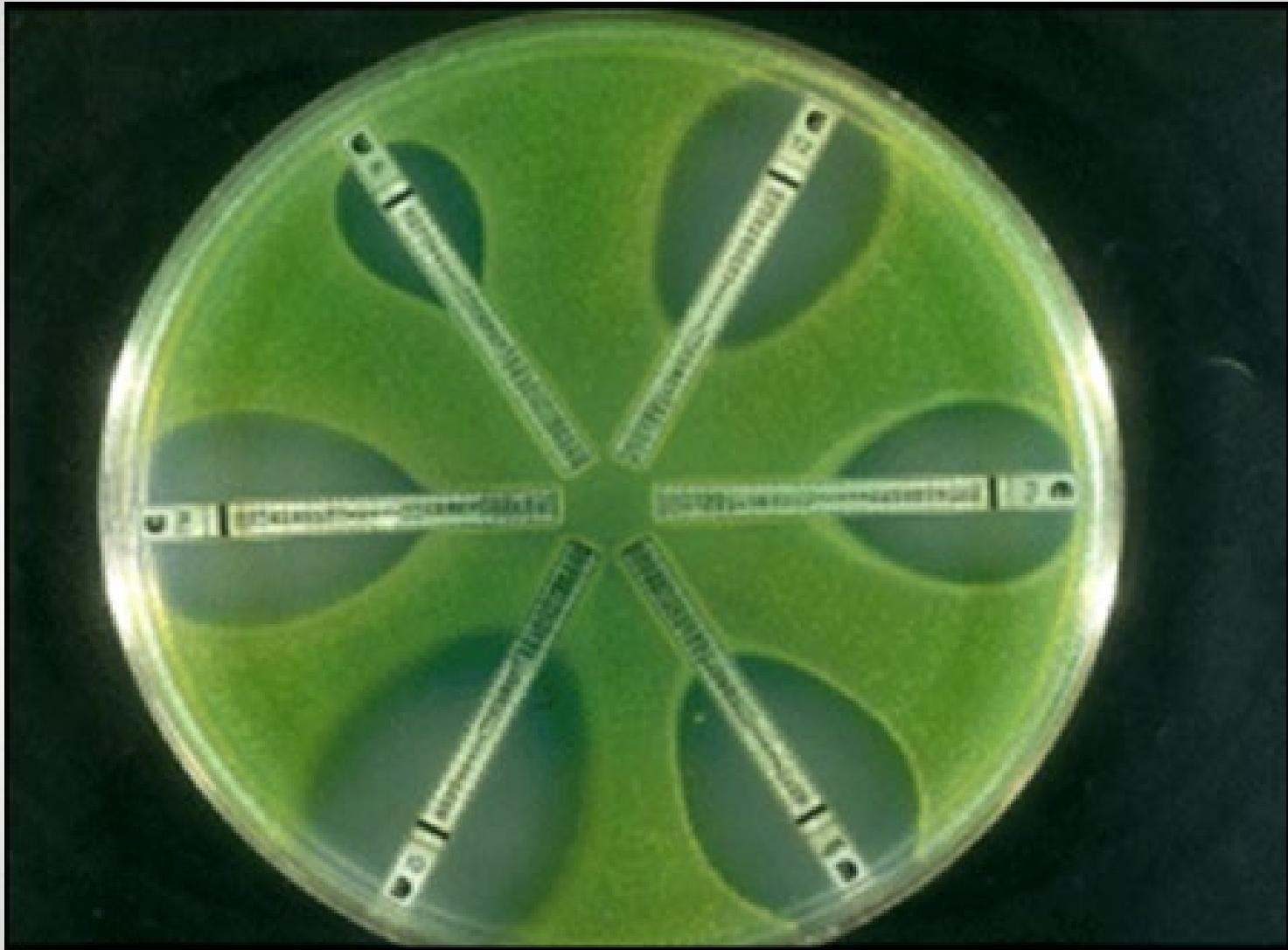
Técnica de Kirby-Bauer.





Método de E-test (Epsilon Test)





Un hato lechero puede ser declarado con seguridad como libre de bacterias, cuando en los últimos muestreos se observa que en ninguna de las muestras de leche del inicio del ordeño de los cuartos, existe la presencia de bacterias.



Bacterina Eco Staph PM+3 y Auto bacterinas

MVZ. PhD. Pablo Hernández Jáuregui

Dirección Técnica e Investigación

CyTA Labs S A de C V

Bacterinas y autobacterinas Mecanismos de acción

Las bacterinas(EcoStaph PM+3) y autobacterinas (ABD) son productos inactivados con aldehidos por lo que no tienen capacidad de reproducirse después de su aplicación.

El mejor sitio de aplicación intramuscular (IM) para EcoStaph PM+3 y ABD es la región crural externa, cerca de los nódulos linfáticos supra mamarios.

DESARROLLO E INVESTIGACIÓN

Consideración de los factores de virulencia de *E coli* como bacteria predominante entre las bacterias del grupo de coliformes Gram negativos y de *Staphylococcus aureus* entre la familia de cocos Gram positivos por su alta virulencia.

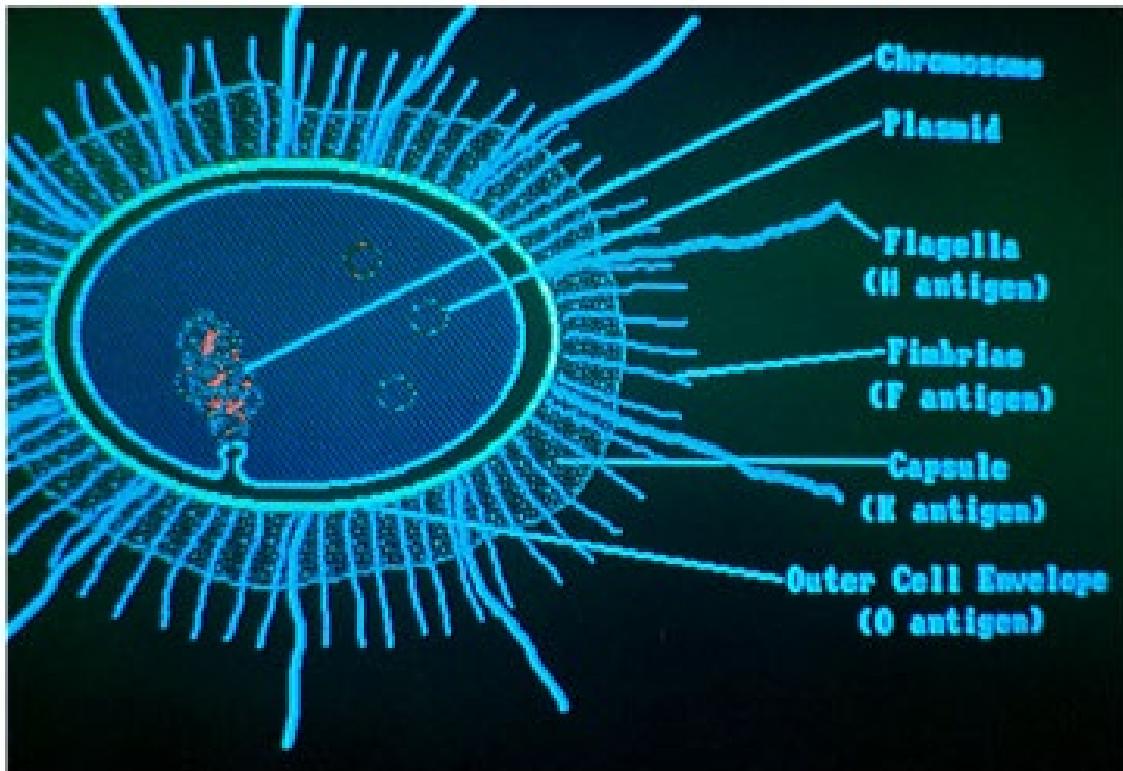


Fig 15.- Esquema de una *Escherichia coli* que muestra la composición externa e interna. La clasificación microbiológica se da por las características de los antigenos que salen de la cápsula (fimbrias). Estos determinantes son el origen de la virulencia de estas bacterias y son transmitidos por los plásmidos durante la conjugación de las bacterias.

La bacterina **Eco Staph PM+3** cuenta en su composición formularia con;

E coli completas con pilis y fimbrias adherentes a células epiteliales de glándula mamaria e intestino.

Vesículas membranales de los factores endotóxicos de *E coli*
Y hemorrágicos entre otros

Adyuvante **PM+3** con excelente capacidad inmuno estimulante

En los bovinos, *Escherichia coli* con pilis K-99 son las enterobacterias responsables de la diarrea de los recién nacidos. La bacterina EcoStaph PM+3 contiene dos variables de *Escherichia coli* K-99 con producción de toxinas termo sensibles y termoestables.

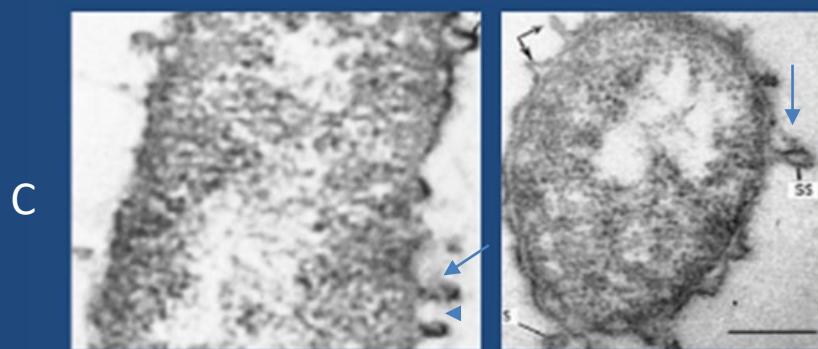
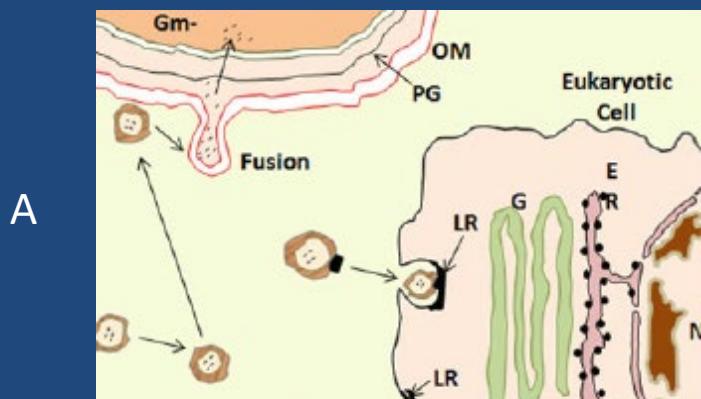
El resultado de inmunizar a las vacas en la “etapa de secado” es el de un calostro enriquecido en inmunoglobulinas IgG-2 que protegen al recién nacido mediante inmunidad pasiva, previniendo la colonización de *Escherichia coli* productoras de diarrea.

BACTERINA ECOSTAPH PM+3*

La bacterina EcoStaph PM+3 es un biológico preparado con cuatro variables de *Escherichia coli* que expresan adhesinas y proteínas de *Staphylococcus aureus* como factores de adhesión

Las variables determinantes de virulencia y patogenicidad en *Escherichia coli* se caracterizan por adhesión a la membrana citoplásmica de las células. Esos determinantes se encuentran en los pilis y fimbrias de la superficie de *Escherichia coli* y son los determinantes K30, K35, K85 y K99 que conforman los antígenos de adhesinas de Eco Staph PM+ 3.

Factores de virulencia de las bacterias Gram negativas



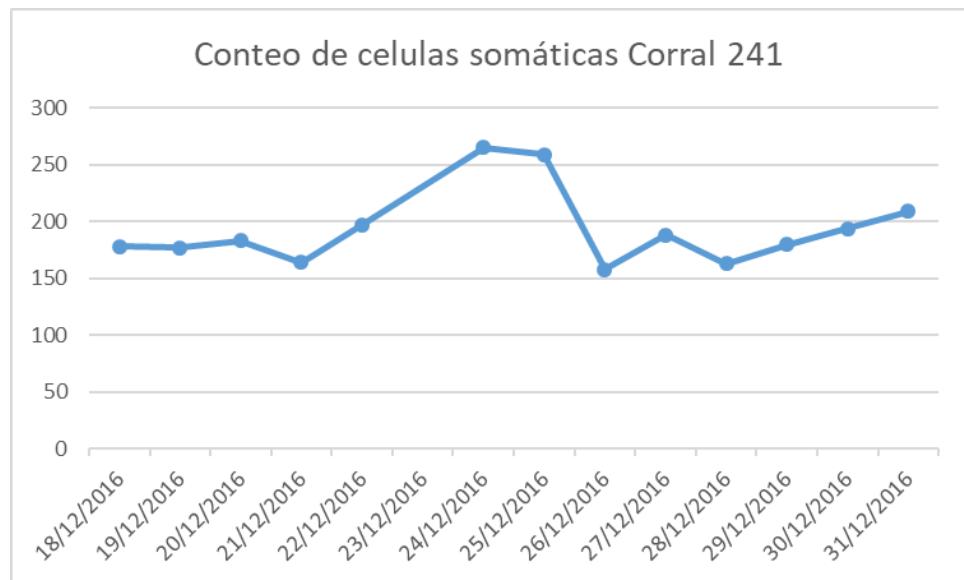
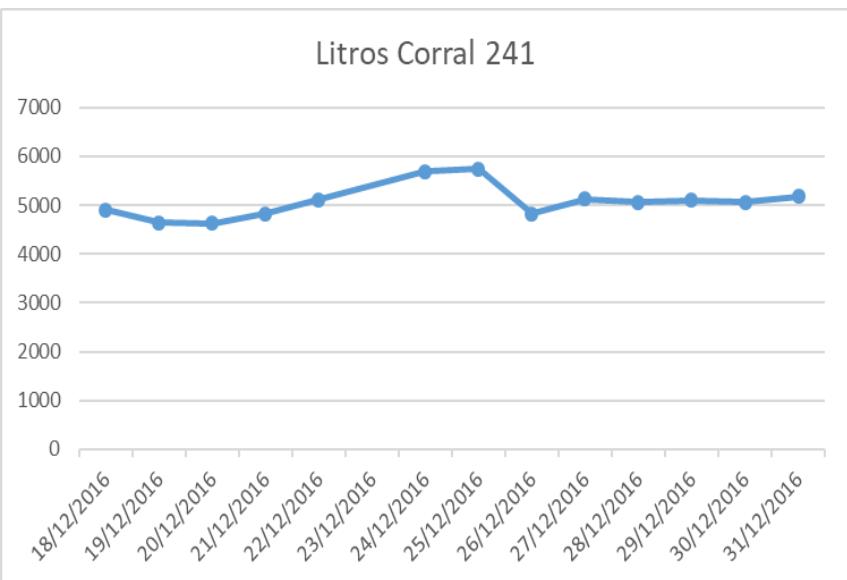
A.- Esquema que representa la formación de vesículas membranales (VM) en bacterias Gram negativas y su interacción con las células eukariotas como las presentadoras de antígenos.

B.- Microfotografías en microscopía confocal e inmunofluorescencia. Los núcleos de las bacterias en azul, las VM en verde

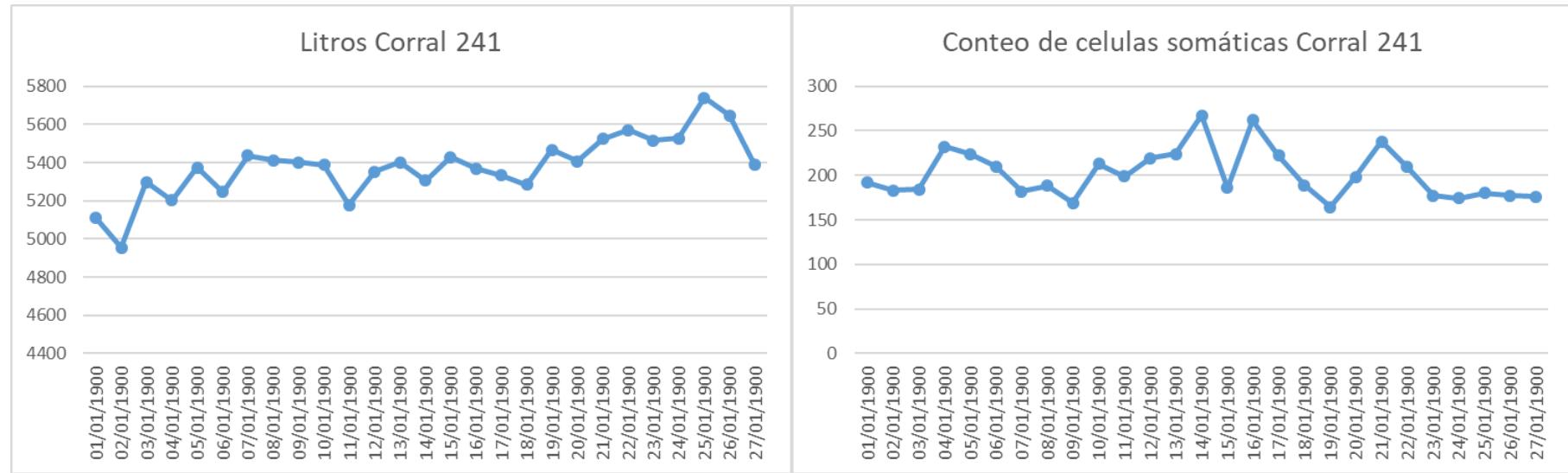
C.- Microfotografía electrónica de dos bacterias Gram neg. Note la formación de las VM (flechas).

Las vesículas membranales exportan más de cuarenta proteínas de virulencia entre ellas las toxinas termo lábiles y sensibles responsables del choque endotóxico

ESTABLO MONTE ALEGRE libre de *S aureus*
PRODUCTOR SANTIAGO MUÑOZ REGION LAGUNERA. ANTES DE
VACUNACIÓN CON ECOSTAPH



ESTABLO MONTE ALEGRE libre de *S aureus*
PRODUCTOR SANTIAGO MUÑOZ REGION LAGUNERA.
DESPUES DE VACUNACIÓN CON ECOSTAPH



Patogenia *Staphylococcus aureus*

