

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

**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**

**SOFÍA MARCELA PROAÑO UTRERAS
CATALINA DEL PILAR VÁSCONEZ GUACHO**

DIRECTORA MASTER LETTY GARCÍA

QUITO, 2 013

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE LICENCIADOS (TERCER NIVEL)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Nosotras, **SOFÍA MARCELA PROAÑO UTRERAS** y **CATALINA DEL PILAR VÁSQUEZ GUACHO**, C.I. **171793376-4** y **171872821-3** respectivamente autoras del trabajo de graduación intitulado: **“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”**, previa la obtención del grado académico de **LICENCIADAS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA** en la escuela de **Bioanálisis**:

1. Declaramos tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 17 de Octubre de 2013

Sofía Marcela Proaño Utreras

Catalina Del Pilar Vásquez Guacho

C.I. 171793376-4

C.I. 171718728213

DEDICATORIA

A mi padre por ser mi fuente de inspiración para salir adelante
A mi madre por ser mi fuerza, mi hombro, mi apoyo, mi todo
A mis hermanas por ser las cómplices perfectas de aventuras
A mi amor por ser el amigo, el compañero perfecto de vida
A mis ángeles en el cielo por guiar cada uno de mis pasos
A toda mi familia y amigos por apoyarme y creer en mí.

Catalina P. Vásquez Guacho

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a la Master Letty García, por darnos la oportunidad de trabajar junto a ella, por permitirnos conocer Llanos de Albas y las actividades desarrolladas en la comunidad, y sobre todo por guiarnos en todo el proceso de nuestra investigación.

Mi agradecimiento sincero a los Señores Carlos Miño y César Lara por acompañarnos durante todo el proceso de recolección de muestras y las innumerables visitas a la comunidad de Llanos de Albas.

A la comunidad de Llanos de Albas por abrirnos las puertas y permitirnos trabajar con sus animales, en especial a la Sra. Rosa Mercedes Ulcuango, su ayuda posibilitó la coordinación con los diferentes propietarios quienes accedieron a participar del estudio sin ella no hubiera sido posible el acceso a todos los propietarios de la comunidad.

Catalina P. Vásquez Guacho

TABLA DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
LISTADO DE FIGURAS	v
LISTADO DE TABLAS	viii
LISTADO DE GRÁFICOS	x
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Característica de la glándula mamaria normal	5
2.1.1. Anatomía de la ubre	5
2.2. Patogenicidad	5
2.2.1 Modo de infección y mecanismos de defensa.....	5
2.3. Triángulo epidemiológico	8
2.4. Clasificación de la mastitis.....	8
2.5. Diagnóstico.....	13
2.6. Prevención.....	17
2.7. Control.....	17
2.8. Bacterias causantes de mastitis	19
2.9. Descripción de bacterias causantes de mastitis encontradas en la comunidad de Llanos de Albas.....	24
2.9.1. Cocos Gram Positivos.....	244
2.9.1.1. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	244
2.9.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	255
2.9.1.3. <i>Staphylococcus coagulasa negativa (SCN)</i>	266
2.9.2. Bacilos Gram positivos	277
2.9.2.1. <i>Corynebacterium bovis</i>	27
2.9.2.2. <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	28

3.	MATERIALES Y MÉTODOS:	300
3.1.	Área de estudio	300
3.2.	Muestra	300
3.3.	Toma de la muestra:	311
3.3.1.	Materiales:	311
3.3.2.	Procedimiento para la toma de muestra	311
3.3.3.	Transporte de muestras	33
3.4.	Pruebas de campo: CMT	33
3.4.1.	Procedimiento para la prueba de campo	33
3.5.	Procesamiento en el laboratorio	344
3.5.1.	Materiales, reactivos, medios de cultivo y equipos	344
3.5.2.	Análisis microbiológico: cultivo y pruebas de identificación	355
3.5.2.1.	<i>Medios de cultivo</i>	355
3.5.2.1.1.	<i>Cultivo en Agar Sangre</i>	355
3.5.2.1.2.	<i>Siembra en Agar MacConkey</i>	36
3.5.2.2.	<i>Pruebas de identificación</i>	366
3.5.2.2.1.	<i>Catalasa</i>	366
3.5.2.2.2.	<i>Coagulasa</i>	377
3.5.2.2.2.1.	<i>Coagulasa libre (en tubo)</i>	377
3.5.2.2.2.2.	<i>Coagulasa conjugada (en placa)</i>	38
3.5.2.2.3.	<i>Hidrólisis del manitol en concentraciones de NaCl 7.5%</i>	388
3.5.2.2.4.	<i>Hidrólisis de bilis de esculina</i>	39
3.5.2.2.5.	<i>Voges – Proskauer</i>	39
3.5.2.2.6.	<i>Hidrólisis de hipurato de sodio</i>	39
3.5.2.2.7.	<i>Tolerancia a concentraciones de 6.5% de NaCl</i>	400
3.5.3.	Coloraciones	41
3.5.3.1.	<i>Coloración de Gram</i>	41
3.5.3.2.	<i>Coloración azul de metileno</i>	42
3.5.4.	Recuento de Células Somáticas	42
4.	RESULTADOS	44

4.1. MUESTRA.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2. Cuadro de resultados	¡Error! Marcador no definido.
4.3. Datos estadísticos	44
4.3.1. Mastitis detectada con cultivo bacteriológico.....	44
4.3.2. Mastitis detectada con California Mastitis Test.....	47
4.3.3. Mastitis detectada con Recuento de Células Somáticas ..	¡Error! Marcador no definido.
4.3.4. Presencia y ausencia de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas ..	¡Error! Marcador no definido.
4.3.5. Bacterias aisladas en las muestras de leche	48
4.3.6. Socialización con la comunidad.....	489
5. DISCUSIÓN.....	495
6. CONCLUSIONES.....	539
7. RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	628
Anexo 1: FORMULARIO PARA LA RECOLECCION DE MUESTRAS	628
Anexo 2: Cuadro de interpretación del CMT	629
Anexo 3: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTOS	70
Anexo 4: DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO.....	71
Anexo 5: FOTOGRAFÍAS TOMADAS EN LA COMUNIDAD DE LLANOS DE ALBAS DE VACAS QUE TIENEN PEZONES NORMALES Y LESIONADOS	75
Anexo 6: RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANÁLISIS PARA DETECCIÓN DE MASTITIS EN LA COMUNIDAD DE LLANOS DE ALBAS.....	77

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Anatomía de la ubre bovina normal.....	5
Figura 2.2 Desarrollo de la mastitis y de la defensa de la vaca contra la infección.....	8
Figura 2.3 Triángulo epidemiológico de la mastitis.....	8
Figura 2.4 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	25
Figura 2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Figura 2.6 <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa.....	27
Figura 2.7 <i>Corynebacterium bovis</i>	28
Figura 2.8 <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	29
Figura 3.1 Recolección de muestras de leche realizada por los propietarios del ganado de la comunidad de Llanos de Albas.....	32
Figura 3.2 California Mastitis Test realizada en la comunidad de Llanos de Albas.....	34
Figura 3.3 Cultivos de leche incubados en CO ₂	36
Figura 3.4 Prueba de catalasa con reacción positiva.....	37
Figura 3.5 Prueba positiva de coagulasa en tubo.....	37
Figura 3.6 Prueba de coagulasa en placa con reacción negativa y positiva.....	38
Figura 3.7 Hidrólisis del manitol en concentraciones de NaCl 7.5% con reacción positiva.....	39
Figura 3.8 Pruebas de hidrólisis de bilis de esculina (1), Voges – Proskauer (2) e hidrólisis de hipurato de sodio (3).....	40
Figura 3.9 Prueba negativa de tolerancia a concentraciones del 6.5% de NaCl.....	41
Figura 3.10 Bacilos Gram positivos.....	41
Figura 3.11 <i>Corynebacterium</i> sp. con tinción azul de metileno.....	42
Figura 3.12 Placas teñidas con azul de metileno para RCS.....	43
Figuras 4.1 al 4.7 Socialización sobre normas de prevención de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas.....	51

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Porcentajes de células blancas en leche de cuartos normales e infectados.....	7
Tabla 2.2 Pruebas más usadas para la detección de mastitis bovina.....	14
Tabla 2.3 Principales microorganismos causantes de mastitis bovina.....	20
Tabla 2.4 Pruebas de identificación de microorganismos causantes de mastitis.....	22
Tabla 2.5 Pruebas de identificación de Enterobacterias causantes de mastitis.....	23

LISTADO DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1 Mastitis detectada con cultivo bacteriológico en la comunidad de Llanos de Albas.....	45
Gráfico 4.2 Mastitis detectada con California Mastitis Test en la comunidad de Llanos de Albas.....	46
Gráfico 4.3 Mastitis detectada con Recuento de Células Somáticas en la comunidad de Llanos de Albas.....	47
Gráfico 4.4 Porcentaje de ausencia y presencia de mastitis en las vacas analizadas mediante California Mastitis Test, Recuento de Células Somáticas y cultivo bacteriológico.....	48
Gráfico 4.5 Bacterias aisladas en cultivo bacteriológico en la comunidad de Llanos de Albas.....	49

RESUMEN

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que se produce como respuesta a la invasión del pezón por diferentes tipos de bacterias, hongos, levaduras, algunos virus y algas o por el efecto de toxinas, productos químicos, traumas, temperaturas extremas, etc. Dicha inflamación, es un mecanismo de protección contra la injuria provocada en el tejido que sirve para eliminar a los microorganismos, o neutralizar los efectos de otros agentes causales y para reparar el tejido productor de leche.

El propósito del presente estudio fue determinar mastitis bovina en la comunidad de Llanos de Albas mediante las técnicas de California Mastitis Test (CMT), recuento de células somáticas (RCS) y cultivo bacteriológico (CB).

Llanos de Albas es una comunidad indígena rural que se localiza en el cantón Cayambe de la Provincia de Pichincha. La comunidad está habitada por un total de 48 familias de campesinos de estrato socioeconómico bajo, presenta un alto índice migratorio de sus pobladores, especialmente de los jóvenes que salen a la ciudad. Trece pobladores, propietarios de ganado, aceptaron colaborar en el presente estudio.

De las veinte y ocho vacas criollas que fueron evaluadas el 39.3% presentaron mastitis. Las bacterias aisladas fueron *Staphylococcus aureus* (17.9%), *Corynebacterium* spp. (17.9%), *Staphylococcus coagulasa* negativa (3.6%), *Streptococcus* sp. (3.6%) y *Arcanobacterium pyogenes* (3.6%). El cultivo permitió encontrar un mayor porcentaje de positividad (39.3%) que las pruebas que analizaron respuesta inflamatoria como CMT y RCS. Se aislaron microorganismos contagiosos y ambientales que demuestran que las prácticas de ordeño no son las adecuadas.

1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad que puede ser provocada por factores: físicos, químicos y de origen infeccioso. Más de 100 especies de microorganismos que se encuentran en diferentes hábitats y tienen distintos modos de transmisión, están implicados como causantes de infecciones intramamarias. Bacterias Gram positivas, Gram negativas, algunos hongos y levaduras (Chaves, Javier; Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA; Lactodiagnóstico del sur SRL; Comisión Directiva de APROCAL;, S.F.), algas también han sido encontrados como agentes productores de mastitis (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM, S.F.).

En algunas circunstancias las condiciones de la producción lechera, mecanizada o manual, permiten la propagación de los organismos de una vaca a otra. La mastitis trae como consecuencia la reducción en el volumen y la calidad de la leche al alterar su composición y su sabor (Pinzón, 1989). Los cambios en la composición son: reducción de caseína, calcio, lactosa, fósforo, proteína y grasa butirosa, e incrementos de enzimas, células somáticas, cloro y concentración de sodio (AGROVIT GESTIÓN AGROPECUARIA, 2004).

De acuerdo a la Federación Internacional de Lechería, los microorganismos que producen mastitis pueden ser transmitidos ya sea a través de las manos del ordeñador en el caso del ordeño manual, por el equipo en el caso de ordeño mecánico, por la suciedad de los establos y los insectos como las moscas que actúan como vectores (Ramirez, Gaviria, Arroyave, Sierra, AEA, & Benjumea, 2001).

La mastitis bovina es una enfermedad que ocasiona pérdidas económicas por la disminución en la cantidad de leche obtenida en el ordeño y la calidad de la misma. Esta disminución en la producción ha sido calculada entre 4% y 30%. Adicionalmente, esta infección causa incremento en el costo del cuidado de la salud del hato y la muerte prematura de los animales con repercusión económica mayor si se trata de razas genéticamente mejoradas. (REDVET, 2008)

La calidad y la producción de leche es un desafío internacional y nacional, especialmente en los países dedicados a la generación de productos lácteos, ya que son alimentos considerados importantes y de alto nivel de consumo por lo que son incluidos en la dieta de la mayor parte de la población, a nivel mundial.

Las pérdidas a nivel mundial, ocasionadas por mastitis aparecen en especial en las regiones con producción lechera intensiva (Castañeda, Kloppert, Wolter, & Zschoesck, S.F.). El impacto económico ocurre por la pérdida de leche, mala calidad de leche, el reemplazo de vacas afectadas, los costos invertidos en el tratamiento y el descarte de leche proveniente de una vaca tratada con antibióticos (Cano, 2004). Las pérdidas en Estados Unidos de América, por la baja producción de leche llegan a 1 billón de dólares por año; en Chile hay una disminución del 14 % en la producción de leche en vacas con mastitis en comparación con vacas que no presentaban la enfermedad. Las pérdidas económicas en los países desarrollados son representativas a su producción, en los países en desarrollo, como el Ecuador, los valores son más significativos, aunque existen pocos estudios que señalen dicha pérdida (Acuña & Rivadeneira, 2008).

De acuerdo al Censo Agropecuario realizado en el año 2000, el 73% de la producción lechera en Ecuador se encuentra centralizada en la Sierra. La disponibilidad de leche cruda en el país es de alrededor de 3.5 millones a 4.5 millones de litros por día, destinándose el 75% para consumo humano (Contero, 2008). La importancia de la determinación de mastitis no se relaciona únicamente con las pérdidas económicas sino también con la posible contaminación de la leche y de los productos lácteos que pueden sufrir deterioros indeseables y además representan un peligro para la salud de los consumidores.

El laboratorio puede brindar ayuda a los propietarios mediante la aplicación de varias técnicas como: pruebas físicas, químicas, automatizadas y biológicas como por ejemplo, California Mastitis Test, la prueba de Wisconsin, el diagnóstico bacteriológico mediante el aislamiento, identificación de los microorganismos y el recuento de células somáticas (REDVET, 2007).

El presente estudio fue realizado en mayo de 2012 en la comunidad de Llanos de Albas que se encuentra localizada en el cantón Cayambe de la provincia de Pichincha. En dicha comunidad la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE), mantiene un proyecto de acción social.

Cayambe es uno de los ocho cantones de la provincia de Pichincha. Se ubica a 75 Km al nororiente de la ciudad de Quito a 2.700 metros sobre el nivel del mar. De acuerdo a los datos del INEC, Cayambe cuenta con una superficie de 1.350 Km². Está conformado por ocho parroquias, tres urbanas: Ayora, Cayambe y Juan Montalvo y cinco rurales: Ascázubi, Cangahua, Otón, Santa Rosa de Cusubamba y Olmedo (Andrade, Cáceres, Mazón, & Silva, 2010).

Llanos de Albas es una comunidad rural perteneciente a la parroquia Olmedo. Un análisis socioeconómico realizado en el año 2010 por la Facultad de Economía y la Escuela de Lenguas Aplicadas a los Negocios y Relaciones Internacionales de la PUCE, determinó que la situación económica de los pobladores es baja y está dedicada a la agricultura y a la ganadería.

La producción de leche generada en Llanos de Albas, está destinada para el autoconsumo y para la venta a las empresas de lácteos, cuyos centros de acopio se ubican en el sector. La comunidad no ha desarrollado un sistema de producción lácteo importante, cuentan con pocos animales, el sistema de ordeño empleado es manual, el rédito económico que adquieren por este bien es bajo, los pobladores no conocen de las buenas prácticas para la prevención de mastitis y tampoco realizan controles.

La determinación de mastitis en el hato bovino de la comunidad de Llanos de Albas es importante para que los pobladores valoren el consumo de un producto sano y la posibilidad de obtener un mayor rédito económico al vender un mejor producto, gracias a un mayor reconocimiento económico por calidad que suelen hacer las empresas procesadoras de lácteos.

En un estudio realizado en Cayambe, en el año 2008 se encontró el 10.67% de prevalencia de mastitis en un total de 20 haciendas visitadas. Se analizaron además los factores de riesgo para

adquirir la enfermedad, y se concluyó que la mastitis es una infección multifactorial, por tanto, su diagnóstico oportuno y la aplicación de normas de prevención ayudaron al control de mastitis en la mayoría de haciendas. (Acuña & Rivadeneira, 2008).

La presencia de mastitis amerita la implementación de medidas de control, independientemente del tipo de ordeño usado o del tamaño de explotación ya sea grande, mediano o pequeño.

Socializar sobre las medidas de prevención es una importante herramienta para disminuir los casos de mastitis, lo cual puede evitar pérdidas en la producción de la leche y además favorecer al consumo seguro de la misma.

En el presente estudio, se planteó como objetivo general: determinar la presencia de mastitis mediante el empleo de California Mastitis Test, Recuento de Células Somáticas y cultivo bacteriológico, en ganado bovino de la comunidad de Llanos de Albas de la provincia de Pichincha, del cual se derivaron los siguientes objetivos específicos:

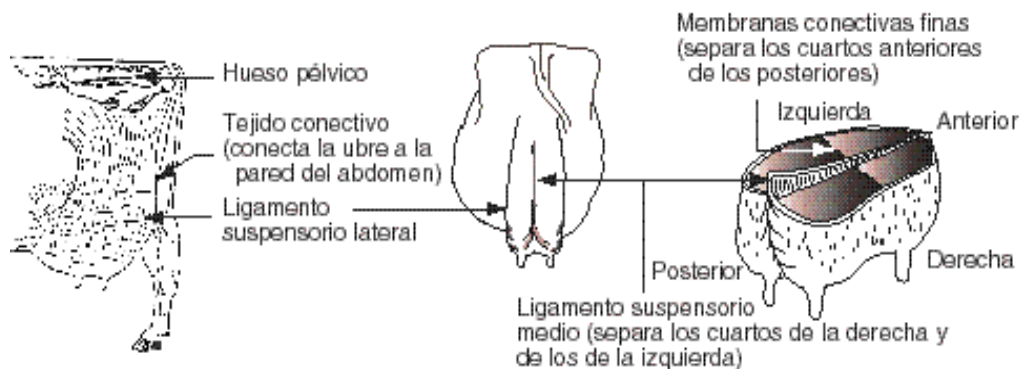
- Determinar la presencia de mastitis en el ganado bovino de la comunidad de Llanos de Albas mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT) y Recuento de Células Somáticas (RCS).
- Identificar los microorganismos causantes de mastitis mediante cultivo bacteriológico en muestras de leche del ganado bovino en estudio.
- Proporcionar información sobre medidas preventivas a los dueños de los pequeños hatos de la comunidad de Llanos de Albas mediante charlas educativas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Característica de la glándula mamaria normal

2.1.1. Anatomía de la ubre

La ubre de la vaca consta de cuatro cuartos o glándulas mamarias. Cada cuarto es completamente independiente, tiene su propia estructura secretora y se comunica con el exterior a través del pezón (Callejo Ramos, S.F.). Cada cuarto tiene su sistema colector por separado y se encuentran divididos por tejido conectivo (Regueiro, 2009) (Figura 2.1). De acuerdo a la posición de los cuartos, estos se identifican como anteriores izquierdo y derecho y como posteriores izquierdo y derecho.



Fuente: Unión Ganadera Regional de Jalisco

Figura 2.1 Anatomía normal de la ubre bovina normal

2.2. Patogenicidad

2.2.1. Modo de infección y mecanismos de defensa

Las infecciones ocurren cuando los microorganismos invaden el canal del pezón y llegan hasta la glándula mamaria donde se multiplican.

El pezón junto con la piel son la primera línea de defensa contra la penetración de los microorganismos dentro de la ubre. En el período seco el esfínter del pezón se cierra cuando el animal ya no es ordeñado formando un tapón de queratina que tiene un efecto de barrera física y adsorción de microorganismos (Agrovit, 2004). Según otros autores, el tapón también previene la multiplicación bacteriana gracias al contenido de proteínas y ácidos grasos (Concha, 2010). Una capa que posee leucocitos protectores se presenta en la Roseta de Furstenberg, que se ubica en la parte superior del tapón de queratina, estos controlan el ingreso de microorganismos a través de su capacidad fagocítica (Meglia & Mata, 2001). El estímulo adecuado para que ocurra la salida de la leche de la ubre ejerce la presión necesaria para la remoción del tapón de queratina y con ello el flujo de células de descamación y microorganismos adosados a él.

Después del ordeño manual o mecánico el conducto del pezón no se cierra inmediatamente. El lapso de tiempo en que el pezón queda abierto fluctúa entre treinta minutos a dos horas. Si se dan las condiciones propicias y existe la presencia de microorganismos causantes de mastitis en las proximidades del pezón, el período de apertura del canal del pezón es más que suficiente para que ocurra el ingreso de microorganismos en cualquier tipo de ordeño (Agrovit, S.F.). En el caso de ordeño mecánico las bacterias ingresan por la entrada de aire durante la colocación de pezoneras o luego en el período en el que los pezones quedan dilatados. Los microorganismos, que logran ascender por el canal del pezón abierto, colonizan los tejidos que recubren los tubos colectores de leche, otros pueden localizarse en otros puntos llevados por la corriente de la leche producida por el movimiento de la vaca.

Una vez establecidos los microorganismos, el sistema inmune de la glándula mamaria, trata de evitar la infección. Una de las maneras de controlar a los agentes extraños es mediante una respuesta inflamatoria aguda en la cual se movilizan gran cantidad de leucocitos, especialmente polimorfonucleares, al sitio de la infección.

Las células somáticas están constituidas por polimorfonucleares, linfocitos, monocitos y células epiteliales que en condiciones normales se encuentran en bajas cantidades en la leche (1×10^5 cél/mL); su número y proporción variará según el grado de infección o el estado fisiológico en el que se encuentre la ubre (Meglia & Mata, 2001). Durante la infección los porcentajes de células somáticas cambian notablemente como se puede ver en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Porcentajes de células blancas en leche de cuartos normales e infectados

	MONOCITOS %	POLIMORFONUCLEARES %	LINFOCITOS %	CÉL. EPITELIALES %
Cuartos sin infección / normales	45 – 90	3 - 25	7 - 35	0 – 2
Cuartos con infección	10 – 35	50 - 90	1 - 20	0 – 2

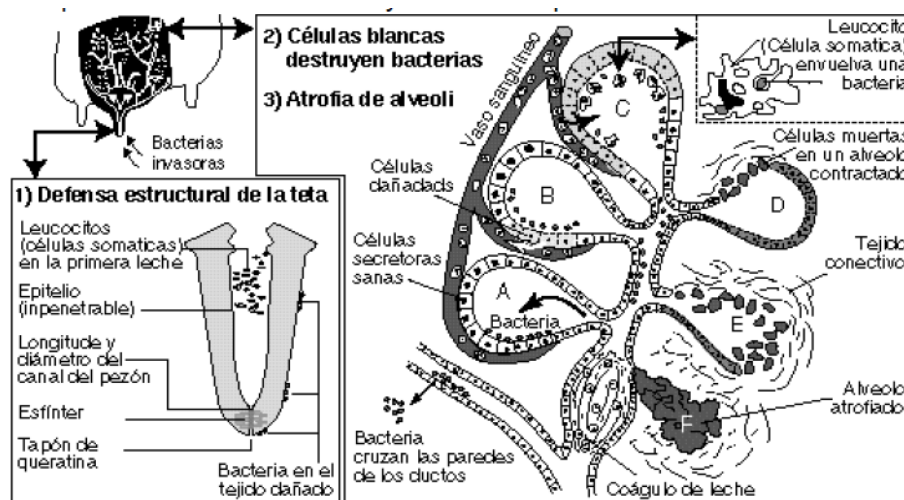
Fuente: (Monardes & Barria, 1995)

En la infección bacteriana las células somáticas se incrementan en un período de 12 a 24 horas. Los polimorfonucleares son las células con mayor incremento durante la infección, su principal función es fagocitar y destruir a los agentes extraños. La fagocitosis consta de varias fases: quimiotaxis de los fagocitos hacia el sitio requerido, reconocimiento del agente extraño, englobamiento, formación del fagolisosoma, destrucción del microorganismo y exocitosis (Arriagada, S.F).

La actividad bactericida del fagocito está dada por mecanismos independientes de oxígeno (enzimas lisosomales: lisozima, defensinas, lactoferrina y perforina) y dependientes de oxígeno (generación de radicales de oxígeno libre, anión superóxido y peróxido de hidrógeno) con la participación de mieloperoxidasa que cataliza la formación de hipoclorito y agentes oxidantes de elevada efectividad bactericida (Meglia & Mata, 2001). Los macrófagos tienen

capacidad fagocítica y producen citocinas, son los responsables de iniciar el proceso de inflamación crónica y compromete a la respuesta inmune específica mediante la presentación de antígenos a los linfocitos (Meglia & Mata, 2001).

Cuando la infección persiste, las células secretoras de leche se vuelven afuncionales, los alvéolos comienzan a reducir su tamaño, y las sustancias producidas por los leucocitos conducen a la destrucción completa de las estructuras alveolares que son reemplazadas por tejido conectivo que luego cicatriza. Este proceso permite mantener la infección bajo control (Agrovit, 2004). (Figura 2.2)

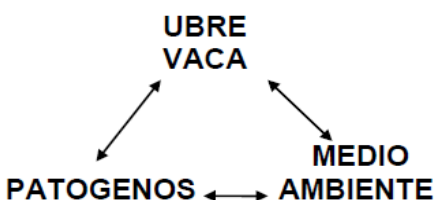


Fuente: www.agrovit.com

Figura 2.2 Desarrollo de la mastitis y de la defensa de la vaca contra la infección

2.3. Triángulo epidemiológico

En el establecimiento de la infección intramamaria hay que considerar algunos factores que se pueden conjugar y si de por medio existen las condiciones que favorecen su aparición entonces se establece la enfermedad, lo cual lleva a considerar a la mastitis como una enfermedad multifactorial. Existen tres elementos importantes que conforman el triángulo epidemiológico.



Fuente: (Chaves, Javier; Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA; Lactodiagnóstico del sur SRL; Comisión Directiva de APROCAL;, S.F.)

Figura 2.3 Triángulo epidemiológico de la mastitis

Los tres elementos se encuentran fuertemente ligados entre sí y su influencia es recíproca. Cada elemento del triángulo tiene sus limitaciones, por lo que cada uno de ellos se vuelve sensible a la enfermedad (Saran, 1986).

Los factores de sensibilidad en la ubre de la vaca son:

- La configuración anatómica de la ubre. Ubres grandes y péndulas son más susceptibles de presentar infección (Cotrino, 2007)
- Estructura de la punta y canal del pezón
- Las características fisiológicas
- Las defensas de la ubre
- La genética del ganado lechero

Los factores del medio ambiente que tienen importancia en las enfermedades de la ubre son:

- Climáticos o estacionales
- La alimentación del ganado
- Los establos y sus condiciones
- El tamaño del hato
- El sistema de ordeño inadecuado
- Ordeños incompleto

Los patógenos de la ubre pueden ser varios y de diferente tipo es decir, en este caso hay una multicausalidad en el sentido de que el agente etiológico puede pertenecer a diferentes tipos o grupos de microorganismos, lo cual la diferencia de enfermedades como la brucelosis, tuberculosis o fiebre aftosa, en las que hay un solo microorganismo causante.

De acuerdo a las características epidemiológicas los patógenos que provocan mastitis se clasifican en contagiosos y ambientales. Los microorganismos contagiosos son aquellos que se transmiten de ubre infectada a ubre sana o entre pezones. Durante el ordeño, los microorganismos se pueden vehicular con facilidad si la rutina del proceso es inadecuada. La falta de higiene en las manos del ordeñador, las toallas sucias y pezoneras contaminadas pueden facilitar la transmisión de patógenos.

Los microorganismos contagiosos pueden clasificarse en patógenos mayores y menores, en base a la intensidad de la respuesta inflamatoria que provocan en el tejido afectado. Los patógenos contagiosos mayores son: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* y *Mycoplasma* spp. Los patógenos contagiosos menores son: *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) y *Corynebacterium bovis*.

Los microorganismos ambientales se encuentran en el estiércol, suelo, etc. Su contagio se origina por malas prácticas de manejo. Los patógenos ambientales son: bacilos Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp.), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Enterococcus* spp (Valero-Leal, Valbuena, Chacón, Olivares, Castro, & Briñez, 2010).

2.4. Clasificación de la mastitis

No existe una clasificación unificada para la mastitis y en la actualidad existen varios autores que clasifican a la enfermedad según varios criterios.

De acuerdo con Ramirez et al (2001) la mastitis se clasifica según la sintomatología en: clínica y en subclínica, ésta última se subdivide en: mastitis moderadamente aguda, mastitis severamente aguda, mastitis crónica y mastitis con glándula improductiva o glándula ciega. En base al origen de la infección la mastitis se clasifica en mastitis contagiosa, mastitis originada en la piel de los pezones, mastitis ambiental, mastitis iatrogénica (Varela, 2002).

- Mastitis subclínica (MSC): Es más frecuente que la forma clínica, no se puede observar a simple vista y es necesario realizar pruebas especiales para su detección. Los cuartos de las vacas tienen apariencia normal, existe disminución en la producción de leche e incremento en el número de células somáticas (Pinzón, 1989).
- Mastitis clínica (Mc): Se la puede observar a simple vista. El cuarto afectado puede encontrarse inflamado, y presenta los signos típicos: calor, rubor, dolor y sensibilidad. En la producción lechera se presentan varias anormalidades como grumos o escamas y suero (Pinzón, 1989). Se estima que por cada caso clínico hay 40 subclínicos (Cottrino, 2007). Generalmente es causada por los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y por coliformes.
- Mastitis moderadamente aguda (MMA): La infección tiene más de 24 horas de evolución, la vaca presenta sus constantes fisiológicas normales pero la leche sale acompañada con natillas. Es necesario realizar la prueba del tazón oscuro antes del ordeño. La producción láctea disminuye aproximadamente el 30% (Cano, 2004).
- Mastitis severamente aguda (MSA): La infección tiene más de 72 horas de evolución. Se aprecia cierta inflamación en la glándula, endurecimiento y aumento de la temperatura. Causa pérdidas en el 40% de la producción (Cano, 2004).
- Mastitis crónica (MC): La vaca presenta algunos problemas ya que la duración de la infección es de 5 días, la pérdida de producción abarca el 50%. Existen problemas en toda la leche ya que sale con tolondrones, la ubre se encuentra severamente inflamada, endurecida y caliente, la vaca tiene fiebre, taquicardia y anorexia (Cano, 2004).

- Mastitis con glándula improductiva o glándula ciega (MI): La infección se extiende varias semanas, la glándula se ve pequeña, flácida y fría, ya no existe producción de leche sino exudados, las constantes fisiológicas están normales ya que la fibrina se encargó de aislar esta glándula (Cano, 2004).
- Mastitis iatrogénica: El origen de este problema es por el mal uso de medicamentos y sondas intramamarias que no cumplen con las medidas antisépticas requeridas (Cotrino, 2007), específicamente cuando los instrumentos o las propias soluciones se encuentran contaminadas o cuando al momento de aplicarlas se introducen microorganismos a través del pezón.
- Mastitis contagiosa: Es causada por un agente infeccioso que se encuentra en la piel, en el pezón o dentro de la glándula mamaria de animales que tienen la enfermedad tanto en la forma clínica o subclínica. La transmisión se debe a la suciedad en las manos de los ordeñadores o por las pezoneras que generan problemas de reflujo (Cotrino, 2007).
- Mastitis ambiental: Se produce por bacterias que son propias del medio ambiente. Acontece al no tener buena higiene en las camas, los corrales o los pisos donde se encuentran los animales (Cotrino, 2007).
- Mastitis aguda gangrenosa: Se manifiesta con aumento de la temperatura, enrojecimiento e inflamación del cuarto. La secreción de leche cesa y sólo una pequeña cantidad de fluido decolorado está presente en la glándula. En pocas horas el contenido de la glándula se hace acuoso sanguinolento y, poco después, puede notarse una zona azulada bien definida que involucra la ubre. Un exudado sanguinolento fluye constantemente de los tejidos necrosados; los signos locales son acompañados de fiebre, anorexia, depresión y deshidratación. En casos severos, la vaca exhibe signos de toxemia provocando la muerte (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM, S.F.).

Cuando se ha identificado el agente causal las mastitis pueden denominarse por el nombre del microorganismo.

- Mastitis estafilocócica: es causada por *Staphylococcus aureus*, bacteria que provoca mastitis clínica, subclínica, aguda, subaguda, gangrenosa y crónica se transmite en el momento del ordeño y coloniza el canal del pezón.
- Mastitis estreptocócica: Tiene como agentes etiológicos a *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y otros estreptococos ambientales. El microorganismo ingresa a la glándula mamaria a través del canal del pezón, reside en la leche y en los canales lácteos, se multiplica con rapidez, lo que provoca la aparición de un gran número de neutrófilos en la zona. Los conductos se obstruyen por lo que la función secretora empieza a fallar. Dado que esta infección es focalizada, el tratamiento es muy fácil de llevar a cabo.
- Mastitis coliforme: Los coliformes que causan, con mayor frecuencia, la infección son: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella* spp. Estos agentes etiológicos se multiplican rápidamente en los cuartos de la ubre. Pueden ocasionar mastitis gangrenosa y en algunos casos la muerte. Hay cuadros febriles, anoréxicos, depresión, pérdida de peso y disminuye la función secretora.
- Mastitis por *Pseudomonas aeruginosa*: Provoca una infección persistente, la bacteria se encuentra fácilmente en suelos y agua de granjas lecheras. El control es eficiente solo con el incremento de la higiene durante las prácticas de ordeño. Existe un alto índice de mortalidad, puede desarrollar a mastitis subclínica o mastitis peraguda severa.
- Mastitis por *Corynebacterium pyogenes*: Se observa habitualmente en los procesos supurantes del ganado bovino. La infección produce exudado profuso, purulento y de mal olor. Las vacas son tratadas al secarse, es decir al no producir leche, pero generalmente se pierden los cuartos infectados. *C. pyogenes* es considerado como

invasor secundario. Otros autores consideran a la especie *C. bovis* como un patógeno contagioso menor (Valero-Leal, Valbuena, Chacón, Olivares, Castro, & Briñez, 2010)

2.5. Diagnóstico

Considerando la variedad de microorganismos causantes de la mastitis bovina, el impacto de la enfermedad en la economía lechera y el control de diferentes bacterias, el diagnóstico de mastitis bovina, debe ser considerado ante todo como un diagnóstico de hato que permita establecer y monitorear las estrategias de control (Cotrino, 2007).

No existe una única prueba que permita evidenciar la mastitis bovina.

Las pruebas más usados a nivel mundial para mastitis se clasifican en físicas, químicas y biológicas, las mismas que tienen diferentes principios, tal como se describen en la Tabla 2.2. Una selección de varias pruebas a ser aplicadas en un rodeo, pueden complementarse apropiadamente para lograr un diagnóstico acertado.

Tabla 2.2 Pruebas más usadas para la detección de mastitis bovina

TIPO	PRUEBA	CARACTERÍSTICAS
PRUEBAS FÍSICAS	Aspecto físico de la ubre y la leche	Se visualizan lesiones, heridas, laceraciones sanguinolentas o con pus, en la ubre y pezón. Se hace el despunte de la leche en un tazón de fondo negro, se revisan los primeros chorros de leche para detectar alteraciones visibles de la leche, grumos o tolondrones. (García, 2006).
	Escudilla de ordeño	Se recoge la leche sobre un tejido negro extendido encima de la escudilla, los grumos se hacen visibles (REDVET, 2007).
	Taza probadora	Examen visual de los primeros chorros de leche sobre un recipiente de fondo oscuro (REDVET, 2007).
	Paño negro	Examen visual para determinar irregularidades de la leche

		sobre un fondo oscuro (Figuroa, y otros, 1984).
PRUEBAS QUÍMICAS	Conductividad eléctrica de la leche	Se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro, que por causa de la inflamación se han filtrado desde la sangre hacia la leche (REDEVET, 2007).
	Papel indicador de mastitis	Determina la presencia de mastitis mediante un papel indicador de pH (Figuroa, y otros, 1984). El pH de la leche normal es ligeramente ácido (6.5 y 6.8), mientras que la leche mastítica tiene un pH ligeramente alcalino (6.9 y 7.5) (Negri, 2005).
	Prueba de Whiteside	Los leucocitos presentes en forma abundante en la leche gelifican con el reactivo de NaOH al 4%. Se mezclan 5 gotas de leche más 2 gotas de reactivo. La formación de grumos es positiva para mastitis (Figuroa, y otros, 1984).
PRUEBAS BIOLÓGICAS	California Mastitis Test (CMT)	Estimador del número de células somáticas. Se evalúa por cruces que se correlaciona con un número aproximado de células. Más adelante se aborda con más detalle.
	Prueba de Wisconsin para mastitis (WMT)	Estimador del número de células somáticas (Gómez, 2008). Es una adaptación semi cuantitativa del CMT y es usada para estimar el contenido de células somáticas en muestras de leche fresca. También es considerada una prueba de screening (National Mastitis Council, 1999).
	Método somaticell	Test para la cuantificación de células somáticas basado en el aumento de la viscosidad resultante de la interacción de las células con el reactivo somaticell (LACTOGANDOLFO, S.F.). Reactivo: Levowitz-Weber, Verde metil-pironina.
	Recuento de células somáticas	Conteo de células blancas por microscopía directa.
	Contaje automatizado de células somáticas (Fossomatic)	Los equipos poseen alta correlación con la microscopía óptica, proporcionan una medida segura en el RCS. Fossomatic: procedimiento colorimétrico, filtra una solución (leche + detergente Triton x-100 EDTA) a través de una membrana con poros fino. Determina el contenido de ADN

		por medio de fluorescencia (bromuro de etidio penetra la célula y forma un complejo fluorescente con el ADN nuclear (REDVET, 2008).
	Cultivo bacteriológico y antibiograma	Identifica las especies bacterianas causantes de mastitis en cada vaca. La prueba de sensibilidad a los antibióticos es una información valiosa para que el veterinario pueda elegir el tratamiento más adecuado. (Gómez, 2008).

Fuente: Adaptado por: PROAÑO, Sofía, VÁSCONEZ, Catalina.

Las pruebas utilizadas en el presente estudio fueron:

- California Mastitis Test: Esta prueba utiliza un reactivo compuesto por sodio lauril y cristal violeta. El cristal violeta puede ser remplazado por el púrpura de bromocresol. Es una prueba indirecta (Wolter, Castañeda, & Kloppert, 2004), cualitativa (Higuera, 2006) sencilla y muy útil para la detección de mastitis subclínica por estimar el número (bajo o elevado) de células somáticas en la leche (REDVET, 2008). El test de CMT se basa en la capacidad que tiene el reactivo lauril sulfato de sodio para liberar el ADN de las células somáticas presentes en la ubre. Cuando las células somáticas están incrementadas el reactivo forma un gel con el ADN liberado. Mientras más células haya en la leche, mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor grado de inflamación (Orellana & Cruz, 2005).
- Recuento de células somáticas: Investiga, fundamentalmente, las células que en la anormalidad se pueden incrementar en la leche (Wolter, Castañeda, & Kloppert, 2004). Indica la concentración de leucocitos y células epiteliales en un mililitro de leche (Monardes & Barria, 1995). La presencia de células somáticas en leche, brinda información sobre la calidad de la leche y el estado funcional y de salud de la glándula mamaria durante la lactancia. El RCS indica el estado inflamatorio de las glándulas mamarias y se puede realizar por cuartos individuales, vacas individuales, hatos

completos o grupos de hatos. (REDVET, 2007). Es confiable y útil, permite observar el estado de las glándulas mamarias dentro de un hato tan solo con tomar una muestra de leche representativa o leche del tanque. Esta técnica indica si la calidad de la leche es apta para el consumo. Recuentos menores de células somáticas indican mayor producción de leche y queso y mayor porcentaje de grasa y caseína. Los factores que influyen en el RCS son: la edad, el stress, la etapa de lactancia, las características genéticas que pueden determinar que una raza sea más propensa que otra a presentar infección, los factores de manejo (tipo de ordeño) y variaciones día a día (Agüero, 2011).

- Cultivo bacteriológico: el cultivo es una prueba indispensable para identificar a los microorganismos responsables de mastitis. Es óptimo para el diagnóstico por menos cantidad de resultados falsos (positivos o negativos) (Tirante, 2006). Un resultado confiable depende de la asepsia observada durante la toma, transporte y procesamiento de las muestras en el laboratorio (REDVET, 2007). Esta técnica permite diferenciar en 24 horas qué infecciones requieren tratamiento antibiótico y cuáles no las necesitan. Es importante evaluar el o los microorganismos que se desarrollan y la cantidad de UFC que aparecen en el medio para emitir un resultado preciso. Identificar el tipo de mastitis que predominan en el hato es un dato importante para que el veterinario pueda tomar las medidas adecuadas de control. La principal desventaja que presenta esta prueba es la infraestructura necesaria y el personal capacitado que debe trabajar en el diagnóstico preciso por el laboratorio. (Lucas & Lucas, 2011)

2.6. Prevención

La prevención de mastitis se realiza siguiendo pasos muy sencillos que tienen como objetivo evitar la infección, reducir la presentación de nuevas infecciones o disminuir el tiempo de infección.

Es importante que los ordeñadores sepan sobre esta enfermedad y cuiden adecuadamente su ganado ya que la mastitis causa grandes pérdidas económicas a nivel mundial.

Los pasos generales a seguir y algunas indicaciones adicionales sobre ellas se mencionan a continuación:

- Conducir a las vacas al sitio de ordeño sin castigos o gritos.
- El corral de ordeño debe mantenerse limpio.
- No permitir la entrada de perros u otros animales al lugar de ordeño (Hernández, S.F.).
- Mantener la higiene de los utensilios.
- Ordeñar siempre a la misma hora.
- Antes del ordeño se debe realizar la limpieza adecuada de los pezones
- Durante la limpieza mojar únicamente los pezones. Otra alternativa es usar una solución desinfectante.
- Secar los pezones con toalla limpia.
- Despuntar en un tazón de fondo negro.
- Ordeñar vacas bien estimuladas.
- Si en el ordeño manual se usa el ternero para estimular, rotar al ternero por los cuatro pezones. Limpiar los pezones con toallas limpias e individuales para reducir la carga bacteriana oral del ternero.
- Prevenir daños de los pezones durante el ordeño. Al sufrir pequeñas lesiones, éstas son causa de mastitis. El control de los pezones ayuda a prevenir futuros problemas.
- Uso de sellador después del ordeño ayuda a reducir en más de un 50% la infección si son usados correctamente. Los productos que se usan como selladores son a base de yodo.
- El sellado de pezones post-ordeño es más efectivo contra *S. aureus* y *S. agalactiae*, las dos bacterias más contagiosas causantes de mastitis. El sellado de pezones no afecta las infecciones existentes.
- En el caso de ordeño con ternero no es necesario el uso de sellador.

- El tratamiento adecuado y a tiempo usando antibióticos según la bacteria identificada y en la dosis apropiada evita la diseminación de la enfermedad.
- El registro de cada vaca es una clave exitosa ya que los ordeñadores o personal encargado del cuidado debe identificar al animal con problemas.
- Una buena nutrición favorece la homeostasis del sistema inmune e inhibe el surgimiento de infecciones. La deficiencia de selenio y vitamina E en la dieta se han asociado con el surgimiento de nuevas infecciones (Andersen, 2008).
- Si en el rodeo se han detectado vacas con mastitis, estas deben ser ordeñadas al final.
- Capacitar al ordeñador respecto a la higiene personal y la limpieza que se debe tener en todo el proceso.
- El último punto hace referencia a las buenas prácticas de ordeño, es decir, las personas que están a cargo del ordeño deben estar: libres de enfermedades (tos, rinorrea, enfermedades de la piel)
- El personal a cargo debe mantener una higiene personal adecuada, se debe insistir sobre la costumbre de tomar un baño. Lavarse las manos con frecuencia y obviamente antes de proceder al ordeño. Algunos recomiendan la desinfección de las manos con agua de yodo o agua con cloro. Mantener las uñas cortas y la ropa limpia. Durante el proceso de ordeño, no tocar otros objetos, no fumar.

2.7. Control

El control de la mastitis bovina abarca un programa completo de manejo y cuidado del animal. El objetivo es reducir el tratamiento quimio-terapéutico que es muy costoso. Además el uso de antibióticos tiene otras implicaciones en la salud pública como su presencia residual en la leche y la presentación de resistencias bacterianas. El control periódico a manera de monitoreo incluye la reducción en los niveles de infecciones determinado por el RCS o el CMT. En condiciones ideales se podría aplicar el CMT cada 30 días.

Todos los casos de mastitis clínica deben tratarse de inmediato, la mayoría de los casos de mastitis subclínica no deben tratarse durante la lactancia, sino al momento de la seca, que es el

período de cese de la lactancia. Entre el 25% y el 30% de los casos de mastitis subclínica se recuperan satisfactoriamente (Andresen, 2001). Si en el hato hay alta prevalencia de infecciones subclínicas por *Streptococcus agalactiae*, se puede aplicar el tratamiento y observar las indicaciones para no utilizar la leche por el período que el veterinario lo indique.

La presencia de moscas es otro factor importante en el control de la mastitis. Además de cuidar la limpieza del establo y controlar las moscas adultas, la clave es eliminar las larvas usando cal o larvicidas sobre el guano húmedo (Andresen, 2001).

2.8. Bacterias causantes de mastitis

Se han encontrado que más de 100 especies de microorganismos pueden provocar mastitis. Las bacterias son los microorganismos que más frecuentemente se aíslan a partir de muestras de leche provenientes de ubres con infección intramamaria.

Los principales microorganismos causantes de mastitis bovina se señalan en la Tabla 2.3 (Ramírez, Palacio, Cerón, & Jaramillo, 2011).

Tabla 2.3 Principales microorganismos causantes de mastitis bovina

Frecuencia de la infección	Microorganismo	Fuente	Forma de presentación de enfermedades
Infección común en la mayoría de los hatos lecheros	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Ubres de otras vacas	Mastitis subclínica, mastitis clínica
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Enterococcus</i>	Ubres infectadas, materia fecal, ambiente del establo	Mastitis subclínica, mastitis clínica
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ubres infectadas, piel de la ubre, manos de operarios.	Mastitis subclínica, clínica, hiperaguda con gangrena
Problemas esporádicos u ocasionales en el hato	Coliformes: <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Citrobacter</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	Materia fecal y agua contaminada	Mastitis clínica aguda

Fuente: (Ramírez, Palacio, Cerón, & Jaramillo, 2011)/ Adaptado: PROAÑO, Sofía; VÁSCONEZ, Catalina

Las bacterias que predominan son los cocos, bacilos Gram (+) y bacilos Gram (-). Otras bacterias con requerimiento de cultivo más exigentes se aíslan con menor frecuencia como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycoplasma*.

Según el National Mastitis Council (NMC) las bacterias que más frecuentemente causan mastitis se dividen dependiendo el origen de las bacterias en dos grupos: patógenos contagiosos y patógenos ambientales (National Mastitis Council, 1999). El aislamiento e identificación de los microorganismos en el laboratorio es de gran importancia para establecer la etiología de la enfermedad. Para la identificación se toma en cuenta las características morfológicas del microorganismo en los medios de cultivo primarios, la reacción al Gram y la morfología microscópica. Luego se pueden realizar una serie de pruebas como las que se muestran en las Tablas 2.4 y 2.5

Tabla 2.4 Pruebas de identificación de microorganismos causantes de mastitis

GRAM	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA/ PRIMOASLAMIENTO	MICROORGANISMOS	BACTERIAS													
			PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN													
			HEMÓLISIS EN AGAR Sangre	CATALASA	COAGULASA	HIDRÓLISIS MANTOL SALADO	HIPURATO DE SODIO	VP	AZUL DE METILENO	HIDRÓLISIS ESCULINA	NaCl 6.5%	CAMP	AZUL LACTOFENOL	SOL SALINA		
COCOS GRAM POSITIVOS	COCOS EN RACIMOS	<i>Staphylococcus aureus</i>	β o γ	POS	POS	POS										
		<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	-	POS	NEG	NEG										
	COCOS CADENAS	<i>Streptococcus agalactiae</i>	β	NEG			POS				NEG	NEG	POS			
		<i>Streptococcus uberis</i>	α	NEG			POS				POS	NEG	VAR			
		<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	α	NEG			NEG				NEG	NEG	NEG			
		<i>Enterococcus spp.</i>	α o γ	NEG			POS				NEG	POS	NEG			
BACIOS GRAM POSITIVOS	ESPORULADOS	<i>Bacillus spp.</i>	α	POS												
	PLEOMÓRFICOS	<i>Corynebacterium bovis</i>	-	POS						X						
OTRAS BACTERIAS		<i>Mycobacterium spp.</i>	-													
	PLEOMÓRFICOS	<i>Mycoplasma spp.</i>	-													
	PLEOMÓRFICOS G VARIABLE	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>		NEG			POS	NEG		NEG		POS				
HONGOS Y LEVADURAS	Hifas/ estructuras unicelulares	Varios	-											X		
ALGAS		<i>Prototheca</i>	-											X	X	

Fuente: National Mastitis Council / Adaptado: PROAÑO, Sofía; VÁSCONEZ, Catalina

- - : NO HEMÓLISIS
- POS: POSITIVO
- NEG: NEGATIVO
- X: PRUEBAS A REALIZAR

Tabla 2.5 Pruebas de identificación de Enterobacterias causantes de mastitis

Microorganismo	Apariencia de la colonia En Agar MacConkey	Morfología microscópica/Reacción al Gram	Pruebas de identificación
<i>E coli</i>	Son rosadas, secas, planas de 2 a 4 mm de diámetro, rodeadas de una zona rosa. Fermentadoras de lactosa. Tiempo de incubación: 24 a 48 horas.	Bacilos G negativos	Citrato: negativo Motilidad: positiva Indol: positivo TSI: A/A + gas Rojo metilo: positivo Voges-Proskauer: negativo Úrea: negativo.
<i>Klebsiella spp.</i>	Rosadas y mucoides. Fermentadoras de lactosa. Tiempo de incubación: 24 a 48 horas.	Bacilos G negativos	Citrato: positivo Motilidad: negativa Indol: negativo TSI: A/A + gas Úrea: variable.
<i>Enterobacter spp.</i>	Rosadas y de aspecto seco. Fermentadoras de lactosa. Tiempo de incubación: 24 a 48 horas.	Bacilos G negativos	Citrato: positivo Motilidad: positivo Indol: negativo TSI: A/A + gas Úrea: negativo
<i>Serratia spp.</i>	Son translúcidas, a menudo con pigmento rojo. Fermentadores lentos de lactosa. Tiempo de incubación: 24 a 48 horas.	Bacilos G negativos	Citrato: positivo Motilidad: positivo TSI: K/A
<i>Proteus spp.</i>	Colonias grises con swarming. No fermentadoras de lactosa. Tiempo de incubación: 24 a 48 horas.	Bacilos G negativos	Oxidasa: negativa Citrato: variable Motilidad: positiva Indol: positivo TSI: K/A + gas + H ₂ S Úrea: positivo
BACILOS GRAM NEGATIVOS NO PERTENECIENTES A LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE			
Microorganismo	Apariencia de la colonia	Morfología microscópica / Reacción al Gram	Pruebas de identificación
<i>Pseudomonas spp.</i>	Color: blancas grisáceas con bordes irregulares. Son hemolíticas (A. sangre). Medio: Agar Cetrimide (pequeñas, verdosas con fluorescencia a luz ultra violeta). Tiempo de incubación: 24 a 48 horas.	Bacilos G negativos	Oxidasa: positiva Prueba del indol: negativo Rojo de metilo negativo Citrato: variable Motilidad: positiva TSI: K/K Voges Proskauer: negativo
<i>Pasteurella spp.</i>	Color gris, son mucosas, hemolíticas y con olor a humedad (A. sangre). Medio: Agar MacConkey, Nutritivo, BHI, Sangre y Chocolate. Tiempo de incubación: 24 a 48 horas.	Bacilos G negativos	Oxidasa: positivo Citrato: negativo Motilidad: negativo TSI: A/A Indol: positivo Reducen nitratos a nitrito y fermentan la glucosa en medio OF.

Fuente: National Mastitis Council / Adaptado: PROAÑO, Sofia; VÁSCONEZ, Catalina

2.9. Descripción de bacterias causantes de mastitis encontradas en la comunidad de Llanos de Albas

Las características asociadas a la infección y las características laboratoriales de los microorganismos encontrados en las muestras de leche en la comunidad de Llanos de Albas se describen a continuación:

2.9.1. Cocos Gram Positivos

2.9.1.1. Streptococcus dysgalactiae

Pertenece al grupo C de la clasificación de Rebeca Lancefield. Es un patógeno contagioso, la fuente del microorganismo es una ubre infectada, lesiones en la piel y el medio ambiente, especialmente agua estancada, suelo y camas orgánicas: paja o aserrín. Se pueden propagar de vaca a vaca al momento del ordeño (National Mastitis Council, 1999). Son bacterias que no pueden ser eliminadas del hato ya que pertenecen al medio ambiente. Su presencia es más notoria en los meses más húmedos del año (Agrovit.com, S.F.).

En agar sangre las colonias son pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro, húmedas, convexas y translúcidas. La mayoría son no hemolíticas (gama) o alfa hemolíticas. Microscópicamente aparecen como cocos Gram positivos en cadenas. Catalasa negativa. CAMP negativo, actividad de esculinasa negativa. Hidrólisis del hipurato de sodio negativo. Trehalosa positiva (National Mastitis Council, 1999) (Figura 2.4).



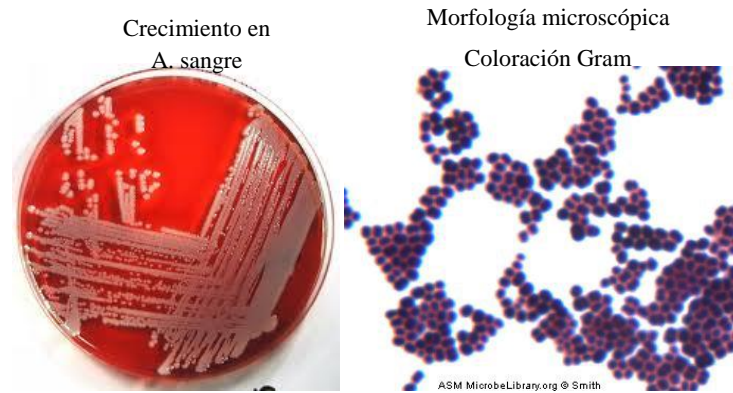
Fuente: www.Medscapereference.com

Figura 2.4 *Streptococcus dysgalactiae*

2.9.1.2. *Staphylococcus aureus*

El reservorio principal es la ubre infectada, tanto dentro como fuera de la misma. *Staphylococcus aureus* comienza a colonizar el orificio y el canal del pezón. No coloniza piel sana. La reducción de *S. aureus* a menos del 1% en el hato puede ser posible a través de un régimen de identificación, segregación, estricta higiene en el tiempo de ordeño, tratamiento eficaz y el sacrificio. Son patógenos contagiosos y son transmitidos de glándula o pezón infectado a sanos durante el proceso de ordeño. La infección por esta bacteria puede producir cicatrices que forman sacos de infección encerradas en la ubre (Agrovit.com, S.F.).

En agar esculina las colonias son de 2 mm a 5 mm tras 24 horas de incubación y de 3 mm a 8 mm a las 48 horas de incubación, en agar sangre las colonias son lisas, enteras y pigmentadas. La pigmentación es cremosa, blanca o grisácea. La hemólisis a las 24 horas de incubación puede ser amplia o con una zona de hemólisis incompleta, la cual puede ser acompañada por una estrecha zona de hemólisis completa que se extiende 2mm o más del borde de la colonia. La hemólisis también puede estar ausente. Microscópicamente son cocos Gram positivos en pares o grupos irregulares. Catalasa positiva. Coagulasa positiva. (National Mastitis Council, 1999) (Figura 2.6).



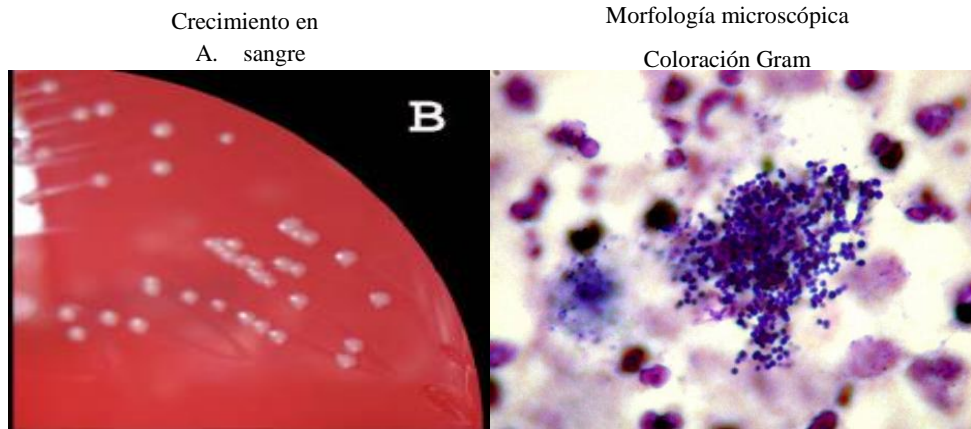
Fuente: EMO ediciones médicas

Figura 2.5 *Staphylococcus aureus*

2.9.1.3. *Staphylococcus coagulasa negativa*

Son de los microorganismos más frecuentemente aislados en vacas e incluyen más de 50 especies y subespecies. Las especies más frecuentes son: *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus simulans* (Navarro, S.F.). Habitan en la piel del pezón y también se encuentran en las manos del ordeñador. Los SCN son oportunistas, infectan el canal del pezón y pueden penetrar hasta los tejidos secretores. Las novillas y las vacas pueden infectarse por SCN antes del parto. El riesgo de infección vaca a vaca es bajo. Es común una prevalencia del 10 al 15% en los cuartos infectados. Existe una tasa elevada de curación espontánea (Quiroga, S.F.). Las infecciones suelen ser leves y causan mastitis subclínica, pueden provocar procesos clínicos, alta prevalencia en vacas primiparas y mayor incidencia de nuevas infecciones en el período seco de la vaca (Navarro, S.F.).

Microscópicamente son cocos Gram positivos dispuestos en pares, tetradas o grupos irregulares. Son catalasa positiva. No poseen la enzima coagulasa. (Grupo Asesor Control de Infecciones y Epidemiología, S.F.). (Figura 2.6)



Fuente: www.Scielo.cl

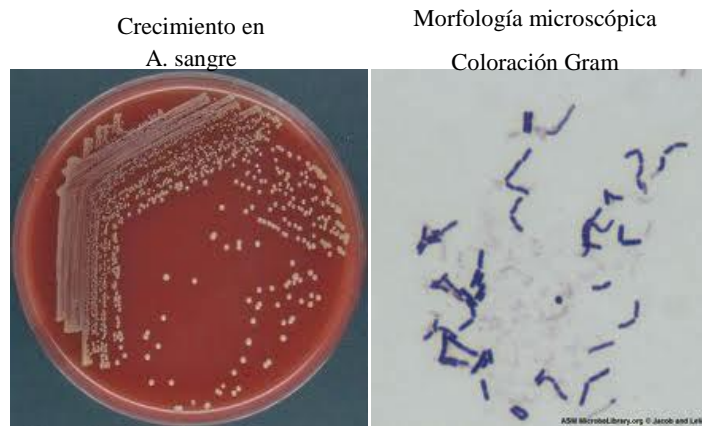
Figura 2.6 *Staphylococcus coagulasa negativa*

2.9.2. Bacilos Gram positivos

2.9.2.1. *Corynebacterium bovis*

La fuente de esta bacteria son las ubres infectadas y el canal del pezón. Suele transmitirse por material o equipo contaminado de una glándula mamaria a otra durante la práctica de ordeño, por moscas portadoras del microorganismo que coloniza a la glándula o por traumatismos en la misma. Este microorganismo se establece primero en el canal del pezón. Causa infecciones ocasionales en la ubre, con ligero aumento del RCS y reducción en la producción de leche. Están presentes en muestras de leche con mastitis clínica. No hay tratamiento antibiótico indicado.

En agar sangre, las colonias son cremosas, grises o blancas, opacas, secas, polvosas, no hemolíticas y pequeñas, pueden alcanzar 1mm de diámetro. A las 24 horas de incubación hay un escaso crecimiento, que no es visible. A las 48 horas de incubación el crecimiento se muestra evidente. Son catalasa positiva. Microscópicamente son bacilos pequeños, no formadores de esporas, Gram-positivos, pleomórficos, la forma puede variar desde esféricas a ovals. (National Mastitis Council, 1999). (Figura 2.7)



Fuente: ASM Microbet Library

Figura 2.7 *Corynebacterium bovis*

2.9.2.2. *Arcanobacterium pyogenes*

Se encuentra presente en la mucosa nasal, conjuntival, vaginal y prepucial de los bovinos (Araínga, Sandoval, Zacarías, & Rivera, 2003). Dentro de las fuentes de este microorganismo se incluyen infecciones de heridas, pezones lastimados, infecciones de la ubre o abscesos. La transmisión se debe al contacto de los pezones con el medio ambiente contaminado como, áreas de parto y establos.

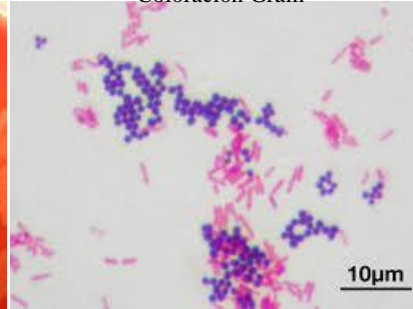
Arcanobacterium pyogenes a menudo causa una forma de mastitis aguda y purulenta, puede ser transmitido por las moscas, por lo que debe existir un programa de control de moscas y mantener a las vacas en lugares secos y limpios (National Mastitis Council, 1999).

En agar sangre el crecimiento es escaso o no visible a las 24 horas de incubación a 37°C. Una leve β -hemólisis puede ser vista en el agar sangre, luego de un día de incubación y especialmente cuando el crecimiento del organismo es masivo. Las colonias son pequeñas, puntiformes, lisas, blanquecinas, están rodeadas por una zona estrecha de hemólisis evidente de 0.5 mm a 1 mm, a las 24 horas de incubación. Son catalasa negativa. Microscópicamente son bacilos pequeños o cocobacilos Gram positivos, aparecen formando masas, son pleomórficos, pueden ser ligeramente curvos y pueden mostrar una ramificación rudimentaria junto con formas en letras chinas y V (Koneman, y otros, 2008) (National Mastitis Council, 1999). (Figura 2.8)

Crecimiento en
A. sangre



Morfología microscópica
Coloración Gram



Fuente: Atlas fotográfico Exopol

Figura 2.8 *Arcanobacterium pyogenes*

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. Área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en la comunidad de Llanos de Albas, parroquia Olmedo del cantón Cayambe, ubicada al noreste del Distrito Metropolitano de Quito, provincia de Pichincha.

Los predios que entraron a formar parte del estudio estaban alejados unos de otros a una distancia promedio de 3 a 5 Km. En casos excepcionales se encontraban a distancias mayores de 10 a 15 Km. La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de docencia de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

3.2. Muestra

Se seleccionó la muestra a partir de vacas criollas que se encontraban en estado de lactación, mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q},$$

Donde:

- Z_{α}^2 = para un intervalo de confianza del 95% es 1.96; $\alpha = 0,05$.
- p = proporción esperada = 0.83^a
- $q = (1 - p) = 0.17$
- d = precisión = 0.03
- N = tamaño poblacional = 30

^a La prevalencia de mastitis en ganado bovino en Cayambe es de 0.83 (Acuña y Ribadeneira, 2008).

$$n = \frac{30 * (1.96)^2 * 0.83 * 0.17}{(0.03)^2 * (30 - 1) + (1.96)^2 * 0.83 * 0.17}$$

$$n = 28 \text{ vacas}$$

3.3. Toma de la muestra:

3.3.1. Materiales:

Los materiales usados en la fase de campo fueron: agua embotellada, alcohol antiséptico, algodón, frascos estériles, se utilizaron los diseñados para recolección de orina, tubos de 12 mL, kit para la prueba de CMT, caja térmica para transporte, refrigerantes.

3.3.2. Procedimiento para la toma de muestra

El muestreo se realizó durante el ordeño de las 5 a 6 de la mañana. Se efectuaron varias visitas a la comunidad, para poder obtener el número de muestras requerido.

Para el registro de datos se utilizó un formulario con el fin de recolectar la información necesaria para el trabajo. (Anexo1).

Se capacitó a los propietarios en la técnica aplicada para la recolección de las muestras de leche. Cada uno de ellos fue instruido en forma personalizada a fin de asegurar que la toma sea lo más aséptica posible, y así evitar contaminaciones. Tanto el lavado de manos con agua y jabón como la desinfección de las mismas con alcohol, fue primordial. Se proporcionó guantes a cada propietario los mismos que fueron utilizados exclusivamente para la recolección.

Mediante observación, se inspeccionó la higiene externa de los pezones y de las ubres. La presencia de barro o suciedad y heces en los pezones exigió la práctica de un aseo acucioso, previo a la recolección. Se cuidó de no mojar la zona de la ubre que presentaba pelos. En el presente estudio se requirió hacer este paso en el 100% de las vacas muestreadas.

Para el lavado de pezones se utilizó el agua embotellada. Luego se procedió a secar perfectamente las zonas húmedas con papel toalla. Se usó papel toalla individual para cada pezón. Se hizo una estricta desinfección de los pezones con algodón embebido en alcohol al 70%.

Para cuidar la asepsia en la recolección se inició con la desinfección de los pezones más alejados al ordeñador, luego se continuó con los pezones más cercanos. La punta del pezón se frotó varias veces con la torunda embebida en alcohol a fin de retirar la posible suciedad que el lavado no fue capaz de hacerlo. (Figura 3.1)

Para la recolección, se descartaron los primeros chorros de leche. Las muestras se tomaron en frascos estériles, comenzando por los pezones más próximos al ordeñador, simultáneamente se recolectó muestras de cada pezón en tubos estériles de 12 mL para la realización de CMT y RCS.



Fuente: PROAÑO, Sofía., VÁSQUEZ, Catalina.

Figura 3.1 Recolección de muestras de leche realizada por los propietarios del ganado de la comunidad de Llanos de Albas.

3.3.3. Transporte de las muestras

Las muestras recolectadas en los frascos estériles, destinadas para el cultivo bacteriológico y aquellas recolectadas en los tubos de 12 mL, destinadas para RCS, fueron transportadas al laboratorio en caja térmica. Se cuidó de ambientar la caja térmica con refrigerantes a temperatura de 2°C – 8°C para mantener las muestras a temperatura de refrigeración y evitar la multiplicación bacteriana.

3.4. Pruebas de campo: CMT

La prueba realizada en la fase de campo fue California Mastitis Test. Se utilizó el kit Vehículo acuoso C.S. Laboratorio LIFE y la paleta especialmente diseñada para este ensayo. Aunque la bibliografía indica hacer la prueba al pie de la vaca, es decir en el mismo instante de recolección de leche, por motivos de tiempo y distancia de predio a predio las muestras fueron previamente recolectadas y transportadas, en condiciones de refrigeración, hasta la casa comunal de la comunidad de Llanos de Albas donde se practicó la prueba y se realizó la interpretación de resultados.

3.4.1. Procedimiento para la prueba de campo

Para la prueba de CMT, en cada uno de los cuatro compartimentos de la paleta plástica del test se colocaron 2mL de leche bien homogenizada. Luego se agregó la misma cantidad del reactivo sobre la leche (Figura 3.2). Se mezcló con movimientos giratorios durante no más de 10 segundos. La lectura se hizo antes de los 20 segundos. Los resultados se leyeron de acuerdo a la tabla de interpretación (Anexo 2). (Figura 3.2) (1: Positivo. 2: Negativo))



Fuente: PROAÑO, Sofía., VÁSCONEZ, Catalina.

Figura 3.2 California Mastitis Test realizada en la comunidad de Llanos de Albas

3.5. Procesamiento en el laboratorio

Los procedimientos bacteriológicos realizados en el laboratorio (Anexo 3) son los recomendados por el National Mastitis Council (NMC). Para la verificación de la calidad de las pruebas realizadas, se utilizaron controles positivos con cepas mantenidas en el laboratorio de docencia de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE.

3.5.1. Materiales, reactivos, medios de cultivo y equipos

- Asas desechables calibradas a 10 μ L
- Portaobjetos
- Palillos
- Pipetas estériles
- Tubos de 12 mL
- Aceite de inmersión
- Xilol
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Plasma sanguíneo fresco
- Tinciones Gram, Azul de metileno 0.5%

- Medios de cultivo: agar sangre, agar MacConkey, manitol salado, úrea, bilis esculina
- Reactivos: rojo de metilo al 5%, alfa naftol al 5%, hidróxido de potasio al 40%, ninhidrina, hipurato de sodio
- Refrigeradora
- Incubadora
- Serófuga
- Baño maría
- Microscopio Leica
- Mecheros
- Autoclave

3.5.2. Análisis microbiológico: cultivo y pruebas de identificación

Se procedió mediante un flujograma establecido para este estudio (Anexo 3).

3.5.2.1. Medios de cultivo

Los fundamentos de cada medio de cultivo se describen en el Anexo 4.

3.5.2.1.1. Cultivo en agar sangre (5% sangre de borrego)

Los aislamientos primarios se practicaron en el mismo día de la recolección. Las muestras y los medios de agar sangre mantenidos en refrigeración, fueron colocados en el mesón durante 15 a 20 minutos a fin de que alcancen la temperatura ambiente.

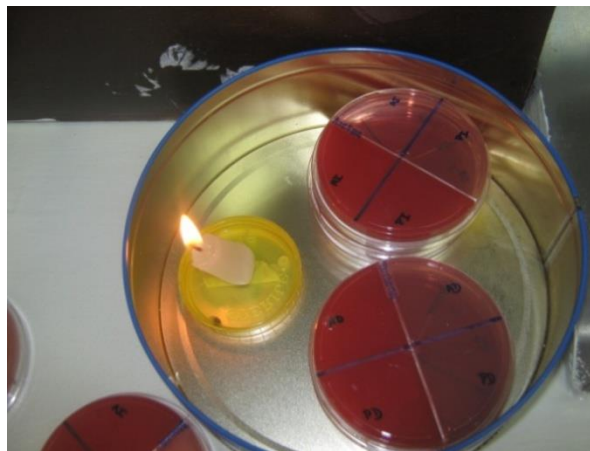
Con el asa estéril de 10 µL, se inoculó en el medio de cultivo, la muestra de leche previamente homogenizada, proveniente de los frascos estériles. Se estrió la muestra en la superficie del agar donde se realizaron pequeños cortes. Se llevó a incubar a 37°C por 24 horas en ambiente de CO₂ (Figura 3.3).

Para la interpretación se tomó en cuenta los criterios que para el efecto usa el laboratorio COLAVECO – Uruguay. (Lab. COLAVECO Uruguay, S.F.)

- Positivo: un solo germen con 2 o más UFC; dos tipos de gérmenes con más de 5 UFC por microorganismo.
- Negativo: menos de 2 UFC.
- Contaminado: 3 o más tipos de microorganismos distintos.

3.5.2.1.2. Siembra en agar MacConkey

Con el asa de 10 μ L estéril, se inoculó la muestra de leche y se estrió para obtener colonias aisladas. Se llevó a incubar a 37°C por 24 horas (Figura 3.3).



Fuente: PROAÑO, Sofía., VÁSCONEZ, Catalina.

Figura 3.3 Cultivos de leche incubados en CO₂

3.5.2.2. Pruebas de identificación

3.5.2.2.1. Catalasa

Con la ayuda de un palillo se tomó la colonia sospechosa a analizar y se colocó en un portaobjetos. Sobre el material bacteriano, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 3%

y se observó. La formación inmediata de burbujas se registró como prueba positiva (Figura 3.4).



Fuente: www.jenmicroii.blogspot.com

Figura 3.4 Prueba de catalasa con reacción positiva

3.5.2.2.2. *Coagulasa*

3.5.2.2.2.1. *Coagulasa libre (en tubo)*

En un tubo de ensayo estéril se colocó 0.5 mL de plasma fresco. Se emulsificó en el plasma una asada de la colonia a analizar. Se mezcló bien y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas. Si hay la presencia de coágulo visible, la prueba es positiva (Figura 3.5).

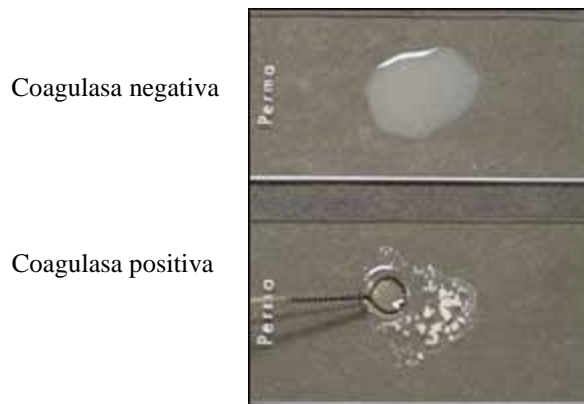


Fuente: PROAÑO, Sofía., VÁSCONEZ, Catalina.

Figura 3.5 Prueba positiva de coagulasa en tubo

3.5.2.2.2. Coagulasa conjugada (en placa)

Se preparó una suspensión gruesa y homogénea del microorganismo en solución salina estéril. Se colocó una gota de la suspensión y una gota de plasma humano en un portaobjetos se mezcló y se procedió a la rotación de la placa. Se registró como positivo cuando se observó aglutinación después de 5 a 20 segundos. (Figura 3.6).

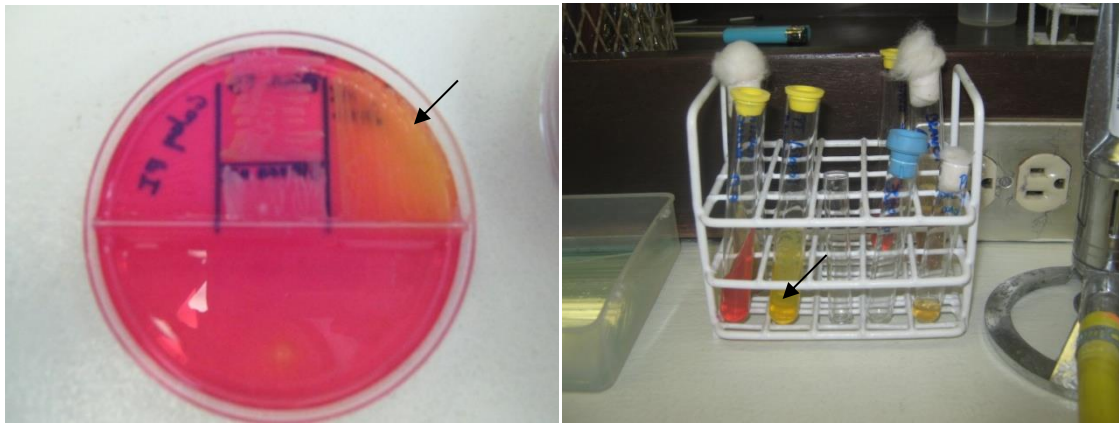


Fuente: www.quimicoclinico.wordpress.com

Figura 3.6 Pruebas de coagulasa en placa con reacción negativa y positiva

3.5.2.2.3. Hidrólisis del manitol en concentraciones de NaCl 7.5%

Con un asa estéril, se sembró la colonia a analizar en el agar manitol salado en caja y en tubo, se llevó a incubación a 37°C por 24 horas. En una misma caja se sembraron varias cepas sospechosas. En la figura, la flecha señala el resultado positivo (Figura 3.7).



Fuente: PROAÑO, Sofía., VÁSCONEZ, Catalina.

Figura 3.7 Hidrólisis del manitol en concentraciones de NaCl 7.5% con reacción positiva

3.5.2.2.4. *Hidrólisis de bilis de esculina*

Se inocularon las colonias sospechosas de *Streptococcus* grupo D, en el fondo y superficie del agar de Bilis Esculina. Se incubó aeróbicamente a 36°C por 18 horas a 24 horas (Figura 3.8) (1).

3.5.2.2.5. *Voges – Proskauer*

Se sembró la bacteria a examinarse en 1 mL de caldo Clark & Lubs. Se incubó a 35°C por 24 – 48 horas. Se agregó 0.6 mL de alfa – naftol seguidos de 0.2 mL de KOH al 40%. Se agitó suavemente el contenido del tubo y se expuso el medio a O₂ atmosférico para que se produzca la oxidación de la acetoína y así poder observar el color rojo de la reacción. Los resultados se leyeron después de 10 a 15 minutos (Figura 3.8) (2).

3.5.2.2.6. *Hidrólisis de hipurato de sodio*

Se sembró una asada llena de colonias del microorganismo a probar en un tubo que contenía 0.4 mL de hipurato de sodio al 1%, luego se incubó en baño maría por 2 horas a 37°C. Con una pipeta Pasteur, se añadió 5 – 6 gotas de ninhidrina y se incubó por 10 minutos en el mismo

baño maría. La reacción positiva se evidenció por desarrollo de color púrpura intenso (Figura 3.8) (3).

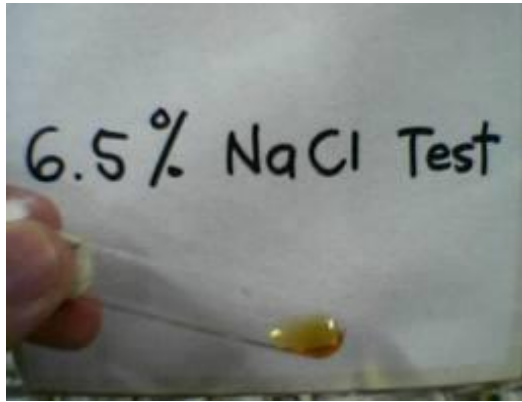


Fuente: PROAÑO, Sofía, VÁSCONEZ, Catalina.

Figura 3.8 Pruebas de hidrólisis de bilis de esculina (1), Voges – Proskauer (2) e hidrólisis de hipurato de sodio (3)

3.5.2.2.7. Tolerancia a concentraciones de 6.5% de NaCl

Se sembró las colonias sospechosas de *Enterococcus* en caldo BHI + 6.5% de NaCl. Se incubó a 36°C por 18 – 24 horas en condiciones de aerobiosis. El crecimiento se registró como positivo cuando hubo existencia de turbidez en el caldo (Figura 3.9).



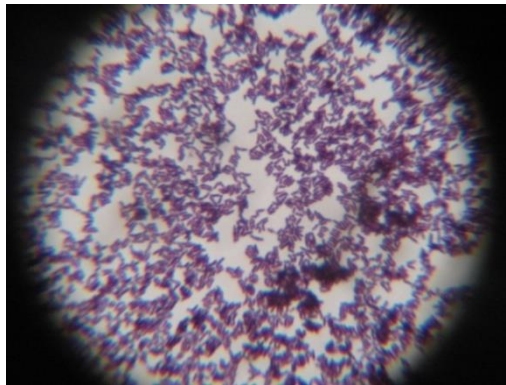
Fuente: www.feumedtechako.tripod.com

Figura 3.9 Prueba negativa de tolerancia a concentraciones de 6.5% de NaCl

3.5.3. Coloraciones

3.5.3.1. Coloración de Gram

Se realizó el frotis y se fijó con calor. Se cubrió el frotis con cristal violeta por un minuto, se desechó el colorante, se lavó con agua corriente. Se colocó la solución yodada de Gram por un minuto y se procedió a lavar delicadamente con agua corriente. Se decoloró el frotis con solución alcohol acetona (1:1) por 10 segundos. Se lavó rápidamente con agua corriente. Se cubrió el frotis con safranina por un minuto y se lavó el exceso con agua corriente. Se llevó la placa al microscopio para visualizar con el objetivo de 100x (Figura 3.10).



Fuente: PROAÑO, Sofía., VÁSCONEZ, Catalina.

Figura 3.10 Bacilos Gram positivos

3.5.3.2. Coloración azul de metileno

Se realizó el frotis y se fijó la placa con calor. Se aplicó azul de metileno por 3 minutos. Se lavó con abundante agua hasta quitar todo el exceso de colorante. Se dejó secar y se observó en el microscopio (Figura 3.11).



Fuente: www.flickr.com

Figura 3.11 *Corynebacterium* sp. con tinción azul de metileno

3.5.4. Recuento de Células Somáticas

La muestra de leche se incubó a 40°C durante 15 minutos. En una hoja de papel se dibujó un portaobjetos con las medidas reales. Dentro de este se dibujaron 2 rectángulos de 1 cm² (0.5cm x 2 cm de superficie). Se colocó un portaobjetos sobre el molde. Con el asa calibrada se tomó 10 µL de leche homogenizada y se colocó sobre el área donde aparece el rectángulo, esto es dentro del centímetro cuadrado. La misma cantidad se puso sobre el otro rectángulo. Se extendió la muestra en el área del portaobjetos equivalente al 1 cm². Se dejó secar la muestra. Posteriormente se cubrió la placa con xilol hasta su total evaporación. Se cubrió el portaobjetos con azul de metileno al 0.5% durante 5 minutos. La placa se lavó con agua corriente para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar al ambiente. (Figura 3.12)



Fuente: PROAÑO, Sofía., VÁSCONEZ, Catalina.

Figura 3.12 Placas teñidas con azul de metileno para RCS

La placa fue leída con lente de inmersión (100x). Se contó el número de células somáticas en 45 campos de cada rectángulo en un recorrido uniforme y continuo (forma de escalera). Se obtuvo la media entre los 2 frotis y luego se realizaron los cálculos para determinar el número total de células contadas, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento Total de Células} = \frac{\text{Total de células contadas}}{\text{Total de campos contados}} \times \text{Factor microscopio} = \# \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

El factor microscópico del lente 100x es de 400.000.

Para la interpretación del recuento de células somáticas, se tomó como referencia el valor de 200.000 cel/ mL (National Mastitis Council, 1999) que es un valor referido por los autores Wolter y Castaneda, 2004.

4. RESULTADOS

Se evaluaron 28 vacas criollas en lactación, cinco de las cuales se encontraban en estado de gestación. En algunas ubres, se evidenció heridas, erupciones, enrojecimiento, calor y edema (Anexos 5, Anexo 6).

4.1. Datos estadísticos

4.1.1. Mastitis detectada con cultivo bacteriológico

El 39% de vacas analizadas dio positivo para cultivo bacteriológico de acuerdo al cuadro de interpretación del Laboratorio COLAVECO de Uruguay donde indica que: para el cultivo bacteriológico, fue necesario encontrar más de 2 colonias por especie bacteriana para determinar la presencia de mastitis. Se consideró como no significativo aquellos cultivos que mostraban solo una colonia. El gráfico 4.1 muestra el porcentaje de vacas analizadas versus los resultados obtenidos en el cultivo bacteriológico.

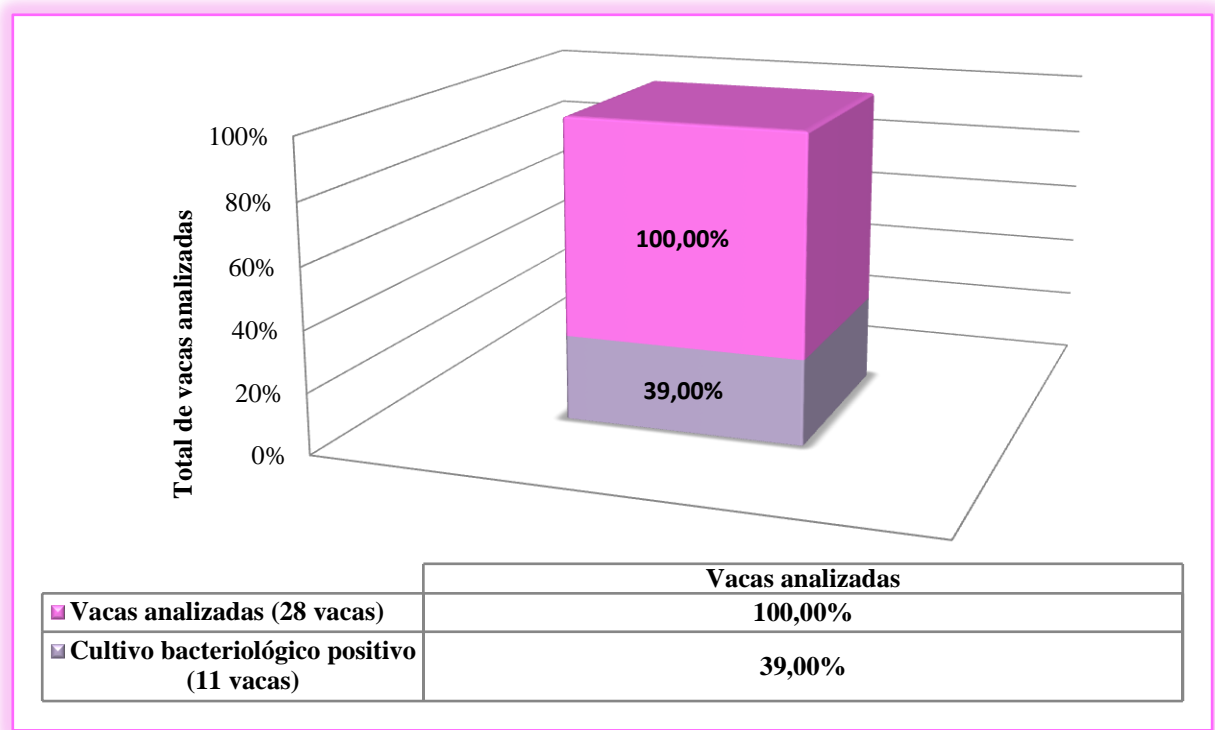


Gráfico 4.1 Mastitis detectada con cultivo bacteriológico en la comunidad de Llanos de Albas

4.1.2. Mastitis detectada con California Mastitis Test

El 21,4% de vacas dio positivo para la prueba de CMT. De acuerdo al cuadro de interpretación de CMT (Anexo 2) las muestras en cuestión dieron una positividad entre trazas y 1+. El gráfico 4.2 muestra el porcentaje de vacas analizadas versus los resultados obtenidos en la prueba de CMT.

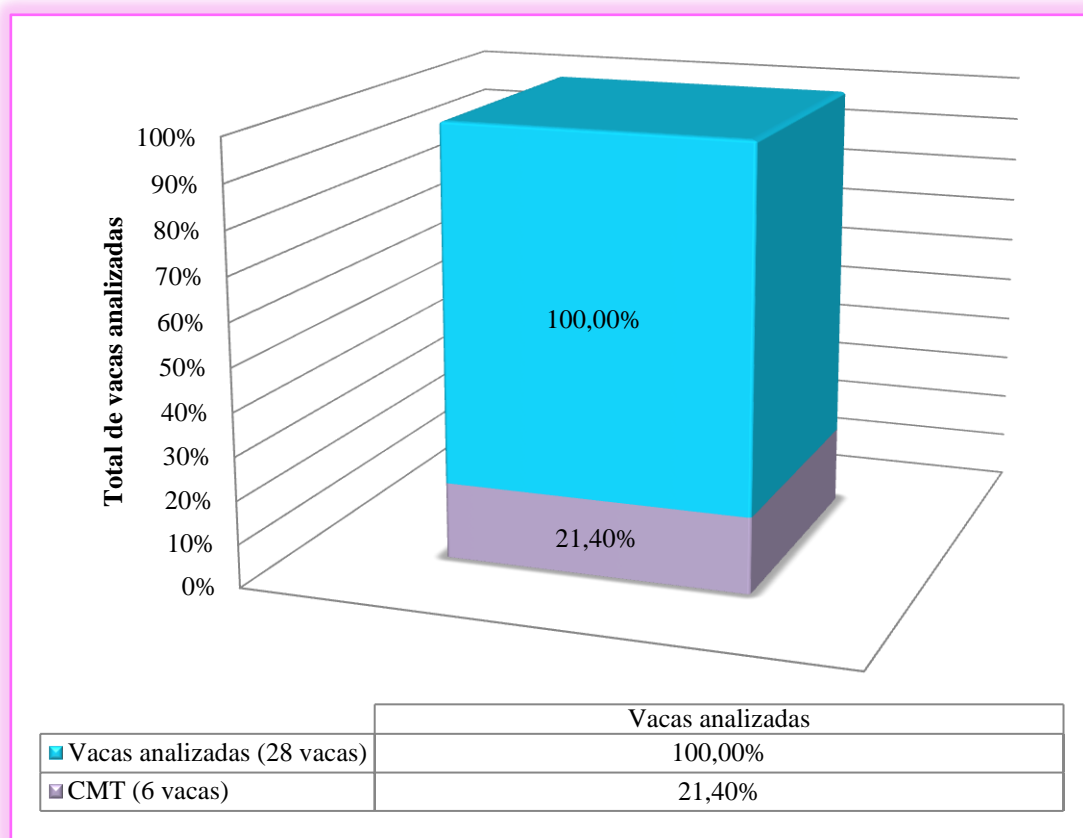


Gráfico 4.2 Mastitis detectada con California Mastitis Test en la comunidad de Llanos de Albas

4.1.3. Mastitis detectada con Recuento de Células Somáticas

En un porcentaje de 21,4% de vacas se encontró un recuento superior a 200 000 cél/mL. El gráfico 4.3 muestra el porcentaje de vacas con RCS mayor a 200000cél/mL.

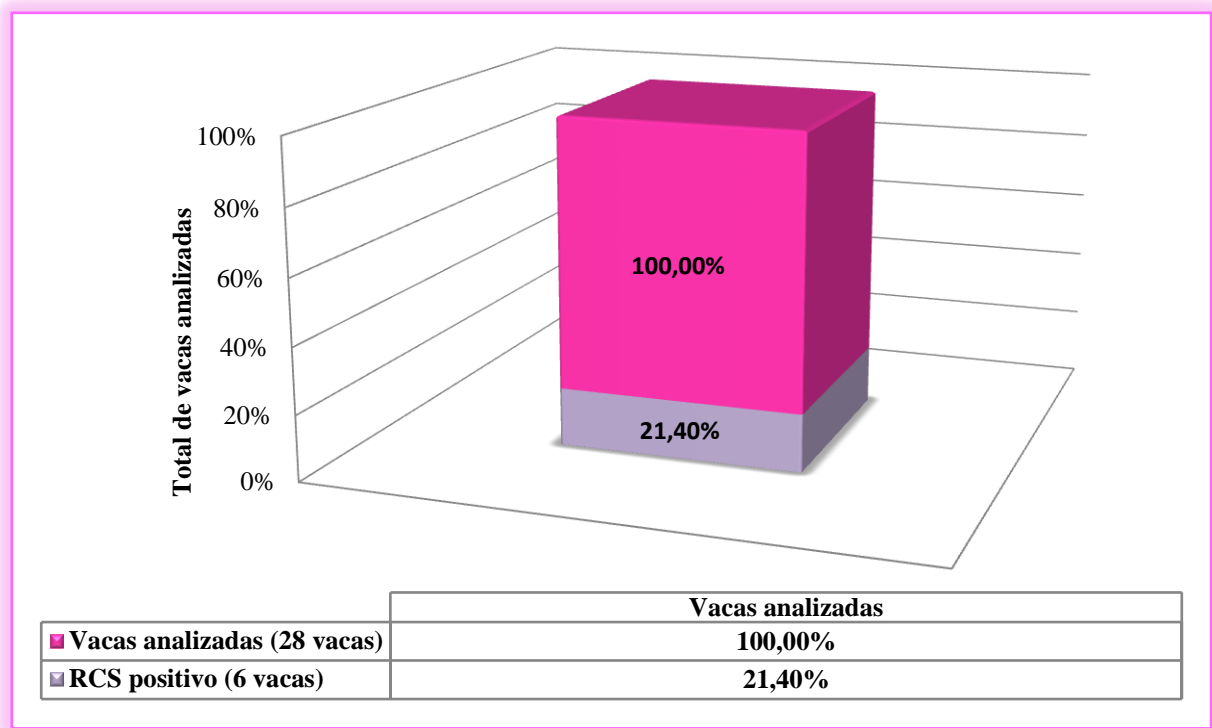


Gráfico 4.3 Mastitis detectada con Recuento de Células Somáticas en la comunidad de Llanos de Albas

4.1.4. Bacterias aisladas en las muestras de leche

En el presente estudio se encontró la presencia de *Staphylococcus aureus* en el 17,9% del total de vacas muestreadas, *Corynebacterium* spp. mostró un porcentaje igual al de *S. aureus*. *Staphylococcus coagulasa* negativa, *Streptococcus dysgalactiae* y *Arcanobacterium pyogenes* presentaron porcentajes de 3.6% cada uno (Gráfico 4.4).

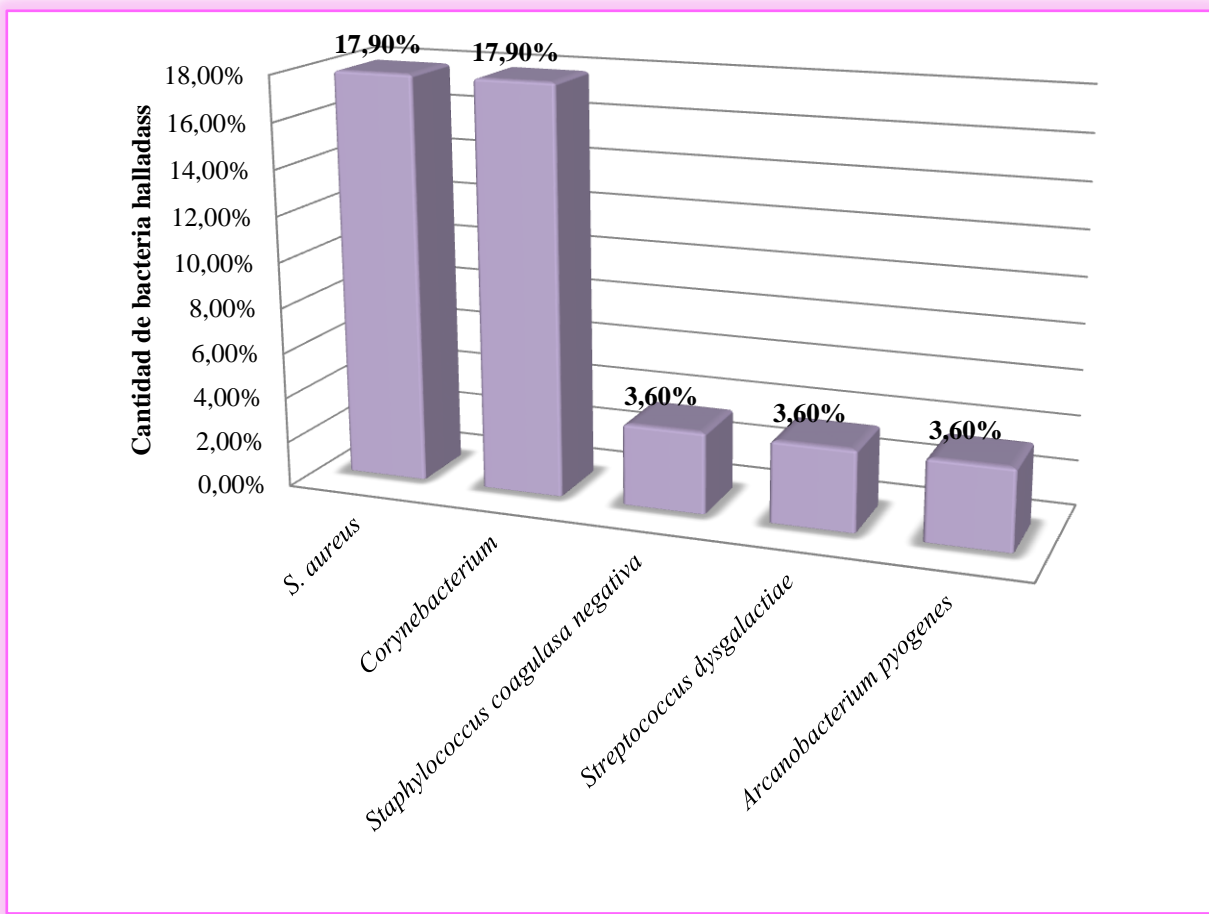


Gráfico 4.4 Bacterias aisladas en cultivo bacteriológico en la comunidad de Llanos de Albas.

4.1.5. Socialización con la comunidad

Se efectuó mediante charlas a los pobladores de LLA. En estas, se informó los resultados obtenidos en el estudio y las medidas generales de higiene que deben mantenerse durante el ordeño.

Las charlas tuvieron acogida tal como se observa en fotografías tomadas durante el transcurso de las mismas (Anexo 7).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio de prevalencia de mastitis detectada mediante cultivo bacteriológico, se encontró que el 39% de vacas estaba afectado por esta condición. Aunque se muestrearon los cuatro cuartos de cada ubre, la interpretación de los hallazgos se hizo por vaca y no por cuartos.

En términos generales, la presentación de mastitis infecciosa puede variar de una región a otra o entre fincas (Reyes, 2005). Una serie de factores inciden directa o indirectamente para la adquisición de la infección como: la raza del ganado, la aplicación de buenas prácticas ganaderas y de ordeño, el tipo de ordeño, entre otros. En la comunidad de Llanos de Albas el sistema de ordeño utilizado es manual. Es conocido que en los sistemas mecanizados se presentan más casos de mastitis que en el ordeño manual es decir que el 39% de prevalencia de mastitis encontrada en Llanos de Albas podría aumentar con un sistema mecanizado. Un estudio de mastitis realizado en Zulia – Venezuela (Faria Reyes, García, D'Pool, Valero, Allara, & Agelosante, 2005) reportó un 82.2% de mastitis para sistema mecanizado y 54.6% de mastitis para ordeño manual. En Pernambuco – Brasil (Ruiz, 2011) se reporta 57.2% de mastitis para ordeño manual y 63.3% mastitis para ordeño mecanizado.

Un estudio realizado en la provincia de Chimborazo en el 2007 (Valdivieso, 2007), mediante la prueba de CMT reporta el 73.3% de mastitis, porcentaje que se aleja notablemente del encontrado en Llanos de Albas.

Los resultados de este trabajo difieren de los obtenidos en el estudio realizado en el 2009 en la provincia de Zamora Chinchipe mediante las técnicas de CMT y cultivos bacteriológicos en el que la prevalencia de mastitis fue del 26.6% (Fierro, Chamba, Castillo, 2009) y con el estudio de Armijos y Rengel 2006, quienes usaron los mismos métodos señalados encontraron 40.89% de mastitis en el sector de Río Blanco, en la provincia de Zamora Chinchipe.

El porcentaje de 21.42% de RCS obtenido en el presente estudio es similar al porcentaje de CMT, pero más bajo que el encontrado con el cultivo bacteriológico, lo que demuestra que el cultivo bacteriológico, presentó una mayor sensibilidad que los métodos que analizaron la presencia de células involucradas en respuesta inflamatoria en la mastitis.

En cuanto a los microorganismos encontrados en el presente estudio, fueron de origen bacteriano, no hubo crecimiento de hongos ni levaduras, en cuanto a algas, el estudio no las evaluó. Este hallazgo coincide con lo que Cotrino (2007) menciona que: “más de 20 especies de bacterias, mohos y levaduras han sido reportados como causantes de mastitis, pero en nuestro medio (se refiere a Colombia) por lo menos el 99% son causados por *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Corynebacterium bovis*”.

En el presente estudio se aislaron 4 géneros de microorganismos, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Arcanobacterium*. El *Arcanobacterium* se lo toma como otro género, aunque hay otras denominaciones para este germen (*Bacillus pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes* y *Actinomyces pyogenes*).

De acuerdo al grado de inflamación que los microorganismos producen en la ubre, estos pueden ser clasificados como patógenos contagiosos mayores y menores (Valero-Leal, Valbuena, Chacón, Olivares, Castro, & Briñez, 2010). En el estudio se encontró un patógeno mayor *S. aureus*. La literatura refiere como patógenos menores a SCN y *Corynebacterium* que también se encontraron en este trabajo. La mayoría de gérmenes aislados en Llanos de Albas son contagiosos (ver pág. 10): *S. aureus*, *Corynebacterium* spp. Y *Staphylococcus* coagulasa negativa. Hay que recalcar además que, *S. aureus* y *Corynebacterium* se encontraron como los microorganismos más prevalentes (17.9% cada uno). Los microorganismos contagiosos tienen como reservorio los cuartos infectados y la diseminación se produce de vaca a vaca durante el ordeño. Los patógenos ambientales se encuentran en el medio, la transmisión se da entre ordeños por contacto de pezones y superficies contaminadas (Cotrino, 2007).

En el 98% – 99% de los casos el número de UFC encontradas por muestra en el primoaislamiento superó el valor escogido como referencia que fue de 2 UFC. Algunos autores recomiendan usar 5 UFC como parámetro, es decir aún si el parámetro seleccionado hubiera sido 5 UFC, el porcentaje de positividad del cultivo no se modificaría.

Al contrastar las prevalencias de microorganismos encontrados en este estudio con similares trabajos realizados en otros contextos geográficos del país se encuentran diferencias notables en cuanto a los porcentajes de prevalencias y unas pocas similitudes en cuanto al tipo de gérmenes encontrados lo cual es esperado, pues puede variar de región a región o de finca a finca. Un estudio realizado en la provincia de Chimborazo en el año 2007 (Valdivieso, 2007), muestra que de 38 bovinos muestreados, se aislaron los siguientes agentes causales: *Staphylococcus epidermidis* en un 45%, *Staphylococcus aureus* en un 32%, *Escherichia coli* con un porcentaje de 16% y *Bacillus sp.* en un 8%. Otro estudio realizado en diferentes haciendas de la provincia de Pichincha en el 2008 (Acuña & Rivadeneira, 2008), indica que de 141 vacas muestreadas la bacteria con mayor prevalencia fueron *Staphylococcus aureus* en un 34%, seguida por *Corynebacterium spp.* en un 21%, *Streptococcus spp* en el 16%, *Staphylococcus coagulasa negativa* en el 12%, *Staphylococcus coagulasa positiva* 5%, *Bacillus spp.* 5%, *Staphylococcus simulans* en el 1% al igual que *Staphylococcus haemolyticus* y *Bacillus cereus*. Del 4% restante no se aisló bacterias. Este último estudio tiene una coincidencia con el nuestro en los gérmenes aislados en mayor porcentaje *S. aureus* y *Corynebacterium spp.*

El presente estudio permitió considerar el siguiente presupuesto que ameritaría una comprobación posterior pero que sin embargo merece ser tomado en cuenta: las prácticas ganaderas y de ordeño inadecuadas utilizadas en la comunidad representan un constante desafío antigénico para el sistema inmune de las vacas. En general, no se observa una fuerte respuesta inflamatoria, probablemente por esta permanente exposición a microorganismos que podría estar controlado por el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo de las vacas. Otro factor interviniente en esta consideración es el tipo de animal; los pobladores acostumbran a comprar animales de la zona que se encuentran muy bien adaptados a las condiciones climáticas y geográficas del sector y por tanto son más resistentes a los agentes

infecciosos que las vacas de razas lecheras criadas en ambientes más controlados y con buen manejo.

6. CONCLUSIONES

- En este estudio el cultivo bacteriológico permitió encontrar un mayor número de casos de mastitis (39%) que las pruebas de RCS (21.4%) y CMT (21.4%), que evalúan la reacción inflamatoria asociada a la enfermedad. Los microorganismos más prevalentes fueron de tipo contagioso: *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium* sp.
- La presencia de patógenos contagiosos y ambientales determinados a través de cultivo en los bovinos analizados demuestran que las buenas prácticas ganaderas y de ordeño no son las adecuadas en la comunidad de Llanos de Albas.

7. RECOMENDACIONES

- Llanos de Albas es una comunidad indígena cuya población no tiene conocimiento sobre el manejo de buenas prácticas de ordeño, se recomienda continuar con la capacitación permanente con respecto al tema, ya que la aplicación de malas prácticas influyen en la aparición de la enfermedad.
- En vista de los resultados obtenidos, se recomienda trabajar con el cultivo como prueba determinante para establecer la presencia de mastitis en las vacas.
- Es importante que los ganaderos trabajen conjuntamente con veterinarios y laboratorios especializados para brindar un tratamiento pronto y eficaz al animal enfermo y en temas de capacitación.
- Establecer como rutina que cada determinado tiempo se realicen pruebas de campo para monitorear la presencia de mastitis en el hato.
- El estudio realizado en Llanos de Albas debería aplicarse a las comunidades aledañas ya que el centro de acopio de la leche se surte con el aporte del producto de otras comunidades de Pesillo.
- En el país hay muchas comunidades de escasos recursos que podrían tener este tipo de problema y por su situación económica no tienen acceso a pruebas diagnósticas, las charlas informativas y la capacitación podrían ser importantes medidas de prevención, con beneficios para el productor y el consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña, V., & Rivadeneira, A. (2008). *Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha*. Quito.

AGROVIT GESTIÓN AGROPECUARIA. (2004). *AGROVIT*. Recuperado el 9 de Marzo de 2011, de http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009en.htm

Andersen, H. (5 de Agosto de 2008). *Scribd*. Recuperado el 14 de Abril de 2012, de <http://es.scribd.com/doc/45361903/19/Capitulo-3-4-Mastitis>

Agrovit.com. (S.F.). Mastitis: Enfermedad y Transmisión. Recuperado el 5 de Febrero de 2013, de http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009en.htm

Agüero, H. (2011). *Mastitis del bovino*. Recuperado el 13 de Marzo de 2013, de https://www.u-cursos.cl/veterinaria/2011/1/FU17/1/material_docente/bajar?id_material=579277

Andrade, N., Cáceres, A., Mazón, C., & Silva, V. (2010). *Análisis socioeconómico comunidad Llanos de Albas*. PUCE, Facultad de Economía Y Escuela de Lenguas Aplicadas a los Negocios y Relaciones Internacionales.

Araínga, M., Sandoval, N., Zacarías, E., & Rivera, H. (2003). *Actinomyces pyogenes Causante de aborto en bovinos*. Recuperado el 5 de Febrero de 2013, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v14n1/a16v14n1.pdf>

Arriagada, E. (S.F). Patología Inflamación.

Andresen, H. (2001). *Rev Inv Perú*. Recuperado el 14 de Abril de 2012, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf>

Breid. (8 de Mayo de 2009). *Slideshare*. Recuperado el 2 de Octubre de 2012, de <http://www.slideshare.net/breid/pruebas-bioquimicas-y-medios-de-cultivo-en-bacterias>

Callejo Ramos, A. (S.F.). *Open Course Ware*. Recuperado en Junio de 2011, de http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordenomecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-orden

Cano, P. (2004). *BOVINOTECNIA*. Recuperado en Marzo de 2011, de Boletín técnico virtual México: www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgCliC004.htm.

Casatañeda, V., Kloppert, B., Wolter, W., & Zschoesck, M. (S.F.). *Instituto Estatal de Investigaciones Hesse*. Recuperado en Marzo de 2011, de <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2002/912/pdf/p020003.pdf>

Chaves, Javier; Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA; Lactodiagnóstico del sur SRL; Comisión Directiva de APROCAL;. (S.F.). Recuperado en Abril de 2011, de http://www.icaarg.com.ar/images/archivos/Calidad_%20de_%20Leche_%20y_%20Mastitis_%20Bovina.PDF

Concha, C. (Agosto de 2010). *Perspectivas de estimulación de la respuesta inmune de la glándula mamaria bovina*. Recuperado el 13 de Marzo de 2013, de <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/perspectivas.htm.pdf>

Contero, R. (2008). *La Granja*. Recuperado el 1 Febrero de 2011, de La Granja.

Contero, R. (2008). *La Granja*. Recuperado el 18 enero de 2011, de La Granja: http://lagranja.ups.edu.ec/documents/1317427/1369624/05calidad_leche7.pdf

Cotrino, V. (2007). Recuperado en Junio de 2012, de <http://lmvltada.com/index.php?section=30>

Egas, J. (S.F.). *Manual de laboratorio de Bacteriología I*. Quito.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM. (S.F.). *Enciclopedia Bovina*. Recuperado el 24 Enero de 2011, de Enciclopedia Bovina: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04MastitisBovina.pdf

Faria Reyes, J., García, A., D'Pool, G., Valero, K., Allara, M., & Agelosante, G. (2005). Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. *Revista Científica*, XV (002), 109-118.

Fierro, N., & Chamba & Castillo, D. (23 de 12 de 2009). *Ergonomix*. Recuperado el Octubre de 2012, de <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/articulos/preparacion-utilizacion-nosode-como-t2785/165-p0.htm>

Figuroa, M., Acevedo, O., Chavarría, M., Fonseca, E., Mendoza, L., Moya, F., y otros. (1984). Recuperado en Enero de 2013, de <http://books.google.com.ec/books?id=rftbdNOg1dIC&pg=PA208&lpg=PA208&dq=prueba+d e+whiteside&source=bl&ots=s5jce2JW8v&sig=1JnJuQwz3pzc0tUhOzXRPU-e0Y&hl=es&sa=X&ei=RTUTUdChE4ju9ATsmIHw&ved=0CDcQ6AEwAQ#v=onepage&q=prueba%20de%20whiteside&f=false>

García, D. (2006). *México: ACD*. (ACD, Ed.) Recuperado en Junio de 2012, de <http://issuu.com/hitsoft/docs/alternativas?mode=window&pageNumber=1>

Gómez, N. (2008). *Pontificia Universidad Javeriana*. Recuperado en Agosto de 2012, de www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis216.pdf

Grupo Asesor Control de Infecciones y Epidemiología. (S.F.). *CODEINEP*. Recuperado el 17 de Mayo de 2012, de http://www.codeinep.org/control/BACTERIAS_GRAM.pdf

Hernández, M. (S.F.). Proyecto de apoyo a la industria láctea artesanal. (Paila).

Higuera, E. (2006). *Práctica relacionada con la toma y procesamiento adecuado de una muestra de leche mastítica*. Recuperado en Marzo de 2013, de <http://es.scribd.com/doc/35264425/Pca-Mastitis-Bovina-2006>

Irigoyen, D. (Intérprete). (S.F.). Lab. COLAVECO Uruguay. Recuperado en Enero de 2013, de <http://www.colaveco.com/colaveco/index.php>

Koneman, E., Winn, W., Allen, S., Janda, W., Procop, G., Schreckenberger, P., y otros. (2008). *Koneman Diagnóstico microbiológico* (6ta edición ed.). Buenos aires: Editorial Médica Panamericana S.A.

LACTOGANDOLFO. (S.F.). *GANDOLFO*. Recuperado en Enero de 2013, de http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CEEQFjAC&url=http%3A%2F%2Fmedia.wix.com%2Fugd%2Fab6c77_ea08c829b2002bf1ad7d075910fa3435.pdf%3Fdn%3Dsomaticell%2B-%2Bficha%2Btecnica%2B-%2BLactogandolfo.pdf&ei=1jUTUZmDLoa69gT09IGYCA&us

Lucas, V., & Lucas, M. (2011). *Control de mastitis en vacas frescas*. Recuperado el 13 de Marzo de 2013, de http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/62-control_frescas.pdf

Martinez. (Agosto de 1996). *Slideshare*. Recuperado en Octubre de 2012, de http://www.slideshare.net/reyeselio/mastitis-9141007?fb_action_ids=10151355251921189&fb_action_types=slideshare%3Aview&fb_source=aggregation&fb_aggregation_id=10150872971651587

Meglia, G., & Mata, H. (2001). Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche.

Monardes, H., & Barria, N. (1995). *Recuento de células somáticas y mastitis*. Recuperado en Febrero de 2013, de <http://www.tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/5141/5024>

National Mastitis Council. (1999). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Estados Unidos.
Navarro, C. (S.F.). Mastitis bovina causada por ECN.

Negri, L. (2005). *El pH y la acidez de la leche*. Recuperado en Marzo de 2013, de <http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/pH-y-acidez-en-leche2.pdf>

Orellana, C., & Cruz, P. (2005). Recuperado en Octubre de 2012, de http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/ORELLANA%20ALEX-20101028-180344.pdf

Pinzón, J. (1989). *FONAIAP DIVULGA*. Recuperado el 24 de Marzo de 2011, de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd31/texto/mastitis.htm

Quiroga, G. (S.F.). *Scribd*. Recuperado el 19 de Febrero de 2013, de <http://es.scribd.com/doc/37589649/Estafilococos-Coagulasa-Negativa>

Ramirez, N. (Mayo de 2011). Mastitis, la enfermedad más costosa en la granja lechera. Prevenir es la clave del éxito. Antioquia, Colombia.

Ramirez, N., Gaviria, G., Arroyave, O., Sierra, B., AEA, & Benjumea, J. (18 de enero de 2001). *Revista colombiana de Ciencias Pecuarias*. Recuperado en Enero de 2011, de Revista colombiana de Ciencias Pecuarias: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/19>

Ramírez, N., Palacio, L., Cerón, J., & Jaramillo, M. (Mayo de 2011). *Universidad de Antioquia*. Recuperado el 22 de Mayo de 2012, de <http://issuu.com/oficiografico/docs/mastitis?mode=window&pageNumber=1>

REDVET. (2007). *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria*. Recuperado en Enero de 2011, de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>

REDVET. (2008). *REDVET Revista electrónica de veterinaria*. Recuperado en Enero de 2011, de REDVET Revista electrónica de veterinaria: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>

REDVET. (Agosto de 2008). *Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de leche*. Recuperado en Febrero de 2013, de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090908/090904.pdf>

Regueiro, M. (2009). *Departamento de Producción Animal y Pasturas*. Recuperado el 17 de Junio de 2011, de <http://cursoafa2009.webs.com/ANATOMIA%20DE%20LA%20GLANDULA%20MAMARIA.pdf>

Ruiz, A. (2011). *Prevalencia e mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil*. Recuperado en Marzo de 2013, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2011000100009&script=sci_abstract

Ruiz, A., Ponce, P., Gomes, G., Mota, R., Sampaio, E., Lucena, E., y otros. (Abril de 2011). *SCIELO Revista de Salud Animal*. Recuperado en Enero de 2013, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2011000100009&script=sci_arttext

Saran, A. (1986). *Instituto Veterinario Kimron*. Recuperado en Agosto de 2011, de <http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/MASTITISBOBINAISR AEL.pdf>

Tirante, L. (Noviembre de 2006). *Diagnóstico bacteriológico de mastitis bovina*. Recuperado en Marzo de 2013, de http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/Diagnostico_Bacteriologico_Tirante.pdf

Universidad de Salamanca. (S.F.). Recuperado en Octubre de 2012, de <http://imb.usal.es/Practicas2/P2/Practicas2.pdf>

Valdivieso, K. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de nano plata sobre mastitis subclínica bovina en la unidad productiva Tunshi*. Riobamba.

Valero-Leal, K., Valbuena, E., Chacón, F., Olivares, Y., Castro, G., & Briñez, W. (Enero de 2010). *Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado de Zulia*. Recuperado en Febrero de 2013, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000500008

Varela, B. (2002). Recuperado en Marzo de 2012, de http://www.mastitis.com.ar/view_nota.php?id_nota=773&id_etapa=6&id_tema=86

Wolter, W., Castañeda, V., & Kloppert, B. (2004). *LA MASTITIS BOVINA*. Recuperado en Febrero de 2013

ANEXOS

Anexo 1: FORMULARIO PARA LA RECOLECCION DE MUESTRAS

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA

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

Nombre del propietario:

Fecha de recolección:

Nombre de la vaca:

Edad de la vaca:

No. de terneros vivos:

de lactación ()

Litros diarios:

Disminución de leche

SI () NO ()

Lugar de pernoctación:

Establo ()

Campo abierto ()

Otro ()

Cambios físicos de la ubre:

Cambios Físicos de la Leche:

Si ()

No ()

Hora de recolección de la Leche:

Antes del ordeño ()

Después del ordeño ()

CMT:

Posterior Derecho:

Anterior Derecho:

Posterior Izquierdo:

Anterior Izquierdo:

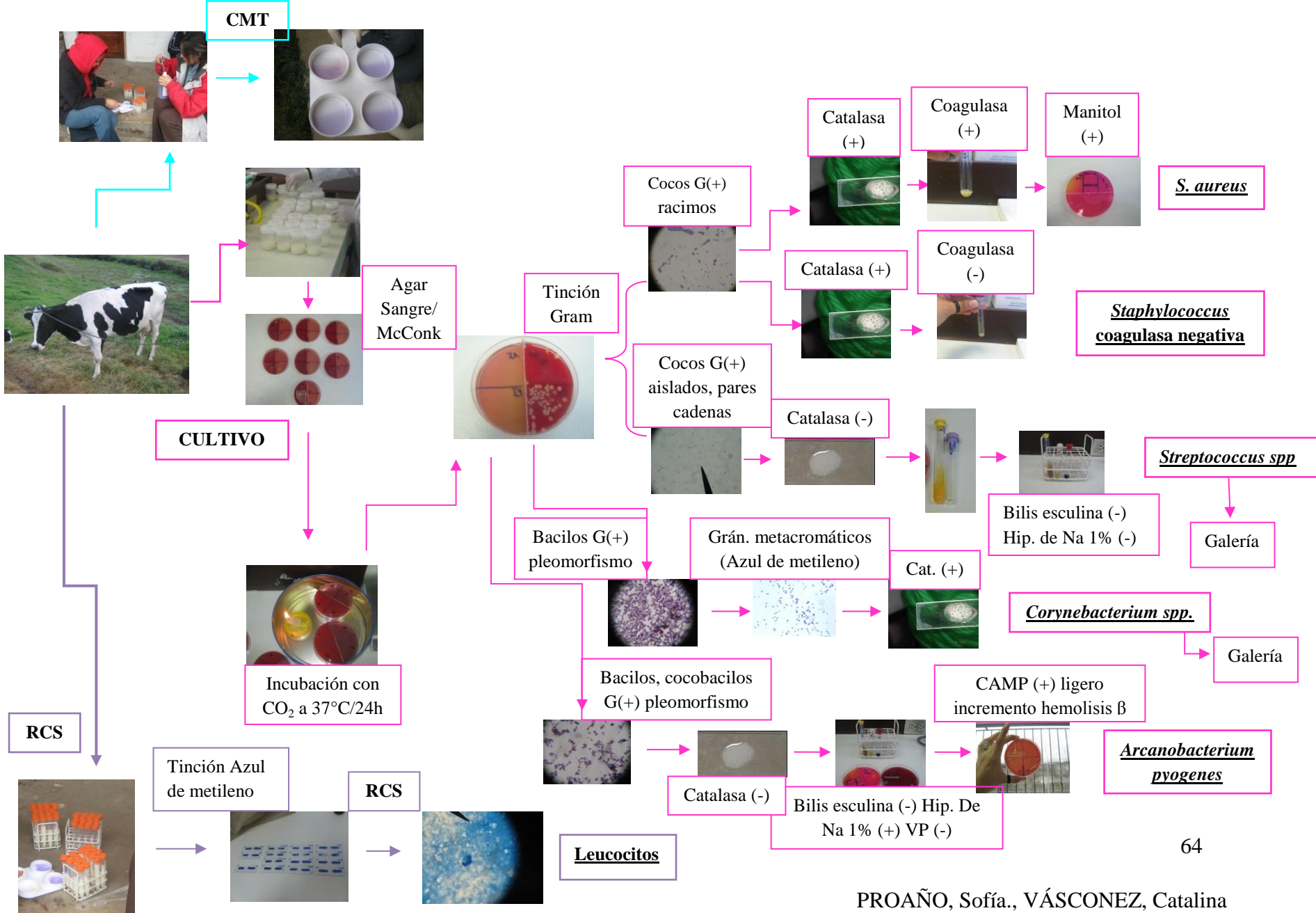
Anexo 2: Cuadro de interpretación del CMT

Relaciones entre el Conteo de Células Somáticas y Reacciones de CMT:

CMT	RCS/ml
-	0-200.000
Trazas	150.000-500.000
1	400.000-1.500.000
2	800.000-5.000.000
3	mayor que 5.000.000

Fuente: (Monardes & Barria, 1995).

Anexo 3: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTOS



Anexo 4: DIAGNÓSTICO POR E

Pruebas de laboratorio para la detección de mastitis:

Fundamentos:

- **Agar Sangre:**

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agregado de sangre al medio de cultivo, en concentración final de 5% al 10%, aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano, y permite detectar hemólisis (Breid, 2009).

- **Agar MacConkey:**

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la biota Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje de color del indicador de pH rojo neutro. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras (Breid, 2009).

- **Catalasa:**

La catalasa es una enzima (hemoproteína) que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Esta enzima cataliza la rotura del agua oxigenada, liberando oxígeno libre (Egas, S.F.).

- **Manitol salado:**

Se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. *Staphylococcus* coagulasa positiva hidroliza el manitol acidificando el medio, las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. *Staphylococcus* coagulasa negativos, presentan colonias

rodeadas de una zona roja o púrpura. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El manitol es el hidrato de carbono fermentable en cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la biota acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH. Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH de color rojo a amarillo. *Staphylococcus aureus* crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol. *Staphylococcus coagulasa* positiva fermentan el manitol y se visualiza colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color. Las *Staphylococcus spp.* que no fermenta el manitol, se visualiza como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura (Breid, 2009).

- **Hipurato de sodio:**

Streptococcus beta hemolítico grupo B posee la enzima hipuricasa hidrolasa, que tiene la capacidad de hidrolizar el hipurato de sodio con la formación de benzoato de sodio y glicina. La presencia de glicina (compuesto alfa amino) se detecta al añadir ninhidrina que es un oxidante fuerte que deamina los grupos alfa amino con liberación de NH_3 y CO_2 . El NH_3 liberado reacciona con la ninhidrina para formar una solución de color púrpura (Egas, S.F.).

- **Voges – Proskauer:**

Esta prueba se basa en la conversión del acetyl-metilcarbinol (acetoína) en diacetilo a través de la acción de hidróxido de sodio y oxígeno atmosférico. El diacetilo se convierte en un complejo rojo bajo la acción catalítica de α -naftol y creatina. La formación de acetoína y butilenglicol es una vía alternativa para el metabolismo del ácido pirúvico. Las bacterias que utilizan esta vía producen solo pequeñas cantidades de ácidos mixtos que pueden ser insuficientes para descender el pH del medio de rojo de metilo lo suficiente como para producir un cambio de color (Koneman, y otros, 2008).

- **Hidrólisis de bilis esculina:**

La esculina es un glucósido que por acción de la enzima (β glucosidasa) de *Streptococcus* grupo D, y *Listeria monocytogenes* se descompone en esculetina y glucosa. La esculetina reacciona con las sales de hierro presentes en el medio de cultivo para formar un compuesto fenólico negro o café oscuro. Citrato férrico (0.05%) se incorpora al medio de cultivo de bilis esculina como el indicador de la hidrólisis de la esculina y la formación de esculetina (Egas, S.F.).

- **Coloración Azul de metileno:**

Permite teñir el interior celular. Tiñe microorganismos procarióticos (vivos o muertos). Los eucarióticos sólo se tiñen si están muertos. Algunas estructuras, como los corpúsculos metacromáticos, se tiñen más intensamente con este colorante que el resto de la célula (Universidad de Salamanca, S.F.).

- **Coloración Gram:**

Permite diferenciar a las bacterias en 2 grupos: Gram positivas que retienen el primer colorante utilizado, cristal violeta, porque la pared, de estas bacterias es menos permeable y resiste la decoloración de las Gram negativas, bacterias que tienen una pared celular más permeable, se decoloran y se tiñen con el segundo colorante, safranina (Egas, S.F.). Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa capa de peptidoglucano, además de dos clases de ácidos teicoicos: ácido lipoteicoico y el ácido. La capa de peptidoglucano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a la membrana plasmática exterior por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior (proteína, fosfolípido y lipopolisacárido) por lipoproteínas. Las bacterias se tiñen diferencialmente debido al peptidoglucano, ya que es el material que confiere rigidez a la pared celular bacteriana, las Gram positivas lo poseen en mayor proporción que las Gram negativas. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración es porque la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos (alcohol/acetona), la capa de peptidoglucano es delgada y no retiene el complejo de cristal violeta/yodo, perdiendo la coloración azul-violácea. Las Gram positivas poseen una pared celular más resistente y con

mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea (Scribd, S.F.).

Anexo 5: FOTOGRAFÍAS TOMADAS EN LA COMUNIDAD DE LLANOS DE ALBAS DE VACAS QUE TIENEN PEZONES NORMALES Y LESIONADOS



Fotografía 1

Pezón normal.



Fotografía 2

Pezón lacerado.



Fotografía 3

Pezones con grandes laceraciones producidas por cercas electrificadas.



Fotografía 4

Ubres inflamadas, eritematosas con pequeñas laceraciones, con dolor ante la palpación y durante la toma de la muestra de leche.

Anexo 6: RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANÁLISIS PARA DETECCIÓN DE MASTITIS EN LA COMUNIDAD DE LLANOS DE ALBAS

NOMBRE VACA	N° TERNEROS VIVOS	GESTACIÓN, POST PARTO LACTANCIA	CMT	CULTIVO	N° UFC	RCS	MASTITIS (Cultivo)
Olga	4	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: <i>S. aureus</i> PI: Neg	AD: No crecmto. PD: No crecmto. AI: 5 UFC PI: No crecmto.	AD: 16000 cél/mL PD: 22000 cél/mL AI: 53000 cél/mL PI: 22000 cél/mL	SI
Morena	1	Gestación	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmto. PD: No crecmto. AI: No crecmto. PI: No crecmto.	AD: 31000 cél/mL PD: 31000 cél/mL AI: 8000 cél/mL PI: 22000 cél/mL	-
Longa	2	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: <i>Corynebacterium</i> PD: <i>Corynebacterium</i> AI: Neg PI: Neg	AD: 32 UFC PD: 20 UFC AI: No crecmto. PI: No crecmto.	AD: 80000 cél/mL PD: 36000 cél/mL AI: 68000 cél/mL PI: 28000 cél/mL	SI
Blanca	4	Post parto (5 días)	AD: Pos (Trazas) PD: Neg AI: Pos (Trazas) PI: Pos (Trazas)	AD: (N.S.) PD: SCN; <i>Streptococcus</i> AI: SCN PI: Neg	AD: 1 UFC PD: 16 UFC; 14 UFC AI: 2 UFC PI: No crecmto.	AD: 80000 cél/mL PD: 80000 cél/mL AI: 80000 cél/mL PI: 80000 cél/mL	SI

Lola	SD	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: <i>Corynebacterium</i> AI: <i>Corynebacterium</i> PI: <i>Corynebacterium</i>	AD: No crecmtó. PD: 40 UFC AI: 13 UFC PI: 30 UFC	AD: 68000 cél/mL PD: 144000 cél/mL AI: 160000 cél/mL PI: 56000 cél/mL	SI
Fortuna (Marcelina)	1	Post parto (7 días)	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: SCN AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: 1 UFC (N.S.) AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 92000 cél/mL PD: 2184000 cél/mL AI: 84000 cél/mL PI: 140000 cél/mL	-
Rosita	10	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: <i>Corynebacterium</i> PD: <i>Corynebacterium</i> AI: <i>Corynebacterium</i> PI: <i>Corynebacterium</i>	AD: 70 UFC PD: 34 UFC AI: 20 UFC PI: 30 UFC	AD: 604000 cél/mL PD: 32000 cél/mL AI: 68000 cél/mL PI: 16000 cél/mL	SI
Canela	1	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 24000 cél/mL PD: 24000 cél/mL AI: 108000 cél/mL PI: 72000 cél/mL	-
Alejandrina	1	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: <i>S. aureus</i> PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: 1 UFC (N.S.) PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 36000 cél/mL PD: 72000 cél/mL AI: 28000 cél/mL PI: 52000 cél/mL	NO
Avelina	1	Post parto (1 día)	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 68000 cél/mL PD: 56000 cél/mL AI: 92000 cél/mL PI: 72000 cél/mL	-
Chimbiña	2	Lactancia	AD: Neg PD: Neg	AD: Neg PD: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó.	AD: 24000 cél/mL PD: 36000 cél/mL	-

			AI: Neg PI: Neg	AI: Neg PI: Neg	AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AI: 36000 cél/mL PI: 24000 cél/mL	
Vieja	5	Lactancia	AD: Neg PD: Pos (1+) AI: Neg PI: Pos	AD: Neg PD: <i>S. aureus</i> AI: Neg PI: <i>S. aureus</i>	AD: No crecmtó. PD: 47 UFC AI: No crecmtó. PI: 50 UFC	AD: 12000 cél/mL PD: 320000 cél/mL AI: 4000 cél/mL PI: 324000 cél/mL	SI
Flor	4	Lactancia	AD: Pos (Trazas) PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: 2 UFC distintas (N.S.) PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 156000 cél/mL PD: 84000 cél/mL AI: 36000 cél/mL PI: 80000 cél/mL	-
Carmelina	4	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 24000 cél/mL PD: 80000 cél/mL AI: 12000 cél/ml PI: 16000 cél/mL	-
Gringa	1	Gestación	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 40000 cél/mL PD: 24000 cél/mL AI: 24000 cél/mL PI: 32000 cél/mL	-
Celia	1	Gestación	AD: Pos (Trazas) PD: Pos AI: Neg PI: Pos	AD: <i>S. aureus</i> PD: Neg AI: <i>S. aureus</i> PI: Neg	AD: 3 UFC PD: No crecmtó. AI: 5 UFC PI: No crecmtó.	AD: 40000 cél/mL PD: 92000 cél/mL AI: 92000 cél/mL PI: 152000 cél/mL	SI
			AD: Neg	AD: Neg	AD: No crecmtó.	AD: 96000 cél/mL	

Fortuna	SD	Lactancia	PD: Neg AI: Neg PI: Neg	PD: Neg AI: Neg PI: Neg	PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	PD: 60000 cél/mL AI: 124000 cél/mL PI: 140000 cél/ mL	NO
Esperanza	1	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: <i>S. aureus</i>	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: 7 UFC	AD: 12000 cél/mL PD: 8000 cél/mL AI: 16000 cél/mL PI: 24000 cél/mL	SI
Linda	3	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 8000 cél/mL PD: 24000 cél/mL AI: 16000 cél/mL PI: 40000 cél/mL	-
Martina	SD	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 16000 cél/mL PD: 44000 cél/mL AI: 16000 cél/mL PI: 8000 cél/mL	-
Gaby	1	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: <i>Arcanobacterium pyogenes</i> PI: <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: 4 UFC PI: 66 UFC	AD: 8000 cél/mL PD: 8000 cél/mL AI: 24000 cél/mL PI: 84000 cél/mL	SI
Dominga	1	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmtó. PD: No crecmtó. AI: No crecmtó. PI: No crecmtó.	AD: 44000 cél/mL PD: 13000 cél/mL AI: 22000 cél/mL PI: 13000 cél/mL	-
			AD: Pos(1+)	AD: <i>Corynebacterium</i>	AD: 7 UFC	AD: 288000 cél/mL	

Ibarreña	3	Gestación	PD: Pos (1+) AI: Pos (Trazas) PI: Pos (1+)	PD: <i>Corynebacterium</i> AI: <i>Corynebacterium</i> PI: <i>Corynebacterium</i>	PD: 60 UFC AI: 33 UFC PI: 6 UFC	PD: 431000 cél/mL AI: 115000 cél/mL PI: 324000 cél/mL	SI
Salvadora	SD	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmto. PD: No crecmto. AI: No crecmto. PI: No crecmto.	AD: 48000 cél/mL PD: 8000 cél/mL AI: 44000 cél/mL PI: 36000 cél/mL	-
Fichola	4	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: <i>S. aureus</i> AI: <i>Corynebacterium</i> PI: Neg	AD: No crecmto. PD: 7 UFC AI: 15 UFC PI: No crecmto.	AD: 48000 cél/mL PD: 266000 cél/mL AI: 24000 cél/mL PI: 8000 cél/mL	SI
Catita	1	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmto. PD: No crecmto. AI: No crecmto. PI: No crecmto.	AD: 8000 cél/mL PD: 16000 cél/mL AI: 8000 cél/mL PI: 8000 cél/mL	-
Sofita	1	Lactancia	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmto. PD: No crecmto. AI: No crecmto. PI: No crecmto.	AD: 8000 cél/mL PD: 16000 cél/mL AI: 8000 cél/mL PI: 24000 cél/mL	-
Esperanza	6	Gestación	AD: Neg PD: Pos (1+) AI: Neg PI: Pos (1+)	AD: Neg PD: Neg AI: Neg PI: Neg	AD: No crecmto. PD: No crecmto. AI: No crecmto. PI: No crecmto.	AD: 8000 cél/mL PD: 764000 cél/mL AI: 8000 cél/mL PI: 936000 cél/mL	-

lave de lectura	Cultivo	RCS	CMT
AD: Anterior Derecho	Para el cultivo bacteriológico, fue necesario encontrar más de 2 colonias por especie bacteriana para determinar la presencia de mastitis. Se consideró como no significativo aquellos cultivos que mostraban solo una colonia.	El valor de referencia de RCS usado (National Mastitis Council, 1999) para considerar la presencia de mastitis es de 200.000cél/mL.	Ver anexo 5.
PD: Posterior Derecho			
AI: Anterior Izquierdo			
PI: Posterior Izquierdo			
SCN: <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa			
SD: Se desconoce cuántas crías tuvo			
(N.S.): No significativo			
No crecmto.: No crecimiento			
-: No hay presencia de mastitis			

**Anexo 7: FOTOGRAFÍAS TOMADAS DURANTE LAS SOCIALIZACIONES CON
LOS POBLADORES DE LA COMUNIDAD DE LLANOS DE ALBAS**



**Figura 4.1 Socialización con el grupo de propietarios cuyas vacas entraron en el estudio.
Comunidad de Llanos de Albas sobre medidas preventivas de mastitis**



Figura 4.2 Socialización sobre normas de prevención de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas.



Figura 4.3 Socialización sobre normas de prevención de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas.



Figura 4.4 Socialización sobre normas de prevención de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas.



Figura 4.5 Socialización sobre normas de prevención de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas.



Figura 4.6 Socialización sobre normas de prevención de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas.



Figura 4.7 Socialización sobre normas de prevención de mastitis en la comunidad de Llanos de Albas.