

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LOS
MICROORGANISMOS AISLADOS EN CASOS DE MASTITIS CLÍNICA
EN UNA EXPLOTACIÓN LECHERA**

MARÍA RAQUEL LÓPEZ CALDERÓN

GUATEMALA, MAYO DE 2008

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LOS
MICROORGANISMOS AISLADOS EN CASOS DE MASTITIS CLÍNICA
EN UNA EXPLOTACIÓN LECHERA**



MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, MAYO DE 2008

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	Lic. Zoot. Marco Vinicio de la Rosa Montepeque.
SECRETARIO	Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina.
VOCAL I	Med. Vet. Yeri Edgardo Véliz Porras.
VOCAL II	Med.Vet. Fredy Rolando González Guerrero.
VOCAL III	Med. Vet. Edgar Bailey Vargas.
VOCAL IV	Br. José Abraham Ramírez Chang.
VOCAL V	Br. José Antonio Motta Fuentes.

ASESORES

Med. Vet. Virginia Bolaños de Corzo.
Med. Vet. Fredy Rolando González Guerrero.
Med. Vet. Jaime Méndez Sosa.

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

**EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA,
PRESENTO A CONSIDERACIÓN DE USTEDES EL TRABAJO DE TESIS
TITULADO:**

**EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LOS
MICROORGANISMOS AISLADOS EN CASOS DE MASTITIS CLÍNICA EN
UNA EXPLOTACIÓN LECHERA**

**Que fuera aprobado por la Junta Directiva de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Como requisito previo a optar el título profesional de

MÉDICA VETERINARIA

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Todopoderoso, por darme la luz, ser mi guía, darme paciencia, sabiduría y fortaleza en todo momento.

A MIS ABUELOS: José Augusto López Chavarría (Q.E.P.D).
Raquel Arévalo Santizo (Q.E.P.D).
María Morales de Calderón.
Manuel Antonio de Jesús Calderón Moscoso.

Por estar conmigo siempre formando parte importante de mi vida y por sus sabios consejos. Mama Raque, yo se que desde arriba tengo su bendición.

A MIS PADRES: José Antonio López Arévalo y Guillermina Calderón de López. Por ser mis héroes, mi ejemplo a seguir, los amo con todo mi corazón.

A MI HERMANO: José Augusto López Calderón. Por inspirarme a seguir adelante, por ser un hermano ejemplar, por disfrutar cada momento de nuestras vidas y por toda la confianza que existe entre nosotros. Te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A MIS TIOS Y PRIMOS: Por darme su cariño y estar ahí siempre. En especial a la Familia López Mayorga por ser mi segunda familia y brindarme su apoyo y confianza.

A MIS ASESORES: Por ayudarme a culminar este logro.

A MIS AMIGOS: Por estar conmigo y demostrarme su cariño en todo momento: Analfi Fuentes, Gaby Franco, Cristina Asturias, Silvia Guirola, Alejandro Hun, Susana Berganza y a todos que de una u otra forma estuvieron cuando los necesité.

A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCIÓN: Por compartir momentos inolvidables y tener el gusto de conocerlos. Les deseo éxitos.

A RODRIGO QUINTO: Por su amor, cariño, comprensión, apoyo y ser una persona muy especial en mi vida.

A todos muchas gracias.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. General	2
2.2. Específicos	2
III. REVISION DE LITERATURA	3
3.1. Mastitis	3
3.1.1. Definición	3
3.1.2. Clasificación	3
3.1.2.1. Mastitis clínica	3
3.1.2.2. Mastitis subclínica	4
3.1.2.3. Infección latente	4
3.1.3. Importancia	5
3.1.4. Diagnóstico	5
3.1.4.1. Exploración física	5
3.1.4.2. Colección de muestras de leche	6
3.1.4.2.1. Cloro en la leche	6
3.1.4.2.2. Determinación de pH en le leche	7
3.1.4.2.3. Determinación albúmina sérica	7
3.1.4.2.4. Conductividad eléctrica	7
3.1.4.2.5. Determinación células somáticas	7
3.1.5. Prevención	10
3.1.5.1. Ordeño mecánico	10
3.1.5.2. Control del ordeño mecánico	10
3.1.5.3. Del Medico veterinario	10
3.1.6. Control	11
3.1.7. Patógenos más frecuentes	12
3.1.8. Epizootiología de la mastitis	12
3.1.8.1. Epizootiología de los patógenos contagiosos	14
3.1.8.2. Epizootiología de los patógenos ambientales	15
3.1.8.3. Epizootiología de los patógenos oportunistas	16
3.1.9. Tratamiento de la mastitis	16
3.2. Antibióticos	16
3.2.1. Definición	16
3.2.2. Antibióticos más comunes	17
3.3. Resistencia antibiótica	18
3.3.1. Bases bioquímicas de la resistencia	19
3.3.2. Resistencia natural	19
3.3.3. Resistencia adquirida	19
3.3.4. Resistencia cromosómica	20
3.3.5. Resistencia extracromosómica	20

3.3.6. Conjugación	20
3.3.7. Transducción	21
3.3.8. Transformación	21
3.3.9. Transposición	21
3.3.10. Resistencia cruzada	21
3.4. Sensibilidad antimicrobiana	23
3.4.1. Método de difusión	24
3.4.2. Fundamentos para interpretar pruebas	24
3.4.3. Agar Mueller Hinton	25
3.4.3.1. Composición	25
3.4.3.2. Preparación	25
3.4.3.3. Interpretación	25
3.4.3.4. Conservación	26
3.4.4. Preparación del inóculo	26
3.4.5. Inoculación de las placas	26
3.4.6. Aplicación de los discos de antibióticos	26
3.4.7. Incubación	27
3.4.8. Lectura de placas	27
3.4.9. Antimicrobianos seleccionados	27
IV. MATERIALES Y METODOS	28
4.1. Materiales	28
4.1.1. Recursos humanos	28
4.1.2. Biológico	28
4.1.3. De campo	28
4.1.4. De laboratorio	28
4.1.5. Centros de referencia	29
4.2 Metodología	30
4.2.1. Definición de la muestra	30
4.2.2. Diseño del estudio	30
4.2.3. Selección y toma de la muestra	30
4.2.4. Procesamiento de muestras	31
4.2.5. Datos del paciente	32
4.2.6. Análisis estadístico	32
4.2.6.1 Variables a utilizar	32
4.2.6.2 Distribución porcentual	32
PRESUPUESTO	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
GRÁFICAS	38
DISCUSION DE RESULTADOS	43
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. RESUMEN	47
IX. BIBLIOGRAFÍA	48

X. ANEXOS	50
10.1 Ficha para la toma de muestras	51
10.2 Hoja de recepción de muestras	52

I. INTRODUCCIÓN

El término de mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria, lo cual trae como consecuencia que se alteren las características físicas, químicas y bacteriológicas de la leche y que se modifique el tejido glandular. Por lo tanto, se produce una reducción en la cantidad de leche producida.

Aunque la mastitis ocurre esporádicamente en todos los mamíferos, adquiere mayor importancia económica solamente en las vacas lecheras. Es sin duda, la enfermedad más importante con la cual debe enfrentarse la industria lechera.

Existen varios tipos de mastitis, y cada uno afecta de diferente forma pero lo importante es que se debe tomar en cuenta la salud pública ya que la leche contaminada pone en peligro la salud de quienes la consumen.

Varios son los agentes causales de la mastitis, por lo tanto se debe conocer la historia clínica y examen físico de las vacas para saber qué tipo de tratamiento se les ha aplicado, siendo por rutina la administración de antibióticos, pero que debido a malas medidas de bioseguridad, no erradican el problema, creándose resistencia.

Las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos muy ingeniosos para sobrevivir al efecto de los antibióticos, es por eso la importancia que tiene hacer una evaluación sobre la resistencia antibiótica en casos de mastitis, para tener una mejor profilaxis en la explotación lechera; la leche sea de buena calidad y pueda ser consumida sin ningún problema.

II. OBJETIVOS

2.1 General

- Generar información sobre la resistencia de los microorganismos aislados, a los antibióticos utilizados en los casos de mastitis clínica en una explotación lechera.

2.2 Específicos

- Identificar los tipos de microorganismos aislados en casos de mastitis clínica.
- Establecer la resistencia antimicrobiana de los microorganismos aislados.
- Determinar que antibióticos podrían ser efectivos de acuerdo a la sensibilidad obtenida para el tratamiento.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1 MASTITIS

3.1.1 Definición

Se define como la inflamación de la glándula mamaria que generalmente se presenta como una respuesta a la invasión por microorganismos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño (3, 16, 17,19).

3.1.2 Clasificación

La mastitis se clasifica en mastitis clínica, subclínica e infección latente, según el grado de inflamación. La inflamación de la glándula mamaria se caracteriza por los signos cardinales de ésta, los cuales son tumor, rubor, dolor, calor y disminución de la función (3,15,17).

3.1.2.1 Mastitis Clínica

Puede presentarse como: a) severamente aguda, b) suave que por la severidad inflamatoria se subdivide moderada y ligera, c) crónica y d) gangrenosa (3,16,17).

a) Mastitis severamente aguda. Generalmente es de presentación súbita con una severa inflamación de la glándula mamaria afectada, pudiendo presentarse o no con alteraciones aparentes en la secreción láctea, pero sí una disminución en la cantidad producida. En ésta forma de mastitis podrán presentarse signos sistémicos como septicemia, toxemia, fiebre, anorexia, depresión, movimientos ruminales disminuidos, entre otros signos (3,16,17).

b) *Mastitis suave-moderada*. De presentación súbita que se presenta con un decremento en producción de leche y alteraciones que pueden ser de aspecto seroso, con hilos de fibrina, coágulos, grumos (3, 16,17).

c) *Mastitis suave-ligera*. Es una forma intermedia entre la forma de presentación anterior y una mastitis crónica. Esta clase de inflamación puede presentarse con brotes de reagudización o pasar a una fase de inflamación crónica. En éste tipo de cuadro es frecuente el que no se aprecien cambios aparentes en la ubre y únicamente al inicio del ordeño se observen pequeños grumos en la secreción láctea (3,15).

d) *Mastitis crónica*. Cuando la agresión en la glándula mamaria persiste y no hay una solución a la reacción inflamatoria aguda el resultado es una inflamación crónica, microscópicamente puede verse necrosis tisular. Un cuadro de mastitis crónica podrá presentarse clínicamente en forma aguda (3,15).

e) *Mastitis Gangrenosa*. Esta forma de presentación clínica es ocasionada cuando los microorganismos involucrados o sus toxinas producen vasoconstricción, isquemia y muerte del tejido. A la inspección la glándula afectada se encuentra inflamada, fría y cianótica, se observa una línea de demarcación entre el tejido sano y el afectado, viéndose éste de color azul o negro (3,15).

3.1.2.2 Mastitis subclínica

Esta es una forma en la cual no hay signos visibles en la glándula mamaria, pero sí una disminución en la producción de leche e incremento en el número de células somáticas (3,15).

3.1.2.3 Infección latente

Esta es una forma de presentación de mastitis subclínica en la cual se da en leche el aislamiento de microorganismo considerados como tradicionalmente patógenos para la glándula mamaria (3,15,18).

3.1.2.4 Cuadro de clasificación de Infecciones Clínicas

Grado	Signos	Acción
1	Leche anormal. Vaca normal. Ubre no inflamada.	Tomar muestras de leche. Tratar infecciones con antibióticos apropiados.
2	Leche que tiene grumos. Vaca no enferma. Ubre inflamada.	Tomar muestras de leche y realizar cultivos. Tratar infección. Reducir edema.
3	Leche que tiene grumos. Vaca enferma. Ubre inflamada y caliente.	Tomar muestras de leche y realizar cultivos (Infección sospechosa causada por <i>E. coli</i> , <i>S. uberis</i> o <i>Staphylococcus aureus</i>). Tratar cuartos infectados con antibióticos y proveer terapia sistémica apropiada.

(3)

3.1.3 Importancia

La leche contaminada pone en peligro la salud de quienes la consumen, en el caso del hombre cobra gran importancia la diseminación de bacterias causantes de enfermedades tales como: tuberculosis, brucelosis, faringitis estreptocócica, entre otras (3,15,18).

3.1.4 Diagnóstico

3.1.4.1 Exploración física:

- Inspección. Consiste en ver y observar, empleando el sentido de la vista (1,15).

- **Palpación.** La palpación se hace utilizando el tacto. Puede ser inmediata en la que se emplea el tacto al tocar o hacer presión, o mediata mediante cateterismo valiéndonos de una sonda o cánula o de un bisturí de campana (1,3,15).
- **Percusión.** Procedimiento exploratorio como un auxiliar en la identificación de abscesos, quistes, estenosis de ductos, enfisema, etc (1,3,15).
- **Auscultación.** Es escuchar aplicando el oído. Habiendo gas entre piel y tejido celular subcutáneo al palpar la glándula, podemos escuchar por medio del sentido auditivo la crepitación que acusa la presencia del gas (1,3).
- **Olfación.** Este es un procedimiento de exploración que nos permite percibir por medio del sentido del olfato a la ubre, así como a las muestras de leche que ocasionalmente tienen olores característicos, que sugieren alteraciones y etiologías específicas (2,3).

3.1.4.2 Colección de muestras de leche:

La muestra de leche es obtenida para hacer diferentes pruebas relacionadas a mastitis: subclínica, clínica y composición de la misma, por lo tanto, la muestra se toma durante el ordeño de la vaca, dependiendo el momento, según el propósito perseguido con la muestra se pueden realizar las siguientes pruebas:

3.1.4.2.1 Cloro en leche.

En la leche la relación lactosa- cloro es influenciada por:

- Estado lactacional.
- Presentación de mastitis (2,3,19).
- En casos de mastitis el contenido de cloro en la leche tiende a incrementarse en proporción a la lactosa, lo que ocasiona en la leche un sabor ligeramente salado (2,3,19).

3.1.4.2.2 Determinación de pH en leche.

Se ha considerado que la leche que proviene de glándulas mamarias afectadas por mastitis el pH es alcalino (6.9) lo que se atribuye a la disminución de la lactosa e incremento de sales que pasan de sangre a la leche. Para determinar el pH en la leche podemos emplear:

- Púrpura de bromocresol.
- Azul de bromotimol.
- Potenciómetros.
- Escala de valoración en papel indicador de pH (2,3,17).

3.1.4.2.3 Determinación de albúmina sérica en leche.

Uno de los primeros cambios en vacas con mastitis fue la presencia de albúmina sanguínea en leche, atribuida al aumento de permeabilidad capilar en el proceso inflamatorio. Se considera que la leche proviene de animales positivos a mastitis cuando contiene más de 0.20 mg/ml (3,17).

3.1.4.2.4 Conductividad eléctrica.

La secreción láctea de una glándula mamaria con mastitis tiene una alta conductividad eléctrica por el elevado contenido electrolítico, especialmente en iones de sodio y cloro; lo que se presenta como uno de los primeros signos en la mastitis, siendo esto un elemento útil en el diagnóstico, considerando que niveles superiores a 6.9 m/cm^2 entre $20\text{-}30^\circ\text{C}$ son anormales (2,3,17).

3.1.4.2.5 Determinación del número de células somáticas.

Esta prueba se puede realizar de una forma directa o indirecta:

- Examen microscópico y cálculo del número de células

Se coloca una laminilla con frotis sobre platina del microscopio, usando el objetivo calibrado. Luego se enfoca el campo a estudiar, contando el número de células presentes y se anota el total de células observadas; se repite la actividad recorriendo los campos. Al

alcanzar aproximadamente 50 células, es sugerible cambiar de zona de observación. Se calcula el número de células considerando todo campo estudiado y sacando el promedio de células por campo, resultado que se multiplica por el factor microscópico lo que resultará en el número de células por mililitro (2,3).

Ejemplo: 35 campos estudiados, con 70 células

$70/35 = 2.0$ células por campo

$2.0 \times 300 \times 300 = 600,600/\text{ml}$ células

Células/ml = 600,600

- Prueba de California para Mastitis (CMT)

En las infecciones por bacterias, de los vasos localizados en el área afectada escapan leucocitos, siendo generalmente ésta, una respuesta celular proporcional a la severidad de la infección. La prueba de CMT, identifica la presencia de ácido desoxirribonucleico de las células somáticas en la leche (2,3,17).

Para hacer la prueba se toma la paleta para CMT por el mango dirigido hacia la cola de la vaca, se descartan los dos primeros chorros de leche de cada pezón y seguidamente se colectan en cada una de las charolas de plástico (debiendo estar la superficie y uniforme), y se anexa a cada charola cuidando que la proporción de reactivo a leche sea de 1:1. De inmediato se mezclan la leche y el reactivo mediante un movimiento rotatorio suave, haciendo la lectura de la reacción alrededor de los 7 segundos, momento en que alcanza el pico la reacción (3,18,19).

Símbolo	Interpretación	Reacción	No. de células/ml
-	Negativa	Sin evidencia	0 a 200,000
T	Traza	Precipitación leve	150,000 – 500,000
1	Positivo leve	Sin formación de gel, mezcla espesa	400,000-1,500,000
2	Positiva	Mezcla espesa cierta formación del gel	800,000-5,000,000
3	Positiva fuerte	El gel causa formación de una superficie convexa	> 5,000,000
+	Leche alcalina	Fuerte color morado	Actividad secretora reducida
++	Leche ácida	Color amarillo	pH 5.2, fermentación de lactosa por bacterias

(3)

- Procedimiento para la Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT).

Se basa en la viscosidad de la mezcla del reactivo de California que ha sido diluido 1:1 con agua destilada y que se combina con la leche.

La leche (2 ml), se agrega en el tubo de plástico al que previamente se le han incorporado la misma cantidad del reactivo ya diluido y posteriormente se coloca el tapón del tubo. Las muestras son agitadas por 10 segundos, con movimientos gentiles y repetidos hacia el frente y abajo hasta que los tubos quedan casi en posición horizontal, evitando la salida del producto por el orificio lateral, pero con la agitación procuramos la adecuada mezcla de la leche y el reactivo en el tiempo determinado (3,15,18).

Se deja reposar los tubos en posición vertical por 20 a 30 segundos. Se coloca la rejilla se pone invertida, quedando el tapón del tubo hacia el suelo por un tiempo de 15 segundos. Posteriormente, la rejilla conteniendo las muestras se regresa a su posición original y se deja reposar por 2-3 minutos permitiendo un adecuado escurrido (3,15,18).

Mililitros	Células/ml	
5	0	75,000
10	75,000	190,000
15	190,000	350,000
20	350,000	570,000
25	570,000	830,000
30	830,000	1,200,000
>30	>1,500,000	

(3)

3.1.5 Prevención

3.1.5.1 Ordeño mecánico. Las tasas de mastitis siempre son más elevadas en hatos mal ordeñados. El buen ordeño depende de varios elementos:

- Buena disposición del ordeñador para el trabajo.
- Capacidad de identificación de las vacas, sus características y sus problemas.
- Capacitación en el mejor arte del ordeño (3,4,15).

3.1.5.2 Control del ordeño mecánico. En manos de un buen jefe; hábil en el manejo del personal, en la supervisión de los procedimientos y en el mantenimiento del equipo de ordeño (3).

3.1.5.3 Médico veterinario. Que es responsable de la planificación de toda la operación desde el punto de vista técnico; sus funciones son:

- Elaborar el manual de procedimientos del ordeño y de la limpieza y desinfección del equipo.
- Enseñar la aplicación correcta del procedimiento de ordeño.

- Elaborar, con otros técnicos, el manual de procedimientos para el mantenimiento del equipo.
- Elaborar y hacer cumplir el manual de procedimientos para el control de la mastitis.
- Seleccionar los implementos (pezoneras), materiales (limpiadores, desinfectantes) y medicamentos que deben emplearse; e instruir al personal sobre su uso.
- Realizar o supervisar los controles con CMT u otros; y decidir, en base a los resultados, la redistribución de los lotes de vacas y el orden del ordeño.
- Decidir sobre la toma de muestras de leche para cultivo y antibiogramas.
- Hacer el análisis estadístico mensual de monitoreo de la mastitis.
- Decidir sobre el rol y método de secado de las vacas.
- Recomendar la saca de las vacas problema de mastitis (1,3,4,18).

3.1.6 Control

Hace 30 años en Inglaterra se sentaron las bases de un programa de control que se sigue empleando hasta hoy día con pequeños cambios. El programa, ya mejorado, es el siguiente:

- Examen del hato (que incluye su historia clínica) y diagnóstico situacional.
- Examen de la sala de ordeño y rutina de ordeño, higiene general, calidad del agua, instalaciones.
- Fijar medidas correctivas en instalaciones y manejo donde fuese necesario.
- Fijar los procedimientos de mantenimiento del sistema de ordeño.
- Fijar el correcto procedimiento de ordeño y saneamiento del equipo.
- Fijar el orden de ordeño de las vacas. (Primero las vacas negativas al CMT, luego las vacas con mastitis subclínica leve, después las vacas con mastitis subclínica de alto riesgo y por ultimo las vacas con mastitis clínica).
- Eliminar las vacas problema.
- Establecer el programa de tratamiento de los casos clínicos.
- Establecer el sistema de secado y el tratamiento de secado.
- Establecer las normas de registro, estadística y monitoreo permanente del programa de control.

- Elaborar pruebas de CMT cada 30 días.
- Realizar cultivos en muestras de leche, de cuartos con mastitis clínica y cuartos con historia de infección (1,4,15,16,18).

3.1.7 Patógenos más frecuentes

La mastitis clínica involucra cambios anormales en la leche (acuosa, escamosa, grumosa o teñida de sangre, con volumen reducido) y algunos cambios en la ubre (caliente, inflamada, sensible) que son evidentes en un examen. Globalmente, los más importantes patógenos involucrados en las infecciones de mastitis clínicas son:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus agalactiae*
- Coagulase-negativa *Staphylococcus* spp. (CNS)
- *Streptococcus* spp. ambientales (*S. uberis* y *S. dysgalactiae*).
- Coliformes (*E. coli*)
- *Mycoplasma* spp (17).

De los más importantes patógenos bacteriales en la mastitis clínica, *S. agalactiae* y *S. aureus* son referidas como bacterias **contagiosas** porque ellas son comúnmente diseminadas de un cuarto infectado a otro y de una vaca a otra vaca. Todas las otras (*Streptococcus* ambientales y coliformes) son llamadas **bacterias ambientales**, porque ellas están comúnmente presentes en el medio ambiente de la vaca y pueden alcanzar la parte final del pezón siendo esa su fuente (17).

3.1.8 Epizootiología de la mastitis

Se han identificado más de 130 especies, subespecies y serovares de bacterias causantes de la enfermedad; sin embargo, más del 75% de los casos se deben a microorganismos Gram Positivos, particularmente especies de los géneros

Staphylococcus y *Streptococcus*. La infección comienza con la presencia de microorganismos patógenos en el extremo del pezón, la penetración de los mismos a través del canal y su establecimiento final en la glándula mamaria. Una vez allí, invaden y producen daño en el tejido glandular cuya consecuencia directa es una disminución en la producción de leche. La enfermedad tiene dos formas básicas de presentación: clínica y subclínica que, por lo general, no son más que fases del proceso inflamatorio (13,19).

En la forma clínica se presentan evidentes signos de inflamación como tumefacción, rubor, dolor, cambios notables en la secreción y eventualmente, signos sistémicos como fiebre, pérdida del apetito y depresión. La forma subclínica se caracteriza por la existencia de inflamación sin los signos macroscópicos que permiten reconocerla, por lo que generalmente pasa desapercibida, a pesar de ser 20 a 50 veces más frecuente que la forma clínica (13,19).

Desde el punto de vista epidemiológico, los patógenos causantes de la mastitis se han clasificado en los siguientes tres grupos, de acuerdo a su origen y forma de transmisión en el rebaño:

- Patógenos Contagiosos, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, y *Corynebacterium bovis* (19).
- Patógenos Ambientales, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Arcanobacterium pyogenes* (19).
- Patógenos Oportunistas, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus intermedius* y muchas otras especies de estafilococos, que forman parte de la flora normal de piel (19).

3.1.8.1 Epizootiología de los patógenos contagiosos

La fuente principal de estos patógenos son los cuartos de ubre infectados y su transmisión ocurre durante el ordeño a través de las manos del ordeñador, paños de secado y pezoneras. En este grupo de microorganismos se ubican: *Streptococcus agalactiae* el cual es un parásito estricto de la ubre bovina, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma bovis* (13,19).

Los dos primeros son los que prevalecen en explotaciones que carecen de programas de control de mastitis y buenas prácticas de ordeño. *Streptococcus agalactiae* generalmente causa una mastitis aguda que, en ausencia de tratamiento, tiene un curso crónico y subclínico, con eventuales episodios clínicos. El microorganismo induce un alto grado de inflamación, con gran aumento en el contenido de células somáticas. *Staphylococcus aureus* generalmente causa mastitis subclínica de larga data, con episodios clínicos recurrentes, gran aumento en el contenido de células somáticas y eliminación cíclica del agente; las infecciones crónicas no responden a los antibióticos y se recomienda la eliminación de los animales crónicamente infectados. *Corynebacterium bovis* es frecuentemente aislado del canal de pezón; causa mastitis subclínica con muy bajo grado de inflamación; es uno de los agentes más frecuentes en fincas en las que no desinfectan pezones (13,19).

Mycoplasma bovis y otras especies de micoplasmas causan agalactia y un desmejoramiento general en los animales afectados; suele afectar las cuatro glándulas y diseminar rápidamente en el rebaño. En general, el pronóstico es malo y suele requerir la eliminación de los animales afectados. En otros países de Latinoamérica, la mayoría de los casos de mastitis subclínica son causados por patógenos contagiosos, particularmente *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*; y en muchas fincas habrá una alta prevalencia de infecciones debidas a *Corynebacterium bovis* y a microorganismos oportunistas de la piel. En las fincas en las que prevalecen los patógenos contagiosos, el recuento de células somáticas en la leche del tanque es muy elevado (13,19).

3.1.8.2 Epizootiología de los patógenos ambientales

La fuente de infección es el ambiente de las vacas. Estos microorganismos provienen del suelo, heces, camas de los animales, aguas contaminadas y no dependen del momento del ordeño para ganar acceso al extremo del pezón; pueden provocar infecciones en cualquier momento, pero más frecuentemente en el período de seca y más probable en el lapso peri-parto (12,13).

Los organismos coliformes como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, por lo general causan mastitis clínica, a veces aguda o hiperaguda, limitada a un cuarto y de corta duración (menor de 10 días). Las mastitis por organismos coliformes son difíciles de diagnosticar por cultivo debido al bajo número de microorganismos que se eliminan en la leche (menos de 100 bacterias/ml) y la brevedad de la infección. Los estreptococos y enterococos que habitan en las vacas y su ambiente como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, entre otros, pueden causar cuadros subclínicos y también clínicos de diferente intensidad, desde leves hasta agudos, tanto en vacas en lactancia como secas, pero la infección es más frecuentemente en el período de seca. Causan infecciones de corta duración (menos de 30 días), pero un poco más prolongadas que las ocasionadas por coliformes (2,19).

Los patógenos ambientales (coliformes, estreptococos ambientales y enterococos) suelen ser un problema en las explotaciones lecheras en las que se han aplicado eficientemente programas de control de la mastitis contagiosa y en países con clima estacional que obliga a la estabulación de los animales por varios meses (19).

En fincas en las que se han controlado e incluso erradicado los patógenos contagiosos, la incidencia de casos clínicos debidos a patógenos ambientales suele aumentar, a veces, de manera alarmante. *Arcanobacterium pyogenes* es el agente causal de la llamada “mastitis de verano”, cuadro clínico poco frecuente en nuestro país, que se caracteriza por graves alteraciones en la glándula y la secreción y que puede ser transmitido por moscas. Otros microorganismos como *Pseudomonas*

aeruginosa, *Nocardia asteroides*, *Prototheca* y muchos otros que habitan en el ambiente de la vaca, pueden eventualmente causar cuadros clínicos, pero con muy baja frecuencia (2,19).

3.1.8.3 Epizootiología de los patógenos oportunistas

La fuente más importante de infección es la piel de la vaca, la frecuencia de infección es mayor en el período de secado, durante el cual la piel del pezón no está expuesta a los germicidas usados en la desinfección post-ordeño. La frecuencia de infecciones causadas por los patógenos oportunistas es alta para el momento del parto, pero baja rápidamente durante la lactancia (19).

Los casos de mastitis clínica resultan fáciles de reconocer debido a las evidentes alteraciones que ocurren en la glándula mamaria y su secreción, aunque el diagnóstico del agente causal sólo se logra mediante cultivo microbiológico de la secreción (4,16,19).

3.1.9 Tratamiento de la mastitis

En la mayoría de los casos cuando se sigue un tratamiento para combatir la mastitis clínica es recomendable hacer aplicaciones intramamarias con antibiótico. Si es o no efectivo tratar mastitis clínica contagiosa con terapia intramamaria (IMM) con antibióticos es un asunto de mucha controversia en la industria lechera hoy (4).

3.2 ANTIBIOTICOS

3.2.1 Definición

Sustancia elaborada por seres vivos, generalmente microscópicos, capaces de actuar como tóxicos selectivos en pequeñas concentraciones, sobre los microorganismos (6,7,15).

Existe actualmente un verdadero arsenal utilizado contra los diferentes agentes productores de mastitis. Los antibióticos más variados se han estado empleando en el tratamiento de la inflamación de la glándula mamaria, muchos de los cuales se usan en

forma indiscriminada, dosis inadecuada o por tiempo muy corto, ineffectividad contra algunas cepas microbianas, etc., lo que ha contribuido en gran forma a la aparición de cepas microbianas resistentes, como ocurre en forma especial con *Staphylococcus aureus* (6, 7,15).

3.2.2 Antibióticos mas comunes

Entre los antibióticos más utilizados en mastitis están:

Las penicilinas que pueden agruparse en aquellas que tienen efecto contra ciertos organismos gram positivos: penicilina G procaínica, penicilina G benzatina, y aquellas penicilinas que tienen actividad contra Gram positivos y Gram negativos como la ampicilina (7,8,9,10).

Las penicilinas que actúan contra los Gram positivos continúan siendo muy eficaces contra las mastitis estreptocócicas; aquellas penicilinas que son inactivadas por beta lactamasa, se ha demostrado que tienen una débil eficacia en el tratamiento de las mastitis estreptocócicas (7,8,9,10).

Las penicilinas de espectro amplio (ampicilina, hetacilina, amoxicilina y carbenicilina), se han utilizado en el tratamiento de mastitis producidas por bacilos Gram negativos y cocáceas. Con la aparición de cepas estafilocócicas resistentes, se han ido descubriendo varias penicilinas que tratan eficazmente a este tipo de cepas, como metacilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina y nafcilina. Otros agentes antimicrobianos efectivos contra estafilococos son: cefalosporina, lincomicina, espectinomina, eritromicina, troleandomicina, oleandomicina, novobiocina, bacitracina y kanamicina (7, 8,14).

En mastitis producidas por coliformes y otros Gram negativos, se han utilizado con buen efecto: ampicilina, hetacilina, amoxicilina, carbenicilina, polimixina B, novobiocina, kanamicina, oxitetraciclina, neomicina, gentamicina, colistina, dihidroestreptomicina, ácido nalidíxico, furaltadona y cloramfenicol. Sin embargo, muchas de estas drogas también

facilitan el desarrollo de resistencia múltiple vía extracromosomal o factor de transferencia R+ (9,13).

Algunas drogas que han dado buen resultado en mastitis por *Pseudomona aeruginosa* son: carbenicilina, polimixina B, gentamicina y colistina (6,13,14).

En mastitis producidas por micoplasma han dado, algunas veces, buen resultado: lincomicina, eritromicina, espectinomicina, tilosina y gentamicina. En algunas mastitis producidas por hongos se han utilizado nistatina y griseofulvina; sin embargo, no existen preparados comerciales disponibles para mastitis (6,7,12).

Como recomendación general, antes de instaurar un tratamiento con antibióticos, ya sea por vía del conducto del pezón o por vía general, recomienda considerar cinco aspectos generales:

1. Que el antibiótico a utilizar haya tenido un éxito probado en el área geográfica en cuestión,
2. Que haya tenido un éxito previo en la lechería del problema.
3. Solicitar test de sensibilidad in vitro,
4. Características de la secreción de la glándula y síntomas clínicos y considerar si la utilización del antibiótico es permitida por la legislación vigente (5,6,7,8,14).

3.3 RESISTENCIA ANTIBIOTICA

La resistencia bacteriana es un tema importante en el estudio de los antibióticos, porque su comprobación implica el fracaso de la terapéutica. Para seleccionar adecuadamente un antimicrobiano, el médico veterinario no sólo necesita conocer el agente etiológico involucrado, sino también su sensibilidad a los antibióticos disponibles en el mercado nacional. Sin embargo, el indiscriminado uso de estos fármacos a través de los años, ha inducido la aparición de microorganismos patógenos resistentes,

ocasionando, en algunos casos, fracaso terapéutico que puede incluso causar la muerte del animal (5,6,7,8,14).

3.3.1 Bases bioquímicas de la resistencia

Las bacterias disponen, crean o logran la resistencia mediante diversos recursos biológicos que explican la rapidez de su adaptación a un ambiente desfavorable. Entre estos recursos se destaca como más importantes:

- Disminución de la permeabilidad bacteriana para impedir el acceso al fármaco.
- Reducción de la afinidad a la enzima blanco del fármaco.
- Modificación de la enzima blanco del antibiótico.
- Segregación de enzimas inactivadoras del quimioterápico resistencia adquirida en el curso de los años o aun en poco tiempo por ciertas bacterias (5,6,7,8,9).

Por esto es conveniente separar para su estudio, la resistencia natural de la resistencia adquirida y de esta los distintos modos de obtenerla. Cada uno de los procedimientos logrados por distintas bacterias para resistir a los antibióticos tiene bases genéticas y bioquímicas cuyo conocimiento se amplía cada año (5,6,7,8,9,14).

3.3.2 Resistencia natural

Es la ofrecida por las bacterias de una misma especie o cepa frente a determinado antibiótico. Se destaca que esta capacidad de resistencia al fármaco es común a todos los integrantes de la especie. Citamos como ejemplo practico a *Pseudomonas aeruginosa*, naturalmente resistente a la penicilina y otros antibióticos. Es la resistencia denominada también como primaria y definida como una insensibilidad de todas las bacterias aisladas de una especie (6,7,8,9,10)

3.3.3 Resistencia adquirida

La resistencia de la bacteria a uno o varios antibióticos puede lograrse en el transcurso del tiempo por los mecanismos básicos: por mutación de las características de su cromosoma, la adquisición del material genético con ubicación extracromosómica. La

resistencia adquirida se diferencia de la resistencia natural o primaria porque se alcanza de un modo parcial por pocos o muchos integrantes de una misma especie o cepa pero no por la totalidad. Por tanto es fragmentaria, no, abarca a toda la especie (5,6,7,8,9).

3.3.4 Resistencia cromosómica

La resistencia cromosómica se origina por una mutación espontánea cuya frecuencia ha sido estimada en 10 a la 10ª potencia. Este número potencial adquiere significado a causa del acelerado crecimiento de las especies bacterianas. Para que esto suceda en términos humanos se necesitan 1.000 años (5,6,7,8,9).

La velocidad de multiplicación explica la presencia de una mutante resistente y si la especie está sometida a una droga, se van deteriorando las bacterias y solo sobreviven aquellas con resistencia cromosómica propia (5,6,7,8,9).

En una primera etapa favorece el desarrollo de células resistentes hasta transformarse en cultivo puro antibiótico-resistente. Este modo de adquirir resistencia se califica como espontáneo y discontinuo, con una frecuencia notoriamente menor que la resistencia de origen extracromosómico, ya que no hay propagación a especies diferentes. La mutación espontánea puede acelerarse por acción de sustancias químicas o agentes físicos mutágenos (5,6,7,8,9).

3.3.5 Resistencia extracromosómica

La resistencia adquirida extracromosómica se obtiene por incorporación de material genético que se sitúa por fuera del cromosoma. Se denomina también resistencia transferida o resistencia mediada por plasmidos. El ingreso del material transferido puede realizarse por mecanismos distintos cuya nominación responde al dispositivo empleado en esta acción bacteriana (5,6,11,12,19).

3.3.6 Conjugación

Es la transferencia de genes entre bacterias sexualmente diferentes. Requiere contacto de células a célula a través de pelos sexuales para transmitir por factor R, gen extracromosómico de la resistencia. Hay un puente citoplasmático de conjugación entre

bacterias de distinta especie como *E. coli*, *Proteus*; *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* (5,6,11,12,19).

La resistencia así obtenida, se extiende con rapidez porque cada célula recién infectada se transforma en donante de genes de la resistencia. Esta operación ocurre en el plazo de segundos, tanto en el intestino como en la orina (5,6,11,12,19).

3.3.7 Transducción

Es otro recurso de intercambio genético. Se realiza por intermedio de bacteriófagos, si los plasmados son de un tamaño reducido, ya que deben transformarse en la estructura cefálica del portador. El fago puede transportar varias resistencias simultáneas porque el ADN para íntegramente de una bacteria a otra (5,6,11,12,19).

3.3.8 Transformación

Se ha registrado en medios de cultivo de gérmenes y se produce entre bacterias homologas. Al sobrevivir la lisis de una bacteria resistente, una porción con el ADN penetra la pared celular de una bacteria susceptible y se combina con el ADN de ésta (5,6,11,12,19).

3.3.9 Transposición

La transposición permite el intercambio entre plásmidos o de un plásmido hacia un cromosoma o hacia un fago sin necesidad de homóloga entre el donador y el receptor. Los elementos así actuantes se denominan transposones, capaces de decidir su propio sitio de inserción. Los transposones son segmentos del ADN que pueden pasar de la posición en el mismo genoma o hacia un lugar diferente (5,6,11,12,19).

3.3.10 Resistencia cruzada

El concepto de resistencia cruzada es de interés médico, porque engloba a los antibióticos con estructura química idéntica. Si el mecanismo de acción de la droga es similar, la bacteria resistente a uno de los integrantes del grupo lo será también a los demás (5,6,11,12,19).

El concepto es válido para determinados grupos, como las penicilinas estándar o las tetraciclinas, pero en otros hay mínimas diferencias estructurales que cambian la sensibilidad (5,6,11,12,19).

Se mencionan los aminoglucósidos o las cefalosporinas cuya acción antibacteriana se altera con modificaciones sintéticas. No obstante, persisten todavía resistencias equivalentes para todos los antibióticos de un grupo, como es bacteroides para los amionoglucósidos o enterococos para las cefalosporinas (5,6,11,12,19).

La resistencia antimicrobiana es un importante problema de salud pública que afecta a la mayoría de los países, teniendo un impacto negativo en control de las enfermedades bacterianas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que existen evidencias que los animales de producción son un reservorio de bacterias resistentes y que deben hacerse esfuerzos entre médicos humanos y veterinarios para abordar este problema (12,15).

Aun cuando los antimicrobianos son actualmente la principal herramienta terapéutica para el tratamiento de infecciones bacterianas en el hombre y los animales, en las últimas décadas el incremento del uso de estos fármacos, su mal uso y otros factores han dado lugar a la emergencia de resistencia antimicrobiana, siendo ésta un importante problema en salud pública que afecta a la mayoría de los países del mundo (9,12).

A la luz de estos antecedentes, la Organización Mundial de la Salud señala que la resistencia antimicrobiana debe ser considerada un problema grave, complejo y de dimensión internacional, y que es conveniente poner en marcha un sistema global de vigilancia, recomendando que se fijen políticas gubernamentales orientadas al uso racional de estos medicamentos en medicina humana y veterinaria (9,12).

Los programas de monitoreo de la resistencia incluyen tres grandes grupos de bacterias en aves, cerdos y bovinos: bacterias indicadoras (*E. coli*, *Enterococcus faecium* y/o *E. faecalis*), bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Pasteurella spp*, etc.) y bacterias zoonóticas (*Salmonella spp* y/o *Campylobacter spp*) (9,12).

La importancia de las bacterias indicadoras se debe a que la microflora normal de los animales es considerada un reservorio de bacterias y determinantes genéticos de resistencia que podrían ser transmitidas a bacterias patógenas y zoonóticas. El monitoreo de este tipo de microorganismos permite dar a conocer a los médicos veterinarios cuáles antimicrobianos están generando resistencia, evitando un riesgo en salud pública, además de disminuir el riesgo de un fracaso terapéutico que genera grandes pérdidas económicas al productor (9,12).

3.4 SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La determinación de la sensibilidad está indicada en los casos en que el microorganismo causal de la infección pertenezca a una especie capaz de exhibir resistencia a los antibióticos de uso clínico. Los mecanismos de resistencia a los agentes antimicrobianos incluyen: producción de enzimas inactivantes, alteraciones en el sitio de acción y modificaciones en el ingreso o el flujo del antibiótico (6,8,9).

Para realizar pruebas de sensibilidad e identificación se debe partir de un cultivo primario en medio sólido y se debe procesar colonias aisladas de cada tipo de microorganismo que pueda tener rol patógeno. No se deben realizar pruebas de sensibilidad sobre mezclas de diferentes tipos de microorganismos, ni sobre el material clínico sin procesar, excepto para emergencias clínicas donde la coloración de Gram sugiera la presencia de un sólo patógeno (6,8,9,14).

Cuando la prueba de sensibilidad haya sido realizada a partir del material clínico, se debe informar como resultado preliminar y se debe repetir utilizando la metodología estandarizada. No es aconsejable la realización de pruebas de sensibilidad cuando no es clara la naturaleza de la infección y la muestra contiene flora normal o polimicrobiana, en la cual el o los microorganismos aislados probablemente tengan poca relación con el proceso infeccioso. En estos casos los resultados obtenidos pueden conducir a errores en el tratamiento (6,8,9,14).

3.4.1 Método de difusión

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con antibióticos en estado cristalino" etc.) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; formará así por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del antibiótico en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación de la velocidad de duplicación bacteriana, y el tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria (9,12,14).

3.4.2 Fundamentos para la interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión:

Sensibles: Un microorganismo se considera sensible a un antibiótico cuando se puede es que una infección causada por el mismo responda al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada (9,12,14).

- *Resistente:* Este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, cualesquiera que sean las dosis y la localización de la infección (9,12,14).
- *Sensibilidad intermedia:* Se aplica a dos situaciones. Por un lado, se incluyen en ella las cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico que puede utilizarse con éxito, para el tratamiento en dosis más altas, por ser poco tóxico o porque se concentra en el foco de infección (9,12,14).

3.4.3 Agar Mueller Hinton

Es considerado como el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de los microorganismos de rápido crecimiento sin exigencias nutricionales especiales debido a que:

- Muestra buena reproducibilidad entre los distintos lotes.
- Tiene bajo contenido de inhibidores para sulfonamidas, trimetropin y tetraciclinas.
- Es adecuado para el crecimiento de la mayoría de bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos recopilados que avalan la calidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio (11).

3.4.3.1 Composición gr. /litro

Infusión de carne	5.0 gr. /litro
Hidrolizado de caseína	17.5 gr. /litro
Almidón	1.5 gr. /litro
Agar- agar	12.5 gr. /litro (10).

3.4.3.2 Preparación

36.5 gramos del producto se suspenden en un litro de agua destilada o desmineralizada fría y se dejan remojar durante 15 minutos. A continuación, se hierve hasta solución total. Se esteriliza en autoclave 10 minutos a 115 ° C (10).

El pH del medio de cultivo listo para su uso es de 7.4 +/- 0.2 a temperatura ambiente, y debe determinarse después de su esterilización. Las correcciones necesarias serán realizadas por el agregado de NaOH o HCL 1M: Recordar que en un pH muy ácido hace que antibióticos como los aminoglucósidos y macrólidos pierdan potencia mientras que un pH muy alcalino disminuye la actividad de las penicilinas (10,11).

3.4.3.3 Interpretación

En las placas destinadas a la determinación de la resistencia, al cabo de 12 horas se miden los diámetros de los halos de inhibición (11).

3.4.3.4 Conservación

Han comprobado que el agar Mueller-Hinton, vertido en placa puede ser utilizado todavía para determinaciones de resistencia al cabo de 3 semanas, si se conserva a + 4°C durante este tiempo (11).

3.4.4 Preparación del inóculo

A partir de 4 ó 5 colonias bien aisladas y de igual morfología en un medio de aislamiento primario (10).

El inóculo con solución salina o caldo, hasta alcanzar una turbidez comparable al 0.5 de McFarland por comparación visual con el estándar. Se agitará vigorosamente con vortex o manualmente tanto el tubo con el inóculo como el estándar de McFarland. Posteriormente mirar los tubos contra un fondo blanco con una o varias líneas negras como contraste (10).

3.4.5 Inoculación de las placas

Dentro de los 15 minutos posteriores a haberse ajustado el inóculo, se sembrarán las placas de Mueller Hinton con un hisopo estéril. Se presiona el hisopo rotándolo firmemente contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso del inóculo. (7,8)

Inocular la superficie seca del agar por hisopado en dos o tres direcciones para asegurar una completa y homogénea distribución del inóculo. Las zonas de inhibición deberán ser uniformemente circulares y el desarrollo bacteriano confluyente o casi confluyente (10,14).

3.4.6 Aplicación de los discos de antibióticos

Esperar 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculado, con pinza de punta fina estéril y aplicando una ligera presión, a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. La distancia al borde de la placa al disco no debe ser menor de 14 mm. Algunos

antibióticos difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 6 a 7 discos por placa de 100 mm (10,14).

3.4.7 Incubación

Se incuban las placas invertidas a 35 °C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados y sin concentración incrementada de CO₂ (10,14).

3.4.8 Lectura de las placas

Se sugiere efectuar la lectura con calibre vernier, nonio, pie de rey, regla graduada en milímetros o plantillas especiales sobre un fondo negro u oscuro y utilizando luz reflejada. Todas las mediciones se efectúan con aproximación de 1 mm. La lectura se efectúa por la parte superior habiéndose removido la cubierta de la placa (10,14).

3.4.9 Antimicrobianos seleccionados

Es evidente la imposibilidad de ensayar un gran número de antibióticos frente a un microorganismo determinado. La selección final de qué antibióticos deben ser estudiados dependerá del Laboratorio de Microbiología y de la explotación lechera a realizarse las pruebas (10,14).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Recursos humanos

- Estudiante Investigador.
- Asesores de tesis.
- Personal de la explotación lechera.
- Personal de Laboratorio (LABSAH) Escuintla.
- Personal de Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

4.1.2 Biológico

- Muestras de leche.

4.1.3 De campo

- Guantes.
- Overol.
- Botas de hule.
- Hielera con hielo.
- Bolsas estériles.

4.1.4 De laboratorio

- Bata.
- Guantes.
- Toallas de papel.

- Marcador.
- Mechero.
- Campana de flujo laminar.
- Microscopio.
- Portaobjetos.
- Chispero.
- Nefelómetro.
- Caldo nutritivo.
- Hisopos estériles.
- Asa bacteriológica.
- Placas de Petri.
- Incubadora.
- Coloración de Gram.
- Bandeja.
- Agar Sangre.
- Agar Tioglicolato.
- Agar MaConkey.
- Agar Muller Hinton.
- Discos de sensibilidad antibiótica.

4.1.5 Centros de Referencia

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Internet.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Definición de la muestra

Se obtuvieron muestras de leche de los cuartos afectados de vacas con mastitis clínica, o sospechosas de padecerla en una explotación lechera del suroccidente de Guatemala.

4.2.2 Diseño del estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal donde se obtuvo por conveniencia muestra de leche de 30 vacas, que presentaron evidencia de mastitis clínica en una explotación lechera del suroccidente de Guatemala.

4.2.3 Selección y toma de la muestra

- Se extrajeron los primeros chorros de leche (despunte).
- Se lavó con agua y jabón la ubre.
- Luego se secó con papel mayordomo verificando que quedara limpia.
- Se tomó la muestra del cuarto afectado, previo al ordeño.
- La cantidad de la muestra fué de 30 ml.
- La muestra se obtuvo en una bolsa estéril y se colocó en la hielera para preservarla.
- Al terminar el ordeño se aplicó yodo como sellador en cada pezón.

- A cada paciente se le hizo una ficha clínica con datos esenciales. (Anexo 1)
- Las muestras fueron llevadas al laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y al Laboratorio tecnificado LABHSA, para ser procesadas.

4.2.4 Procesamiento de las muestras en el laboratorio

- Al llevar las muestras al laboratorio, se procedió a realizar la siembra bacteriológica en Agar Sangre, Agar Mac Conkey, por agotamiento y en medio Tioglicolato, por suspensión.
- Se incubaron los medios sembrados con la muestra a 37 °C, por 24 – 48 horas, con baja tensión de oxígeno, en Agar sangre.
- Pasadas las 48 horas se realizó el estudio macroscópico y microscópico de la muestra para identificar las bacterias que crecieron.
- Identificadas las bacterias, se procedió a la realización del antibiograma realizando la suspensión en 5 ml de agua destilada debiendo tener una concentración de 0.5 en la escala de Mac Farland, haciendo la lectura en el Nefelómetro; luego se realizó la siembra masiva en el medio respectivo con un hisopo, colocando los sensidiscos con el antibiótico de elección, siendo estos; ciprofloxacina, gentamicina, lincomicina, ceftriaxona, eritromicina, amoxicilina, neomicina, penicilina, estreptomycinina, ácido clavulánico + amoxicilina.
- Por último se incubó a 37 °C, por 24 horas y se realizó la lectura para ver si son resistentes o no.

4.2.5 Datos importantes del paciente para el trabajo de investigación

- Fecha de la toma de muestras.
- Lugar.
- Número de de la muestra.
- Cuarto afectado.
- Identificación del paciente.

4.2.6 Análisis Estadístico

4.2.6.1 Variables a Analizar

1. Tipos de microorganismos aislados.
2. Sensibilidad y Resistencia Antibiótica.

4.2.6.2. Se hizo una distribución porcentual de los microorganismos aislados, se elaboraron tablas y gráficas de los resultados obtenidos.

Presupuesto

50 Bolsas estériles para coleccionar la muestra	Q	50.00
50 pares de guantes de látex	Q	10.00
Botas de hule	Q	30.00
Hielera	Q	100.00
Hielo	Q	50.00
Gasolina	Q	1,500.00
Gastos de Oficina		
▪ Hojas de papel		
▪ Tinta de impresora	Q	1, 500.00
50 Muestras de laboratorio	Q	1, 500.00
		<hr/>
TOTAL	Q	4,740.00

Todos los gastos corren por cuenta del investigador.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 1. Microorganismos aislados de los casos de mastitis clínica. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.

Especie	Frecuencia	%
<i>Escherichia coli</i>	18	60.00
<i>Streptococcus spp</i>	6	20.00
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3.33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	3.33
Negativo	4	13.33
TOTALES	30	100.00

Cuadro 2. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *E.coli*. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.

Antibiótico	Sensible	Resistente
Ciprofloxacina	18	0
Lincomicina	1	17
Nitrofurantoina	18	0
Penicilina	1	17
Cefalexina	3	15
Tetraciclina	4	14
Streptomycin	0	18
Gentamicina	13	5

Cuadro 3. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *Streptococcus spp.* Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.

Antibiótico	Sensible	Resistente
Ciprofloxacina	5	1
Lincomicina	2	4
Nitrofurantoina	4	2
Penicilina	3	3
Cefalexina	4	2
Tetraciclina	2	4
Streptomicina	0	6
Gentamicina	3	3
Amoxicilina + A. Clavulánico	2	4
Eritromicina	2	4
Ceftriaxona	3	3
Neomocina	1	5

Cuadro 4. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *Staphylococcus aureus*. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.

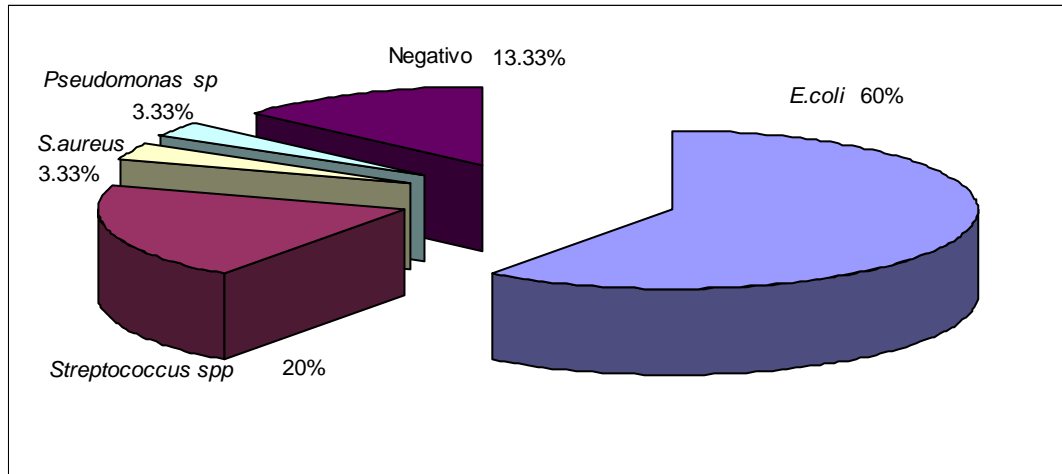
Antibiótico	Sensible	Resistente
Ciprofloxacina	1	0
Lincomicina	1	0
Nitrofurantoina	1	0
Penicilina	0	1
Cefalexina	1	0
Tetraciclina	1	0
Streptomicina	0	1
Gentamicina	1	0

Cuadro 5. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.

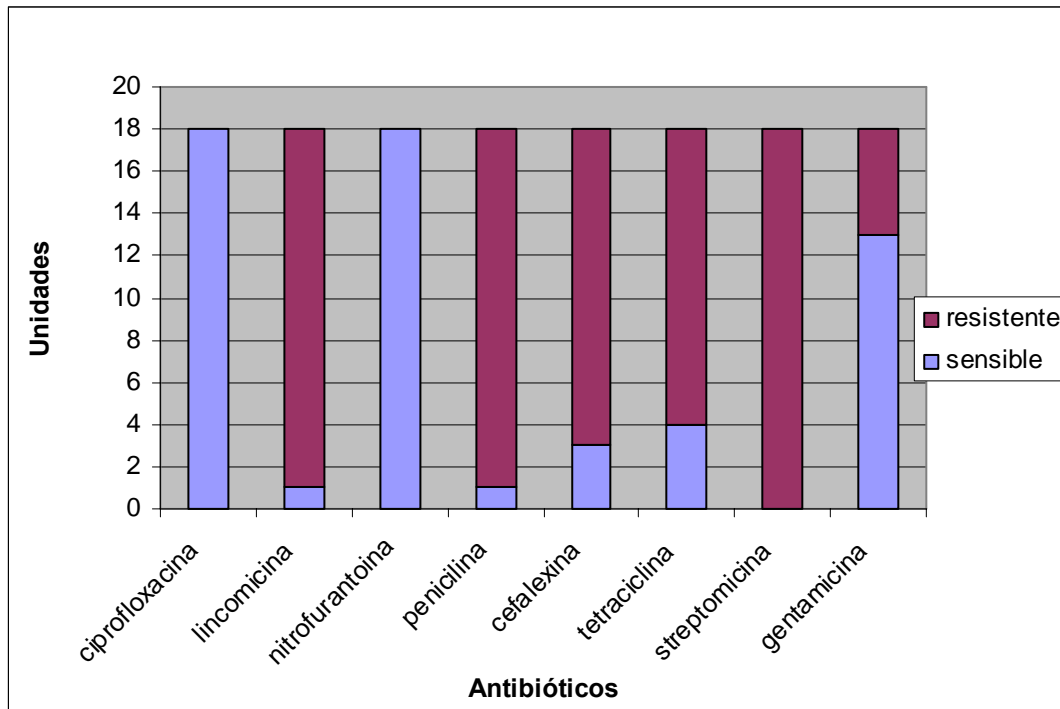
Antibiótico	Sensible	Resistente
Ciprofloxacina	1	0
Penicilina	0	1
Tetraciclina	0	1
Gentamicina	1	0
Amoxicilina	0	1
Sulfatrimetoprim	0	1
Ceftriaxona	1	0
Norfloxacina	1	0

GRÁFICAS

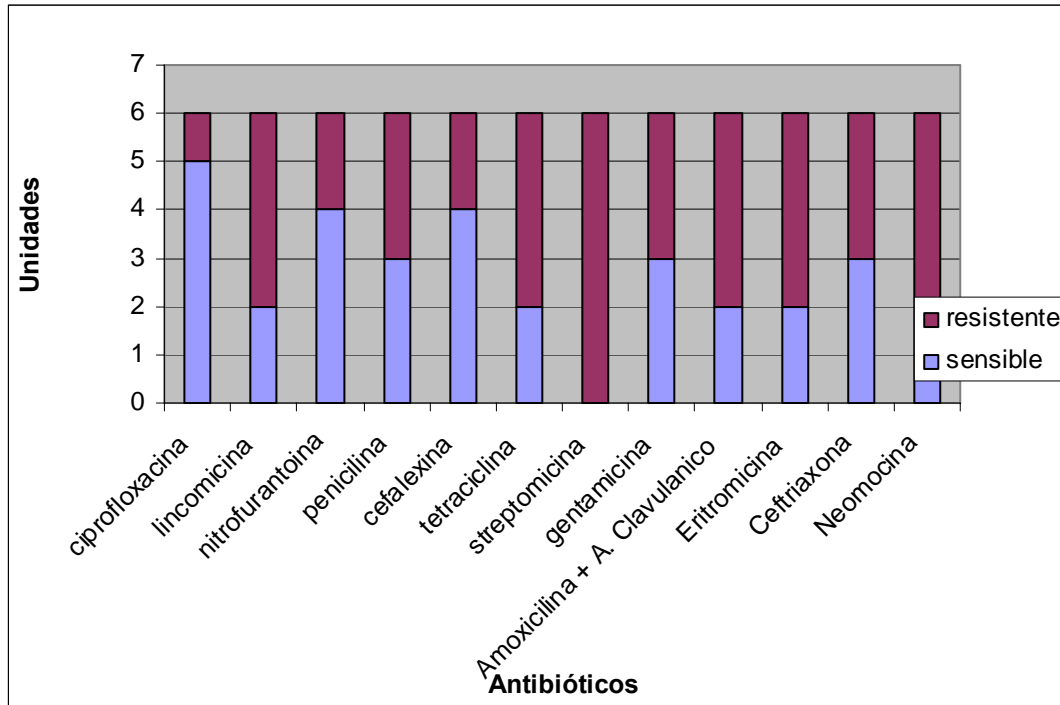
Gráfica 1. Microorganismos aislados de los casos de mastitis clínica. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.



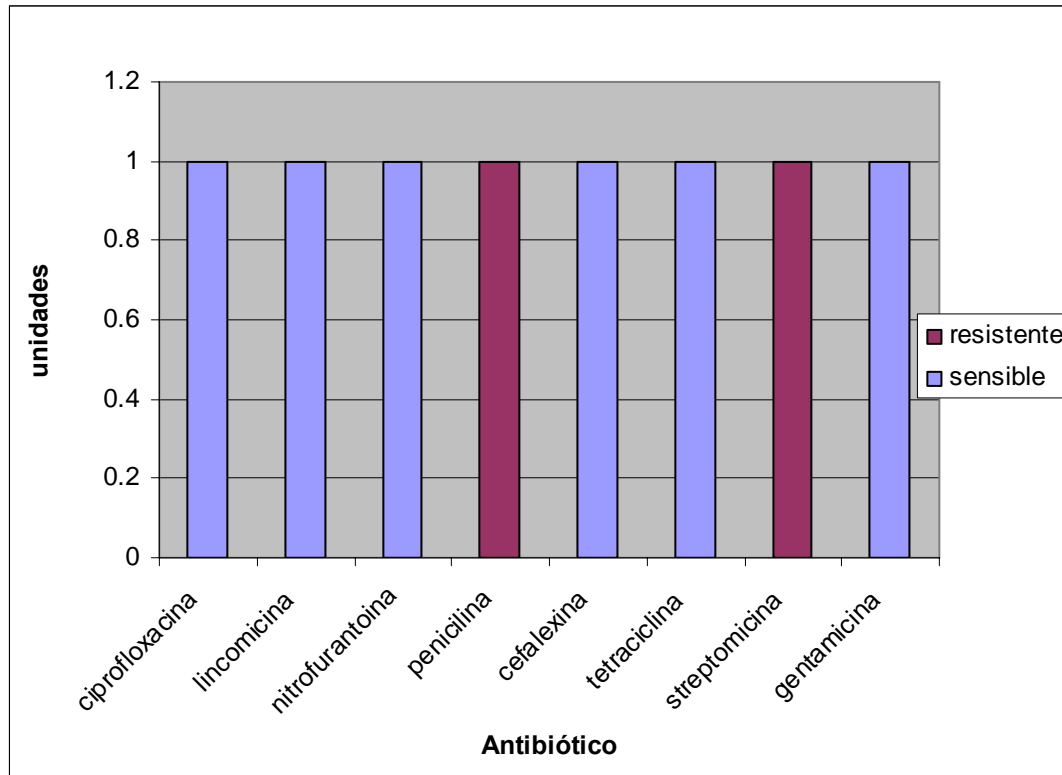
Gráfica 2. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *E.coli*. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.



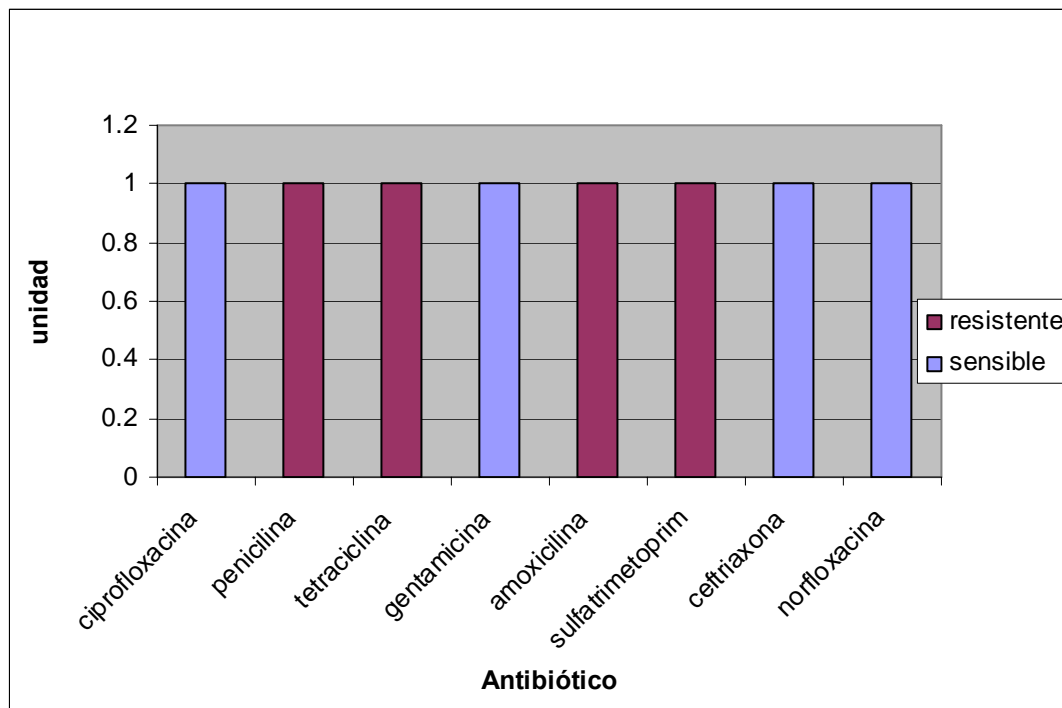
Gráfica 3. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *Streptococcus spp.* Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.



Gráfica 4. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *Staphylococcus aureus*. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.



Gráfica 5. Resultados del antibiograma realizado a la cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera. Guatemala, Mayo de 2008.



DISCUSION DE RESULTADOS

Se colectaron un total de 30 muestras de una explotación lechera del suroccidente de Guatemala, por conveniencia, ya que contaba con el número de casos requeridos. Los resultados de laboratorio reportaron los tipos de microorganismos aislados con su respectivo antibiograma.

En el cuadro 1 se presentan Los microorganismos que se aislaron de las muestras analizadas y éstos fueron en orden de frecuencia: *Escherichia coli* presente en un número de 18 muestras, representando el 60% del total de las muestras colectadas, luego se aisló *Streptococcus spp* con un numero de 6 muestras representando el 20% de las mismas, seguido de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* las cuales solo se aislaron una vez cada una, representando un 3% cada una.

Dentro de las muestras se obtuvo 4 resultados negativos, representando un 13% del total de las muestras.

La contaminación con microorganismos ambientales indican fallas en el sellado de las vacas post ordeño, mientas que *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp* indican deficiencias en el secado de las vacas.

En el cuadro 2 se presentan los resultados de los antibiogramas de sensibilidad y resistencia antibiótica de las cepas de *E. coli* encontradas bajo las condiciones del presente estudio, demostrando un 100% de sensibilidad a la ciprofloxacina y la nitrofurantoína, un 72% a la gentamicina. Por el contrario, mostró una resistencia del 100% a la estreptomycin, seguido de un 94% a la penicilina y lincomicina, luego un 83% a la cefalexina y por último un 78% de resistencia a la tetraciclina.

En el cuadro 3 se muestran los hallazgos de la sensibilidad y resistencia antibiótica de los *Streptococcus spp*, aislados en el presente trabajo; siendo más sensible a la ciprofloxacina con un 83%, a la cefalexina y nitrofurantoina con un 67% cada uno, luego a la penicilina con un 50% al igual que la gentamicina y la ceftriaxona. Por otro lado mostró un 100% de resistencia a la estreptomina, seguido de la neomicina que mostró un 83% de resistencia, a la lincomicina, tetraciclina, amoxicilina + ácido clavulánico y eritromicina con un 67% de resistencia, a la penicilina, ceftriaxona y gentamicina, mostraron también el otro 50% de resistencia.

En el cuadro 4 se muestran los resultados del antibiograma a *Staphylococcus aureus*, aislados en el presente estudio, ya que solo fue una muestra positiva a este microorganismo, presentó un 100% de sensibilidad hacia la ciprofloxacina, nitrofurantoína, lincomicina, cefalexina, tetraciclina y gentamicina. Por el contrario solo presentó resistencia a la penicilina y estreptomina.

En el cuadro 5 se presenta los resultados del antibiograma que se le realizó a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* encontrada en el presente estudio y se puede observar que mostró sensibilidad a la ciprofloxacina, gentamicina, ceftriaxona y norfloxacina. Por el contrario, fue resistente a la amoxicilina, sulfatrimetoprim, penicilina y tetraciclina.

VI. CONCLUSIONES

1. El microorganismo que se aisló con más frecuencia fue *E.coli*, con un 60% de las muestras, y mostró un 100% de sensibilidad a la ciprofloxacina y nitrofurantoína.
2. El segundo microorganismo aislado fue *Streptococcus sp.* Con un 20% de las muestras, y mostro un 83% de sensibilidad a la ciprofloxacina, un 67% a la cefalexina y nitrofurantoína.
3. Ocupando el tercer lugar en frecuencia se encontraron, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, representando el 3% de las muestras cada una. *Staphylococcus aureus* mostró un 100% de sensibilidad hacia la ciprofloxacina, nitrofurantoína, lincomicina, cefalexina, tetraciclina y gentamicina. Mientras que *Pseudomonas aeruginosa* mostró 100% de sensibilidad a la ciprofloxacina, gentamicina, ceftriaxona y norfloxacina.
4. Al analizar los resultados del correspondiente antibiograma de cada uno de los microorganismos aislados se observó que hubo mayor sensibilidad a la ciprofloxacina, nitrofurantoína, cefalexina y gentamicina.
5. Los microorganismos aislados fueron resistentes en su mayoría a la penicilina y estreptomicina, tetraciclina y lincomicina.
6. La mejor opción de antibióticos para el tratamiento son, la ciprofloxacina, nitrofurantoína, sin embargo éste último no existe en medicina veterinaria.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar buenas técnicas de ordeño y cumplir con las medidas de bioseguridad en una granja, para mantener animales sanos y obtener buena calidad de la leche.
2. Contar periódicamente con un programa de campo para realizar las pruebas correspondientes (California Mastitis Test), y lograr así detectar a tiempo las mastitis.
3. Capacitar al personal de las explotaciones acerca de los microorganismos que pueden aislarse, el daño que causan y qué antibióticos utilizar.
4. Hacer uso del laboratorio para identificar que antibiótico puede ser eficaz en los diferentes casos que se presenten, logrando así disminuir gastos posteriores.
5. Conscientizar a los productores de leche la importancia que tiene la calidad de la leche, sobre la cantidad que produzcan sus vacas.

VIII. RESUMEN

El estudio se realizó en una explotación lechera del suroccidente de Guatemala, teniendo ordeño mecánico y personal capacitado. Se muestreó leche de los cuartos afectados de 30 vacas que presentaban mastitis clínica, luego fueron llevadas a laboratorio para procesarlas.

El diagnóstico mostró que los microorganismos que más presencia tuvieron fueron *E. coli*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

A cada bacteria aislada se le realizó el antibiograma con diferentes antibióticos y los resultados mostraron que las bacterias se mostraron más sensibles a la ciprofloxacina, nitrofurantoína, cefalexina y gentamicina. Y en menor grado a la tetraciclina, penicilina, lincomicina, estreptomina, eritromicina y ceftriaxona. Lo que nos indica que la mejor opción de tratamiento es la ciprofloxacina ya que todas las bacterias mostraron siempre sensibilidad hacia éste antibiótico.

Dentro de las buenas prácticas de ordeño es necesario realizar pruebas de diagnóstico para saber el agente causal de la mastitis y así erradicar el problema, de acuerdo a la disponibilidad de productos en el mercado.

Las pruebas que resultaron negativas fueron porque evidentemente la mastitis clínica no fue causada por una bacteria sino por un golpe o trauma.

La importancia de realizar este estudio consistió en saber que tratamiento es el mejor en casos de mastitis clínica, y hacer buen uso de los antibióticos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Andresen, H. 2001. Mastitis: Prevención y control. (en línea). Perú. Consultado 17 sep. 2007. Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bVrevistas/veterinaria/v12_n2/mastitis.htm#ALGUNAS_CONSIDERACIONES
2. Armenteros, M. 1997. Prevención de la mastitis bovina: desinfección de pezones post-ordeno. (en línea). Consultado 17 sep. 2007. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos36/prevencion-mastitis/prevencion-mastitis.shtml>
3. Ávila, S. 2000. Mastitis en ganado bovino. (en línea). Facultad de medicina veterinaria y zootecnia, México. Consultado 23 jul. 2007. Disponible en <http://www.bio-zoo.com.mx/articulos/salud-animal/mastitis-en-ganado-bovino.html>
4. Balsa, J. 2006. Tratamiento de mastitis aguda y crónica. (en línea). Laboratorios Burnet, Argentina. Consultado 10 ago. 2007. Disponible en http://www.engormix.com/master_tratamiento_mastitis_s_products783-42.htm
5. Begoglio, RM. 1993. Antibióticos. 5 ed. Argentina, Editorial Médica Panamericana.
6. Biberstein, E. 1990. Tratado de microbiología veterinaria. Trad M. Ramis. España. Acribia.
7. Davis, B; Dulbecco, R; Eisen, H; Ginsberg, H; Wood, B. 1998. Tratado de Microbiología. 2 ed. España. Salvat.
8. Freeman, B. 1984. Tratado de Microbiología de Burrows. Trad R. Espinoza. 21 ed. México. Interamericana.
9. Galas, M; Pasteran, F. 2006. Sensibilidad a los Antimicrobianos. Argentina. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.
10. Manual de medios de cultivo 1994. MERCK 1994. [Edición 1994]. Alemania, MERCK.

11. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. 2001. México, s.e.
12. Martín, B; Bonie, C. 2005. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino. (en línea). Facultad de ciencias veterinarias. Universidad Austral de Chile. Consultado 3 oct. 2007. Disponible en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301732X2005000200005&script=sci_arttext
13. Mastitis bovina con especial énfasis en la realidad nacional. 2004. (en línea). Drogas sin efecto antimicrobiano utilizadas en mastitis clínica. Facultad de ciencias pecuarias. Universidad de Chile. Consultado 3 oct. 2007. Disponible en http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D7824%2526ISID%253D414%2526PRT%253D7798,00.html
14. Mateos, E; Piris, S; Valdillo, S. 2002. Manual de microbiología veterinaria. 2 ed. España. Interamericana.
15. Merck & CO. 2000. El manual merck de veterinaria. Trad J. Gutiérrez. 5 ed. Colombia. Océano.
16. Noguera, E. 2002. La mejor manera de controlar la mastitis bovina. (en línea). Fonaiap, Maracaibo. Consultado 17 sep. 2007. Disponible en <http://www.fonaiap.gov.ve/publica/divulga/fd59/mastiti.html>
17. Patógenos más comunes de la mastitis. (en línea). 2005. Pfizer salud animal, México. Consultado 10 ago. 2007. Disponible en <http://www.pfizerah.com.mx/health.asp?country=MX&specieas=DA&lang=SP&drug=US&t=834key=863&type=3>
18. Prevención y detección de la mastitis. (en línea). 2005. Agrovit, Argentina. Consultado 17 sep. 2007. Disponible en http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000008en.htm
19. Scaranelli, A. 2005. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. (en línea). Facultad de ciencias veterinarias. Venezuela. Consultado 3 oct. 2007. Disponible en http://209.85.165.104/search?q=cache:okUAh_tY6E8J:www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo9-s5.pdf+Patogenos+mas+frecuentes+en+mastitis+bovina&hl=es&ct=clnk&cd=1&gl=sv

X. ANEXOS

(ANEXO 2)
HOJA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE LABORATORIO

	Fecha:
Nombre:	Doctor:

CULTIVO DE LECHE
TIEMPO DE INCUBACION:
RESULTADO:
SUSCEPTIBLE:
INTERMEDIO:
RESISTENTE:

P.M.P María Raquel López Calderón.

Dra. Virginia Bolaños de Corzo.
ASESOR PRINCIPAL.

Dr. Fredy Rolando González Guerrero.

Dr. Jaime Méndez Sosa.

Imprímase _____
Lic. Zoot. Marco Vinicio De La Rosa Montepeque.
Decano