

ISBN 970-27-1045-6

TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA ORIENTADAS A INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LOS CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS APLICABLES EN LOS PROGRAMAS DE CONTROL DE VACAS CON MASTITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA

Valdivia Vázquez O.*, Castañeda Vázquez H.***, Castañeda Vázquez M.A.***,
Bedolla Cedeño C.**Valdivia Vázquez E.*, García Gómez J.*, Wolter Wilfried.***,
Barragán Cano Victor****

*Investigadores del laboratorio de microbiología del Hospital Civil de Guadalajara Depto. de Bacteriología. Hospital N° 278 Gdl Jal.

** Laboratorio de Mastitis y diagnostico molecular, Depto. de Medicina Veterinaria CUCBA, Universidad de Guadalajara, Km. 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Zapópan, Jalisco México.

***Regierungspräsidium Giessen Dezernat 51,2, Schanzenfeldstrasse 8, 35578 Wetzlar, Alemania Federal.

Introducción

La ganadería en la producción de leche es la principal actividad del sector agropecuario de la región centro y una de las más importantes del país. De las 995.483 vacas lecheras inventariadas en el estado de Jalisco aproximadamente el 16% se explotan en la región centro con 162.994 vacas que aportan el 9% de la leche que se produce en el estado. (SAGARPA,2004., INEGI.2004). Investigaciones realizadas sobre la mastitis, nos indican que existe una incidencia de mastitis clínica y subclínica, hasta de un 50% de las vacas lecheras. Sin embargo hay muchos vacíos en los bancos de información, con respecto a los agentes causales más comunes, actualmente se realiza una división de 31 géneros de *Staphylococcus* de los cuales 14 han sido aisladas de glándulas mamarias bovinas como agentes causantes de mastitis; esto tiene relación con la reacción que estos microorganismos causan en la ubre. La ganadería en la producción de leche es la principal actividad del sector agropecuario de la región centro y una de las más importantes del país. De las 995.483 vacas lecheras inventariadas en el estado de Jalisco aproximadamente el 16% se explotan en la región centro con 162.994 vacas que aportan el 9% de la leche que se produce en el estado. (SAGARPA,2004., INEGI.2004). Investigaciones realizadas sobre la mastitis, nos indican que existe una incidencia de mastitis clínica y subclínica, hasta de un 50% de las vacas lecheras. Sin embargo hay muchos vacíos en los bancos de información con respecto a los agentes causales más comunes, actualmente se realiza una división de 31 géneros de *Staphylococcus* de los cuales 14 han sido aisladas de glándulas mamarias bovinas como agentes causantes de mastitis; esto tiene relación con la reacción que estos microorganismos causan en la ubre. Valorar la eficacia de la centrifugación y la

preincubación de muestras de leche en el crecimiento de la sensibilidad del cultivo para la identificación de vacas con mastitis causada por *S. aureus* y *Str. agalactiae*, así como el aislamiento de patógenos causantes de mastitis clínica y subclínicas bovina en la zona centro de Jalisco.

Limitaciones del cultivo bacteriológico en el diagnóstico de mastitis:

A pesar de que, en el diagnóstico de la mastitis, los cultivos bacteriológicos son el método de referencia para la estimación del estatus infectivo de una glándula mamaria, no es cierto que dicho método tiene varias limitaciones destacables, ya sean fruto del propio procedimiento analítico como de las características dinámicas y cambiantes de la infección mamaria. Entre las limitaciones del cultivo bacteriológico de leche para la determinación de la presencia o ausencia de infección en el masto, podemos destacar las siguientes:

1) Limitaciones derivadas de las características de la infección mamaria:

-Excreción de microorganismos muy variable, desde nula (excreciones intermitentes) muy escasa (< de 50ufc/ml) hasta de decenas de miles de bacterias por ml.

-Posible ausencia de microorganismos en la mama aun cuando existan signos clínicos y alteración de la secreción; tal como las secreciones de algunas mastitis colibacilares.

-Presencia de microorganismos en el canal del pezón aun cuando no exista infección en el interior de la glándula mamaria, y que por tanto pueden ser aislados aunque se haya desinfectado correctamente la superficie externa del esfínter del pezón.

-Implicación en las mastitis de los rumiantes de patógenos que habitan de forma saprofítica en el entorno del animal y en el medio ambiente general, y que por lo tanto forman parte de la flora contaminante habitual aislada de muestras no recolectadas asépticamente.

2) Limitaciones derivadas de los procedimientos diagnósticos, tanto analíticos como recolección de muestras y conservación de las mismas:

-La colecta no aséptica de muestras conduce al aislamiento de bacterias habitualmente causantes de mastitis y, por tanto, puede provocar una interpretación errónea del cultivo, Falso positivo, o un enmascaramiento del patógeno causante de la infección.

-El análisis en conjunto de la mezcla de leche de todos los cuartos no es recomendable, ya que la infección en dos o más cuartos, con presencia en el medio de cultivo de más de tres o más especies bacterianas no permitiendo cual de ellas es la responsable de la infección y cuál proviene del exterior de la glándula mamaria.

-Los procedimientos analíticos habituales utilizados para el cultivo de muestras individuales de cuartos medios no selectivos, que permiten el crecimiento de posibles contaminantes.

-Dado que en los procedimientos de rutina la muestra no se enriquece previamente, excepción hecha del cultivo de micoplasmas, el análisis tiene una sensibilidad limitada y

marcada por la cantidad de inóculo. Este es normalmente de 10-25 microlitros, lo que permite un umbral de detección de 55-105 ufc/ml.

-Dificultad para el aislamiento e identificación de la mayor parte de los microorganismos en los cultivos donde existe la presencia de dos o más especies y en una densidad elevada

Algunas de estas limitaciones se reducen considerablemente cuando se trata de identificar ciertos microorganismos causantes de mastitis, fácilmente identificables en los medios de cultivo por su morfología colonial y cuyo hábitat es preferencial o estrictamente mamario, lo que permite aislarlos y relacionarlos con la infección mamaria aun en cultivos severamente contaminados. El *Streptococcus agalactiae*, *disgalactiae* y *Staphylococcus aureus* son ejemplo de ello. Son además de patógenos clasificados como “contagiosos”, pueden alcanzar elevadas prevalencias en los rebaños y su control pasa en algunos casos por la identificación de los animales infectados.

Así en el caso de *S. aureus*, el tratamiento antibiótico-terapia simultáneamente de los animales infectados es una rutina utilizada de costosa erradicación de este patógeno del rebaño. La necesidad de respetar los períodos de absorción de antibióticos pretende que, especialmente en rebaños con prevalencias medias o bajas, el tratamiento selectivo de cuartos infectados sean en la mayoría de los casos, la eficiencia del control más adecuada a) por su parte la segregación estricta del ordeño en los animales infectados por *Streptococcus agalactiae* o *S. aureus*, así como el desecho de vacas que no prospero la eliminación de la infección, son medidas ineficaces pero que exigen el análisis individual y periódico de todos los animales del hato. b).

En el caso de estos patógenos, dado que su aislamiento e identificación en los cultivos tradicionales, tanto no selectivos como selectivos, es algo relativamente simple, el umbral de la detección determinada por la cantidad de leche sembrada es el principal factor limitante de la sensibilidad del análisis. Sin embargo, la cantidad de inóculo no es limitada, dado que la siembra se realiza en superficie de cajas de petri de tamaño estándar, 20 ml de agar aproximadamente.

Sin embargo, la incubación y la centrifugación de muestras son técnicas que permiten incrementar la concentración microbiana, ya sea por multiplicación de los microorganismos en el conjunto de la muestra (incubación), o por su concentración en una fracción determinada de ella (centrifugación). En muestras potencialmente positivas, ambas técnicas pueden suponer un incremento del número de microorganismos presentes en el inóculo que se siembra y, por tanto, una mejora en el umbral de detección en los medios de cultivo para cantidades similares de inóculo.

Objetivo

Valorar la eficacia de la centrifugación y la preincubación de muestras de leche en el crecimiento de la sensibilidad del cultivo para la identificación de vacas con mastitis

causada por *S. aureus* y *Str. agalactiae*, así como el aislamiento de patógenos causantes de mastitis clínica y subclínica bovina en la zona centro de Jalisco.

Material y Métodos

Se analizaron 3 establos lecheros por época de secas y lluvias con una población total de animales muestreados de 97, 120 y 44 vacas respectivamente, estando ubicados en el municipio de Zapopan región centro de Jalisco. En estos fueron tomados de vacas en producción, de manera antiséptica. Muestras de leche de cuartos aparentemente sanos, al inicio del ordeño, Los aislamientos y métodos utilizados para la identificación, fueron los sugeridos por (NOM-115-SSA 1-1994) y el (BAM 2001). Para el aislamiento de *S. aureus* se utilizó medio de cultivo agar-sangre soja tripticosa con 5 % de sangre de humano, el aislamiento para *Str. agalactiae* se utilizó, un medio de agar de Edwards con un 5 % de sangre ovina se sembraron en los medios de cultivo 15 microlitros aproximadamente de leche. La identificación de las colonias se realizó mediante la prueba de Camp, esculina y test de aglutinación para estreptococos.

El procedimiento de la centrifugación se realizó durante 15 minutos a 1.500 rpm, sobre una cantidad variable de muestras 1-5 ml, utilizando el sedimento para la muestra a sembrar. Mientras que la preincubación se realizó a 37°C +/- durante 24, 48 y 72 hrs.

Con el fin de estimar la concentración bacteriana inicial en las muestras y el crecimiento en concentración provocado por la centrifugación y la preincubación de forma a correlacionarlas con la mejor sensibilidad obtenida en cada uno de los métodos, se efectuó el recuento celular en placa y se corrigió para la cantidad de muestra sembrada ($n^{\circ} \text{ ufc} \times 50 = n^{\circ} \text{ bacterias} / \text{ml}$ de leche inoculada), las tasas bacterianas inferiores a 50 por ml, (límite de detección del cultivo) se considero como excreción 0 ó nula, mientras que las tasas superiores a 15.000 (considerando de 250-300 ufc como límite máximo de recuento en placa) se aquirataron en cantidad con el fin de manejarlas cuantitativamente.

Resultados

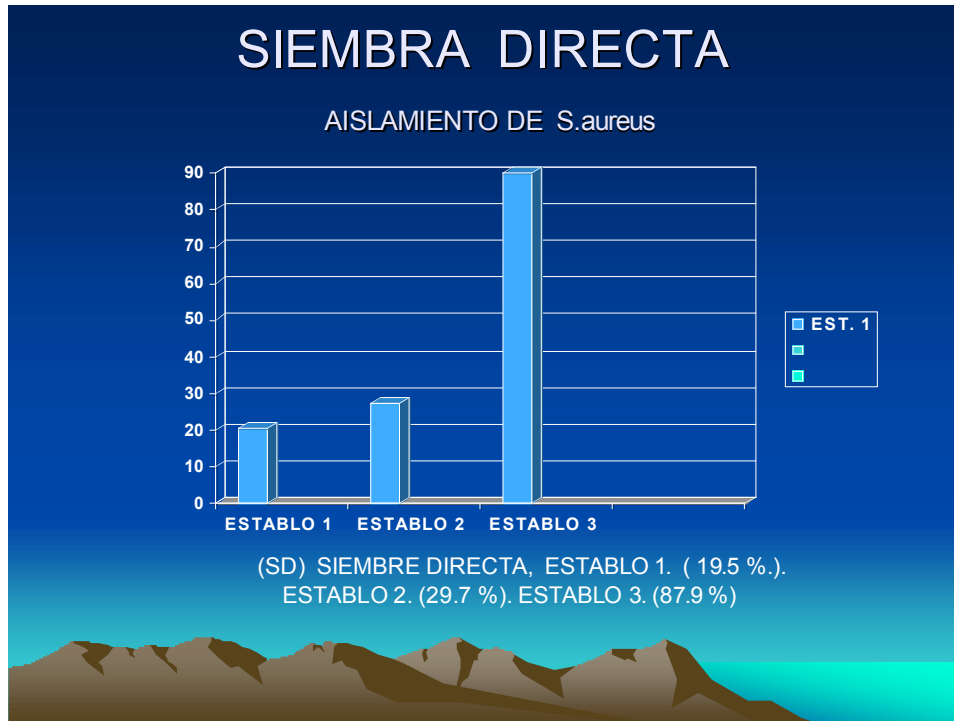
Aislamiento de *S. aureus*.

Tras la siembra directa, *S. aureus* se aisló en 14 de 143 muestras prevalencia de: 9.8%. 8 de 96 en el establo 1, (8.3%), 6 en el establo 2 (14.7%) y 2 de 14 en el establo 3 8.8%. Gráfica 1)

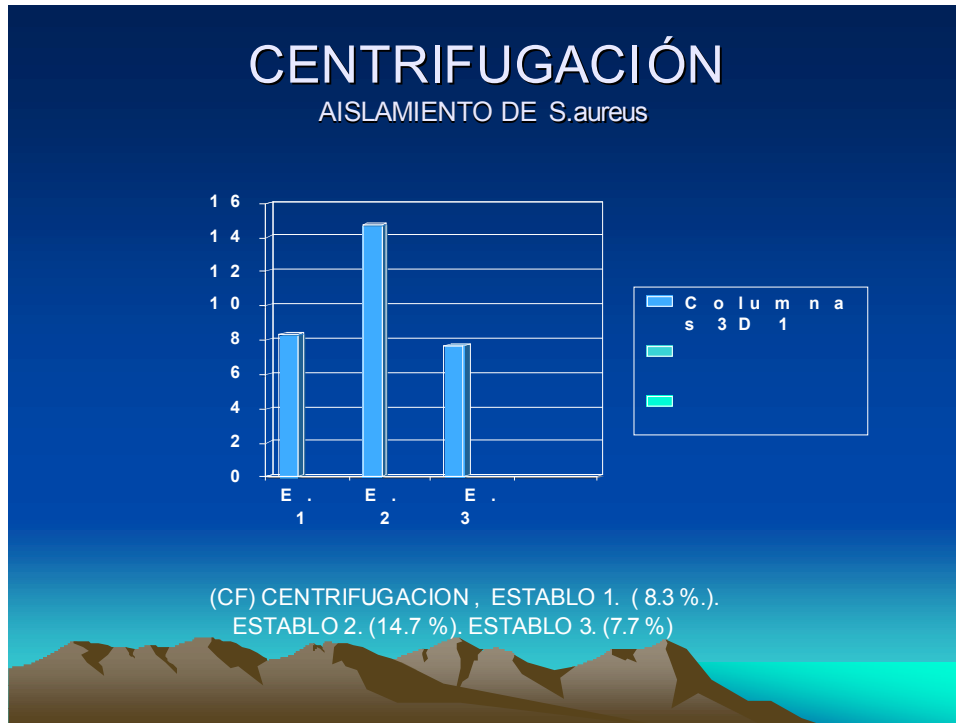
Después de haber centrifugado *S. aureus* se aisló 15 de 144 muestras prevalencia de 9.81%, 8 de 96 en el establo 1, 8.3%. 6 de 35 en el establo 2, 14.7%. y 2 de 14 en el establo 3, 7.7%.

Después de la incubación de las muestras de *S. aureus* se aisló 25 de 146 prevalencia de 15.4%. 15 de 99 en establo 1, 15.5%. 9 de 34 en el establo 2, 26.5% 2 de 14 en el establo 3, 7.7 %.

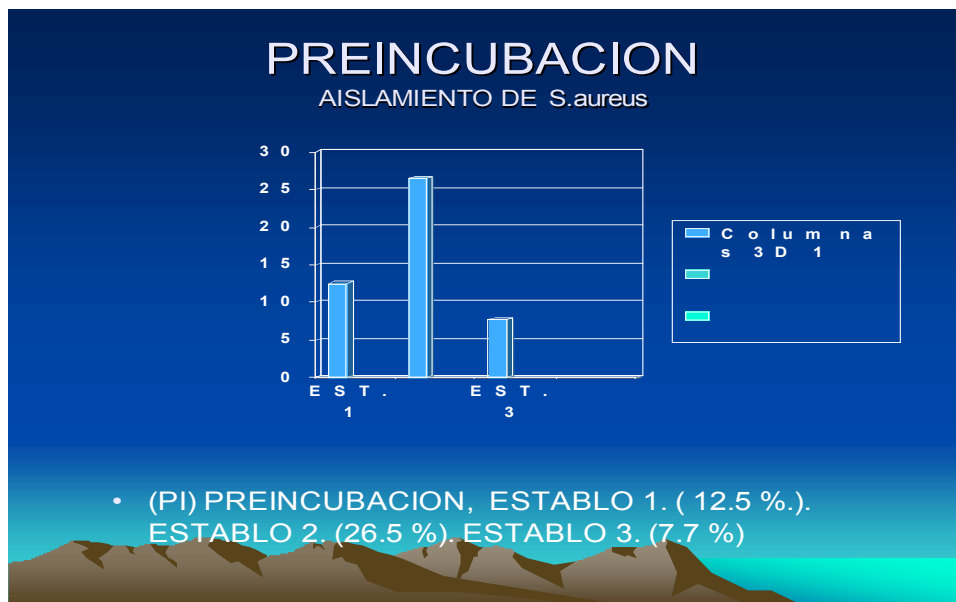
Siembra directa, aislamiento de *S. aureus* (gráfica 1).



Centrifugación. Aislamiento de *S. aureus*, (gráfica 2).



Preincubación, aislamiento de *S. aureus*, (gráfica 3).



Resultados

Aislamiento de *Str. agalactiae*.

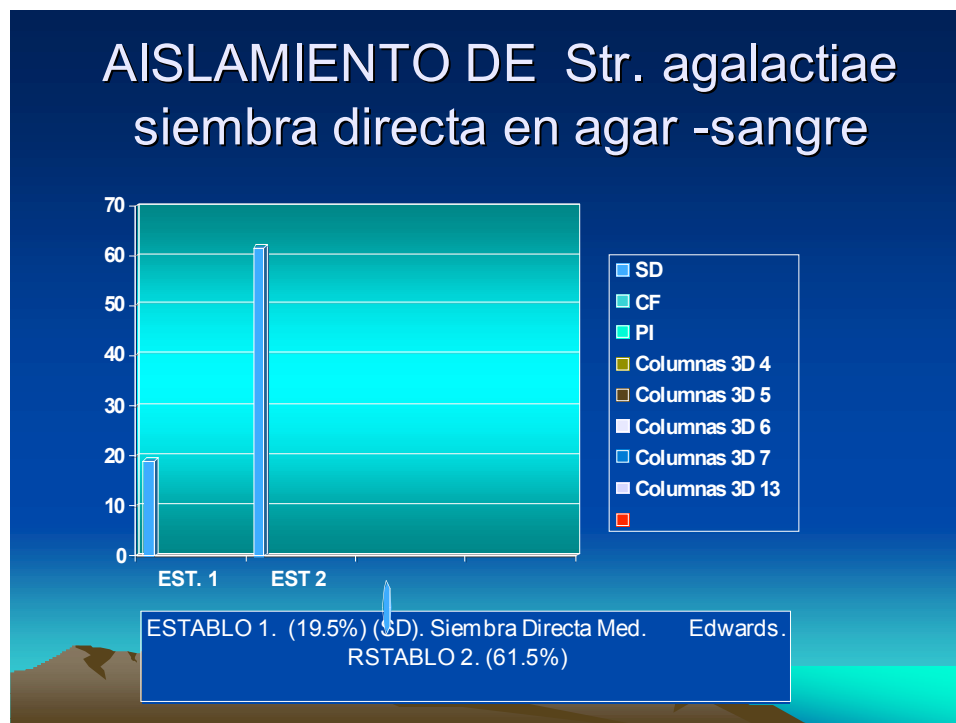
Después de la siembra directa de en agar sangre. *Str. agalactiae* se aisló, en 22 de 39 muestras con una prevalencia de 56.41% en el establo 2 únicamente se utilizó este medio,

Tras la siembra directa en agar de Edwards (ED), *Str. agalactiae* se aisló en 41 de 124 muestras con una prevalencia de 32.5%, 16 de 84 en el establo 1, 19.01% y 24 de 39 en el establo 2, 61.51%.

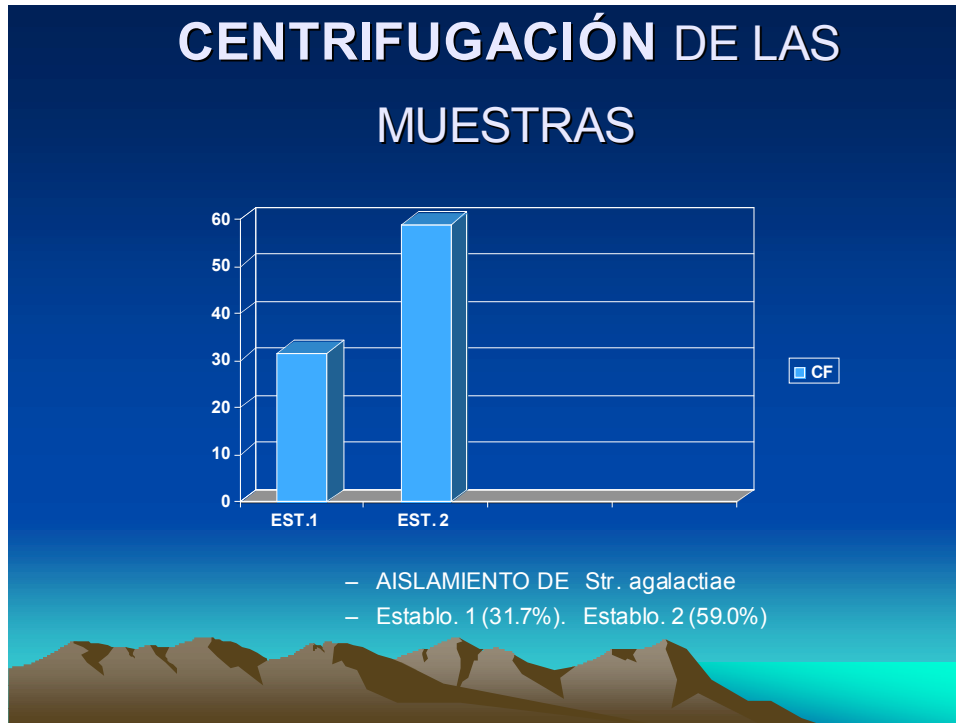
Tras la centrifugación de las muestras y siembra en agar (ED) *Str. agalactiae* se aisló en 39 de 123 muestras con una prevalencia de 31.7%. 16 de 84 en el establo 1, 31.7%, y 23 de 39 en el establo 2, 59.01%,

Tras la preincubación de las muestras y siembra en agar ED, *Str. agalactiae* se aislo en 54 de 123 muestras con una prevalencia de 43.9%, 30 de 84 en el establo 1, 35.7% y 24 de 39 en el establo 2 61.5%

Siembra directa, en agar sangre. Aislamiento de *Str. agalactiae*. (gráfica 4).



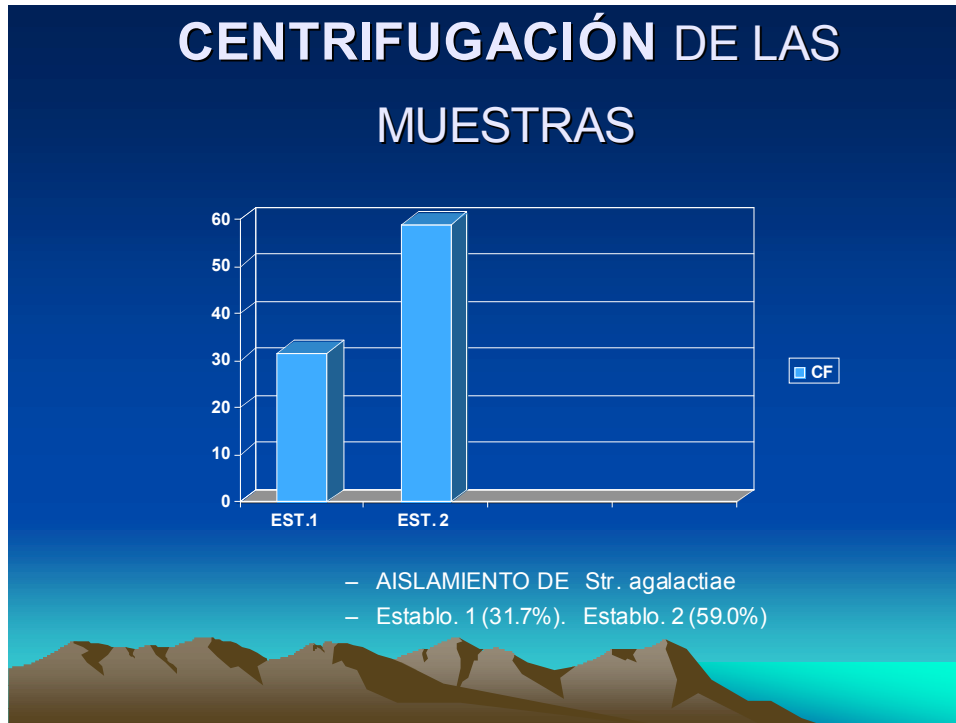
Centrifugación de las muestras de *Str. agalactiae*. (gráfica 5).



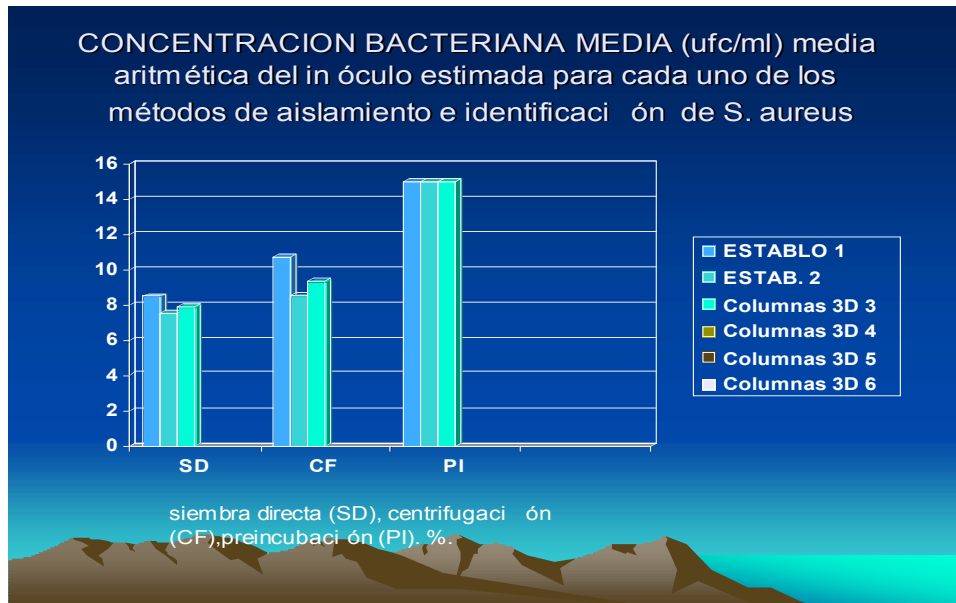
Preincubación de las muestras medio de Edwards, aislamiento de *Str. agalactiae*, (gráfica 6).



Centrifugación de las muestras de *Str. agalactiae*, estable 1 y 2. (gráfica 7).



Concentración Bacteriana ufc/ml. método de aislamiento e identificación de *S. aureus*. (gráfica 7).



Discusión

Después de la centrifugación de muestras, según el protocolo de material y métodos, no se consigue mejoramiento en ninguno de los métodos. En la investigación de *S. aureus*, el porcentaje de positivos aislados fue similar al método de siembra directa, mientras que en la investigación del aislamiento para *Str. agalactiae* fue incluso ligeramente inferior (3 positivos en siembra directa no se detectaron por centrifugación. Al respecto hay que señalar que la cantidad de muestra centrifugada en el establo 2 en la experiencia de *Str. agalactiae* fue sensiblemente inferior al resto, no superando los 3cc en la mayor parte de los casos

Bibliografía

- Castañeda H. Distribución y prevalencia de Bacterias Patógenas aisladas de Casos de Mastitis Bovina en Jalisco México-Avances en la Investigación Científica. En el CUCBA. XVI Semana de la Investigación Científica. Pag. 603-607. (2006).
- Esnal. A. Analítica Veterinaria. (2006). Técnicas Microbiológicas, Volumen 17.- pag. 10-28
- Romero AT. 2004. Departamento de Producción Animal: Rumiantes FMVZ-UNAM 2-7.
- Valdivia O. (2006) Identificación y Genotipificación de Cepas de *Staphylococcus aureus* de Vacas con Mastitis en la Región Centro de Jalisco México. Avances en la Investigación Científica. En el CUCBA. XVI Semana de la Investigación Científica. Pag.702-707.
- Watts JL. (1998). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16:41-66.
- Wolter W., Castañeda-Vázquez,H.,Kloppert, B.(2004). La mastitis Bovina, prevención, diagnóstico, tratamiento. Ed. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.