

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL**  
**DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**



**Tesis**

**Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos  
para mastitis subclínicas, California Test y  
DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba -  
Carazo, Agosto-Octubre, 2015.**

**Por:**

Elder Azael Reyes Sánchez.

Jefferson Steven Argüello Sánchez.

**Octubre, 2015**

**Managua, Nicaragua**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**



**Tesis**

**Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos  
para mastitis subclínicas, California Test y  
DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba -  
Carazo, Agosto-October, 2015.**

**Por:**

Elder Azael Reyes Sánchez

Jefferson Steven Argüello Sánchez

**Asesores:**

MV. Omar Navarro Reyes

Lic. Mario J. Romero Vargas

Ing. Pasteur Parrales

**October, 2015**

**Managua, Nicaragua**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL**  
**DEPARTAMENTO DE VETERINARIA**



**Tesis**

**Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis subclínicas, California Test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba - Carazo, Agosto-Octubre, 2015**

Tesis sometida a la consideración del Consejo de Investigación y Desarrollo (CID), de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), para optar al título profesional de:

**MEDICO VETERINARIO**

**En el grado de licenciatura**

**Por:**

Elder Azael Reyes Sánchez

Jefferson Steven Argüello Sánchez

**Asesores:**

MV. Omar Navarro Reyes

Lic. Mario J. Romero Vargas.

Ing. Pasteur Parrales.

**Octubre, 2015**

**Managua, Nicaragua**

# UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

## FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL



### CARTA DEL TUTOR:

Considero que el presente trabajo titulado: **Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis subclínicas, California Test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba - Carazo, Agosto-Octubre, 2015**; reúne todos los requisitos para ser presentado como trabajo de tesis.

Los diplomantes, Elder Azael Reyes Sánchez y Jefferson Steven Argüello Sánchez; desarrollaron un extenso análisis sobre el Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis subclínicas, California Test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba - Carazo, Agosto-Octubre de 2015, lo que servirá como pauta para el desarrollo pecuario de ganaderías de la zona.

Felicito a los sustentantes por su ardua labor desarrollada, por su dedicación, interés y su gran esfuerzo en la realización de este trabajo.

**Atentamente**

---

**MV. Omar Navarro Reyes.**

**Tutor**

Esta tesis fue aceptada en su presente forma, por el Consejo de Investigación y Desarrollo (CID) de la Facultad de Ciencia Animal (FACA) de la Universidad Nacional Agraria (UNA) y aprobada por el Honorable Tribunal Examinador nombrado por tal efecto, como requisito parcial para optar por el título profesional de:

**MÉDICO VETERINARIO**

**Miembros del Honorable Tribunal Examinador:**

Presidente:

---

Secretario:

---

Vocal:

---

Tutor:

---

M.V. Omar Navarro Reyes

Sustentantes:

---

Elder Azael Reyes Sánchez

---

Jefferson Steven Argüello Sánchez

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme sabiduría y las fuerzas para mantenerme firme y ayudarme a culminar mis estudios universitarios.

A mis padres por brindarme su apoyo y guiarme por el camino del bien sin ellos esto no habría sido posible, con su esfuerzo y mi esfuerzo hemos logrado alcanzar el objetivo por el cual inicie esta linda carrera y ser un profesional.

A mi abuelo Emiliano Reyes que en paz descanse y Dios lo tenga en su Santo Reino.

A mi hijo por ser fuente de motivación y para ser una mejor persona cada día.

A mí esposa por ser un pilar importante y por el apoyo incondicional que me ha brindado.

A mi amigo Jefferson Arguello más que un amigo te has convertido en un hermano para mí, hemos compartido muchos momentos juntos apoyándonos en los momentos difíciles y juntos nos hemos esforzado para poder culminar nuestra carrera y lograr ser profesionales.

**Elder Azael Reyes Sánchez**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda mi vida.

A mis padres Francisco Arguello y Zorayda Sánchez, por amarme, creer en mí y porque siempre me apoyaron en cada etapa de mi vida. Gracias por enseñarme a luchar por lo que uno quiere, este triunfo no solo es mío sino también de ustedes.

A Mi abuelo Rafael Sánchez (QEPD), siempre fue un ejemplo a seguir y sé que en el reino de Dios me está viendo y me está guiando en cada paso que doy.

A mis hermanos, Yasser Arguello y Jonathan Arguello gracias por siempre estar en los momentos que los necesito, siempre dándome ánimo para luchar y seguir adelante. Los quiero mis hermanos.

A mi novia Carla Alvarez por tu paciencia, comprensión y apoyo. Siempre alentándome para continuar y lograr cada uno de mis objetivos, gracias por estar siempre a mi lado.

A mi amigo Elder Reyes más que un amigo te has convertido en un hermano para mí, hemos compartido muchos momentos juntos apoyándonos en los momentos difíciles y en la culminación de nuestros tesis, te agradezco tu amistad

A mis maestros Mv. Omar Navarro por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestro estudio profesional y para la elaboración de la tesis; al Lic. Mario Romero por su apoyo ofreció en esta investigación; TV. Lázaro Morejón por su apoyo incondicional y su linda amistad; al Ing. Pasteur Parrales por su tiempo compartido y ayuda brindada en su momento.

**Jefferson Steven Argüello Sánchez**

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Omar Navarro Reyes por brindarnos su apoyo y amistad para realizar este trabajo de tesis.

Al Tec. Vet. Lázaro Morejón Aldama por su apoyo y amistad que nos ha brindado durante los últimos años y por compartir sus conocimientos siempre que se le necesito.

Al Lic. Mario J. Romero Vargas por brindarnos sus conocimientos y ayudarnos a la realización de este trabajo.

Al Ing. Pasteur Parrales por ayudarnos a la realización de nuestro trabajo de tesis.

Al laboratorio División veterinaria, Labvet por permitirnos realizar todos los aislamientos, identificaciones bacterianas y antibiogramas en sus instalaciones.

Al señor Ricardo Hoigjelle V, Gerente General de NORDIS por permitirnos utilizar sus equipos.

A los dueños de la ganadería Santa Ana ubicada en Diriamba, Carazo por permitirnos realizar nuestras pruebas de campo en sus instalaciones.

A todos los docentes que a lo largo de los últimos cinco años nos brindaron sus conocimientos.

**Elder Azael Reyes Sánchez**

**Jefferson Steven Argüello Sánchez.**

# Índice

I. INTRODUCCION .....	1
II. OBJETIVOS .....	2
2.1. Objetivo general .....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
III. REVISION BIBLIOGRAFICA .....	3
3.1. Mastitis .....	3
3.2. Factores que predisponen la presentación de mastitis .....	3
3.2.1. Manejo.....	3
3.2.2. Factores físicos .....	3
3.2.2.1. Heridas físicas .....	3
3.2.3. Factores genéticos .....	4
3.2.4. Factores nutricionales.....	4
3.3. Clasificación de las mastitis .....	4
3.3.1. Mastitis subclínica.....	5
3.4. Patógenos causantes de mastitis .....	6
3.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
3.4.2. <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	6
3.4.3. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> .....	6
3.4.4. <i>Streptococcus uberis</i> .....	7
3.4.5. Bacterias Gram negativas causantes de mastitis .....	7
3.4.5.1. <i>Escherichia coli</i> .....	7
3.4.5.2. <i>Pseudomonas</i> .....	7
3.4.5.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	7
3.5. Pérdidas ocasionadas por la mastitis subclínica .....	8
3.5.1. Diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de campo .....	8
3.5.1.1. California Mastitis Test .....	8
3.5.1.2. Que son las células somáticas .....	9
3.5.1.3. Función de las células somáticas en la leche.....	9
3.5.1.4. Causas de un recuento celular somático elevado .....	10
3.5.1.4.1. Mastitis .....	10
3.5.1.4.2. Fase de lactación .....	10
3.5.1.4.3. Lesiones en la glándula mamaria .....	10

3.5.1.4.4.	Variación fisiológica .....	10
3.5.1.4.5.	Variaciones diarias y de temporada.....	11
3.5.1.4.6.	Frecuencia de ordeña.....	11
3.5.1.4.7.	Estrés .....	11
3.5.4.8.	Cantidad de cuartos o vacas afectadas .....	11
3.5.1.5.	Procedimiento para la toma de muestra de leche para california mastitis test .....	11
3.5.1.6.	Interpretación de prueba california mastitis test (CMT) .....	12
3.5.2.	Detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q .....	12
3.5.2.1.	Pasos para realizar la medición con detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q .	13
3.5.2.2.	Interpretación de resultados (DRAMINSKI 4Q) .....	13
3.6.	Preparación de medios de cultivo.....	14
3.6.1.	Agar sangre de carnero al 5%.....	14
3.6.2.	Agar MacConkey .....	14
3.7.	Métodos de siembra en medios de cultivo .....	15
3.8.	Temperatura y tiempo de incubación de los microorganismos .....	15
3.9.	Tinción Gram .....	15
3.9.1.	Procedimiento para la tinción Gram.....	15
3.10.	Pruebas especiales para Gram positivos.....	16
3.10.1.	. Prueba catalasa .....	16
3.10.2.	Prueba coagulasa .....	16
3.11.	Pruebas bioquímicas para Gram negativos .....	17
3.11.1.	Prueba TSI.....	17
3.11.2.	Inoculación de microorganismo en prueba TSI.....	17
3.11.3.	Interpretación de resultados de prueba TSI.....	17
3.12.	Agar lisina hierro (LIA) .....	18
3.12.1.	Inoculación del microorganismo en prueba LIA.....	18
3.12.2.	Interpretación de resultados de prueba LIA .....	18
3.13.	Prueba movilidad, indol, ornitina (MIO).....	19
3.13.1.	Inoculación del microorganismo en la prueba MIO.....	19
3.13.2.	Interpretación de los resultados de la prueba MIO.....	19
3.14.	Agar Citrato de Simmons .....	20
3.14.1.	Procedimiento para inoculación del microorganismo en medio citrato de Simmons .....	20
3.14.2.	Interpretación de los resultados de prueba citrato de Simmons .....	20

3.15.	Realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana (antibiograma) .....	20
3.16.	Antibiograma.....	20
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
4.1.	Ubicación del área de estudio.....	22
4.2.	Diseño metodológico.....	22
4.3.	Manejo del ensayo.....	23
4.3.1.	Manejo y codificación de la información.....	23
4.3.2.	Procedimiento de diagnóstico de mastitis subclínica .....	24
4.3.2.1.	Pasos que se siguieron para hacer las mediciones con DRAMINSKI 4Q.....	24
4.3.2.1.1.	Interpretación de los resultados del detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q .....	24
4.3.2.2.	Prueba California Mastitis Test (CMT).....	25
4.3.3.	Toma de muestras de cuartos afectados .....	25
4.4.	Aislamiento, identificación bacteriana y antibiograma .....	25
4.5.	Variables evaluadas.....	26
V.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
5.1.	Número de cuartos que resultaron positivos a una o ambas pruebas a nivel de campo .....	27
5.2.	Porcentaje de eficacia en diagnóstico de detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q y califonia mastitis test CMT .....	28
5.3.	Porcentaje de falsos negativos de detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q y califonia mastitis test CMT .....	29
5.4.	Porcentaje de falsos positivos para detector de mastitis subclínica DRAMINSKI y califonia mastitis test CMT .....	30
5.5.	Bacteriología .....	30
5.6.	Análisis estadístico.....	31
VI.	CONCLUSIONES .....	32
VII.	RECOMENDACIONES .....	33
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	34

## Índice de cuadros

### Contenido

<b>Cuadro</b>	<b>Pág</b>
1. Clasificación de la mastitis	4
2. Procedimiento para la toma de muestra para de leche para CMT	11
3. Interpretación de prueba de CMT	12
4. Diagnostico obtenido a nivel de campo por DRAMINSKI 4Q y CMT	27
5. Resultados obtenido a nivel de laboratorio de DRAMINSKI 4Q y CMT	27
6. Porcentaje de eficacia en el diagnóstico para DRAMINSKI y CMT	28
7. Porcentaje de falsos negativos para DRAMINSKI y CMT	29
8. Porcentaje de falsos positivos para DRAMINSKY y CMT	30
9. Resultados de prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Staphylococu saureus</i>	31
10. Resultados de prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Pseudomona aeruginosa</i>	31

## Índice de anexos

### Anexo

### contenido

1. Plan sanitario para lechería Santa Diriamba, Carazo
2. Vacas lactantes en la unidad de producción
3. Vacas seleccionadas para el estudio
4. Formato utilizado para la toma de muestras durante el estudio
5. Instalaciones finca Santana Diriamba, Carazo
6. Diagnóstico de mastitis subclínica utilizando DRAMINSKI 4Q y California Mastitis Test
7. Toma de muestras de cuartos afectados
8. Medios de cultivo utilizados
9. Siembra de muestras de leche en medios de cultivo
10. Procedimiento para tinción Gram
11. Microorganismos observados en la tinción Gram
12. Pruebas bioquímicas para Gram negativos
13. Antibiogramas
14. Total de cultivos realizados y antibiogramas durante el estudio

Reyes, Sánchez. E.A. y Argüello, Sánchez. J.S. 2015 Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para mastitis subclínicas, California test y DRAMINSKI 4Q en vacas Jersey, Diriamba - Carazo, Agosto-October de 2015, Tesis MV. En el grado de Licenciatura, Managua, NI, Facultad de Ciencia Animal, Universidad Nacional Agraria (UNA).

## RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo de proporcionar una nueva herramienta de diagnóstico de mastitis subclínica bovina a nivel de campoy reducir las pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica a los productores mediante el diagnóstico temprano, esto se pretende lograr mediante la comparación de dos métodos de diagnóstico como son California Mastitis Test y Detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q, el estudio se realizó en la finca “Santana” ubicada en el municipio de Diriamba, departamento de Carazo, ubicada en las coordenadas 11°49’59.9” latitud norte y de 86°14’21.1” longitud oeste con una altura aproximada a 580msnm, fueron utilizadas 19 hembras las cuales estaban entre dos y tres lactancias, fueron muestreadas por cinco semanas consecutivas en el segundo ordeño, se utilizaron ambos métodos de diagnóstico iniciando por el DRAMINSKI debido a las indicaciones del equipo, se deben utilizar los primeros chorros de leche para obtener mejores resultados, posteriormente se utilizó la prueba california en las mismas vacas, de los cuartos que dieron positivo a uno o ambos métodos de diagnóstico se procedió a tomar la muestra de leche para llevarlo al laboratorio y de esta forma verificar el resultado mediante aislamiento e identificación bacteriana. Los datos fueron analizados mediante la realización de bases de datos Excel y mediante la utilización de la prueba de dependencia para CHI-CUADRADO, en los resultados se obtuvo que no hubo dependencia entre los métodos diagnósticos, pero las diferencias obtenidas no fueron significativas entre uno y otro. En el porcentaje de efectividad en los diagnósticos, para los resultados de DRAMINSKI se obtuvo un **97.38 %** de efectividad en el diagnóstico correcto y un **2.62 %** de diagnósticos incorrectos versus un **96.11 %** de diagnósticos correctos y un **3.89 %** de diagnósticos incorrectos que obtuvo la prueba California, los microorganismos aislados causantes de mastitis fueron *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

**Palabras Clave:** Mastitis subclínica, estudio comparativo, DRAMINSKI 4Q, CALIFORNIA MASTITIS TEST, Aislamiento.

## I. INTRODUCCION

La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es comúnmente una consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón. Se caracteriza por diferentes cambios ya sea físicos o químicos de la glándula mamaria (Bolaños et al., 2012).

Es considerada una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero, y es una de las más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche producida y un aumento en los costos de tratamiento, servicios veterinarios y pérdida de animales (Bolaños et al., 2012 ).

La reacción inflamatoria de la glándula mamaria puede ser ocasionada por diversos factores, entre los cuales podemos mencionar (golpes), mecánicos (manipulación o manejo) e infecciones (bacterias).

En el ganado bovino la mastitis puede presentarse en forma clínica que es definida como una anomalía de la glándula mamaria de la vaca o la leche, que puede ser fácilmente observada (Tollersrud *et al.*, 2000). La mastitis subclínica que se caracteriza por la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche, esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento (Aragón, 2014).

La mastitis subclínica no presenta cambios visibles en la leche o ubre. Apenas se percibe una reducción en el rendimiento de la leche, siendo alterada su composición por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias (Gallegos y Moncada, 2011).

La mastitis representa un serio problema en nuestro país, ya que sus efectos dañan tanto el sector pecuario, como a la salud pública, disminuyendo la calidad de la leche que es un producto básico en la alimentación diaria. El sector pecuario se ve afectado en el área económica, debido a la baja en la producción de la leche, animales que se descartan a temprana edad por la pérdida de uno o más cuartos de la glándula mamaria y por los costos de tratamiento de la enfermedad.

Se han identificado aproximadamente 140 especies causantes de mastitis, que se dividen en patógenos contagiosos y ambientales; dentro de los primeros, los principales son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma*; siendo su principal vía de entrada al canal del pezón (Radostits *et al.*, 2002).

Se ha establecido que la mastitis ocasiona pérdidas económicas significativas, por lo que es de importancia el uso de un método rápido de diagnóstico, dentro de éstas se encuentran: la prueba de California para mastitis, prueba de Catalasa, prueba de Wisconsin, detector de cargas eléctricas de la leche y el monitoreo de células somáticas, así como el diagnóstico

bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, bioquímica e identificación (Pérez *et al.*, 2005; Bedolla *et al.*, 2007).

La presente investigación consiste en la realización de un estudio comparativo entre dos métodos de diagnóstico a nivel de campo de mastitis subclínica bovina, como lo son la California mastitis test y el detector de mastitis subclínica (DRAMINSKI 4Q).

Mediante este estudio se pretende proporcionar una nueva herramienta para el diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de campo a los productores y de esta forma ayudar a mantener la salud de los cuartos mamarios en las diferentes unidades de producción, producir leche de calidad, incrementar la producción, disminuir gastos en tratamientos para mastitis clínicas, diagnosticando las mastitis subclínicas de forma temprana lo cual nos permitirá tratar a tiempo y evitar pérdidas en la producción, pérdidas de cuartos mamarios, y en otros casos descarte de hembras de alta producción antes de que éstas completen su ciclo productivo.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Proporcionar una nueva alternativa para el diagnóstico de mastitis subclínica a los productores de Nicaragua.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Realizar un estudio comparativo entre los métodos diagnósticos para la detección de Mastitis subclínica” California Mastitis Test” (CMT) y “Detector de mastitis” (DRAMINSKI) en vacas Jersey.
2. Evaluar la efectividad del diagnóstico de campo para mastitis subclínicas entre las pruebas de CMT y Detector de mastitis DRAMINSKI.
3. Identificar la facilidad y rapidez de interpretación de ambos métodos de diagnóstico para mastitis subclínica.
4. Proponer plan sanitario adecuándolo para el control de las presentaciones de mastitis subclínicas en la Finca Santana.

### **III. REVISION BIBLIOGRAFICA**

#### **3.1. Mastitis**

Mastitis (del griego mastos = glándula mamaria y del sufijo itis = inflamación). 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 (Mazo, 2012).

#### **3.2. Factores que predisponen la presentación de mastitis**

##### **3.2.1. Manejo**

Es importante considerar la fuente y formas de transmisión de la enfermedad. Los organismos que causan la mastitis viven en diferentes ambientes (materia fecal, cama, piel, etc.). La limpieza general de las vacas y su alojamiento, como también buenos procedimientos de manejo (especialmente ordeño) son formas efectivas de controlar la difusión de la mastitis (ARA 2006).

##### **3.2.2. Factores físicos**

###### **3.2.2.1. Heridas físicas**

Las heridas físicas pueden causar daños en la piel del pezón. Si estas heridas involucran apertura de la punta del pezón (canal), por lo general, no se recuperan apropiadamente. Tales heridas incrementan el riesgo de entrada de bacterias a la glándula a través de la apertura del pezón y causan nuevas infecciones y elevados recuentos de células somáticas (González, 2012).

###### **3.2.2.2. Personal**

El personal que labora en la zona para ordeño, constituye uno de los elementos más importantes en el modelo de producción, sin embargo, es poca la atención que la administración de los establos pone en la selección y supervisión de este personal, el ordeñador es un importante vector para la diseminación de microorganismos causantes de mastitis (Gonzales, 2012).

### 3.2.3. Factores genéticos

Es un hecho que algunas vacas presentan una mayor susceptibilidad a la mastitis que otras. Los factores estructurales del canal del pezón son importantes en la regulación de la entrada de microorganismos. Algunos autores afirman que si el tono de las estructuras anatómicas de la apertura del pezón es reducido, lo que es un carácter heredable, la resistencia a la entrada de los microorganismos será menor. Se seleccionará genéticamente vacas con diámetro pequeño del canal del pezón, lo que hará que la frecuencia de mastitis disminuya (Zúñiga, 2006).

### 3.2.4. Factores nutricionales

La alimentación actual de la vaca lechera está destinada a mantener un alto nivel de producción; esto constituye un factor de tensión fisiológico que puede provocar mastitis clínica en vacas con antecedentes de infecciones o mastitis sub clínica (Zúñiga, 2006).

## 3.3. Clasificación de las mastitis

La mastitis bovina normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica (dos Santos et al., 2002; Field, 2003). Es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no (cuadro 1).

**Cuadro 1. Clasificación de la mastitis**

<b>Formas de mastitis</b>	<b>Vaca</b>	<b>ubre</b>	<b>Leche</b>
<b>Clínica híper aguda</b>	Muy enferma puede morir. No tiene coordinación muscular.	Fibrosis mamaria. Puede agravarse.	Frecuentemente aguada y con manchas de sangre.
<b>Clínica aguda</b>	No hay cambios observables.	El cuarto afectado se muestra duro, rojo e inflamado.	Purulenta y acuosa.
<b>Clínica subaguda</b>	No hay cambios observables.	El cuarto afectado puede estar inflamado.	No se ven cambios, pero la producción puede reducirse.
<b>Subclínica</b>	No hay cambios observables.	No hay cambios observables.	No hay cambios observables.

Fuente: Modificado de Philpot *et al.*, 2000.

### 3.3.1. Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas de la leche (Tollersrud, 2000).

La mastitis subclínica es sutil y difícil de corregir, la vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación y la leche parece normal, sin que existan cambios organolépticos en la misma. El número de células somáticas en la leche, indicativo de la respuesta inflamatoria, se encuentra elevado, al igual que el número de bacterias, lo que va acompañado de una disminución del nivel de producción de la secreción láctea, así como de la alteración de la composición de dicho producto.

Existe un incremento electrolítico exactamente iones de Na y Cl, el incremento de sodio y cloro al estar afectado un cuarto mamario con mastitis subclínica es debido a que después de la invasión bacteriana se produce: congestión capilar, edematización del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares. También existe alteración de la permeabilidad capilar que produce cambios en la composición de la leche, algunos de ellos son:

- Disminuye la CANTIDAD y la CALIDAD de caseína sintetizada
- Disminuye la grasa butirosa
- Disminuye la lactosa
- Aumenta la concentración de sodio
- Aumentan los cloruros
- Aumentan las proteínas del suero sanguíneo
- Aumentan enzimas
- Aumentan las CELULAS SOMATICAS (Martínez *et al.*, 2014).

la mastitis subclínica es de larga duración, difícil de tratar con los antibióticos, difícil de detectar, reduce drásticamente la producción de leche, afecta adversamente la calidad de leche, y puede servir como un reservorio para infectar a otros animales en el rebaño lechero (Bedolla, 2008).

La mastitis, particularmente subclínica y crónica, es la más persistente y más amplia del grupo de enfermedades de importancia por la higiene de la leche en el ganado lechero (Ariznabarreta *et al.*, 2002). La mastitis subclínica ocurre frecuentemente, y puede conducir a grandes pérdidas económicas debido al reducido rendimiento de leche, y multas a causa de los elevados conteos de células somáticas presentes en los tanques de leche.

En la práctica, los casos de mastitis subclínica con frecuencia no son detectados rápidamente, o pueden incluso no ser reconocidas por el ordeñador (Wellenberg *et al.*, 2002).

Es imperativo para los granjeros lecheros y sus asesores veterinarios enfocar su principal atención al control de la mastitis subclínica debido a que: (1) es 15 a 40 veces más prevalente que la mastitis clínica; (2) usualmente precede a la mastitis clínica; (3) es de duración prolongada; (4) es más difícil de detectar debido a la naturaleza oculta de la enfermedad; (5) reduce significativamente la producción láctea; (6) afecta adversamente la composición de la leche y (7) constituye un reservorio de patógenos causantes de mastitis que pueden diseminarse a otras vacas en el hato (Bedolla, 2008).

### **3.4. Patógenos causantes de mastitis**

Según (Pinzón 1989), la mastitis es ocasionada por organismos microscópicos que penetran la ubre a través del canal de los pezones. La penetración puede ocurrir por multiplicación, movimiento mecánico, propulsión durante el ordeño o por una combinación de factores.

Aproximadamente del 90 al 95% de los casos son provocados por cuatro microorganismos. Los cuales son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*.

Según Kirk (1984), Los gérmenes más importantes de la inflamación de la ubre son los estreptococos, los estafilococos, los coliformes, *Corynebacterium pyogenes*, las pseudomonas y levaduras. Los gérmenes menos frecuentes son los micoplasmas, clostridios, klebsiellas, aerobacter, *bacilo céreus*, nocardias, hongos, etc.

Los microorganismos causales de mastitis más comunes son los siguientes:

#### **3.4.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* son patógenos contagiosos y son transmitidos por los tejidos infectados durante el proceso de ordeño. Este patógeno puede producir gangrena y afectar otros tejidos; sin embargo no pueden sobrevivir grandes periodos en el medio ambiente (Acuña y Rivadeneira, 2008).

#### **3.4.2. *Streptococcus agalactiae***

Este microorganismo es considerado un parásito obligatorio, y el único organismo susceptible de ser erradicado de todo un rebaño lechero. El microorganismo es muy sensible al tratamiento de penicilina, incluso, durante la lactancia. Una excelente higiene, el buen manejo del ordeño, el tratamiento de las infecciones conocidas durante la lactancia y el tratamiento de rutina en las vacas secas erradican el organismo o lo mantiene a un nivel muy bajo (Pinzón 1989).

#### **3.4.3. *Streptococcus dysgalactiae***

La fuente principal son las ubres infectadas, amígdalas y lesiones en la piel. (Pinzón 1989). *Streptococcus dysgalactiae* puede ser contagiado de una vaca a otra durante el ordeño y las vacas pueden también llegar a ser infectadas por el medio ambiente (Hogan *et al.* 1999).

#### **3.4.4. *Streptococcus uberis***

El *Streptococcusuberis* y *Streptococcus dysgalactiae* son responsables también por la mayoría de las mastitis que se presentan ya sea al comienzo o al final del período de seca. Además de estas dos especies de bacterias, existen muchos otros estreptococos ambientales (*Streptococcusbovis*, *Streptococcusfecalis*) que pueden causar mastitis (Adams y Moss 2005).

#### **3.4.5. Bacterias Gram negativas causantes de mastitis**

Los coliformes pueden causar mastitis solamente si las partículas contaminadas del medio ambiente entran en contacto con la ubre. Estos microorganismos no se adhieren a los conductos y al alvéolo de la ubre, en lugar se multiplican rápidamente en la leche y producen toxinas que son absorbidas dentro del torrente circulatorio; produciendo infecciones que conducen a mastitis clínicas agudas. La temperatura corporal de la vaca puede elevarse a 40°C y el cuarto infectado se inflamará y se volverá sensible al tacto (Pinzón 1989).

##### **3.4.5.1. *Escherichia coli***

En la mastitis sobreaguda causada por *Escherichia coli*, la toxemia puede matar a una vaca en 3 días, si no se da un tratamiento a tiempo, han dado resultado los tratamientos a base de sulfatrimetoprin y las quinolonas con el tratamiento sintomático según los signos (Pinzón 1989).

##### **3.4.5.2. *Pseudomonas***

Generalmente aparece una infección persistente que puede estar caracterizada por exacerbaciones agudas o sub-agudas intermitentes (Pinzón 1989). Según Ávila y Gutiérrez (2004), se puede manifestar clínicamente en formas variadas como: severamente aguda, suave o crónica.

##### **3.4.5.3. *Klebsiella pneumoniae***

Mastitis causada por *Klebsiella*, la mastitis causada por *Klebsiella*, se puede presentar esporádicamente en una o varias vacas que descansan de lactar o bien en vacas en lactación, con cuadros severamente agudos o suaves, pudiendo también presentarse en forma crónica (Ávila y Gutiérrez 2004).

### **3.5. Pérdidas ocasionadas por la mastitis subclínica**

La mastitis subclínica es más importante y peligrosa en el ganado bovino productor de leche, porque al no poder medir su dimensión se le subestima, ya que produce bajas de productividad crónica con alteraciones imperceptibles en la leche, lo que suele provocar que se tomen medidas contra el proceso cuando ya la supresión de productividad es muy grande y el procedimiento para la curación es muy costoso (Bedolla 2008).

La mastitis subclínica cuya frecuencia es de 20 a 50 veces superior a la mastitis clínica, es hoy en día el principal problema de todo el complejo patológico que representa la mastitis. Cuidadosos análisis indican que el 80% de las pérdidas de la producción de leche son debidas a las mastitis subclínicas (Montenegro, 2006).

Dentro de los principales factores que causan pérdidas por la presencia de mastitis subclínica, se pueden mencionar los siguientes:

- a) Disminución drástica en la producción lechera de las vacas afectadas.
- b) Costos en los tratamientos antimastóticos.
- c) Pérdida de cuartos mamarios en infecciones severas o crónicas y desecho de vacas al rastro.
- d) Gastos médico-veterinarios y de diagnóstico.
- e) Castigo por parte de las plantas pasteurizadoras por mala calidad de la leche.

Las pérdidas ocasionadas por mastitis han sido atribuidas principalmente a disminución en la producción leche causada por la mastitis subclínica. Una gran mayoría de los casos de mastitis son casos de mastitis subclínica (Bedolla, 2008).

Aunque la mastitis subclínica no tiene ningún costo directo, la ubre infectada produce un 5% menos leche por cada 100 000 células somáticas adicionales en ml de leche.

El costo atribuible a las formas subclínicas de mastitis asciende a la mayoría del costo total, que se ubica entre 100 y 150 dólares vaca/año o del 50 % al 80% de las pérdidas de producción total de la industria que proviene de mastitis (Bedolla, 2008), mientras que las pérdidas de producción de leche, debido a la mastitis subclínica, y los costos de reemplazo de vacas, asociados con las cuentas de las células somáticas, se estimó en 960 millones de dólares americanos (Bedolla, 2008).

#### **3.5.1. Diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de campo**

##### **3.5.1.1. California Mastitis Test**

Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células somáticas de la leche (células epiteliales y leucocitos). No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (González, 2012).

A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación (Bedolla, 2008).

Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Bedolla, 2008).

### **3.5.1.2. Que son las células somáticas**

Las células somáticas están constituidas por una asociación de leucocitos y células epiteliales. Los leucocitos se introducen en la leche en respuesta a la inflamación que puede aparecer debido a una enfermedad o, a veces, a una lesión. Las células epiteliales se desprenden del revestimiento del tejido de la ubre (Blowey y Edmondson, 1995).

Se denomina a las células de la leche, a aquellas células propias del cuerpo (somáticas) en la leche. Estas provienen de la sangre y del tejido de la glándula mamaria. El contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer datos claves sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante y debido a su cercana relación con la composición de la leche un criterio muy importante de calidad de la leche (Wolter y Kloppert, 2004).

Las bacterias ambientales están presentes en el medio ambiente de la vaca, en su piel, pesebre, charcos de agua, etc. y penetran en la ubre cuando se dan determinadas condiciones (Figura 1). Una vez que las bacterias atacan las células del interior de la glándula mamaria la respuesta inmunitaria del organismo es enviar glóbulos blancos de la sangre para neutralizar a las bacterias invasoras. Estos glóbulos blancos son en esencia lo que constituye los conteos de células somáticas (CCS). Un alto CCS en la leche de vacas individuales o en el tanque de enfriado significa que las bacterias han invadido la glándula de la vaca (Gómez, 2008).

### **3.5.1.3. Función de las células somáticas en la leche**

Cada leche contiene células somáticas, las cuales en una glándula sana sólo se presentan en un número pequeño. En este caso se trata de células de tejido (células epiteliales) y células inmunes, (neutrófilos polimorfo nucleares, granulocitos, macrófagos, linfocitos). La importancia biológica de las células somáticas es que participan en la defensa contra infecciones de la ubre. Cuando hay estímulos o enfermedades de la glándula mamaria aumenta en contenido de células somáticas, con lo cual el número de células inmunes aumenta considerablemente (Bedolla, 2008).

### **3.5.1.4. Causas de un recuento celular somático elevado**

#### **3.5.1.4.1. Mastitis**

La mastitis reduce las ganancias tanto con la pérdida temporal de producción de leche como con la pérdida permanente del potencial de producción. La mastitis es, con mucho el factor más importante que provoca aumento de los recuentos de células. Cuando los microorganismos causantes de la mastitis entran a la glándula mamaria, los mecanismos de defensa envían grandes cantidades de leucocitos hacia la leche para intentar destruir las bacterias. Si la infección es eliminada, el recuento de células disminuirá. Si los leucocitos son incapaces de eliminar los organismos, se crea una infección subclínica. En este caso son segregados continuamente leucocitos hacia la leche, que originan un recuento elevado de células (Blowey y Edmondson, 1995).

#### **3.5.1.4.2. Fase de lactación**

Cuando el secado de la vaca no se hace correctamente es posible que dentro de la primera semana después del parto se presenten conteos celulares elevados. Al final de la lactación, como disminuye la cantidad de leche, los conteos celulares aumentan en las vacas que tienen mastitis subclínica. El conteo de células somáticas, automáticamente tiende a aumentar a medida que la vaca llega al período final de la lactancia. A medida que la vaca se seca hay un aumento de células somáticas que pasan a la leche. Además, la vaca produce menos leche, de manera que el número normal de células se concentra en un volumen menor de leche (Carrión, 2001).

#### **3.5.1.4.3. Lesiones en la glándula mamaria**

Un número de factores pueden causar lesiones en la glándula mamaria o lastimar los cuartos. Entre ellos, el uso inadecuado de máquinas de ordeño y corrales o instalaciones mal diseñadas o en mal estado. En lesiones de esta naturaleza, un gran número de glóbulos blancos está presente, lo que resulta en un recuento aumentado de células somáticas (Blowey y Edmondson, 1995).

#### **3.5.1.4.4. Variación fisiológica**

En ciertos días del mes se pueden registrar variaciones en el recuento individual de la vaca debido a procesos fisiológicos. Por ejemplo, el ligero aumento en el recuento de células somáticas que se puede observar en la vaca en celo (Saran y Chaffer, 2000).

#### **3.5.1.4.5. Variaciones diarias y de temporada**

En la ordeña de la tarde, los recuentos de células tienden a ser más elevados que en la ordeña de la mañana. Esto es debido en parte al intervalo más corto entre ambos ordeños y a la producción de menor cantidad de leche que se traduce en un efecto de concentración. En verano, los recuentos tienden a ser más elevados que en invierno aunque no se sabe con certeza la causa de esto (Blowey y Edmondson, 1995).

#### **3.5.1.4.6. Frecuencia de ordeña**

Las vacas que se ordeñan de manera intermitente hacia el final de la lactación tendrán recuentos de células incrementados espectacularmente, aún en ausencia de infección subclínica (Blowey y Edmondson, 1995).

#### **3.5.1.4.7. Estrés**

Cualquier acontecimiento que produzca estrés, como el estro, la enfermedad, entre otras, pueden influir en el recuento de células. Además de aumentar el número de leucocitos en la sangre, con frecuencia existe una disminución de la producción de leche que causa un efecto adicional de concentración (Saran y Chafer, 2000).

#### **3.5.4.8. Cantidad de cuartos o vacas afectadas**

Si bien el estado infeccioso es el factor más importante que aumenta el recuento celular somático de la vaca, cuanto mayor es la cantidad de vacas afectadas de mastitis mayor será el recuento celular en el tanque (Saran y Chaffer, 2000).

#### **3.5.1.5. Procedimiento para la toma de muestra de leche para california mastitis test Según (Mellenberg, 2000).**

#### **Cuadro 2. Procedimiento para la toma de muestra de leche para california mastitis test.**

Paso 1	Tomar aproximadamente 1 cucharadita (2cc) de leche de cada cuarto.
Paso 2	Agregar igual cantidad de solución CMT a cada compartimiento.
Paso 3	Rotar la raqueta con movimientos circulares hasta mezclar totalmente el contenido. No mezclar por más de 10 segundos.
Paso 4	Leer rápidamente la prueba. La reacción visible desaparece en unos 20 segundos. La reacción recibe una calificación visual. Entre más gel se forme, mayor es la calificación.

**3.5.1.6. Interpretación de prueba california mastitis test (CMT)  
Según (Mellenberg, 2000).**

**Cuadro 3. Interpretación de prueba california mastitis test.**

Resultado	Significado	Descripción de la reacción	Interpretación (Rcs/ml)
N	Negativo	No hay espesamiento de la mezcla.	0-200,000
T	Trazas (mastitis subclínica)	Ligero espesamiento de la mezcla. La reacción “trazas” parece desvanecerse con la rotación continua de la raqueta.	200,000-400,000
1	Ligeramente positivo (mastitis subclínica)	Definido espesamiento de la mezcla, pero sin tendencia a formar gel.	400,000-1,200,000
2	Positivo (infección seria)	Inmediato espesamiento de la mezcla con ligera formación de gel.	1,200,000-5,000,000
3	Muy positivo (infección seria)	Hay formación de gel y la superficie de la mezcla se eleva (como un huevo frito.	Más de 5,000,000

**3.5.2. Detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q**

La Prueba de Conductividad Eléctrica (PCE) (DRAMINSKI), se ha utilizado como un indicador de la mastitis durante la última década, se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones de sodio y de cloro y se ha desarrollado como un método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca (Medina y Montaldo, 2003).

El incremento de sodio y cloro al estar afectado un cuarto mamario con mastitis subclínica es debido a que después de la invasión bacteriana se produce: congestión capilar, edematización del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares. También existe alteración de la permeabilidad capilar que produce cambios en la composición de la leche, algunos de ellos son:

- Disminuye la CANTIDAD y la CALIDAD de caseína sintetizada
- Disminuye la grasa butirosa
- Disminuye la lactosa

- Aumenta la concentración de sodio
- Aumentan los cloruros
- Aumentan las proteínas del suero sanguíneo
- Aumentan enzimas
- Aumentan las CELULAS SOMATICAS (Martínez *et al.*, 2014).

Este instrumento proporciona una lectura digital del resultado de la PCE y representa una alternativa a la Prueba de California para Mastitis (CMT) como prueba de monitoreo de la mastitis subclínica al lado de la vaca (Medina y Montaldo, 2003).

### **3.5.2.1.Pasos para realizar la medición con detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q**

1. Sostener el detector de mastitis subclínica debajo de la ubre y exprimir el primer chorro de leche dentro de la copita de medida.
2. Retirar el instrumento de la ubre para poder leer de una manera clara el resultado.
3. Apretar el botón de encendido del detector.
4. Después de la estabilización inicial que dura aproximadamente de 1,5 a 2 segundos., la resistencia eléctrica de la leche se registra en la pantalla.
5. Soltar el botón de encendido y tirar la leche. No se olvide de anotar el resultado.
6. Sosteniendo el detector de mastitis subclínica por el mango, sumergir la copita de medida en el balde, baldes o recipiente con agua caliente para quitar los residuos de leche.
7. La copita de medida (en particular los electrodos), se pueden limpiar con tapones de algodón en vez de remojarlos en agua caliente.
8. Repetir este procedimiento para cada una de las ubres.

### **3.5.2.2.Interpretación de resultados (DRAMINSKI4Q)**

Una diferencia de 40 o más unidades en la lectura del o los cuartos respecto al cuarto de mayor valor indica la presencia de mastitis subclínica en el o en ellos.

#### ***Ejemplo:***

Cuarto delantero izquierdo = 350 u

Cuarto delantero derecho = 300 u

Cuarto trasero Izquierdo = 330 u

Cuarto trasero derecho = 350 u

Interpretando la lectura se concluye que para ese ejemplo el cuarto afectado con mastitis subclínica es el delantero derecho, permaneciendo los restantes normales.

### **En términos muy generales se puede asumir que:**

Un resultado de entre 250 – 300 unidades indica una fase intermedia entre mastitis subclínica y un buen estado de salud en el cuarto probado.

## **3.6. Preparación de medios de cultivo**

### **3.6.1. Agar sangre de carnero al 5%**

Este medio de cultivo es utilizado para el aislamiento de numerosos microorganismos. Al ser suplementado con sangre ovina, permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis, durante el estudio fue utilizado para el aislamiento de microorganismos gram positivos y gram negativos.

En la preparación comercial del medio es viable la sangre de oveja o en su lugar sangre de vaca controlando las colonias de *Streptococcusagalactiae* y *Staphylococcus aureus* que producen zonas de hemólisis en estos medios (Hogan *et al.* 1999). El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes (Val 2007).

La preparación de agar sangre según se realiza según lo indicado por “El Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Inquieta Pérez” (2003): pesar el agar Nutriente a razón de 39g. Por litro de agua destilada. Calentar la suspensión hasta que la solución llegue a ebullición para permitir una disolución completa y luego esterilizar a 121°C durante 15 minutos, El medio fundido se deja enfriar a 45°C, y se coloca en placas Petri.

### **3.6.2. Agar MacConkey**

Se emplea para el aislamiento de enterobacterias, debido a que las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias gram positivas. Las colonias lactosas positivas son de color rosado, las bacterias no fermentadoras son incoloras (BBL, 1974).

La preparación según (BBL 1974): Se pesa 50 g. del medio en un litro de agua destilada. Se mezcla hasta obtener una suspensión uniforme y se Calienta en el hotplate agitando frecuentemente y se deja hervir durante 1 minuto y luego se esteriliza en autoclave a 121°C (15lb de presión), durante 15 minutos.

El medio fundido se deja enfriar a 45°C, y se coloca en placas Petri doble desechables con 10 ml aproximadamente en un lado y se deja solidificar las placas destapadas parcialmente.

### **3.7. Métodos de siembra en medios de cultivo**

Siembra por agotamiento: El objetivo de esta técnica es diluir la muestra de tal manera que al final se obtenga colonias separadas para poder iniciar el estudio de identificación y sensibilidad a los antimicrobianos.

1. El asa de siembra se esteriliza a la llama antes de usarla y después de haber sido usada, para evitar la contaminación de los microorganismos en estudio con otros microorganismos que estén presentes en el filamento metálico y se esteriliza después de su uso para evitar que los microorganismos que sean tomados contaminen el laboratorio o sea incluso un riesgo biosanitario.
2. Para esterilizar el asa de siembra se debe poner lo más vertical posible y se acerca el filamento a la llama del mechero Bunsen. Cuando todo el filamento se ponga al rojo vivo significa que se ha conseguido la esterilización. En ese momento se retira y se deja enfriar antes de tomar la muestra, para evitar que el calor destruya a los microorganismos.
3. Se debe obtener la muestra de leche del tubo con el asa y se suspende en un extremo de la placa de agar, haciendo estrías (líneas) de un extremo a otro (primer cuadrante)
4. Se flamea el asa y se deja enfriar en el extremo se inician las estrías desde el cuadrante primero y se extienden hasta el cuadrante dos.
5. Se flamea el asa, se deja enfriar en el extremo y se inician las estrías desde el cuadrante dos y se extienden hasta el cuadrante tres.

### **3.8. Temperatura y tiempo de incubación de los microorganismos**

Luego de la siembra las placas deben ser incubadas a 37°C por 24 horas (Tortora, 2007).

### **3.9. Tinción Gram**

Debe utilizarse un cultivo de 24 horas (Tortora, 2007).

#### **3.9.1. Procedimiento para la tinción Gram**

1. Se debe recoger una muestra del cultivo, aplicar una gota de solución salina en un porta objeto y se realiza el extendido (frotis) en espiral, se deja secar a temperatura ambiente y luego fijar la muestra al calor (flameado 3 veces aproximadamente).
2. Agregar cristal violeta y esperar 1 minuto, éste tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas, se enjuaga con agua.
3. Agregar yodo, esperar 1 minuto y enjuagar con agua.
4. Agregar alcohol acetona, esperar 30 segundos y enjuagar con agua.

5. agregar safranina, esperar 1 minuto, éste colorante dejará de color rosado las bacterias Gram negativas. Finalmente enjuagar y se secar, observar al microscopio óptico con lente de 100x con aceite de inmersión (Tortora 2007).

### **3.10. Pruebas especiales para Gram positivos**

#### **3.10.1. . Prueba catalasa**

##### **Prueba de la catalasa**

Detecta la presencia de enzimas catalasas capaces de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Se encuentra presente en la mayoría de los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos que contienen citocromo, excluyendo los estreptococos (Marrero 2006).

##### **Materiales que fueron utilizados para realizar la prueba**

Peróxido de Hidrógeno 3%, cultivo bacteriano y portaobjetos.

##### **Interpretación**

La prueba se considera positiva cuando se produce una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas, la enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Esta prueba se emplea para diferenciar los géneros **Micrococcus** y **Staphylococcus**(catalasa positivo) del género **Streptococcus**(catalasa negativo), (Marrero 2006).

#### **3.10.2. Prueba coagulasa**

La habilidad de coagulación que tiene el plasma es el método más ampliamente usado para distinguir *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus* spp. Coagulasa-Negativos. La prueba en tubo de coagulasa es considerado más definitivo que la prueba en placa (Hogan et al. 1999).

Se necesita inocular 0,5 ml de plasma de conejo en un tubo de ensayo con inóculo de 24 horas de haber sido cultivado, se debe utilizar una asa recta estéril para la inoculación. Para la interpretación tenemos que, una reacción positiva corresponde a semi-sólido a sólido gelificado, como por ejemplo *Staphylococcus aureus*; una reacción negativa se presenta en estado líquido después de 24 horas de incubación, como por ejemplo *Staphylococcus chromogenes* (Marrero, 2006)

### **3.11. Pruebas bioquímicas para Gram negativos**

#### **3.11.1. Prueba TSI**

La preparación del medio se realiza según las especificaciones del laboratorio “Britania” Suspende 62,5 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar reposar 5 minutos. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Distribuir en tubos, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de los mismos. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta profundo.

Este medio de cultivo determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible ácido sulfhídrico.

Este medio contiene lactosa con una concentración de 1% y glucosa 0.1%, lo cual permite la observación de la fermentación de uno o de ambos carbohidratos por parte de las bacterias, además de la producción de gas y de ácido sulfhídrico.

#### **3.11.2. Inoculación de microorganismo en prueba TSI**

La inoculación del medio de cultivo se realiza mediante el uso de un asa recta con la cual se realiza la picadura de una colonia ya diferenciada como gram negativa y se procede a introducirla en él tubo realizando una punción en el centro del medio y realizando una estría en el pico de flauta. Luego de inocular el microorganismo se procedió a incubar a 37°C durante 24 horas.

#### **3.11.3. Interpretación de resultados de prueba TSI**

1. Pico de flauta alcalino / profundidad alcalina (K/K). No fermentación de hidratos de carbono. Característico de bacterias no fermentadoras como *Pseudomonasaeruginosa*.
2. Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (K/A). Glucosa fermentada, lactosa no fermentada. Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa como especies de *Shigella*.
3. Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (negra) (K/A/H<sub>2</sub>S). Glucosa fermentada, lactosa no fermentada; producción de H<sub>2</sub>S. Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa y productoras de H<sub>2</sub>S como: *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter* y algunas especies de *Proteus*.
4. Pico de flauta ácido / profundidad ácida (A/A). Glucosa y lactosa fermentadas. Característico de coliformes que fermentan lactosa como: *E. coli* y grupo *Klebsiella*, *Enterobacter* (Koneman, 2008).

### 3.12. Agar lisina hierro (LIA)

Mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad (González, 2014).

La preparación del medio de cultivo se realiza de la siguiente forma, se suspende 35 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando con frecuencia y dejar hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir en tubos y se dejar esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Luego se dejar enfriar y solidificar en posición inclinada (pico de flauta profundo), ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)).

#### 3.12.1. Inoculación del microorganismo en prueba LIA

A partir del cultivo puro del microorganismo en estudio ya identificado mediante la tinción gram como gram negativo y mediante el uso de asa recta, se procede a inocular el medio de cultivo, realizando tres perforaciones en el medio en forma de triángulo, picando el fondo y extendiendo en forma de estrías sobre la superficie del mismo ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)).

Luego de que se inoculo el microorganismo se debe incubar a 37 °C durante 24 horas.

#### 3.12.2. Interpretación de resultados de prueba LIA

Los resultados de la prueba LIA deben interpretados de la siguiente forma ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)):

##### Interpretación de los resultados Descarboxilación de la lisina:

1. Resultado Positivo: superficie alcalina / profundidad alcalina (pico violeta / fondo violeta).
2. Resultado negativo: superficie alcalina / profundidad ácida (pico violeta / fondo amarillo).

##### Desaminación de la lisina:

1. Resultado positivo: superficie rojiza / profundidad ácida. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y algunas de *Morganellaspp*.

##### Producción de SH<sub>2</sub>:

1. Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo (especialmente en el límite entre la superficie y profundidad).
2. Resultado negativo: el medio de cultivo permanece sin cambio de color ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)).

### **3.13. Prueba movilidad, indol, ornitina (MIO)**

El medio MIO se utiliza para la identificación de Enterobacterias sobre la base de movilidad, la producción de ornitina descarboxilasa y de indol.

El medio de cultivo se prepara según las indicaciones del laboratorio “Britania” se suspende 31 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Se calienta, agitando frecuentemente y se lleva a ebullición hasta completa disolución. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar y solidificar en posición vertical ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)).

#### **3.13.1. Inoculación del microorganismo en la prueba MIO**

La inoculación se realizó a partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, se sembró por punción profunda utilizando un asa recta para la inoculación. Se dejó incubando a 37°C por 24 horas ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)).

#### **3.13.2. Interpretación de los resultados de la prueba MIO**

Los resultados observados son obtenidos según la capacidad de movilidad y el color que adoptaba el medio de cultivo a causa del crecimiento bacteriano y luego se realiza la prueba de indol ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)).

##### **Movilidad:**

1. Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
2. Resultado negativo: crecimiento solamente en la línea de siembra.
- 3.

##### **Ornitina descarboxilasa:**

1. Resultado positivo: color púrpura.
2. Resultado negativo: color amarillo. A veces se puede desarrollar un color violáceo en la superficie del medio.

##### **Prueba del indol: Agregar al medio de cultivo 3-5 gotas de Indol Reactivo Kovac's en la superficie del medio.**

1. Resultado positivo: se forma un anillo color rojo en la superficie del medio.
2. Resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento.

### **3.14. Agar Citrato de Simmons**

Este medio indica la capacidad de las bacterias de metabolizar el citrato. Contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de fosfato y azul de bromotimol como indicador de pH (BBL, 1974).

Para la preparación de este medio se suspende 24,2 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Se dejó reposar 5 minutos. Se Calienta con agitación frecuente hasta llevar a ebullición durante 1 o 2 minutos para disolución total. Se distribuye en tubos y se deja esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Luego se deja enfriar y solidificar en posición vertical.

#### **3.14.1. Procedimiento para inoculación del microorganismo en medio citrato de Simmons**

La inoculación se realiza a partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, se siembra por punción profunda utilizando un asa recta para la inoculación. Se deja incubando a 37°C por 24 horas ([www.britanialab.com](http://www.britanialab.com)).

#### **3.14.2. Interpretación de los resultados de prueba citrato de Simmons**

1. **Positivo:** crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.
2. **Negativo:** ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.

### **3.15. Realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana (antibiograma)**

Debido a que tuvimos crecimiento de bacterias causantes de mastitis se procedió a la realización de antibiograma a cada vaca que salió afectada con mastitis con el objetivo de brindarles una terapéutica más eficaz para el tratamiento de las mastitis.

### **3.16. Antibiograma**

Según Val (s.f.), el antibiograma consiste en medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos. Además por medio del antibiograma se determina la evolución de las resistencias bacterianas.

Para la realización del antibiograma se utilizó el agar MullerHinton el cual fue preparado y luego chorreado en placas Petri, con el medio solidificado se procedió a tomar las placas con las colonias ya identificadas. Los materiales utilizados fueron tubos de ensayo, agua destilada, (Pedrique 2002).

Según (Pedrique 2002), es necesario seguir las siguientes recomendaciones: Autoclavear el medio de cultivo y dejar enfriar a 45-50°C. Verter asépticamente suficiente cantidad de medio de cultivo en una placa de Petri, para obtener una capa de 4 mm de espesor aproximadamente. Para una placa de 10 cm. de diámetro se requieren 30 ml de medio y para una de 15 cm. se requieren 70 ml.

Dejar solidificar el medio de cultivo y luego secar las placas durante 30 minutos antes de usarlas para la inoculación. Inocular la placa con 1 ml de la suspensión del germen de 18 a 24 horas de incubación con una turbidez equivalente a  $1,5 \times 10^6$  bacterias (Equivale al tubo No. 5 de la escala de Mc Farland). La suspensión debe cubrir la superficie de placa de Petri y es necesario eliminar el sobrante.

Colocar la tapa a la placa y dejar secar el inóculo por 3 a 5 minutos. Colocar los discos con los antibióticos sobre el agar mediante pinzas estériles o usando un aplicador de discos. Oprimir los discos suavemente con una pinza para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Los discos deben estar espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa sea de 15 mm. y entre ellos de 30 mm. Incubar a 35 – 37°C hasta el siguiente día (aproximadamente 18-19 horas). Si se requieren los resultados con rapidez se pueden leer las zonas de inhibición después de 6-8 horas de incubación, pero estos resultados deben ser confirmados mediante una nueva lectura después de la incubación por las 18 -19 horas.

La medida del diámetro de la zona de inhibición se hace preferentemente desde el exterior de la placa, sin quitar la tapa, esto puede hacerse con una regla milimetrada, un vernier o cualquier otro Instrumento similar. Los resultados deben ser analizados de acuerdo al aro que presenta cada uno de los sensi discos utilizados, si no existe la presencia del aro indica que hay crecimiento bacteriano en las zonas, por lo cual el microorganismo es resistente a este antibiótico. El sensi disco que contenga el aro con mayor diámetro es el más efectivo, es decir el microorganismo analizado es sensible a este antibiótico (Pedrique 2002).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Ubicación del área de estudio**

El estudio se realizó en la Finca Santana, localizada en el municipio de Diriamba, con las coordenadas geográficas 11°49'59.9" latitud norte y de 86°14'21.1" oeste de longitud con una altura aproximada a 580msnm, el clima se caracteriza por tener un clima húmedo, siendo relativamente fresco con leves alzar de temperatura, la que oscila entre los 27 y 30 °C. La precipitación alcanza entre los 1,200 y 1,400 mm (INETER, 2001).

### **4.2. Diseño metodológico**

El estudio se realizó en la lechería Santana ubicada en Diriamba-Carazo, durante el período que comprende del 31 de agosto del 2015 al 02 octubre de 2015, con hembras bovinas de la raza jersey, con un tipo de explotación semi-intensivo sin terneros en el ordeño actualmente la unidad de producción cuenta con 85 hembras en ordeño las cuales van desde una hasta las cinco lactancias, se seleccionó una media entre el número de lactancias lo cual nos dio un número de dos punto cinco lactancias, se trabajó con vacas que tienen de dos a tres lactancias, el porcentaje de vacas que se muestreo fue de un 22 % de las hembras lo que nos dio como resultado un total de 19 vacas muestreadas.

Se realizó un estudio comparativo entre la prueba california mastitis test (CMT) y detector de mastitis subclínica DRAMINSKI. Se realizaron 5 muestreos con un período de una semana entre cada uno, al terminar los muestreos se realizó la comparación entre los datos obtenidos en los muestreos y así se obtuvieron los siguientes resultados y se determinó cuál de las pruebas tiene un mejor porcentaje de acierto en el diagnóstico y cual resulta más rentable y con menor dificultad de interpretación a nivel de campo.

Los muestreos se realizaron los días lunes a la 1:00 pm hora en que inician el segundo ordeño, se utilizaron ambos métodos de diagnóstico iniciando con el detector de mastitis DRAMINSKI debido a que según las indicaciones de uso requiere de los primeros chorros de leche de cada cuarto para dar un mejor resultado y posteriormente se procedió a utilizar la prueba california mastitis test.

Los cuartos que dieron positivo a una o ambas pruebas se procedió a realizar la toma de muestra en tubos estériles y se llevó al laboratorio donde se realizaron las pruebas de bacteriología e identificación del agente causal de mastitis y realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana a los microorganismos detectados con el fin de verificar los resultados de ambas pruebas de campo.

Las muestras recolectadas fueron procesadas en el laboratorio Clínico División Veterinaria, ubicado en la colonia miguel Bonilla Managua, Nicaragua.

### **4.3. Manejo del ensayo**

El estudio fue realizado bajo dos condiciones la primera que se realizó a nivel de campo, utilizando el detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q y la prueba California Mastitis Test (CMT) para el diagnóstico de mastitis subclínica y la segunda a nivel de laboratorio para validar los resultados obtenidos mediante la realización de aislamiento microbiano.

Para el estudio, se incluyó el 22% del hato en ordeño de la finca Santana lo que nos dio como resultado 19 vacas que fueron las que muestreamos durante este período, el diagnóstico a nivel de campo se realizó cada ocho días los días lunes del (31 de agosto al 28 de septiembre del 2015), en total se realizaron cinco muestreos.

#### **4.3.1. Manejo y codificación de la información**

Se examinaron en total 76 cuartos en cada muestreo lo que equivale a las 19 vacas estas mismas vacas se muestrearon cinco veces para un total 380 cuartos examinados.

Se recolectaron 50 muestras las cuales fueron llevadas al laboratorio División Veterinaria donde se sembraron y se procedió al aislamiento e identificación bacteriana.

Los registros se codificaron de la siguiente forma:

**Los cuartos de la ubre los codificamos con números los que corresponden a la posición de cada cuarto:**

1= cuarto posterior izquierdo (PI)

2= cuarto anterior izquierdo (AI)

3= cuarto posterior derecho (PD)

4= cuarto anterior derecho (AD)

**Los cuartos que dieron positivo se procedió a codificarla de la siguiente forma:**

Positivo a mastitis subclínica = 1

Negativo a mastitis subclínica = 0

**Las muestras de las vacas que hubo crecimiento en el medio de cultivo se procedió a codificarse de la siguiente manera:**

*Staphylococosaureus*= 1

*Pseudomonaaeruginosa* = 1

No hubo crecimiento = 0

### 4.3.2. Procedimiento de diagnóstico de mastitis subclínica

Antes de utilizar los métodos diagnósticos se procedió a realizar lavado y secado de los cuartos mamarios, secado de las manos de los ordeñadores.

Se procedió a utilizar el DRAMINSKI primero debido a que el manual de usuario dice que debe utilizarse los primeros chorros de leche para la medición ([www.DRAMINSKI.com](http://www.DRAMINSKI.com)) y posteriormente se procedió a realizar el diagnóstico con California Mastitis Test (CMT).

#### 4.3.2.1. Pasos que se siguieron para hacer las mediciones con DRAMINSKI 4Q

- 2- Se sostuvo el detector bajo la teta y se exprimió el primer chorro en la copa de medida.
- 3- Se retiró el instrumento de la ubre para poder ver el resultado.
- 4- Se presionó el botón de encendido.
- 5- Después de dos segundos mostro el resultado del primer cuarto.
- 6- Se bota la leche y se presionó el botón nuevamente y se le hecho leche del otro cuarto y se realizó el mismo procedimiento con los cuatro cuartos.
- 7- Luego de examinar los cuatro cuartos nos dio los resultados de todos, presionamos nuevamente el botón y nos la diferencia entre cada cuarto.
- 8- Después de examinar la vaca se procedió a limpiar la copa con agua y calibrar con agua con sal o solución salina la calibración la realizamos cada cinco vacas debido a que observamos que después de ese número nos variaban los resultados ([www.DRAMINSKI.com](http://www.DRAMINSKI.com)).

##### 4.3.2.1.1. Interpretación de los resultados del detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q

Cada cuarto nos dio como resultado una cifra que es equivalente a la resistencia eléctrica de ese cuarto si un cuarto dos da una diferencia de 40 o más con respecto a la cifra mayor de los cuatro cuartos significa que ese cuarto está afectado con mastitis subclínica ([www.DRAMINSKI.com](http://www.DRAMINSKI.com)).

##### Ejemplo:

**C1 (PI) = 250. C2 (AI) = 160**, cuarto afectado con mastitis subclínica.

**C3 (PD) = 250. C4 (AD) = 240.**

#### **4.3.2.2. Prueba California Mastitis Test (CMT)**

Para realizar esta prueba se necesita de paletas de plástico con recipientes de 7 cm de diámetro por 2 cm de alto, un dosificador y el reactivo para California Mastitis Test.

Se realizó luego de realizar la prueba **DRAMINSKI** en las mismas vacas se tomaron muestras de leche (2ml) individualmente de cada cuarto, en la paleta de diagnóstico, se adiciono igual cantidad de reactivo california, se procedió a realizar movimiento circular a la paleta para homogenizar la leche con el reactivo por 20 segundos y se procedió a la lectura de la reacción observando si hay formación de grumos o gel.

La interpretación se hizo siguiendo lo indicado en el cuadro 3 P12.

#### **4.3.3. Toma de muestras de cuartos afectados**

La toma de muestra se realizó siguiendo los pasos indicados por Hogan *et al.* (1999).

1. Se etiquetaron los tubos para el muestreo (fecha, hacienda, vaca, cuarto afectado).
2. Se eliminó la suciedad de la glándula mamaria y de los pezones, mediante un lavado y secado, antes de proceder a la colección de la muestra.
3. Secamos los pezones completamente con toallas individuales.
4. Para tomar la muestra se, coloco el tubo a 45° para la recolección de la muestra. Evitando que los pezones tocan el tubo, llenar el tubo de 2 – 3 ml con un máximo de 5 ml (1-3 chorros).
5. Las muestras recolectadas se procedieron a colocar en un termo con refrigerante.

#### **4.4. Aislamiento, identificación bacteriana y antibiograma**

Las muestras de leche remitidas al laboratorio se procesaron según (López 2004), para el aislamiento de enterobacterias y bacterias gram positivas; Se inocularon por la técnica de agotamiento en platos Petri doble con agar Sangre de Cordero al 5%, para la preparación de este medio se utilizó el agar nutriente (DIFCO 213000) y agar MacConkey (MERCK 105465), se incubaron por 24 horas a 37 °C. Luego de ser incubadas se procedió a realizar la tinción de Gram (Mayberry 2002), y evaluar las características Macroscopicas de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), y determinar la Morfologías y color de las mismas.

Luego de caracterizar los cultivos según sus características macroscópicas y microscópicas se procedió a realizar pruebas bioquímicas para determinar el género y la especie de las bacterias gram negativas (Hogan *et al.*, 1999), las bacterias gram positivas identificadas se les realizo pruebas especiales como; Catalasa, Coagulasa (Hogan *et al.*, 1999).

Luego de ser identificadas por microbiología convencional se procedió a realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana (Pedrique 2002), se inició con la escala de McFarland 0.5 según el grado de turbidez e inocular en agar Mueller Hinton (Britania B0213706), los antibióticos de

elección se seleccionaron tomando en cuenta la características de tinción, género y especie de las bacterias identificadas.

#### **4.5. Variables evaluadas**

##### **1- Eficacia en el resultado de ambos métodos diagnósticos**

La eficacia fue medida de acuerdo a los cinco muestreos que fueron realizados en los cuales se tomó muestras de los cuartos afectados que fueron detectados por una o ambos métodos de diagnóstico y además se tomaron muestras de vacas que durante los cinco muestreos resultaron sanas para verificar los resultados.

Las muestras fueron llevadas al “laboratorio división veterinaria” en donde se realizaron pruebas de aislamiento e identificación bacteriana con el fin de verificar los resultados obtenidos mediante los métodos de diagnóstico de mastitis a nivel de campo.

Los muestreos fueron realizados del 31 de septiembre al 28 de agosto del 2015 y en cada muestreo se tomaron muestras de leche de los cuartos afectados las cuales fueron llevadas al laboratorio para hacer aislamiento e identificación bacteriana.

Para el análisis de la información se procedió a realizar una base de datos en Excel 2010 en la cual se detalló número de muestreo, identificación de la vaca, cuarto afectado, resultado en DRAMINSKI, resultado en CMT, crecimiento bacteriano si hubo o no y que microorganismo creció, con estos datos se logró obtener el total de diagnósticos verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos y falsos negativos que tuvieron cada método durante los cinco muestreos realizados.

Luego se procedió a sumar los diagnósticos correctos que entre ellos se encontraron los verdaderos positivos (que fueron detectados por los métodos y hubo crecimiento bacteriano) y verdaderos negativos (que dieron negativo en los métodos y negativo en los cultivos), también se sumaron los diagnósticos incorrectos que dentro de estos estuvieron los falsos positivos (que dieron positivo en los métodos y negativo en el cultivo) y los falsos negativos (que dieron negativo en los métodos y positivo en el cultivo).

El análisis estadístico que se utilizó fue la prueba de independencia de CHI- CUADRADO para los diagnósticos correctos e incorrectos de los métodos detectores de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q y California Mastitis Test.

##### **2- Facilidad y rapidez de interpretación de ambos métodos de diagnóstico**

La facilidad y rapidez entre ambos métodos fue obtenida mediante la experiencia adquirida al utilizar ambos métodos de diagnóstico durante el análisis de los 380 cuartos examinados en los cinco muestreos realizados.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. Número de cuartos que resultaron positivos a una o ambas pruebas a nivel de campo

Se muestrearon 380 cuartos en 5 semanas, que representan 19 Vacas en producción equivalentes al 22% del hato, de los cuales 50 cuartos dieron positivas a la suma de ambas pruebas, dando como resultado la afectación de 13 vacas de la 19 tomadas en cuenta en el estudio. Además se tomaron tres vacas sanas como control (vacas sanas en todos los muestreos).

**Cuadro 4.** Diagnósticos obtenidos a nivel de campo por DRAMINSKI y CMT

<b>Cuartos positivos a una o ambas pruebas de campo</b>	
Detectados por DRAMINSKI	47
Detectados solo por DRAMINSKI	6
Detectados por CMT	44
Detectados solo por CMT	3
Detectados por ambos métodos	41
Total de muestras recolectadas	50

El DRAMINSKI 4 Q dio un total de 47 cuartos afectados de estos 6 cuartos no fueron detectados por la prueba CMT. Mientras que el número de cuartos detectados por la prueba CMT fue de 44 y del total 3 no fueron detectados por el DRAMINSKI 4 Q.

**Cuadro 5.** Resultados obtenidos a nivel de laboratorio por DRAMINSKI 4Q y CMT

Verdaderos+ DRAMINSKI	Verdaderos - DRAMINSKI	Falsos+ DRAMINSKI	Falsos - DRAMINSKI	Verdaderos + CMT	Verdaderos - CMT	Falsos + CMT	Falsos - CMT
39	331	8	2	35	330	9	6
Total cuartos examinados= 380.				Total cuartos examinados= 380.			

La confirmación de los cuartos afectados por microbiología convencional arrojaron los siguientes resultados de 47 Cuartos detectados como positivos por el DRAMINSKI 4 Q, en 39 muestras procesadas en el laboratorio de microbiología coincidieron con los detectados con DRAMINSKI, de los cuartos detectados por CMT, se observó el crecimiento de 35 que coincidieron con esta prueba. Esto equivale a 39 cuartos positivos en la prueba DRAMINSKI y el cultivo. Mientras que el CMT dio 35 cuartos positivos en la Prueba y el cultivo.

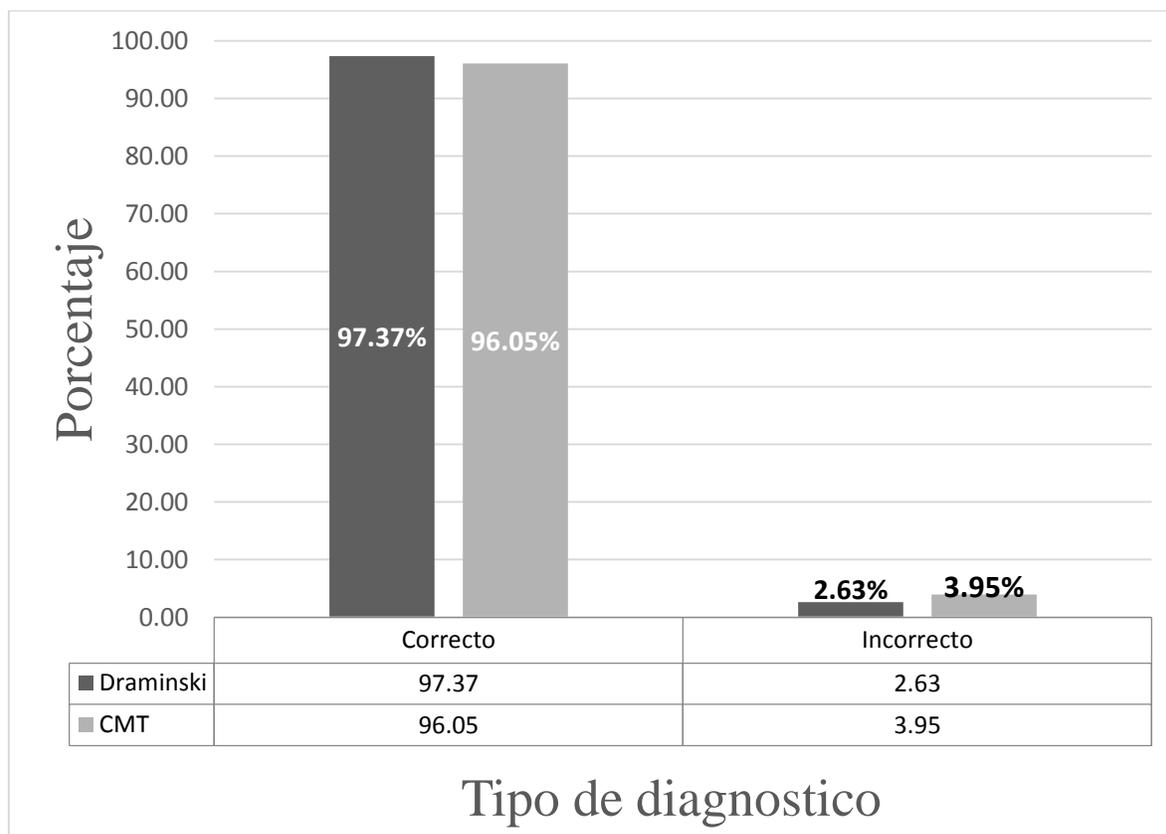
La evaluación de los falsos positivos para DRAMINSKI se obtuvo ocho resultados que fueron detectados por DRAMINSKI en los cuales no hubo crecimiento bacteriano y nueve falsos positivos de CMT en los cuales no hubo crecimiento bacteriano.

En la evaluación de falsos negativos se obtuvieron seis resultados para CMT en los cuales no fueron detectados y si hubo crecimiento bacteriano y dos resultados para DRAMINSKI que no fueron detectados por esta prueba y si hubo crecimiento bacteriano.

En la evaluación de los verdaderos negativos de ambas pruebas se obtuvieron 331 resultados para DRAMINSKI y 330 para CMT.

## 5.2. Porcentaje de eficacia en diagnóstico de detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q y california mastitis test CMT

**Cuadro 6.** Porcentaje de eficacia en diagnósticos para DRAMINSKI 4Q y CMT

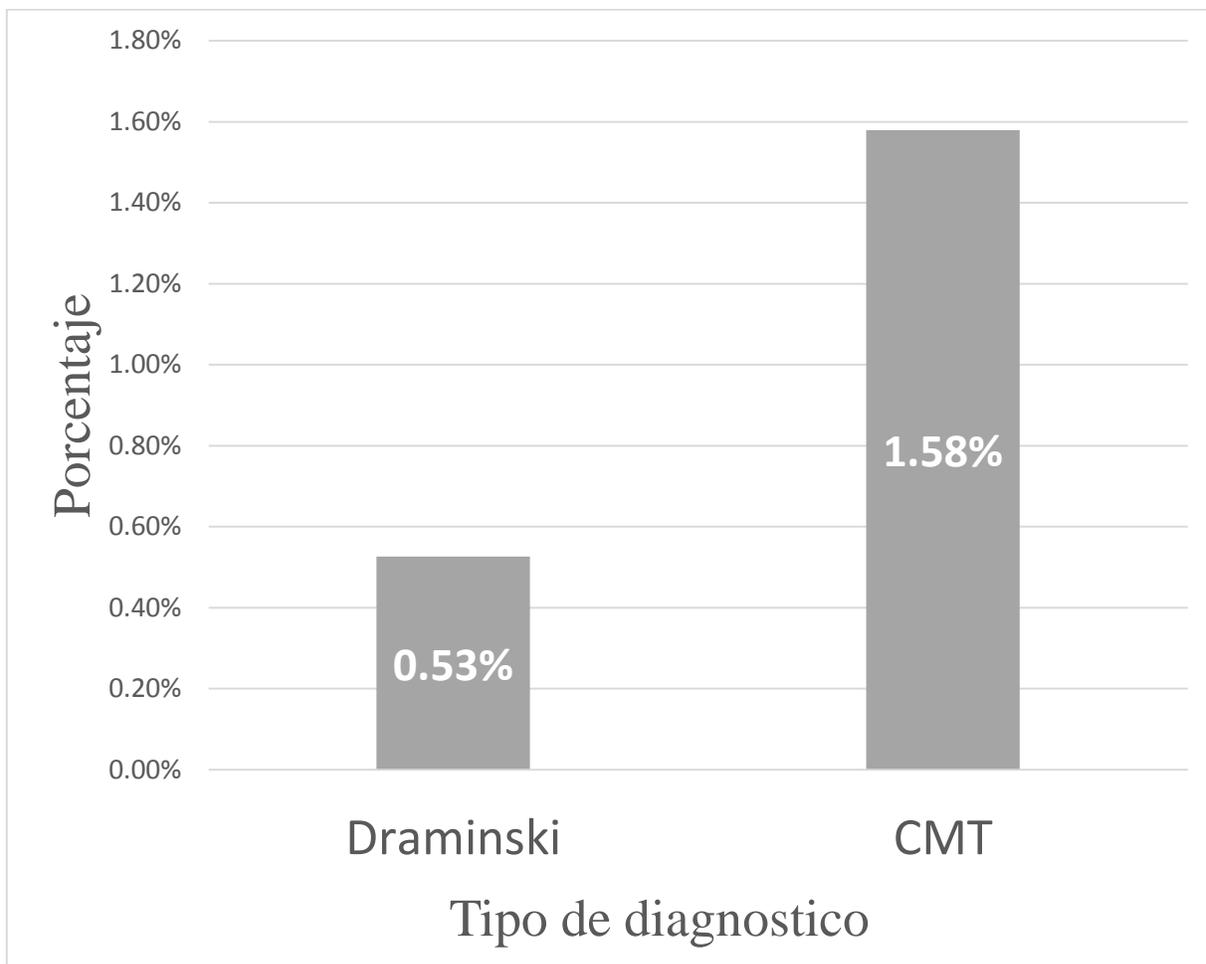


Con relación a la técnica CMT, (Cepero *et al.*, 2005) plantea que dicha prueba posee gran importancia práctica ya que permite un diagnóstico de campo rápido y sin muchas exigencias técnicas, aunque presenta algunas deficiencias debido a la gran diversidad de errores a la que se encuentra expuesta y a la gran variabilidad en su interpretación.

Trabajos realizados por (Cepero *et al.*, 2005) en diferentes unidades bovinas de las provincia spiritus, encontraron una correlación positiva entre CMT y la CE, en villa clara, evidenciaron gran relación entre la CMT y CE.

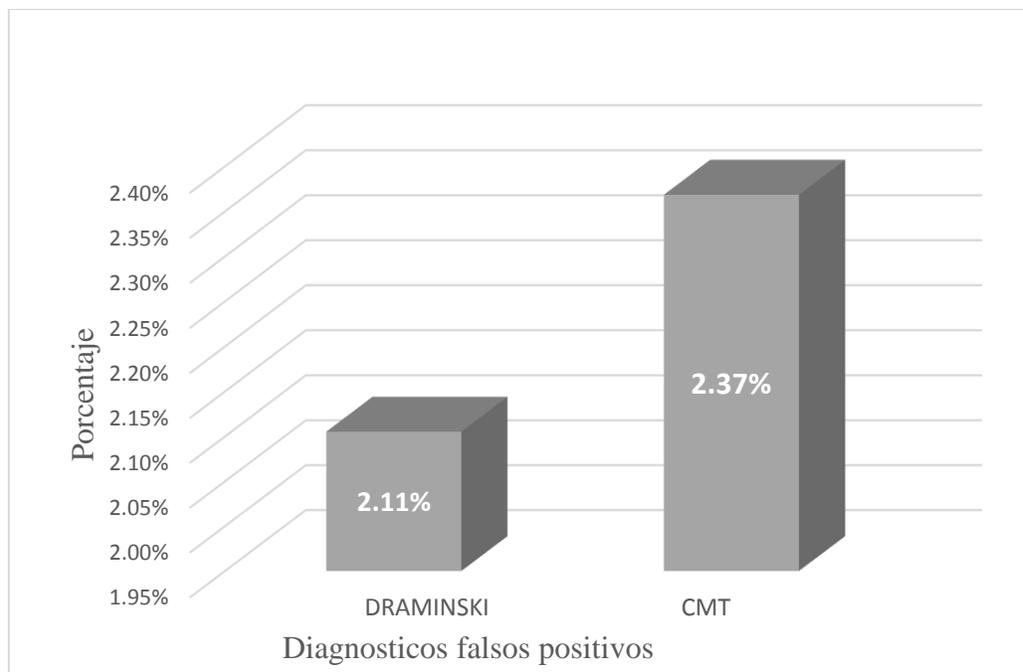
### 5.3. Porcentaje de falsos negativos de detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q y california mastitis test CMT

**Cuadro 7.** Porcentaje de falsos negativos para DRAMINSKI 4Q y CMT



#### 5.4. Porcentaje de falsos positivos para detector de mastitis subclínica DRAMINSKI y california mastitis test CMT

**Cuadro 8.** Porcentaje de falsos positivos para DRAMINSKI 4Q y CMT



#### 5.5. Bacteriología

De las 50 muestras procesadas en laboratorio de bacteriología 41 muestras presentaron crecimiento. Dando como resultado 41 casos de mastitis producida por *staphylococosaureus* y dos con infección mixta en las cuales se identificó *Staphylococosaureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

En los resultados, la prueba de sensibilidad a los antibióticos para confirmar la presencia de estos agentes y facilitar el tratamiento e incluirlos en el plan sanitario: *Staphylococosaureus*: sensibles: Resistentes.

*Pseudomona aeruginosa*: Sensibles: Resistentes:

**Cuadro 9.** Resultados de pruebas de sensibilidad antimicrobiana para staphylococosaureus

<b>Staphylococosaureus.</b>	
<b>Sensibles</b>	<b>Resistentes</b>
Amoxicilina clavulanico	Trimetoprimsulfa
Cefalexina	
Gentamicina	
Enrofloxacina	
Streptomicina	
Penicilina G	

**Cuadro 10.** Resultados de pruebas de sensibilidad antimicrobiana para pseudomonaeruginosa

<b>Pseudomonaeruginosa.</b>	
<b>sensibles</b>	<b>Resistentes</b>
Enrofloxacina	Amoxicilina clavulanico
Gentamicina	Cefalexina
	Enrofloxacina
	Streptomicina
	Penicilina G

### 5.6. Análisis estadístico

Formula CHI-CUADRADO:

$$X^2 = \sum (O - E)^2 / E$$

La prueba utilizada fue la prueba de independencia para CHI-CUADRADO utilizando las variables, resultados correctos y resultados incorrectos de ambas pruebas, el valor de chi cuadrado fue de 1.03.

Se trabajó con un grado de libertad. El nivel de significación alfa utilizado fue de 0.05 entonces un valor de la tabla para  $X^2$  asociado a 1 grado de libertad alfa 0.05 es 3.84, con lo cual se aceptó la hipótesis nula y se concluye que no hay dependencia entre ambos métodos pero las diferencias entre ambos métodos no son significativas.

## VI. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

Se encontró que a nivel estadístico el detector de mastitis subclínica DRAMINSKI y California Mastitis Test no tienen dependencia uno del otro pero las diferencias entre ambos no resultaron ser significativas.

La eficacia que se obtuvo de ambos métodos durante los cinco muestreos realizados fue la siguiente el detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q mostro un 97.37% de diagnósticos correctos y un 2.63% de diagnósticos incorrectos, mientras que la eficacia en diagnóstico que se obtuvo de la prueba california mastitis test fue de un 96.05% de diagnósticos correctos y un 3.95% de diagnósticos incorrectos.

La manipulación resulto ser más fácil para el detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q debido a que no requiere de un reactivo para dar el resultado y además brinda el diagnóstico de cada cuarto en un intervalo de 2 segundos cada uno y luego el mismo equipo refleja la diferencia entre cada cuarto, mientras que el california requiere de la paleta para la toma de muestra necesita una cantidad de 2cc de leche y 2 cc de reactivo para la prueba y requiere estar homogenizando la mezcla por diez segundos.

La interpretación del diagnóstico resultó ser más fácil para el detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q debido a que esta refleja los datos en forma numérica y muestra las diferencias entre cada cuarto, el cuarto afectado con mastitis subclínica deberá reflejar una diferencia de 40 a más con respecto al mayor, mientras que con la prueba california mastitis test obtendremos una variedad de resultados y la interpretación puede variar según la experiencia y percepción que tenga la persona que esté realizando la prueba.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Mejorar las condiciones de manejo e higiene en la finca estudiada, basados en el plan sanitario proporcionado.
2. Higiene en el ordeño para evitar la transmisión de microorganismos causante de mastitis subclínica de una vaca a otra.
  - Que una persona se dedique solo a enjear y administrar el concentrado en el ordeño.
  - Lavado de ubre en forma individual y secado con papel absorbente con el fin de retirar el lodo y estiércol de los cuartos.
  - Lavado y sacado de las manos del ordeñador con el fin evitar la posible transmisión de microorganismo causante de mastitis subclínica de una vaca afectada a una vaca sana.
  - Que una persona se dedique a la limpieza de la sala de ordeño.
3. Realizar un ordeño a fondo, siguiendo con la aplicación de un sellador en el orificio de los cuartos .Con esta práctica se evita la penetración de microorganismo causante de mastitis subclínica.
4. Realizar análisis de mastitis subclínica a todo el hato en ordeño ya sea con detector de mastitis subclínica DRAMINSKI 4Q o CALIFORNIA MASTITIS TEST con el fin de categorizar y realizar dos lotes vacas sanas y vacas afectadas.
5. Tratar correctamente los casos diagnosticados con mastitis subclínica ordeñando a fondo y aplicando el antibiótico al cual resultaron más sensibles los microorganismos causantes de mastitis subclínica.
6. Realizar estudio para evaluar prevalencia de mastitis en el Hato de la Lechería Santa Ana.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, M.; Moss, M. 2005. Food Microbiology. University of Surrey, Guildford, UK. p. 187 – 253.

Arango Uribe, JC. 2014. Parámetros zootécnicos que afectan la prevalencia de mastitis en hatos lecheros. Tesis por título de zootecnista. Antioquia, CL. Corporación Universitaria Lasallista, facultad de ciencias administrativas y Agropecuarias. 36 P. (en línea). Consultado 9 jun. 2015. Disponible en:

[http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1088/1/Parametros\\_zootecnicos\\_prevalencia\\_mastitis\\_hatos\\_lecheros.pdf](http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1088/1/Parametros_zootecnicos_prevalencia_mastitis_hatos_lecheros.pdf)

Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F. 2002. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. J. Dairy Sci. 85:1370-1375.

Avila T, S, Gutiérrez C, A. Mastitis. 2004. Universidad Nacional Autónoma. (en línea). México. Consultado 8 sep. 2015. Disponible en

<http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/24jul04/Mastitis%20en%20Ganado%20Bovino.doc>

BBL (Baltimore Biological Laboratory). 1974. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL. Edt. Rohde, P. MX.

Bedolla, 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. REDVET. no. 4(9): 1-26.

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>

Blowey, R. y Edmondson, P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Acribia. Zaragoza, ESP. P 208.

Bolaños, 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. Revista Veterinaria REDVET. no. 13(11): 1-11. (en línea). Consultado 4 jun. 2015. Disponible en

[http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_leche/78-mastitis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/78-mastitis.pdf)

Carrión, G. M. 2001. Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación Para el Desarrollo Integral Regional de Michoacán, MX. P 22-32.

Cepero, 2005. Conductividad eléctrica y california mastitis test en la detección de la mastitis subclínica. REDVET. no. 3(6): 1-6. (en línea). Consultado 8 jul. 2015. Disponible en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305/030516.pdf>

Dos Santos, J. N., Netto dos Santos, K. R., Gentilini, E., Sordelli, D., de Freire Bastos, M. C. 2002. Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 85: 133 -144.

Field, T. R, Ward, P. N, Pedersen, L. H., James, A. y Leigh, J. A. 2003. The Hyaluronic Acid Capsule of *Streptococcus uberis* Is Not Required for the Development of Infection and Clinical Mastitis. *Infection and Immunity*. 71(1):132-139.

Gallegos, A, Moncada Cortez, J, N. 2011. Evaluación del efecto de la adición de extractos de semillas de cítricos sobre la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis de la comunidad de tejaro, Michoacán. Tesis. Michoacán, MX.UMSNH, Facultad de Medicina Veterinaria. 60P.

Gómez hurtado, NM. 2008. Estandarización y validación de la técnica de recuento de células somáticas del equipo DCC de laval frente a la técnica de microscopia directa en la organización la Alqueria S.A. Tesis para optar al Título de Microbiólogo Industrial. Bogotá, COL. Pontificia Universidad Javeriana, facultad de ciencias. P 20. (en línea). Consultado 15 julio 2015. Disponible en

<http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8221/1/tesis216.pdf>

González de la Cruz, EG. 2012. Correlación de los métodos california mastitis test (CMT), conductividad eléctrica (CE) y conteo de células somáticas (CCS). Tesis para obtención de Título de ingeniero agropecuario. Cayambe, ECU. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. P 45. (en línea). Consultado 3 abril 2015. Disponible en <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/3730/6/UPS-YT00136.pdf>

González, S. 2014. Pruebas bioquímicas para entero bacterias. (en línea). Consultado 10 jun. 2015. Disponible en

<http://es.slideshare.net/SusanaGG/pruebas-bioquimicas>

Hogan, J, Gonzalez, R; Harmon, R; Nickerson, S.; Oliver S.; Pankey, J.; Smith, K. 1999. Laboratory Handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council. EU. P. 34-89.

Kirk, J, Barlett, P. 1984. Mastitis in a Hariana cow- A case report. *Indian*. p. 58-76.

Koneman, EW. 2008. Diagnostico Microbiológico. 6 ed. Buenos Aires, ARG, Medica Panamericana P. 1696. (en línea). Consultado 4 jun. 2015. Disponible en.

[https://books.google.com.ni/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=koneman&hl=es&sa=X&ved=0CB4Q6AEwAGoVChMI0\\_Ds0rvryAIVBugmCh0NtAVt#v=onepage&q=koneman&f=false](https://books.google.com.ni/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=koneman&hl=es&sa=X&ved=0CB4Q6AEwAGoVChMI0_Ds0rvryAIVBugmCh0NtAVt#v=onepage&q=koneman&f=false)

Marrero Carralero, D. 2006. Guía para la identificación de las bacterias más Frecuentes en el laboratorio de microbiología clínica (en línea). Consultado 20 agosto. 2015. Disponible en

<http://es.slideshare.net/Biohazardoa/215-guia-para-la-identificacion-de-las-bacteria>

Martínez, CS. 2014. Mastitis y sus causas predisponentes. (en línea). Consultado 10 jun. 2015. Disponible en

<http://merlassino.blogspot.com/2014/11/martinez-celeste-soledad-mastitis-y-sus.html>

- Mazo Velásquez, R. 2012. Mastitis bovina un problema en el campo. (en línea). Consultado 15 jun. 2015. Disponible en <http://mazovelasquezenelcampo.blogspot.com/2012/09/mastitis.html>
- Medina CM, y Montaldo VH. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., MX. 29-31 de Mayo.
- Montenegro Alvarado, P. 2006. Incidencia de la mastitis subclínica, en el sector de descanso de Sucre, parroquia victoria del portete. Tesis para obtención de Título de Ingeniero Agropecuario. Cuenca-ECU. Universidad del Azuay, Facultad de ciencia y tecnología. P 20. (en línea). Consultado 21 sep. 2015. Disponible en <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/437/1/05601.pdf>
- Pedrique, M. 2002. Determinación De La Sensibilidad De Las Bacterias A Los Antibióticos Antibiograma. (en línea). Consultado 19 ago 2015. Disponible en [www.ucv.ve/Farmacia/Micro\\_web/Catedras02/antibiog.pdf+procedimiento%2Bantibiograma&hl=es&ct=clnk&cd=1&gl=ec&lr=lang\\_es](http://www.ucv.ve/Farmacia/Micro_web/Catedras02/antibiog.pdf+procedimiento%2Bantibiograma&hl=es&ct=clnk&cd=1&gl=ec&lr=lang_es)
- Philpot, W. N. 1998. Today's Challenge to Meet Tomorrow's Needs. Proc. Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality. Mérida, México. 12-21.
- Pinzón G, JL. 1989. Mastitis Bovina. (en línea). Consultado 10 Mayo 2015. Disponible en [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd31/texto/mastitis.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd31/texto/mastitis.htm)
- Saran, A y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Ed. Inter-Médica. Buenos Aires, ARG. P. 14-16, 31-42.
- Seegers, H., Fourichon, C. y Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet. Res. 34:475–491.Servet Talavera. (en línea). Consultado 5 jun. 2015. Disponible en <http://www.servetalavera.es/documentos/CMT.pdf>
- Tollersrud, T, Kenny, K, Reitz, A. J. Jr. y Lee, J. C. 2000. Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of Staphylococcus aureus and Other Staphylococcus spp. from Europe and the United States. Journal of Clinical Microbiology. 38:2998-3003.
- Tortora, JG. 2007. Introducción a la microbiología. 9 ed. Buenos Aires, ARG, Medica Panamericana. P 70. (en línea). Consultado 6 jun. 2015. Disponible en [https://books.google.com.ni/books?id=Nxb3iETuwpIC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ni/books?id=Nxb3iETuwpIC&redir_esc=y)
- Val, D. 2005. Presentación de la coloración Gram (en línea). Consultado 21 sep. 2015. Disponible en <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioTinciones.html>
- Wellenberg, G.J., van der Poel, W. H. M. and Van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology, Article 2361. P. 2-21.

Wolter, W, Kloppert, B. 2004. Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Guadalajara, Jalisco, MX. P5.

Zúñiga Pacheco, DR. 2006. Plan Preventivo para mastitis. Monografía para obtención de Título de médico Veterinario Zootecnista. Cuenca, ECU. Universidad de buenos aires, Facultad de ciencias veterinarias. P 136. (en línea). Consultado 25 mayo 2015. Disponible en

<http://cdjbv.ucuenca.edu.ec/ebooks/mv102.pdf>

## IX. ANEXOS

### Anexo 1. Plan sanitario “lechería Santana Diriamba-Carazo”

Actividad	Actividades de realización diaria							Actividades de realización mensual	
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo		
Limpieza y desinfección del área de ordeño.								Control de vectores (moscas).	
Designar una persona que se encargue del enrejado.								Muestreos de mastitis subclínica.	
Realizar lavado y secado de manos del ordeñador.									
Realizar lavado y secado de cuartos mamarios con toallas individuales.								Secado de vacas de destete (con antibióticos intramamarios y vía IM).	
Ordeñar a fondo.									
Sellado de pezones con yodo por 30 segundos.								Encalado de sala de ordeño.	

**Anexo 2. Vacas lactantes en la unidad de producción**

<b>Nombre/numero</b>	<b>Fecha de parto</b>	<b>Número de lactancias</b>
1- Reina 547	23/02/15	1
2- Melisa 746	25/12/14	1
3- Canela 730	20/12/14	1
4- Chancha 769	12/01/15	1
5- Cocinera 777	19/11/14	1
6- Belleza 749	23/03/15	1
7- Carla 780	22/02/15	1
8- Victoria 802	07/05/15	1
9- Pepesca 783	03/06/15	1
10- Ricarda 739	27/03/15	1
11- Pinta 746	25/12/14	1
12- Tijera 768	21/12/14	1
13- Lola 797	11/04/15	1
14- Poronga 188	26/05/15	1
15- Pachanguera 789	21/02/15	1
16- Maravilla 797	19/03/15	1
17- Sardina 787	25/02/15	1
18- Sofía 779	31/03/15	1
19- Yuri 751	16/08/14	1
20- Pitufa 800	23/05/15	1
21- Tinca 796	30/12/14	1
22- Pisuca 781	25/02/15	1
23- Guatusa 774	25/12/14	1
24- Polaca 773	09/01/15	1
25- Campana 775	23/12/14	1
26- Papaya 809	18/04/15	1
27- Calceta 764	27/03/15	1
28- Bandera 763	18/07/14	1
29- Mapa 696	1/06/15	2
30- Coquito 738	21/02/15	2
31- Peruana 737	23/03/15	2
32- Leona 686	7/11/14	2
33- Peli buey 664	19/05/15	2
34- Manuela 729	06/03/15	2
35- Colocha 716	31/10/14	2
36- Ratona 690	27/10/14	2
37- Camarona 674	05/11/14	2
38- Pujagua 685	18/04/15	2
39- Paca 723	23/01/15	2
40- Isolda 724	29/12/14	2

<b>41- Carmen 694</b>	<b>02/02/15</b>	<b>2</b>
<b>42- Juana 692</b>	<b>15/12/14</b>	<b>2</b>
<b>43- Pimienta 732</b>	<b>07/11/14</b>	<b>2</b>
<b>44- Mazorca 718</b>	<b>01/12/14</b>	<b>2</b>
<b>45- Chocolate 700</b>	<b>04/11/14</b>	<b>2</b>
<b>46- Paloma 695</b>	<b>19/03/15</b>	<b>3</b>
<b>47- Pulsera 555</b>	<b>19/12/14</b>	<b>3</b>
<b>48- Jirafa 671</b>	<b>25/02/15</b>	<b>3</b>
<b>49- Cerveza 675</b>	<b>09/11/14</b>	<b>3</b>
<b>50- Retania 566</b>	<b>18/03/14</b>	<b>3</b>
<b>51- Rosquilla 619</b>	<b>02/11/14</b>	<b>4</b>
<b>52- Mandarina 590</b>	<b>12/10/14</b>	<b>4</b>
<b>53- Mariposa 600</b>	<b>30/08/14</b>	<b>4</b>
<b>54- Marisol 579</b>	<b>03/04/15</b>	<b>4</b>
<b>55- Casilda 544</b>	<b>19/09/14</b>	<b>4</b>
<b>56- Morena 591</b>	<b>25/09/14</b>	<b>4</b>
<b>57- Chiltoma 604</b>	<b>21/09/14</b>	<b>4</b>
<b>58- Chiriza 605</b>	<b>20/05/15</b>	<b>4</b>
<b>59- Zorra 532</b>	<b>20/10/14</b>	<b>4</b>
<b>60- Pastora 493</b>	<b>01/09/14</b>	<b>4</b>
<b>61- Zopilota 563</b>	<b>22/01/15</b>	<b>4</b>
<b>62- Conga 560</b>	<b>24/10/14</b>	<b>4</b>
<b>63- Chela 570</b>	<b>01/03/15</b>	<b>4</b>
<b>64- Chibola 542</b>	<b>30/05/15</b>	<b>4</b>
<b>65- Chispa 557</b>	<b>19/09/14</b>	<b>4</b>
<b>66- Rosa 587</b>	<b>29/12/14</b>	<b>4</b>
<b>67- Guensi 537</b>	<b>25/04/15</b>	<b>4</b>
<b>68- Parda 524</b>	<b>29/09/14</b>	<b>4</b>
<b>69- Panameña 455</b>	<b>15/04/15</b>	<b>4</b>
<b>70- Caramelo 482</b>	<b>04/04/15</b>	<b>4</b>
<b>71- Ramona 506</b>	<b>29/03/14</b>	<b>4</b>
<b>72- Coneja 540</b>	<b>06/05/15</b>	<b>4</b>
<b>73- Pájara 460</b>	<b>23/08/14</b>	<b>5</b>
<b>74- Tigra 439</b>	<b>22/07/14</b>	<b>5</b>
<b>75- Maraca 547</b>	<b>16/11/14</b>	<b>5</b>
<b>76- Gaviota 487</b>	<b>24/06/14</b>	<b>5</b>
<b>77- Libia 505</b>	<b>06/04/15</b>	<b>5</b>
<b>78- Margarita 454</b>	<b>20/06/14</b>	<b>5</b>
<b>79- Mantequilla 414</b>	<b>05/06/15</b>	<b>5</b>
<b>80- Golondrina 430</b>	<b>19/01/15</b>	<b>3</b>
<b>81- Estampa 496</b>	<b>21/06/15</b>	<b>5</b>
<b>82- Julia 392</b>	<b>30/08/14</b>	<b>5</b>
<b>83- Caimana 380</b>	<b>15/11/14</b>	<b>5</b>
<b>84- Pirinola 381</b>	<b>18/05/15</b>	<b>5</b>
<b>85- Barril 373</b>	<b>13/07/15</b>	<b>5</b>

### Anexo 3. Vacas seleccionadas para el estudio

<b>Vacas seleccionadas para el estudio.</b>		
<b>Número/Código</b>	<b>Nombre</b>	<b>numero de lactancias</b>
3- 694	Carmen	2
2- 674	Camaroná	2
3- 675	Cerveza	3
4- 738	Coquito	2
5- 430	Golondrina	3
6- 700	Chocolate	2
7- 724	Isolda	2
8- 617	Jirafa	3
9- 692	Juana	2
10- 729	Manuela	2
11- 696	Mapa	2
12- 718	Mazorca	2
13- 723	Paca	2
14- 695	Paloma	3
15- 664	Peli buey	2
16- 737	Peruana	2
17- 685	Puja gua	2
18- 555	Pulsera	3
19- 690	Ratona	2

Vacas que dieron positivo en los muestreos en DRAMINSKI y CMT.						
Numero	Nombre	1 muestreo	2 muestreo	3 muestreo	4 muestreo	5 muestreo
1- 694	Carmen					
2- 674	Camaronas					C4 D y CMT
3- 675	Cerveza					C2 D
4- 738	Coquito			C4 D		C4 D
5- 430	Golondrina		C3 D y CMT		C3 D y CMT	C3 D y CMT
6- 700	Chocolate					
7- 724	Isolda					
8- 617	Jirafa	C1 D y CMT	C1 D y CMT	C1 D y CMT	C1 D y CMT	C1 D y CMT
9- 692	Juana	C1 D y CMT		C3 D y CMT	C1,C3 D y CMT	C1,C3 D y CMT
10- 729	Manuela					
11- 696	Mapa				C2 D	C2 D
12- 718	Mazorca					
13- 723	Paca			C4 D y CMT	C4 D y CMT	C4 D y CMT
14- 695	Paloma	C4 D y CMT	C2, C4 D y CMT	C2 D y CMT	C4 D	C2,C4 D y CMT
15- 664	Pelibuey		C3 D y CMT		C3 D y CMT	C3 D y CMT
16- 737	Peruana					
17- 685	Pujagua	C2 D y CMT	C2 D y CMT	C2 D y CMT	C2 D y CMT	C2 D y CMT
18- 555	Pulsera	C2 D y CMT	C2 D y CMT	C2 D y CMT	C2 D y CMT	C1,C2 D y CMT
19- 690	Ratona	C1 CMT	C2 D y CMT	C2 CMT	C2 D/CMT C3CMT	C2 D y CMT

- Donde color rojo significa vacas que dieron positivo en DRAMINSKI y negativo en California Mastitis Test.
- Donde color morado significa vacas que dieron positivo en california mastitis test y negativo en DRAMINSKI.

**Crecimiento bacteriano de las muestras recolectadas.**

Numero	Nombre	1 muestreo	2 muestreo	3 muestreo	4 muestreo	5 muestreo
1- 694	Carmen					
2- 674	Camaronas					C4 D y CMT. S. aureus
3- 675	Cerveza					C2 D. s. aureus.
4- 738	Coquito			C4 D s. aureus.		C4 D. s. aureus.
5- 430	Golondrina		C3 D y CMT NHC.B.		C3 D y CMT S. aureus.	C3 D y CMT. S. aureus.
6- 700	Chocolate					
7- 724	Isolda					
8- 617	Jirafa	C1 D y CMT s. Aureus.	C1 D y CMT s. aureus.	C1 D y CMT s. aureus, p.aeruginosa.	C1 D y CMT s. aureus.	C1 D y CMT. S. aureus.
9- 692	Juana	C1 D y CMT s. aureus.		C3 D y CMT s. aureus.	C1,C3 D y CMT s. aureus.	C1,C3 D y CMT. S. aureus.
10- 729	Manuela					
11- 696	Mapa				C2 D s. aureus.	C2 D s. aureus.
12- 718	Mazorca					
13- 723	Paca			C4 D y CMT s. aureus.	C4 D y CMT s. aureus.	C4 D y CMT s. aureus.
14- 695	Paloma	C4 D y CMT NHC.B.	C2, C4 D y CMT NHC.B.	C2 D y CMT s. aureus, aeruginosa.	C4 D s. aureus.	C2,C4 D y CMT s. aureus.
15- 664	Peli buey		C3 D y CMT NHC.B.		C3 D y CMT s. aureus.	C3 D y CMT s. aureus.
16- 737	Peruana					
17- 685	Puja gua	C2 D y CMT s. aureus.	C2 D y CMT s. aureus.	C2 D y CMT s. aureus.	C2 D y CMT s. aureus.	C2 D y CMT s. aureus.
18- 555	Pulsera	C2 D y CMT NHC.B.	C2 D y CMT NHC.B.	C2 D y CMT s. aureus.	C2 D y CMT s. aureus.	C1,C2 D y CMT s. aureus.
19- 690	Ratona	C1 NHC.B.	C2 D y CMT NHC.B.	C2 CMT s. aureus.	C2 D y CMT,C3 CMT S. aureus.	C2 D y CMT s. aureus.

**Anexo 4. Formato utilizado para toma de muestras durante el estudio**

<b>1- California</b>		<b>1- DRAMINSKI</b>	
<b>#/nombre</b>		<b>#/nombre</b>	
<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>2- California</b>		<b>2- DRAMINSKI</b>	
<b>#/nombre</b>		<b>#/nombre</b>	
<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>3- California</b>		<b>3- DRAMINSKI</b>	
<b>#/nombre</b>		<b>#/nombre</b>	
<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>4- California</b>		<b>4- DRAMINSKI</b>	
<b>#/nombre</b>		<b>#/nombre</b>	
<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<b>5- California</b>		<b>5- DRAMINSKI</b>	
<b>#/nombre</b>		<b>#/nombre</b>	
<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>

## Anexo 5. Ubicación e instalaciones finca santana Dirima, Carazo

- Ubicación satelital coordenadas



- Corral de espera para ordeño



- Sala de ordeño



- **Corral de descanso**



**Anexo 6. Diagnóstico de mastitis subclínica usando DRAMINSKI 4Q y CMT**



- **Diagnostico utilizando CMT**



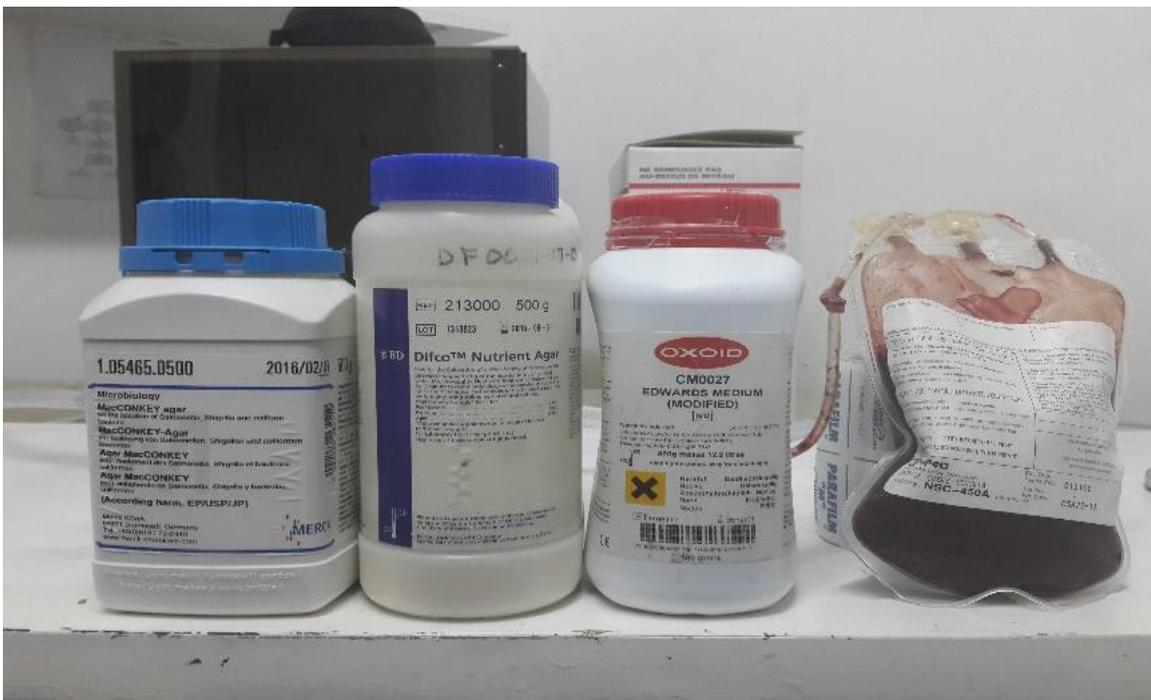
- **Comparación de resultado de ambos métodos**



## Anexo 7. Toma de muestras de cuartos afectados



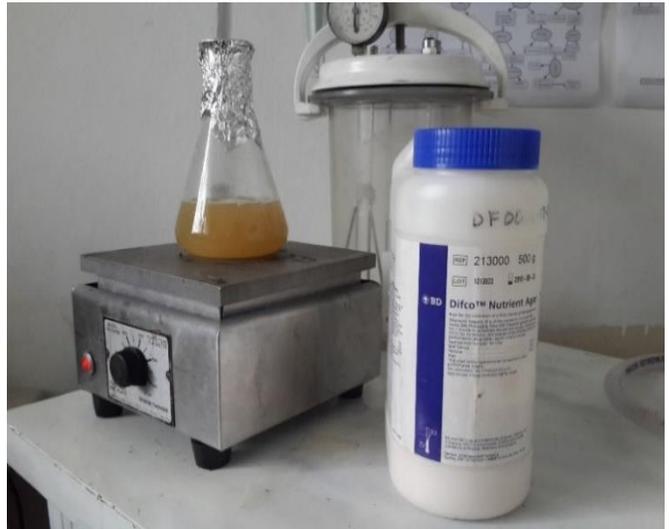
## Anexo 8. Medios de cultivo utilizados Agar MacConkey, Agar Nutriente y EDWARDS modificado.



- Preparación de medios de cultivo
- Pesaje de agar MacConkey y precalentado en Hot Plate



- Pesaje y precalentado en hot plate Agar nutriente



## **Pesaje y precalentado de Agar Muller Hinton en Hot Plate.**



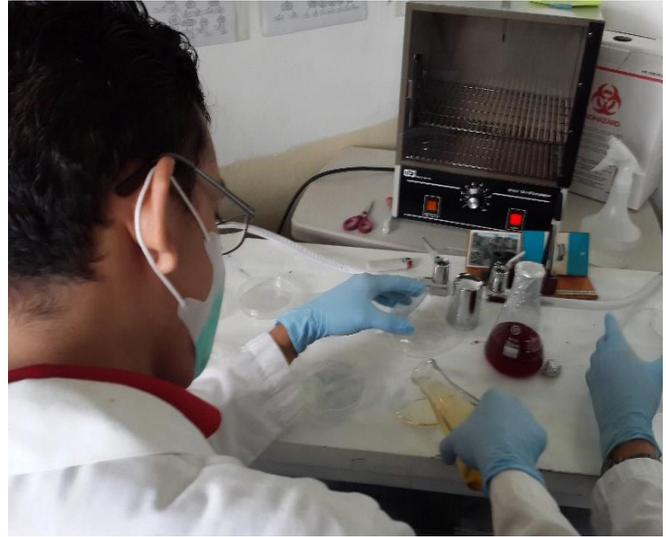
- **Esterilización de medios en autoclave a 121° C por 15 minutos**



- **Preparación de placas Petri dobles para chorrear medios de cultivos**



- **Chorreando medios de cultivo en placas Petri**



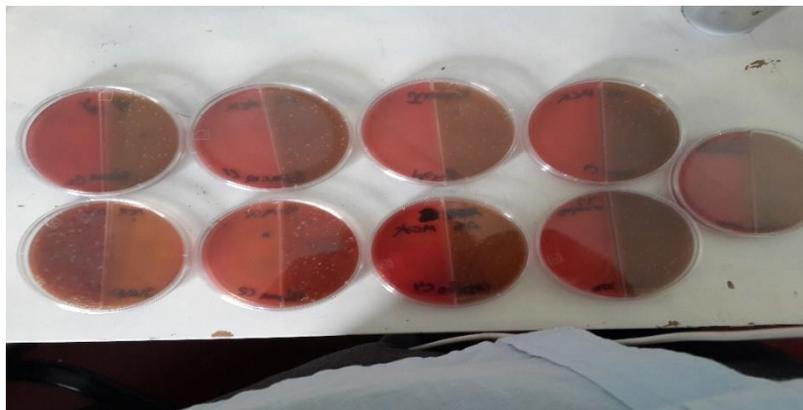
- **Anexo 9.**  
**Siembra de muestras de leche en medios de cultivo**



- Incubación de medios de cultivo a 37 ° C durante 24 horas

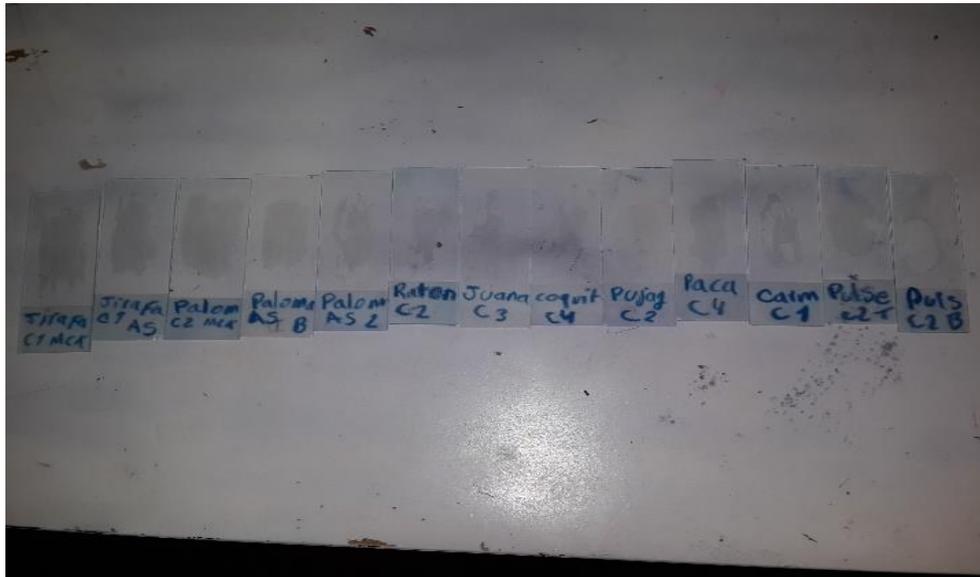


- Crecimiento bacteriano

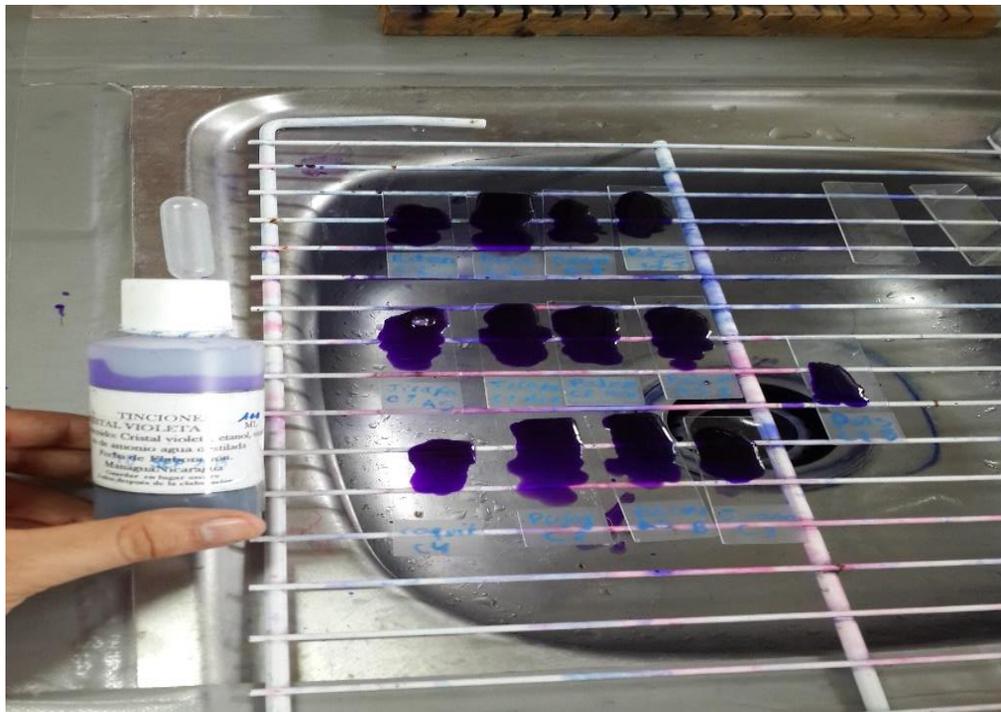


## Anexo 10. Procedimiento tinción Gram

- Realización de frotis



- Aplicación de cristal violeta 1 minuto y luego enjuagar



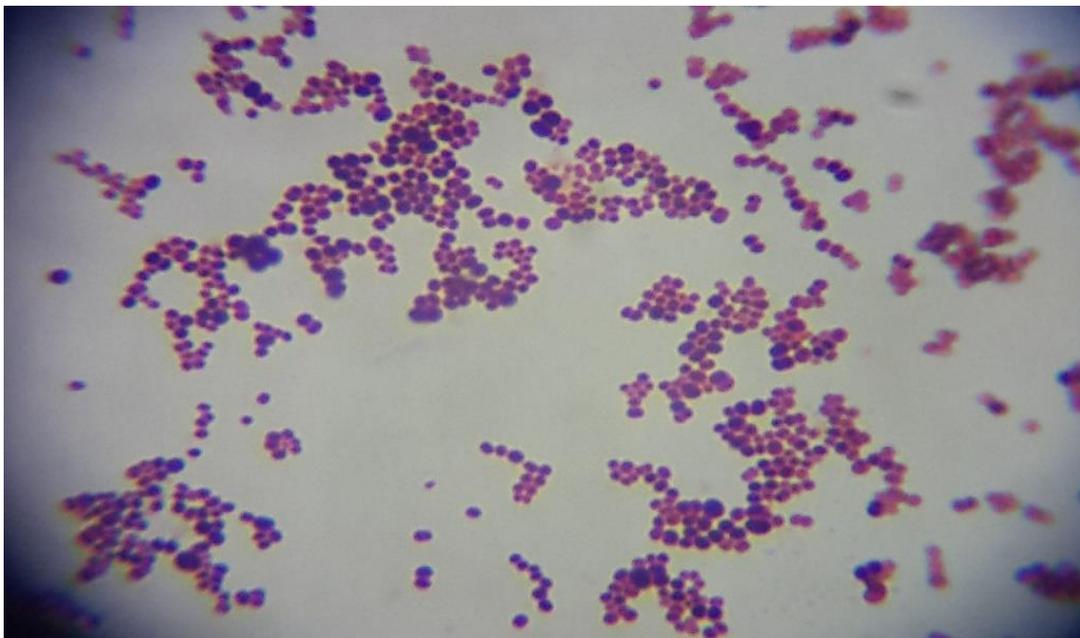


- **Aplicación de safranina 1 minuto enjuagar, esperar que seque y verlo al microscopio con aceite de inmersión**



**Anexo 11. Microorganismos observados en la tinción Gram (cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos)**

- **Cocos Gram positivos**



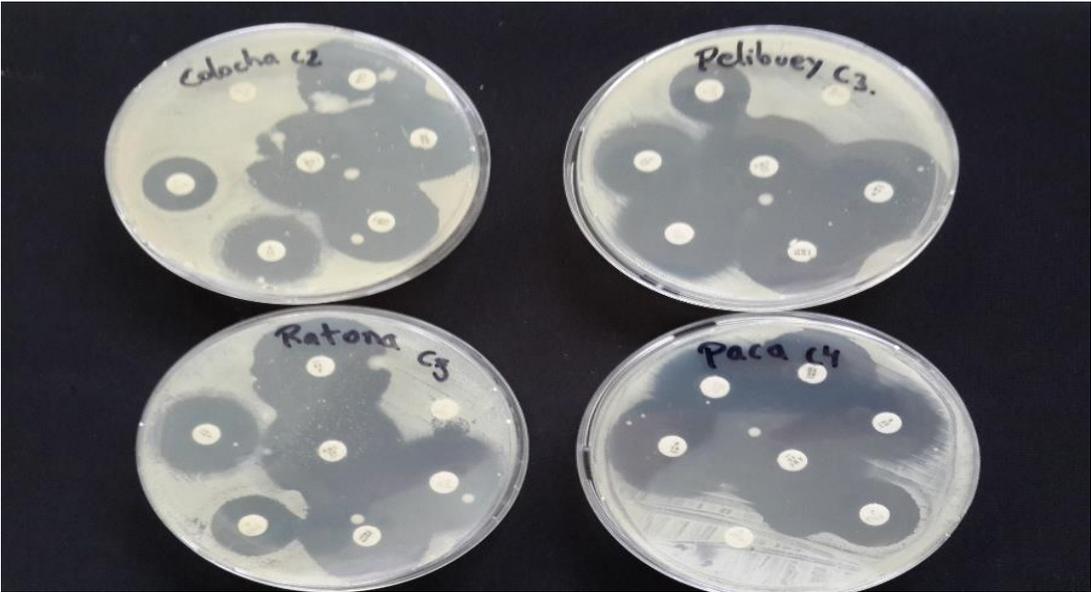
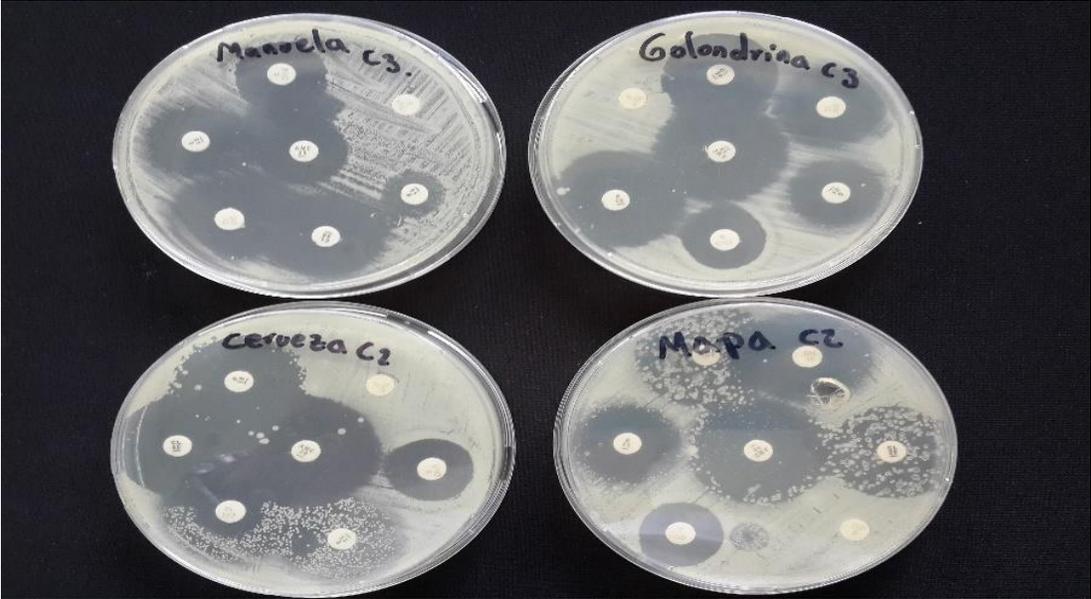
- Bacilos Gram negativos



Anexo 12. Pruebas bioquímicas para Gram negativas



Anexo 13. Antibiogramas



**Anexo 14. Total de muestras sembradas y antibiogramas realizados durante el estudio**

