

# El Laboratorio de Diagnóstico en el control de las mastitis en el ganado vacuno

ANTÓN ESNAL\*, BELÉN EXTRAMIANA\*, IÑIGO ESCOBAL\* Y JUAN CARLOS MARCO\*\*

## INTRODUCCIÓN

Las actuaciones dirigidas a la mejora de la calidad de la leche deben comprender, como mínimo, aquellas encaminadas a la reducción de la incidencia y prevalencia de mastitis (descenso del recuento celular), a un ordeño y conservación de la leche más higiénicos (descenso del recuento bacteriano y ausencia de microorganismos patógenos) y a garantizar la ausencia de inhibidores en la leche producida en la explotación.

La demanda analítica requerida a un laboratorio de diagnóstico de mastitis bovinas ha evolucionado en los últimos años, fruto de varios aspectos:

- El nuevo concepto integral de la calidad higiénica de la leche.
- La creciente demanda de los ganaderos de servicios encaminados a la mejora de la calidad de la leche.
- La formación específica en este área de los veterinarios, así como de otros equipos pluridisciplinarios (ingenieros técnicos, personal de revisión de equipos de ordeño y del control lechero, etc.)
- La Normativa Legal Comunitaria y las exigencias de la industria láctea.

En este contexto, el laboratorio de diagnóstico debe ser una herramienta imprescindible, como otras, para el éxito de los programas de mejora de calidad de la leche. Sin embargo, para que esta herramienta sea útil y eficaz es necesario que sus usuarios conozcan algunos aspectos relativos a la recogida y selección de muestras e interpretación y limitaciones de las técnicas microbiológicas. A conti-



nuación se comentan estos aspectos relacionados exclusivamente con la mastitis.

## RECOGIDA Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LECHE PARA ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS

El análisis bacteriológico es una herramienta fundamental de diagnóstico de las infecciones mamarias; sin embargo su uso debe racionalizarse. La selección de muestras debe acomodarse al tamaño de la explotación y a la problemática observada. En cualquier caso, nuestra propuesta comprende la recogida de muestras de leche de cuarterones de vacas de primer parto y de vacas multíparas con mastitis subclínicas y mastitis clínicas no sometidas a tratamiento, y finalmente, la leche del tanque.

Establecidos estos criterios, el número genérico de muestras de leche individuales necesarias para el diagnóstico de la problemática de mastitis podría ser de

aproximadamente 10 en explotaciones de tamaño pequeño y medio (hasta 100 vacas). En explotaciones de mayor tamaño el porcentaje de animales a muestrear variaría entre el 10 y 3%, siendo menor a medida que aumenta el tamaño del rebaño. Así por ejemplo, nuestro laboratorio distribuye entre nuestros clientes un kit denominado "9 + 1" para la recogida de muestras, que incluye 9 tubos etiquetados para la recogida de muestras de cuarterón, un tubo con conservante para la recogida de leche de tanque y una ficha clínica que facilite la interpretación epidemiológica de los resultados microbiológicos.

La asepsia en la recogida de las muestras de leche es una cuestión básica y requisito imprescindible para la fiabilidad de los resultados. En síntesis, los pasos a seguir son los siguientes:

- 1.- Lavado del área del esfínter del pezón, sólo en los casos en los que la suciedad sea excesiva.
- 2.- Desinfección del esfínter del pezón con una torunda de algodón impregnada en etanol.
- 3.- Repetir la desinfección si la suciedad observada así lo aconsejara.
- 4.- Desechar los dos primeros chorros de leche emitidos.
- 5.- Recoger un único chorro de leche, emitido horizontalmente para evitar la contaminación por partículas del aire y/o suciedad, en tubos de boca estrecha y cerrados rápidamente con el tapón a rosca, que se habrá mantenido entre los dedos boca abajo.
- 6.- Refrigerar inmediatamente las muestras, o congelarlas si se va a demorar su envío al laboratorio más de 48 horas.

\* Analítica Veterinaria.

\*\* Dpto. de Sanidad. Gobierno Vasco.

## INTERÉS DEL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS MAMITIS

## Características diferenciales entre Mamitis Ambientales y Mamitis Contagiosas

|                       | Estrep. Ambientales y Coliformes | Str. agalactiae y S. aureus |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Localización primaria | Ambiente                         | Interior de la ubre         |
| Signos                | Clínica                          | Subclínica                  |
| Duración              | Corta                            | Larga                       |
| RCS tanque            | A menudo bajo                    | A menudo alto               |

## Estimación del riesgo de los diferentes microorganismos

|                   | Riesgo para el animal | Riesgo para la explotación |
|-------------------|-----------------------|----------------------------|
| S. aureus         | Alto                  | Alto                       |
| Mycoplasma spp    | Alto                  | Alto                       |
| Str. agalactiae   | Bajo                  | Alto                       |
| Escherichia coli  | Alto                  | Bajo                       |
| Str. uberis       | Alto                  | Medio                      |
| Enterococcus spp  | Medio                 | Medio                      |
| Str. dysgalactiae | Medio                 | Medio                      |

Aunque la congelación preserva la mayoría de microorganismos patógenos durante varias semanas, sus principales inconvenientes son los posibles falsos negativos en algunas mamitis, principalmente colibacilares, debido a la escasa excreción bacteriana.

La secuencia de tareas propuesta para la optimización del trabajo de campo y para facilitar al laboratorio un diagnóstico etiológico y epidemiológico preciso de la situación actual de mamitis es la siguiente:

- Analizar la información disponible en la explotación. Se deben revisar unos datos mínimos relativos a la leche del tanque y su evolución en los últimos 6 meses. De ahí se observará la tendencia y/o las desviaciones de los criterios de calidad: recuento celular, recuento bacteriano (calidad bacteriológica) e inhibidores.

Con respecto al recuento celular, si se dispone de recuentos celulares individuales (RCI), previo análisis de dicha información, se seleccionarán los animales a examinar, sobre la base del período de lactación y de determinados criterios y umbrales de recuento celular. A grandes rasgos los animales susceptibles de toma de muestras son los que posean datos de recuentos celulares estables (2 ó 3 RCI), con la referencia de umbrales de RCI > 300.000 (animales de primer parto) y RCI > 800.000 (animales adultos). Sin embargo se estudiarán las modificaciones en el último mes, de modo que animales con cambios cualitativos importantes de RCI, sean asimismo sujeto de análisis.

- Realización del California Mastitis Test (CMT), exclusivamente a los animales preseleccionados con datos individuales de recuento. Si no existen datos de RCI, se realizará el CMT a la totalidad del efectivo, o a un porcentaje significativo de animales en ordeño (mínimo 20%), según

sea el tamaño de la explotación.

- Tomar muestras asepticas de cuarterones individuales con la reacción más intensa al CMT, de los animales previamente seleccionados.

- Detección de mamitis crónicas. Para ello, se llevará a cabo la palpación mamaria para la detección de lesiones, y se recabará información del ganadero sobre animales con episodios de mamitis clínicas de repetición en la misma lactación (2 o más casos) o en lactaciones consecutivas (3 o más casos). En ambos casos se considerarán animales con mamitis crónicas.

- Diagnóstico de nuevas infecciones. Por ser las más recientes, son también las más interesantes de cara a enfocar el control. Se obtendrá prioritariamente a partir de las muestras de leche de animales de primer parto, con elevaciones del recuento celular (RCI > 200.000 cel/ml) o positivos al CMT, así como a partir de animales en los que se constata una elevación del

RCI entre dos controles consecutivos.

- Detección de mamitis clínicas de animales no tratados. La recogida de estas muestras es el apartado más complicado, ya que la coincidencia de episodios de mamitis clínicas que no hayan recibido tratamiento, con la visita de intervención veterinaria no siempre es factible. La propuesta que realizamos es que el ganadero registre los casos de mamitis clínicas, tome las muestras antes del tratamiento y las mantenga en congelación hasta su análisis.

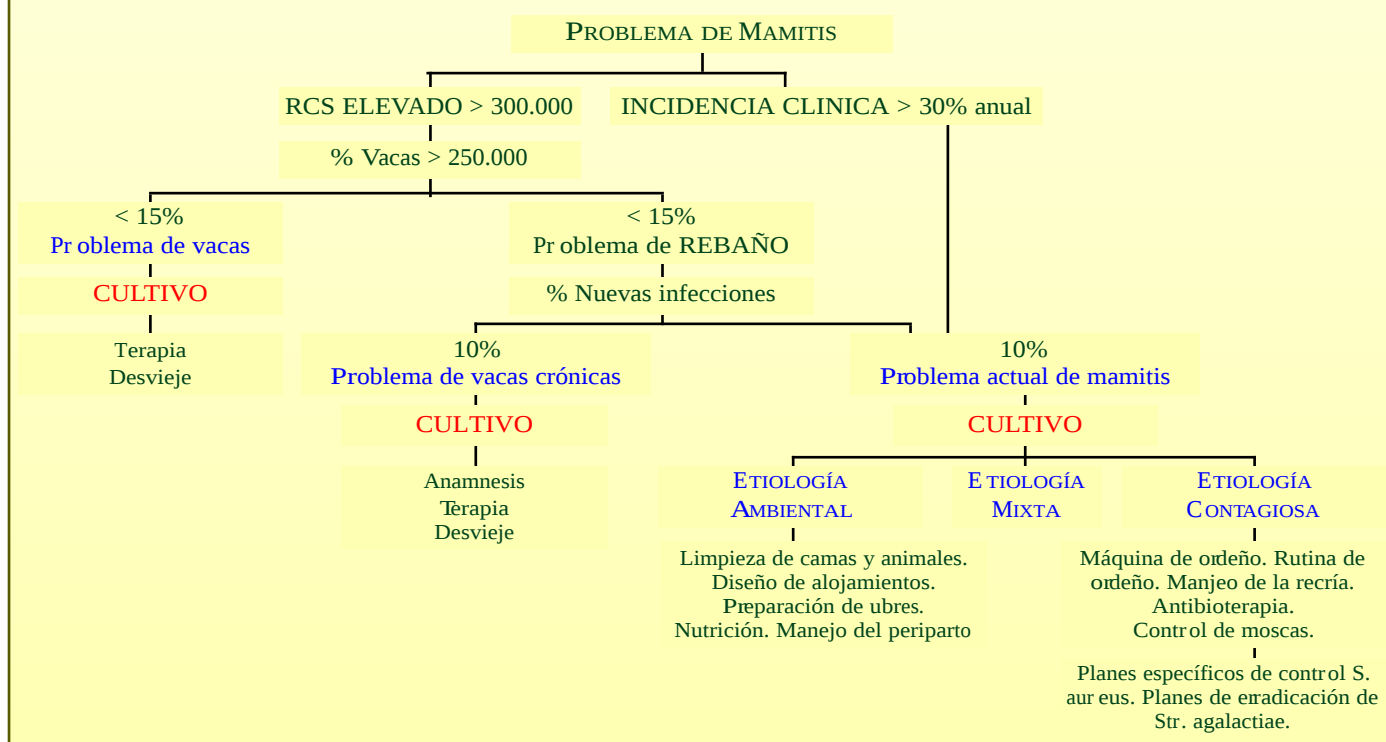
- Aportar la información básica sobre los animales muestreados: identificación (crotal oficial o numérico de la explotación) y cuarto muestreado; edad o nº de parto; resultados completos del CMT; calificación de la mamitis: clínica aguda/sobreaaguda (MCA); clínica (MC); subclínica (MS) y crónica (MCR).

- Muestra de leche de tanque. Es una de las de indudable elección, que debe adjuntarse a cualquier envío al laboratorio. Nuestra idea sobre la utilidad del cultivo bacteriológico de la leche del tanque es que sus resultados están bastante condicionados a tres aspectos fundamentales: la calidad higiénica de la leche del tanque (recuento de bacterias del tanque), el sistema de conservación y transporte hasta el laboratorio, y la excreción intermitente de algunos microorganismos por parte de animales con infecciones mamarias. En cualquier caso, su rendimiento es especialmente satisfactorio para la detección de Str. agalactiae, S. aureus y Mycoplasma spp. Como análisis complementarios, puede estimarse la prevalencia de otros estafilococos y de los microorganismos ambientales (estreptococos y coliformes).

Se ha constatado que la muestra suplementada con el conservante azidiol, es una



## ESQUEMA PARA IDENTIFICAR Y RESOLVER UN PROBLEMA DE MAMITIS USANDO RECuentOS DE CÉLULAS SOMÁTICAS Y CULTIVOS DE LECHE



alternativa muy interesante ya que preservan los niveles iniciales de contaminación por patógenos y en definitiva, estima más aproximadamente la prevalencia de los mismos. De cualquier modo, a nuestro juicio, la ausencia de crecimiento de patógenos contagiosos es una estimación válida de su ausencia y/o baja prevalencia, y por el contrario, niveles elevados de cualquiera de los agentes contagiosos o ambientales, permite considerar un problema relevante ocasionado por los mismos.

### EL CULTIVO BACTERIOLÓGICO Y SU INTERPRETACIÓN

La mayoría de microorganismos causantes de mastitis, se encuentran en el propio animal (piel de la ubre, tracto genital o respiratorio, heces...), así como en el entorno del mismo. Este hecho es un factor primordial a la hora de la interpretación de los aislamientos, de modo que la fiabilidad de los resultados va a ir en función directa a la calidad del muestreo.

En las muestras individuales de leche, nuestra metodología consiste en la utilización de un sólo medio de cultivo enriquecido con sangre (Agar sangre: Columbia + 5% de sangre de camero, o Agar sangre suplementado con esculina, sustrato que permite una primera discriminación de las especies microbianas). El empleo de varios medios selectivos para los diferentes microorganismos (*S. aureus*, otros esta-

filococos, estreptococos, enterobacterias, hongos etc.) está desaconsejado por motivos de coste, de dificultad de interpretación (pueden proporcionar cultivo positivos varios microorganismos) y no supone una solución a un muestreo defectuoso. Excepción a este procedimiento general es la utilización de medios de cultivo selectivos para la detección de ciertos agentes contagiosos, básicamente *Str. agalactiae* (medios TKT, Edwards, Granada etc.), *S. aureus* (Baird Parker, Manitol Salt etc.) y *Mycoplasma* (PPL0-Hayflick), especialmente en programas específicos de control y/o erradicación de estos patógenos.

La incubación convencional es de 48 horas, período en el que se observa crecimiento de la casi totalidad de los microorganismos causantes de mastitis. Nuestro laboratorio prolonga la incubación de los cultivos negativos hasta los 7 días, para permitir el desarrollo de las bacterias de crecimiento lento (*Micobacterias*, *Nocardia* spp, *Actinomyces* spp, *Mycoplasma* spp etc).

Los rasgos del cultivo, cuya consideración es básica para la interpretación de sus resultados son los siguientes:

- No existe una flora normal en el interior de la ubre por lo que la leche de un animal sano no contiene bacterias. Por lo tanto, en condiciones de un muestreo correcto, cualquier microorganismo aislado en el cultivo es susceptible de ser considerado como causante de la infección.

- El canal del pezón puede estar colonizado por bacterias, habitualmente de baja patogenicidad (*C. bovis*, especies de estafilococos coagulasa negativos, etc.), en ausencia de una verdadera infección mamaria.

- La infección mamaria es provocada normalmente por una sola especie microbiana. Varios autores han informado, y nuestra experiencia así lo corrobora, que más del 90% de infecciones de un cuartérón son producidas por un solo microorganismo, y rara vez por dos o tres (aprox. 5-10% y 1% respectivamente). Como excepción, en las mastitis de verano es común la plurietiolología, asociándose *A. pyogenes* a otros patógenos (*P. indolicus*, *Bacteroides* spp, *Str. dysgalactiae* ...).

- La mayor densidad del cultivo no se asocia necesariamente con la gravedad de la infección. La excreción bacteriana es variable en la propia dinámica de la infección, y concretamente en las mastitis colibacilares la reacción inflamatoria puede incluso ocasionar la desaparición total de las bacterias, produciéndose el cuadro tóxico sin presencia de bacterias vivas en la mama.

- La negatividad del cultivo en mastitis clínicas puede atribuirse a varios aspectos, algunos ya comentados. De índole etiológica, destacan las mastitis por enterobacterias, microorganismos inhabituales y/o de crecimiento lento; no obstante, es tam-

bién causa frecuente la aplicación de tratamiento antibióticos en las horas previas al muestreo.

- **Muestras contaminadas:** se definen como tales las que contienen tres o más tipos microbianos (excepción ya avanzada de las mamitis de verano). No obstante, en dichas muestras es conveniente identificar la presencia al menos de patógenos contagiosos de especial relevancia y hábitat marcadamente mamario como *S. aureus* y especialmente *Str. agalactiae*.

En ningún caso se recomienda la identificación ni el antibiograma correspondiente de microorganismos cuya procedencia pueda ser ambiental, ya que los resultados muy probablemente contribuirán a tomar decisiones erróneas.

- Para la detección de ciertos microorganismos inhabituales (hongos, micoplasmas, *Nocardia*, etc.), hay que partir de

la base de que la riqueza del medio general (agar sangre) es, en términos generales, suficiente para su aislamiento. Como excepción se encuentran los microorganismos anaerobios, aunque no por un déficit nutricional del agar sangre sino debido a las condiciones especiales de incubación (en ausencia de oxígeno). De cualquier modo, se expone a continuación algunas de las características de las mamitis por microorganismos de baja prevalencia (< 1% del total de aislamientos), cuyo aislamiento suele ser esporádico.

a) **Mamitis fúngica:** consecuencia en la mayoría de casos de la aplicación reiterada y/o poco aséptica de cánulas antibióticas intramamarias. Debe desecharse la idea de la relación directa causa-efecto entre la contaminación fúngica de los piensos, ensilados o forrajes y la presentación de episodios clínicos de mamitis fúngica. Aunque la ingestión de alimentos en mal estado puede producir un efecto inmunosupresor y un incremento de la incidencia de mamitis clínicas, en el análisis bacteriológico de éstas se aíslan microorganismos habituales y no necesariamente especies fúngicas. En las mamitis fúngicas verdaderas, si se trata de levaduras, se ha descrito la posible eliminación natural de la infección, aunque se puede favorecer la curación recurriendo a especialidades antifúngicas. Los casos más graves son los ocasionados por *Aspergillus* spp y algas del

G<sup>o</sup> Prototheca, y sus posibilidades de curación muy reducidas.

b) **Mamitis por micoplasmas.** Los brotes clínicos pueden sospecharse por la aparición de varios casos de mamitis clínicas que comprometen a varios cuarterones. Pueden existir síntomas asociados de artritis y neumonía (vacuno). La primera verificación, consiste en el análisis de los casos clínicos así como de muestras de

La decisión sobre el antimicrobiano a emplear en lactación, una vez cumplido el requisito de sensibilidad "in vitro", debe tomarse considerando la clasificación de la actividad base de los antimicrobianos y los aspectos farmacocinéticos según su potencial de distribución en la ubre, tras su administración parenteral e intramamaria, como los propuestos por Ziv (1980) y que se detallan en la tabla siguiente:

| Actividad y farmacocinética de los antimicrobianos empleados en el tratamiento de la mamitis bovina |               |               |                 |             |                      |              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------|-----------------|-------------|----------------------|--------------|
| Antimicrobiano                                                                                      | Actividad     |               |                 |             | Distribución mamaria |              |
|                                                                                                     | Estreptococos | Estafilococos | Enterobacterias | Micoplasmas | Parenteral           | Intramamaria |
| Penicilina G                                                                                        | +++           | +             | -               | -           | ++                   | ++           |
| Penetamato                                                                                          | +++           | +             | -               | -           | +++                  | +++          |
| Ampicilina                                                                                          | +++           | +             | + / ++          | -           | ++                   | +++          |
| Amox + Clavulanico.                                                                                 | +++           | +++           | +++             | -           | ++                   | +++          |
| Cloxacilina                                                                                         | ++            | +++           | -               | -           | ++                   | ++           |
| Cefalosporinas 1 <sup>a</sup> / 2 <sup>a</sup>                                                      | +++           | +++           | + / ++          | -           | ++                   | ++           |
| Cefalosporinas 3 <sup>a</sup> / 4 <sup>a</sup>                                                      | ++            | ++            | +++             | -           | ++                   | ++           |
| Estreptomina                                                                                        | +             | ++            | +               | -           | +                    | +            |
| Kanamicina/Neomicina                                                                                | +             | ++ / +++      | ++              | -           | +                    | +            |
| Gentamicina                                                                                         | +             | +++           | ++              | -           | +                    | +            |
| Quinolonas 1 <sup>a</sup> (Flumequine)                                                              | -             | +++           | ++              | -           | ++                   | ?            |
| Quinolonas 3 <sup>a</sup> (enrofloxacin)                                                            | + / -         | +++           | +++             | +++         | +++                  | ?            |
| Oxytetraciclina                                                                                     | -             | ++            | + / ++          | ++ / +++    | ++                   | ++           |
| Macrólidos/lincosamidas                                                                             | + / ++        | +++           | -               | +++         | +++                  | +++          |
| Sulfamidas                                                                                          | +             | +++           | ++ / +++        | -           | ++ / +++             | +++          |
| Rifampicina                                                                                         | ++            | ++            | -               | -           | ?                    | +++          |
| Novobiocina                                                                                         | +             | +++           | -               | -           | ++                   | +++          |
| Colistina                                                                                           | -             | -             | +++             | -           | +                    | +            |

Actividad: +++: excelente; ++: Aceptable; +: baja; -: Muy baja/nula; Distribución: +++: Buena; ++: Limitada; +: Baja

mezcla de los cuatro cuarterones de animales de nueva incorporación, que en muchos casos son las responsables de la introducción de la infección.

Tanto en estos casos como periódicamente, conviene solicitar el análisis de micoplasmas en la leche del tanque, ya que el cultivo es muy sensible, pudiendo proporcionar un resultado positivo con tan solo un solo animal infectado sobre un colectivo de hasta 300 animales.

c) **Mamitis clínicas por otros gérmenes atípicos.** Además de los casos clásicos de mamitis de verano, se debe sospechar de microorganismos anaerobios cuando la leche mamítica proporciona olores desagradables. Finalmente, la implicación de otras especies de crecimiento lento como micobacterias (*M. smegmatis* es la especie más frecuentemente aislada por nuestro laboratorio) o *Nocardia* y otros actinomicetos, puede ser detectada alargando la incubación de los cultivos hasta 7 días.

#### EL ANTIBIOGRAMA

Constituye uno de los criterios básicos para la elección racional de los antibióticos susceptibles de uso en mamitis. Sin pormenorizar en sus limitaciones, como orientación general debe de servir para eliminar todos aquellos tratamientos de lactación que contengan antimicrobianos informados en el antibiograma como resistentes.

Con todo ello, hay que tener en cuenta que a pesar de la sensibilidad "in vitro" de un microorganismo a un determinado antibiótico, la infección natural puede mostrar múltiples factores de patogenicidad (adherencia, resistencia intracelular, encapsulamiento, etc.) que determinan una baja respuesta "in vivo" al tratamiento y la cronificación de dicha infección. Además, se deben realizar muestreos periódicos para evaluar modificaciones en los patrones de sensibilidad del antibiograma. Finalmente, respecto a la elección del tratamiento de secado, se debe basar principalmente en la etiología predominante de las mamitis subclínicas.

#### BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Farnsworth, R.J. Microbiological examination of bulk tank milk. update on Bovine mastitis. Veterinary Clinics of North America. Vol 9: n° 3: 469-474. (1993)
- Marco, J.C.; Luengo, Y.; Pérez del Río, M.C. Aportaciones al conocimiento de la situación actual de las mamitis bovinas en Bizkaia. Diputación Foral de Bizkaia. (1990).
- Poutrel, B. Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthode de contrôle. En Les mammites bovines. Recueil de Médecine Vétérinaire. N° special: 495-511. (1985).
- Ziv, G. Drug selection and use in mastitis: systemic vs. local therapy. J.A.V.M.A.176. (1980).

