

Identificación de gérmenes de la mastitis

Si no conocemos las bacterias que tenemos en la ganadería, no podremos aplicar las medidas eficaces para combatir las ni los tratamientos para su eliminación. La identificación de los gérmenes que afectan a una explotación es el primer paso para el control de la mastitis. Los gérmenes suelen ser clasificados como contagiosos, es decir de transmisión principalmente durante el ordeño, o medioambientales (de infección fuera del ordeño, en las camas y medioambiente).

Se han identificado unas 140 especies o subespecies en casos de mastitis bovina (Radostits, 2007).

Sistema de identificación por cultivo

Las muestras de forma habitual se procesan por cultivo. Las muestras que se analizan normalmente son de casos clínicos, subclínicos o de tanque. Se suelen remitir al laboratorio donde en el plazo de 48h se obtienen resultados. Se siembran cantidades muy pequeñas (10 l, el equivalente a una gota) en placas que contienen diferentes medios de cultivo y se incuban en estufa a 37°C. Se examina el crecimiento a las 24h y posteriormente a las 48h. A partir del crecimiento que exista en las placas de cultivo, se realizarán pruebas bioquímicas en las colonias para determinar que tipo de bacteria tenemos.



María Martín Richard. Veterinaria. ASPROLAC

La gran ventaja de los medios convencionales de cultivo es que se puede identificar el germen causante y a partir de ella analizar los antibióticos a los que son sensibles (antibiograma).

Cuando en el medio de cultivo se aprecia un crecimiento de más de 3 tipos diferentes de colonias, se da la muestra por contaminada. Quiere decir que alguna de las colonias que han crecido en la placa no proceden de dentro de la ubre, sino de fuera (del pelo de la vaca, de la mano del ordeñador, del medioambiente) y por lo tanto induce a un error en el diagnóstico.

La ventaja de este sistema es que cualquier laboratorio lo puede realizar y el precio, puesto que una identificación tiene un precio entre 4 y 6 euros, y si se identifica un solo germen (ej *S aureus*), el precio es de unos 2-3 euros. Otra ventaja es que en un medio de cultivo crecen cerca del 90% de los gérmenes causantes de la mastitis y por lo tanto quedará en manos del personal del laboratorio su capacidad de detección de estos gérmenes.

La gran desventaja es que existe un porcentaje elevado de muestras sin crecimiento incluso en muestras de mastitis clínicas, cerca del 30% (entre el 23 y el 40%) son negativas. En mastitis subclínicas, los porcentajes llegan a ser superiores, entre el 29 y el 50%. Las causas de este problema suelen ser:

- que la cantidad de bacteria en la leche no alcanza el umbral (la bacteria existe pero en una cantidad muy pequeña),
- que la bacteria crezca en medios específicos y no en medios generales como el agar sangre que es el que habitualmente se utiliza en el laboratorio, ya que necesita unos medios especiales,
- que puedan quedar restos de antibióticos que inhiban el crecimiento de la bacteria,
- o que debido a la presencia de un elevado número de leucocitos en la leche se puede dar con resultados negativos.

Estas muestras sin crecimiento suelen ser frustrantes tanto para el ganadero que ha remitido muestras de animales que él considera enfermos como para el veterinario que no puede tomar ninguna conclusión válida.

En algunos gérmenes, como el *S aureus*, que se elimina por ubre de forma fluctuante (en un ordeño se eliminan más bacterias que en otros) se considera que un animal es negativo cuando al menos 3 muestras consecutivas lo son. Esto implica un coste en tiempo y dinero.

Sistema de identificación en granja

La identificación de los gérmenes en granja nos permite, sin necesidad de enviar al laboratorio, conocer el grupo (Gram positivos o negativos) al que

pertenece y aplicar un tratamiento diferente según lo que obtengamos. De forma general, se considera que los gérmenes Gram negativos tienen una capacidad de autocuración mayor que los Gram positivos y además los antibióticos existentes en el mercado están más "especializados" en los positivos. Así pues en función del grupo de gérmenes a los que se identifica en la explotación y a los síntomas (más o menos graves) se pueden establecer protocolos de tratamiento basados en antibióticos, antiinflamatorios o sueros. El fin principal de este sistema es la aplicación menor de antibióticos para ahorrar, utilizar antibióticos solo en casos necesarios y evitar el peligro de inhibidores en tanque. El 80% de los antibióticos que se utilizan en ganadería corresponden a tratamientos de mastitis (vía intramamaria o parenteral, en casos clínicos o en el secado). Y también es cierto que el 90% de los casos de inhibidores en tanque son debidos a tratamientos de mastitis.

Por lo tanto se busca reducir el riesgo de antibióticos en tanque, la resistencia a antibióticos así como el gasto en medicamentos.

El sistema es simple: se toma la muestra y se siembra en placas que tienen al menos 2 medios de cultivos diferentes, uno "especializado" para gérmenes Gram negativos y otro para Gram positivos. Se cultivan durante 24h a 37°C y se realiza la lectura. Cualquier crecimiento en el medio para Gram negativo nos llevará según el protocolo de tratamiento, a no usar antibiótico, mientras que el crecimiento de Gram positivos nos llevará a la utilización de antibióticos.

Se requiere un "mini" laboratorio (tener una estufa) y sobre todo la toma de forma constante de las muestras y a una recogida cuidadosa de las muestras para evitar la contaminación de las mismas (y que por lo tanto no sirva para nada todo el trabajo).

Los protocolos de tratamiento para Gram negativos deben establecerse en la propia explotación, en función de la gravedad de los síntomas y de la duración de la infección.



de un germen y determinar con mayor sensibilidad. Se identifica el ADN de los gérmenes y no como en los cultivos la presencia de una bacteria viva. Es decir que no es necesario ni siquiera que la bacteria esté presente, sino que quede algo de su ADN.

La técnica de PCR se basa en la detección de un gen diana, específico de cada germen y de su amplificación por medio de la enzima polimerasa. Así este gen diana se copia muchas veces teniendo entonces un gran número de copias iguales que pueden detectadas por sondas marcadas con moléculas fluorescentes. Con un fluorómetro, se mide la cantidad de fluorescencia emitida que es proporcional a la cantidad de bacterias presentes en la muestra.

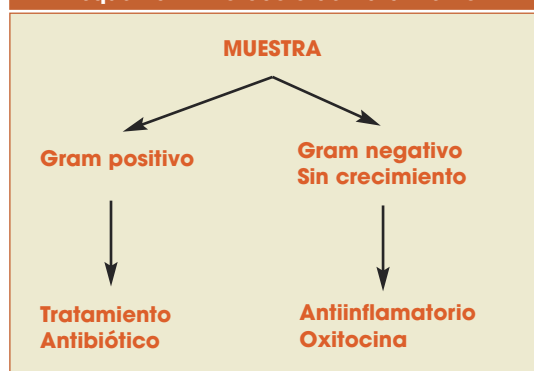
Sin embargo, al contrario que en los cultivos donde se deja que crezca la bacteria y luego se identifica, con este sistema se "buscan" determinadas bacterias. Existen kits que permiten la identificación de 3, 4 o hasta 16 gérmenes más habituales en función de las sondas que se utilicen. Pero no se podrán identificar ninguno fuera de estos que se buscan.

Es por lo tanto muy útil para identificación de los gérmenes habituales en tanque o cuando ya conocemos el problema de la explotación y buscamos que animales están infectados (ej, frente a S aureus o Micoplasma). Es especialmente interesante en análisis de tanque y una vez detectados ciertos gérmenes poder realizar entonces una identificación animal por animal. También es de gran utilidad cuando se incorporan animales nuevos al rebaño, ya sea por compra o por incorporación de animales recién paridos (novillas o vacas) y queremos asegurarnos de que no son portadores de las bacterias más conflictivas.

Un problema que presenta es el precio, que en función del número de muestras ronda los 20 euros como mínimo. Sin embargo, se pueden abaratar los costes realizando mezcla de muestras (ej de 10 en 10) y solo se analizan las muestras si la mezcla (llamado pool) es positiva.

Las diferencias con las muestras analizadas por cultivo son grandes: si por cultivo se identifica como mínimo una bacteria en el 77% de las muestras de mastitis clínica, mediante PCR se identifica el 89%.

Esquema 1: Protocolo de tratamiento



Los tratamientos antibióticos se reducen a la mitad sin que se vean afectados las curaciones clínicas y bacteriológicas, el porcentaje de casos recurrentes, la producción de leche o el recuento celular.

Utilización de PCR para identificación de gérmenes

En la actualidad existe una técnica que se aplica desde hace menos de 10 años la identificación de gérmenes de la mastitis: es el PCR (polymerease chain reaction). Permite analizar en 4 h (en vez de las 48 h como mínimo de un cultivo) la presencia

Identificación de gérmenes de la mastitis

Tabla 1: Análisis laboratorial dentro de los programas de prevención de la mastitis y la mejora de la calidad de la leche (Jubert A).	
Pathoproof Mastitis Major 3	<i>Mycoplasma bovis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Pathoproof Mastitis Major 4.2	<i>Mycoplasma bovis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>
Pathoproof Mastitis Major 4.1	<i>Mycoplasma bovis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	Gen + a resistencia a penicilina (<i>S aureus</i>)
Pathoproof Mastitis Complete 12	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Enterococcus (incluye faecalis y faecium)</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Klebsiella spp</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Corynebacterium bovis</i>
	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
	Gen + a resistencia a la penicilina (<i>S aureus</i>)
Pathoproof Mastitis Complete 16	Los anteriores
	<i>Mycoplasma bovis</i>
	<i>Mycoplasma spp</i>
	<i>Prototheca spp</i>
	Levaduras

Por lo tanto con un sistema (cultivo) el 23% de las muestras no tienen crecimiento ni por lo tanto diagnóstico frente al 11% en el caso del PCR (Koskinen, 2010).

En ese mismo estudio, de 780 casos clínicos analizados, el sistema de PCR detectó 53 *S aureus* y 137 *St uberis* que mediante cultivo resultaron ser negativos.

Sin embargo, también se detectaron en cultivo 44 microorganismos que no lo fueron por PCR, incluyendo *Bacillus spp*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp* y levaduras.

En el caso de mastitis subclínicas, también era más sensible el PCR (91%) frente al cultivo (83%). Es un sistema muy sensible para *S aureus* pues evita sus problemas de eliminación de forma fluctuante.

En conclusión, este sistema tiene ventajas sobre un cultivo convencional como velocidad (4h frente a 48h), no depende tanto de la experiencia del personal del laboratorio sino que su interpretación es más automática y tiene más sensibilidad. Además se pueden enviar muestras con restos de inhibidores y también con conservantes.

Como desventajas, es que solo se podrán buscar las bacterias para los que las sondas estén preparadas y por supuesto el precio (aunque al hacer pool o mezclas, se puede abaratar bastante).

