

**PROTOCOLO PARA CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE
MASTITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA EN FINCAS LECHERAS DE LA SABANA
DE BOGOTÁ**



**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina Veterinaria**

**Yadi Lorena Lopez Salazar
Michell Paola Reyes Bedoya
Francy Lorena Rodríguez Córdoba
Jorge Andrés Suarez Cáceres**

**Bogotá
2021**

**PROTOCOLO PARA CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE
MASTITIS CLÍNICA Y SUBCLÍNICA EN FINCAS LECHERAS DE LA SABANA
DE BOGOTÁ**



**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina Veterinaria**

Trabajo de grado presentado para optar al título de Médico Veterinario

Yadi Lorena Lopez Salazar Cod. 10511622157

Michell Paola Reyes Bedoya Cod.10511623036

Francy Lorena Rodríguez Córdoba Cod. 10511626959

Jorge Andrés Suarez Cáceres Cod. 10511622745

Director

Médico Veterinario, MSc, PhD

Francisco Javier Vargas Ortiz

Bogotá

2021

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos inicialmente a nuestro tutor Francisco Javier Vargas Ortiz, Medico Veterinario y Zootecnista, por su compromiso y labor durante la realización de las pruebas realizadas en campo, siempre siendo nuestro apoyo para poder ingresar a los establecimientos y proceder en la toma de muestras.

Agradecemos a nuestro docente Yuli Bernal del departamento de Biología, por su paciencia y sabiduría dentro del laboratorio de la universidad para poder procesar y estudiar con más detalle las muestras obtenidas en campo y establecer la mayoría del proceso de caracterización.

Agradecemos a nuestra docente Sandra Patricia Garzón Jiménez, Medico Veterinario con Esp. en Salud pública por su aporte y conocimiento en la realización de la encuesta aplicada en los establecimientos.

RESUMEN

En estudios previos se ha identificado como problemática la presentación de mastitis en la sabana de Bogotá. La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que produce alteraciones físicas y químicas en la leche, existen dos formas de presentación: la mastitis clínica y subclínica.

El objetivo del trabajo fue estandarizar el protocolo para la caracterización de las bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica en fincas lecheras ubicadas en la sabana de Bogotá, para cumplir con ello nos propusimos diseñar, elaborar, establecer y finalmente estandarizar ciertos pasos, en los que consisten explicar protocolos de rutina de ordeño en cuatro fincas lecheras de la sabana de bogotá, donde se evaluaron 101 vacas de producción de leche, para una total de 404 cuartos o pezones. Mencionados protocolos se establecieron mediante diferentes métodos de campo y laboratorio, entre ellos: encuestas, bases de datos, registros de producción, Prueba de California mastitis Test (CMT), recolección de muestras, pruebas de microbiología en diferentes cultivos (Agar base sangre, Macconkey, Manitol, Bilis esculina, EMB, DNAsa), API y antibiograma.

Durante las encuestas realizadas en el estudio se destacó el desconocimiento de los protocolos de manejo, el inadecuado lavado y desinfección de los equipos de ordeño, el incorrecto uso del CMT así como del tratamiento para la mastitis y por último resalta el hecho de que más de la mitad de las fincas estudio reutilizan las jeringas durante los tratamientos, todo esto recalca los factores más predisponentes en la problemática.

Mediante la prueba de CMT, obtuvimos como negativos el 71.6%, lo que indica en gran medida que el estado de la ubre en la mayoría de los animales es el ideal. Los resultados

de trazas y una cruz fueron del 6.6%, dos cruces presentó un 5.8 %, por último la clasificación de tres cruces presentó un promedio de 9.4%.

En relación a los microorganismos aislados en el laboratorio, se evidenció que predominaron las bacterias cocos gram positivas, resultados que coinciden con lo señalado por otros autores en Colombia que señalan que las bacterias predominantes son: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

Finalmente se concluye que el protocolo instaurado para caracterizar las bacterias causantes de mastitis es una excelente opción para los hatos problema que inciden sin saber cual es el patógeno de base que se debe combatir. Por último demostró ser apto para instaurar un tratamiento adecuado y disminuir la resistencia antibiótica.

Palabras Clave: Rutina de ordeño, Industria lechera, Bacterias, Mastitis, Calidad de leche, Protocolo, Antibiograma.

ABSTRACT

In previous studies, the presentation of mastitis in the savannah of Bogota has been identified as problematic. Mastitis is an inflammatory reaction of the mammary gland that causes physical and chemical alterations in milk, there are two forms of presentation: clinical and subclinical mastitis.

The objective of the work was to standardize the protocol for the characterization of bacteria causing clinical and subclinical mastitis in dairy farms located in the savannah of Bogota, to comply with this we set out to design, develop, establish and finally standardize certain steps, in which they consist of explaining routine milking protocols in four dairy farms in the savannah of Bogota , where 101 milk production cows were evaluated for a total of 404 quarters.

These protocols were established using different field and laboratory methods, including: surveys, databases, production records, California mastitis Test, sample collection, microbiology tests in different crops (Blood-based Agar, Macconkey, Mannitol, Bile Squaline, EMB, DNAsa), API and Antibigram.

During the surveys conducted in the study, the disrecognition of management protocols, inadequate washing and disinfection of milking equipment, incorrect use of CMT as well as treatment for mastitis were highlighted and finally highlighted the fact that more than half of the study farms reuse syringes during treatments, all of which emphasize the most predisponderant factors in the problem.

Through the CMT test, we obtained 71.6% as negative, which largely indicates that the state of udder in most animals is ideal. Trace and cross results were 6.6%, two crosses were 5.8%, finally the classification of three crosses averaged 9.4%.

In relation to isolated microorganisms in the laboratory, it was shown that gram-positive coconut bacteria predominated, results that match what was indicated by other authors in Colombia that the predominant bacteria are: *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*.

Finally, it is concluded that the protocol in place to characterize mastitis-causing bacteria is an excellent choice for problem herds that affect without knowing which is the base pathogen to be fought. Finally, it proved apt to establish proper treatment and decrease antibiotic resistance.

Keywords: Mastitis, CMT test, Herds, Protocol, Antibiogram

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
Resumen	4
1. Introducción	12
1.1 Planteamiento del problema	12
2. Objetivos	13
2.1 Objetivo general	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Justificación	13
4. Marco teórico	14
4.1 Mastitis clínica	15
4.1.1 Mastitis clínica leve	
4.1.2 Mastitis clínica grave	
4.1.3 Mastitis clínica moderada	
4.2 Mastitis subclínica	16
5. Metodología	23
5.1 Manitol	29
5.2 DNasa	30
5.3 MacConkey	30
5.4 Bilis esculina	31
5.5 EMB	32
5.6 API	33
5.7 Antibiograma	35

6. Resultados	36
6.1 Resultado del protocolo	36
6.2 Resultados encuestas	38
6.2.1 Procedimiento para el uso de los equipos de ordeño	38
6.2.2 procedimientos de limpieza y desinfección de las vacas a ordeñar	39
6.2.3 Procedimientos de limpieza y desinfección de equipos y salas de ordeño	42
6.2.4 Tratamiento de mastitis clínica	45
6.2.5 Tratamiento de vacas secas	49
6.3 Resultados CMT	52
6.4 Resultados de laboratorio	53
7. Discusión	58
8. Conclusiones	59
9. Bibliografía	60
Anexo 1: Actividad encuesta	67
Anexo 2: Consentimiento Informado	69
Anexo 3: Planilla para CMT	70

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Caracterización de las bacterias causantes de mastitis	18
Tabla 2. Clasificación California Mastitis Test	25
Tabla 3. Resultado del protocolo para la caracterización	37
Tabla 4. Resultados de la encuesta	52
Tabla 5. Resultado de las muestras en laboratorio Las Martas	53
Tabla 6. Resultado de las muestras en laboratorio El Espino	54
Tabla 7. Resultado de las muestras en laboratorio La Granada	55
Tabla 8. Resultado de morfología y tinción Gram bacteriana	55
Tabla 9. Resultado de las muestras en el laboratorio del antibiograma - La Manuelita	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Clasificación de los resultados de hemólisis en agar base sangre	28
Figura 2. Diferencia entre prueba positiva y negativa en una enterobacteria	34
Figura 3. Diferencia entre prueba positiva y negativa en un estafilococo	34
Figura 4. Diferencia entre prueba positiva y negativa de un bacilo gram negativo	34
Figura 5. Ejemplo de antibiograma	36
Figura 6. Representación gráfica del resultado global de la prueba CMT	52
Figura 7. Incidencia de bacterias causantes de mastitis en Colombia	57

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha identificado por reportes previos la problemática de la mastitis en la sabana de Bogotá desde varios años atrás, por lo que en este proyecto se realizará la estandarización de los pasos para caracterizar aquellas bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica en fincas lecheras ubicadas en la Sabana de Bogotá estableciendo la especie, su clasificación (Contagiosa y ambiental) y el resultado del antibiograma.

La mastitis bovina continúa siendo considerada a nivel mundial como la enfermedad más importante de la industria lechera, debido a la disminución de la producción láctea, alteración en la calidad de la leche, costos por tratamiento y riesgo para la salud humana. (Trujillo, 2010)

La lechería es la industria pecuaria más importante de la sabana de Bogotá. Sin embargo, la leche se explota en muchos hatos con absoluta falta de higiene y la ciudadanía se ve sometida, por esta causa, a consumir diariamente gran cantidad de leche de mala calidad. El Dr. Jaime Castro H. ex -director del Laboratorio Municipal de Leches, dio la voz de alerta y en su interesante tesis intitulada: “Sobre la necesidad de una revisión de las disposiciones vigentes para la leche y derivados” saca entre otras conclusiones la siguiente: “que, por su alto grado de contaminación, en especial por gérmenes conocidos como patógenos, la mayor parte de la leche que se distribuye en Bogotá no es apta para el consumo público”. (Román G, 1946)

Con los trabajos desarrollados por Rodríguez (1988) en la Sabana de Bogotá, se pudo determinar la magnitud del problema al realizar un estudio del comportamiento de la enfermedad en hatos de ganaderías lecheras especializadas y donde demostró la tendencia que existe de la dinámica de las infecciones en la glándula mamaria y su efecto en la producción lechera comparándola con el comportamiento que ha tenido y tiene la enfermedad en las diferentes regiones del mundo donde la lechería es uno de los principales renglones de la economía (Rodríguez G, 2006).

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

1. Estandarizar el protocolo para la caracterización de las bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica en fincas lecheras ubicadas en la sabana de Bogotá.

2.2. Objetivos específicos

1. Diseñar el protocolo para la caracterización de las bacterias causantes de mastitis.
2. Elaborar y aplicar una encuesta para evaluar el programa de mastitis y calidad de leche en los rebaños de estudio.
3. Establecer el protocolo para determinar el nivel de mastitis clínica y subclínica de los rebaños bovinos que se van a estudiar mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT) y toma de muestras para estudio de laboratorio.
4. Estandarizar el protocolo para el aislamiento y caracterización de patógenos en muestras de leche de los cuartos de la ubre de vacas con mastitis clínica y subclínica con reacción 2+ y 3+ en la prueba de CMT.

3. JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero y una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera, ya que ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo (Bedolla & Ponce de León, 2008).

El tratamiento de esta afección se realiza con antibióticos, lo que genera gastos, resistencia bacteriana, residuos en la leche, eliminación de leche, reacciones alérgicas en los consumidores y disminución de la producción (Martínez, 2015).

Se hace necesario conocer los patógenos causantes para establecer medidas de control y un uso eficiente de los antibióticos.

4. MARCO TEÓRICO

La mastitis bovina es una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero y una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera, ya que ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo (Bedolla & Ponce de León, 2008). Su origen, principalmente es infeccioso y está clasificada como una enfermedad multifactorial, su presentación depende de varios factores como: la vaca, el medio ambiente y el agente causal. Además, es una enfermedad de difícil erradicación (Martínez, 2015)

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que produce alteraciones físicas y químicas en la leche, un aumento en el número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos y finalmente cambios como la pérdida de la funcionalidad (Ruiz, Tobón & Olivera, 2010).

Esta reacción inflamatoria ocurre como consecuencia de la respuesta de los tejidos a lesiones traumáticas, sustancias irritantes o a la presencia de agentes infecciosos y sus toxinas que han logrado colonizar el tejido secretor. (Calderón & Rodríguez, 2008).

Sin embargo, la magnitud del aumento en el conteo de células somáticas (CCS) varía de acuerdo a la bacteria involucrada en la infección intramamaria (Bedolla & Ponce de León, 2008).

La constitución anatómica de la ubre, la expone constantemente a lesiones y agentes patológicos de diversos orígenes. El propósito de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar al agente causal y preparar la forma de sanar y retornar a su función normal. (Bedolla & Ponce de León, 2008).

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso activo que se inicia en el embrión y tiene varias etapas de crecimiento. La sola existencia del tejido mamario y su comunicación con el medio exterior por el conducto del pezón lo hacen un lugar susceptible para infecciones causadas por cualquier tipo de agentes patógenos que pueden invadir el tejido por el conducto del pezón o por vía sistémica (Contreras, 2009).

La causa más común de la mastitis es una infección intramamaria (IMI). Un IMI se refiere a la presencia de un organismo infeccioso en la glándula mamaria. (Adkins & Middleton, 2018).

El mayor efecto económico se da en la forma subclínica donde los diferentes agentes etiológicos aumentan el número de las células somáticas y trae como consecuencia disminución de la producción de leche (Ruiz, Tobón & Olivera, 2010).

La mastitis se presenta de dos maneras, la forma clínica es decir que presenta signos y de forma subclínica sin signos visibles (Goli et al, 2012).

4.1. Mastitis clínica: Leche visiblemente anormal de un cuarto mamario, puede definirse según la gravedad como leve, moderada o grave.

4.1.1. Mastitis clínica leve: Leche anormal que generalmente se manifiesta por coágulos, escamas y/o cambios en el color y la consistencia de la secreción de leche.

4.1.2. Mastitis clínica moderada: Leche y glándula mamaria anormal, que se manifiesta por cambios inflamatorios en el tejido, como enrojecimiento, calor, dolor e hinchazón.

4.1.3. Mastitis clínica grave: Leche anormal, glándula mamaria anormal y vaca enferma (que se manifiesta por cambios en la temperatura corporal, la velocidad de rumia, el apetito, el estado de hidratación y el comportamiento. (Adkins & Middleton, 2018).

4.2 Mastitis subclínica: Se caracteriza por la ausencia de signos clínicos en la ubre y la apariencia normal de la leche, sin embargo, el recuento de las células somáticas (RCS) se encuentra aumentado (Calderón, Arrieta & Máttar, 2011).

Existe una disminución en la producción de la misma. Esta presentación tiene mayor impacto en animales que tienen más de un ciclo de lactación que en animales jóvenes. Existe una relación negativa en cuanto al conteo de células somáticas y el rendimiento de la leche. La leche normal proveniente de cuartos sanos generalmente contiene menos de 200.000 células somáticas/ml. Valores de células somáticas arriba de 300.000 es un indicador de la inflamación de la ubre (Ruiz, 2011)

La leche proveniente de cuartos afectados con este tipo de mastitis presenta un menor porcentaje de sólidos totales, proteínas, grasas y calcio; mientras que el recuento total de bacterias, así como el riesgo de encontrar residuos de antibióticos se incrementan, afectando su calidad. Esta leche puede constituir un peligro potencial para la salud de los consumidores, y por esta razón, los centros de acopio optan por el rechazo de la leche de baja calidad o con una penalidad en el precio, generando pérdidas importantes al productor rural (Velázquez & vega, 2012).

La mastitis en novillas fue reportada por primera vez en 1940 por Palmer et al, más tarde Schalm rastreo IIM causadas por *Streptococcus agalactiae* a problemas por succionamiento de pezones entre terneras. Luego en los años ochenta se empezaron a describir IIM alrededor del parto. La presencia de IIM en novillas puede perdurar durante el primer trimestre de la lactancia, observándose cuartos con recuentos elevados de células somáticas especialmente en las primeras semanas después del parto (Contreras, 2009).

Las estrategias de prevención y el control de la mastitis están íntimamente ligadas a las condiciones de alojamiento, manejo, rutina de ordeño y políticas de tratamientos aplicados en el hato (Cotrino, 2009).

El tratamiento de esta afección se realiza con antibióticos, lo que genera gastos, resistencia bacteriana, residuos en la leche, eliminación de leche, reacciones alérgicas en los consumidores y disminución de la producción (Martínez, 2015).

Alrededor de un tercio de los casos de mastitis clínica no severa que ocurren en muchas granjas lecheras modernas se benefician del uso de antibióticos (Ruegg, 2018).

La aparición de residuos de medicamentos en la leche se debe generalmente a que no se respetan tiempos de espera o se usan dosis excesivas. Entre los residuos más comunes en la leche se encuentran las sulfonamidas y nitrofuranos, dado que se usan para el control de mastitis (Salas, Calle, Falcón, Pinto & Espinoza, 2013).

La mastitis nunca será erradicada debido a que existen diferentes bacterias involucradas y algunas de éstas se hallan presentes continuamente. El tratamiento antibiótico tiene grados variables de eficacia, por tanto, el enfoque de la mastitis debe ser un enfoque de control, el mismo que será cada vez más importante en el futuro (Martínez, 2015)

Las graves falencias en el manejo del proceso sanitario, la falta de conocimiento de mastitis clínica y de mastitis subclínica, y el uso indiscriminado de fármacos para su tratamiento, dan como consecuencia resistencia bacteriana, pérdidas de cuartos, descarte temprano de animales y repercusiones en la salud pública, reflejando la ineficiencia de los procesos de producción (Martínez, 2015)

Más de 130 microorganismos están involucrados en la mastitis bovina, bacterias que causan mastitis ampliamente clasificadas como patógenos contagiosos y ambientales. Los seis patógenos, incluidos son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* constituyen hasta el 90% de los patógenos que causan mastitis en todo el mundo (Goli et al., 2012).

Tabla 1.

Caracterización de las bacterias causantes de mastitis

Grupo	Especie	Características Tintoriales (gram)
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Gram (+)
<i>Mycoplasma</i>	<i>M. bovis</i>	Gram (-)
<i>Corynebacterium</i>	<i>C. bovis</i>	Gram (+)
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Gram (-)
<i>Klebsiella</i>	<i>Spp</i>	Gram (-)
<i>Enterobacter</i>	<i>Spp</i>	Gram (-)
<i>Streptococcus</i>	<i>S. uberis</i>	Gram (+)
	<i>S. dysgalactiae</i>	Gram (+)
	<i>S. agalactiae</i>	Gram (+)

Los microorganismos contaminantes en la leche cruda se originan principalmente de infecciones de la ubre o conducto del pezón; exterior de la ubre y ambiente; manejo de la leche y equipo de almacenamiento. Sin olvidar que la edad, etapa de lactancia, la estación del año, la variación de la temperatura ambiental y las variaciones día a día de las condiciones climáticas (Bedolla & Ponce de León, 2008).

Los microorganismos causantes de infección intramamaria o mastitis han sido divididos en patógenos contagiosos y ambientales; en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte respectivamente. Dependiendo, asimismo, de su reservorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria afectada (Bedolla & Ponce de León, 2008).

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.*

Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, donde el reservorio primario que alberga los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre.(Bedolla & Ponce de León, 2008).

Los patógenos ambientales a diferencia de los contagiosos son transmitidos entre las ordeñas por el ambiente. Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp* (Bedolla & Ponce de León, 2008).

La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis (Bedolla & Ponce de León, 2008).

Estos patógenos poseen un potencial muy pobre para causar enfermedades. Sin embargo, pueden penetrar en el conducto galactóforo hacia la ubre y provocar infecciones muy persistentes que requieren una terapia muy difícil (Bedolla & Ponce de León, 2008).

Las fuentes de patógenos ambientales incluyen materiales de cama, estiércol, suciedad, lodo, agua estancada e incluso el alimento. La fuente más importante es la cama porque los pezones están en contacto frecuente y prolongado con ella (Bedolla & Ponce de León, 2008).

También se encuentran factores predisponentes de mastitis que incluye la ubicación geográfica, donde los climas húmedos y cálidos favorecen la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma*, el inadecuado control de ectoparásitos, la alta prevalencia de IIM en las vacas adultas y el suministro de leches mastíticas a las terneras de levante (Contreras, 2009).

Los microorganismos dentro de la ubre pueden ser patógenos obligados como el *Streptococcus agalactiae*, ya que sólo se aísla del interior de la glándula mamaria y microorganismos no obligados como el *Staphylococcus aureus*, que se puede aislar del interior de la glándula mamaria, de lesiones en los pezones, de las manos de los ordeñadores, en los corrales y los equipos de ordeño. (Martínez, 2015)

El *Staphylococcus aureus* es uno de los agentes etiológicos más frecuente de la mastitis bovina en Colombia, su resistencia se puede deber a factores como: fallas en el uso de la terapia antibiótica, y los factores de virulencia propios de este microorganismo como encapsulamiento en tejido fibroso, sobrevivencia a la fagocitosis en células polimorfonucleares, potencial de distribución en tejidos mamaros, modificaciones del medio interior de la glándula mamaria por pH y residuos inflamatorios (Martínez, 2015).

Este microorganismo cuenta con diferentes factores de virulencia como: leucocidina, proteína A, cápsula, Formas L, enzimas como la coagulasa y la resistencia a los antibióticos se da por ganancia cromosomal o de plásmidos, haciendo que su respuesta al tratamiento con antibióticos sea reducida (Calderón & Rodríguez, 2008).

El *Staphylococcus aureus* se ha encontrado transitoriamente en la piel y pequeñas heridas en las novillas desde donde puede llegar a tener acceso al pezón e infectar la glándula mamaria. La persistencia en la colonización de la piel o heridas puede incrementar la incidencia de IIM al momento del parto, aunque en general la prevalencia en novillas es menor que aquellas por *Staphylococcus coagulasa negativo*. (Contreras, 2009).

Los *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) son considerados como la principal causa de IIM en novillas no servidas y en novillas preñadas, en hatos en confinamiento como también en hatos de pastoreo continuo. Algunos de los SCN son parte de la flora normal de la piel de los bovinos e incluyen las especies *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus epidermidis*, otros se encuentran en el ambiente como las especies resistentes a la novobiocina. Los SCN son oportunistas e infectan el canal del pezón y la glándula mamaria desde la piel, por esto se ubican entre los patógenos asociados con la mastitis bovina en el grupo de organismos ambientales (Contreras, 2009).

La glándula mamaria del feto puede verse afectada por el *Streptococcus agalactiae*, se ha demostrado que es muy susceptible a los antibióticos betalactámicos por lo cual es relativamente fácil de erradicar siempre y cuando se sigan buenas prácticas como lo son el uso de selladores de pezón y terapia antibiótica en el periodo seco (Contreras, 2009).

Otros *Streptococcus* causantes de IIM son *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Streptococcus uberis* el cual especialmente es común en novillas en pastoreo. La prevalencia de infecciones por este agente se

incrementa en la última semana antes del parto y en los primeros cinco días después de este, donde puede llegar a representar hasta el 90% de las IIM causadas por patógenos no contagiosos (Contreras, 2009).

La presencia de patógenos ambientales Gram negativos como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, está directamente asociada a su prevalencia en el hato. Estudios epidemiológicos en ganaderías de leche han reportado pocos cuartos infectados (Contreras, 2009).

El *Corynebacterium bovis* es prevalente en condiciones medioambientales de humedad y calor y su presencia en novillas preparto es muy baja tanto en hatos confinados como en hatos de pastoreo. (Contreras, 2009).

Los *Micoplasmas* son patógenos clasificados como contagiosos causantes de mastitis subclínica, clínicas y crónicas, son los organismos con capacidad replicativa más pequeños que se conocen. *Mycoplasma bovis* es la especie más comúnmente aislada en los brotes de mastitis en hatos lecheros. (Contreras, 2009).

Acceder a los datos de la mastitis clínica y subclínica es esencial para el monitoreo de la salud de la ubre, en lo individual y a nivel del hato, es un prerrequisito para la evaluación económica y control de los programas (Bedolla & Ponce de León, 2008).

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño y estandarización del protocolo

La obtención de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y clínica se realizó en diferentes fincas lecheras ubicadas en la zona llamada “Sabana Centro de Bogotá”, Colombia, subregión ubicada en el centro geográfico de Colombia sobre la cordillera oriental en la parte sur del Altiplano Cundiboyacense, con una altura promedio de 2600 msnm, con una temperatura promedio de 9°C (-5°C y 26 °C) y precipitaciones que oscilan entre los 64 y 214 mms/año, con una época más seca entre los meses de diciembre y marzo, una época lluviosa de abril, mayo, septiembre, octubre y noviembre y una época de mucha variabilidad térmica y fuertes vientos entre junio, julio y agosto. Esta zona incluye poblaciones como Tabio, Tenjo, Cota, Chía, Cajicá, Zipaquirá, Cogua, Nemocón, Sopó, Tocancipá, y Gachancipá, aquellas fincas que geográficamente no pertenezcan a esta zona serán excluidas. La población bovina en la zona es de alrededor de 108.375 cabezas de ganado distribuidos en 17.847 predios con predominancia de razas lecheras (Universidad de la Sabana, 2017).

Se seleccionaron un total de 4 fincas lecheras ubicadas en la zona de la Sabana Centro de Bogotá. En este estudio se tomaron muestras de leche de vacas con mastitis subclínica y clínica que no hubiesen recibido tratamiento antibiótico recientemente y las vacas que estaban en el transcurso del periodo de vaca seca fueron excluidas.

Se elaboró una encuesta con la ayuda de un epidemiólogo para evaluar dentro de las instalaciones de la finca los siguientes parámetros: el uso, limpieza y desinfección de los equipos de ordeño, corrales y sala de ordeño, rutina de ordeño, tratamientos previos para mastitis, tratamiento establecido para las vacas secas y el plan sanitario dentro de la finca.

Se realizó un consentimiento informado (anexo 1) el cual se expuso a los propietarios de las fincas donde se realizaron las muestras para que tuvieran conocimiento de los procesos que se llevaron a cabo, posteriormente se realizó la encuesta epidemiológica (anexo 2) en cada predio seleccionado y finalmente el análisis de dichas encuestas fue registrado.





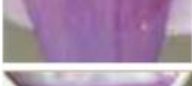
Se procedió a una inspección visual de las instalaciones donde se realiza la rutina de ordeño, observando la limpieza de equipos y ambiente (entorno, suelos, estructura), inmediatamente se evidencio la rutina de ordeño empleada por cada finca, la cual debía cumplir los siguientes pasos:

1. Lavado y desinfección de las manos del ordeñador
2. Preparación de la cantina con su debida limpieza y desinfección
3. Extracción y examinación de los primeros chorros de leche para evidenciar mastitis clínicas, la cual debe hacerse en un recipiente de fondo negro
4. Sumergir los pezones durante 30 segundos en una solución yodada o clorada
5. Limpiar y retirar excesos de estos productos con una toalla de papel
6. Colocar las pezoneras con la presión indicada para extraer la leche sin dañar la glándula mamaria
7. Realizar sellado de los pezones con una solución yodada antes de salir del lugar de ordeño. (Ortiz et al., 2014)

Se realizó la prueba de CMT (California Mastitis Test) a las vacas que se encuentran en el lote de ordeño, en dicha prueba se tomaron muestras de cada uno de los cuartos de la ubre (2 ml por cuarto) y se agregó el reactivo de CMT (2 ml), el cual reacciona con las células somáticas (células inflamatorias presentes en la leche).

Tabla 2.

Clasificación (CMT) relacionado con el nivel de células somáticas en leche.

	SCORE	SIGNIFICADO	DESCRIPCION DE LA REACCION	INTERPRETACION (RCS / ml)
	N	Negativo	La mezcla permanece en estado líquido y homogéneo. Puede gotear de la paleta así.	0-200.000
	T	Trazas	Hay algo de engrosamiento. La reacción es reversible y la viscosidad observada por primera vez tiende a desaparecer.	150.000-500.000
	1	Ligeramente Positivo	La mezcla espesa, pero no hay formación de gel en el medio de la paleta y la viscosidad observada tiende a persistir. La mezcla cae poco a poco.	400.000-1.500.000
	2	Positivo	Gel se formará en el centro de la paleta durante el movimiento giratorio. El gel se acumula en la parte inferior de la paleta cuando el movimiento giratorio se interrumpe. Cuando se vierte la mezcla la masa gelatinosa cae y puede dejar un poco de líquido en el pocillo.	800.000-5.000.000
	3	Muy Positivo	Gel se formará en el centro de la paleta y se pega en el fondo del pocillo, pero no a un lado. Cuando se vierte la mezcla, se cae sin dejar líquido detrás.	>5.000.000

Recuperado de Servet Talavera, 2020.

El resultado de la prueba se clasifica como Negativo, Trazas, 1+, 2+, 3+ (Tabla 1), o mastitis clínica, lo cual se corresponde con un nivel de células somáticas en la leche. Las vacas clasificadas como mastitis clínica son aquellas que presentan alteraciones en la leche como cambios de color, presencia de grumos o pus, acompañada en algunos casos de inflamación de la ubre, por otro lado las vacas clasificadas como mastitis subclínicas son aquellas que no presentan alteraciones en la leche o en la ubre, pero presentan reacción positiva (Trazas, 1+, 2+, 3+) a la prueba de CMT, seleccionamos 5 muestras de leche que salieron reactivas al CMT del lote de producción en cada una de las fincas seleccionadas

para un total aproximado de 20 muestras de leche. Los resultados de la prueba de cada cuarto de las vacas se anotaron en una planilla diseñada para tal fin (Anexo 3).

Se tomaron un total de 20 muestras para bacteriología de leche de los cuartos de vacas que sólo resultaron con mastitis subclínica grado 2+ y 3+ o mastitis clínica, siempre y cuando no hayan sido tratadas aún con antibióticos. Para tomar dichas muestras se utilizaron tubos estériles y se realizó previamente una limpieza del pezón utilizando un producto pre sellador de ubres (yodado al 2%) y posteriormente la desinfección de la punta del pezón con alcohol antiséptico. Las muestras fueron refrigeradas para posteriormente ser procesadas en el laboratorio de Microbiología.

En el laboratorio se realizó la preparación de agar base sangre (se añaden 40 gramos de agar base sangre por litro de agua destilada, se hierve y se esteriliza a una temperatura de 121°C, dejar enfriar a temperatura corporal, añadir por la pared del erlenmeyer 10 tubos tapa lila de 5 ml de sangre de preferencia que sea de cordero, homogeneizar delicadamente y servir 20 ml en cada caja de petri) posteriormente se sembró la muestra de leche agregando 500 microlitros de leche a cada caja y realizando un duplicado por cada muestra, estas se incubaron a 37°C durante 24 horas para observar el crecimiento de bacterias, cumplido el tiempo de espera se describió cada tipo de bacteria que observamos y se identificaron cuantas colonias habían por cada agar ya inoculado.

Se realizaron pases, en esta técnica es importante emplear un asa de siembra en buen estado. Un asa de siembra rota o deteriorada rasgará el agar al realizar el agotamiento.

1. Esterilizar el asa flameada en el mechero hasta conseguir un rojo incandescente.
2. Enfriar el asa en la proximidad de la llama. Tomar un inóculo de la muestra

3. Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde. Extender el inóculo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa
4. Flamear de nuevo el asa y enfriar. Tomando como inóculo el obtenido mediante el rozamiento del asa de siembra con las estrías sembradas la primera vez, realizar sobre una porción virgen de la placa una segunda tanda de estrías que toque la primera.
5. Flamear y enfriar el asa. Repetir exactamente la operación descrita en el punto 4 pero empleando como inóculo la segunda y tercera tanda de estrías la cual debe terminar en zig zag, las nuevas series de estrías deben tocar sola la última porción de las anteriores.
6. Flamear el asa y tapar la placa de Petri. Esta se incubó a temperatura adecuada en posición invertida, ya que, de otra manera, el agua de condensación que se irá depositando sobre la superficie del agar e impedirá la obtención de colonias aisladas (Sanz, 2011)

De acuerdo a las colonias identificadas en agar base sangre, conforme a sus características de crecimiento se debe aislar cada una de ellas para quedar purificadas , se incubaron durante 24 horas y posteriormente se clasificaron según la hemólisis (Gamma hemolítica, Beta hemolítica y Alfa hemolítico).

El agar base sangre es un medio de cultivo enriquecido con la adición de sangre. Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes, las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes, se clasifican en hemólisis Alfa, Beta y Gamma.

La hemólisis alfa se refiere a una lisis parcial de eritrocitos que produce una coloración verde que se observa alrededor de las colonias (debido a la liberación de un producto de degradación de la hemoglobina llamado biliverdina); la hemólisis beta se refiere a un halo de hemólisis completamente claro y la hemólisis gamma se refiere a la ausencia de hemólisis (S.A, S.F)

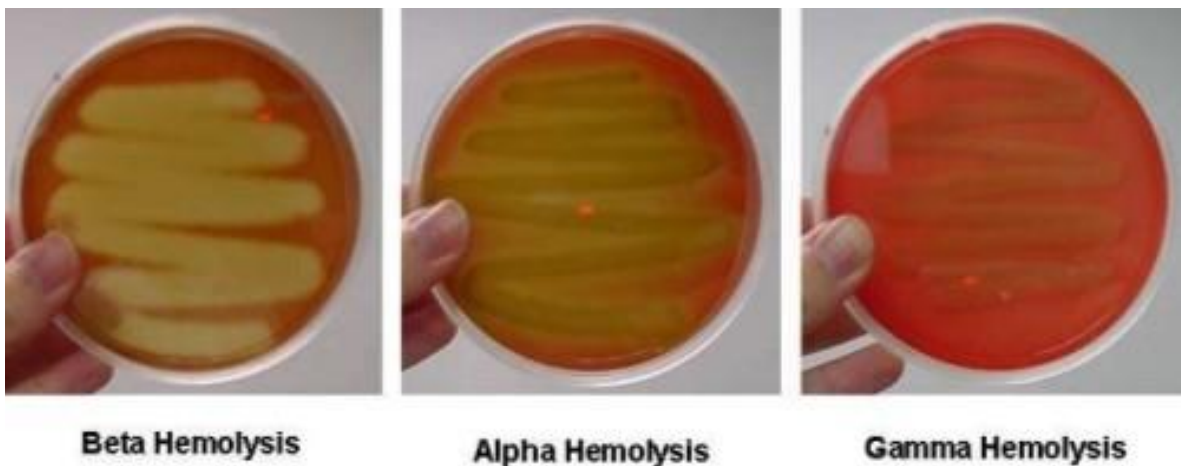


Figura 1. Clasificación de los resultados de hemólisis en Agar base sangre.

A partir de los cultivos se realizaron pases en láminas portaobjetos para realizar la prueba de catalasa (Anexo)

1. Con una siembra transferir células del cultivo a identificar a un portaobjetos limpio.
2. Añadir una o dos gotas de agua oxigenada al 3%. Es recomendable que los organismos no sean añadidos directamente sobre el reactivo ya que las asas de siembra que se usan contienen hierro y pueden dar falsas reacciones positivas.

La presencia de gas o efervescencia significa que el test es positivo. Como algunas bacterias poseen enzimas diferentes de la catalasa, pero capaces también de descomponer el agua oxigenada, las pequeñas burbujas que se forman después de los 20 o 30 primeros segundos no son consideradas como test positivo (Sanz, 2011).

La tinción de Gram (Anexo) diferencia a las bacterias en dos grandes grupos. Se llama bacterias Gram positivas a aquellas que retienen la tinción azul-violeta, y se denomina bacterias Gram negativas a las que se decoloran y después se tiñen con fucsina (Rodríguez y Arenas, 2018).

1. Con un asa estéril se toma el inóculo de la caja de Petri, transfiriendo este a una lámina portaobjetos en forma de barrido, asegurando que las colonias queden dispersas para facilitar su observación al microscopio.
2. Dejar secar dentro de la zona estéril alrededor del mechero bunsen, una vez secado se debe sellar pasando dos veces la lámina por encima de este.
3. Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto y después lavar ligeramente con agua corriente.
4. Cubrir con yodopovidona (Lugol) durante 1 minuto
5. Lavara con agua corriente
6. Decolorar con alcohol-acetona (1 minuto)
7. Lavar con agua corriente
8. Cubrir con fucsina durante 30 segundos.
9. Lavar con agua corriente.
10. Dejar secar y observar al microscopio (Rodríguez y Arenas, 2018)

Para continuar con la clasificación de las bacterias se realizaron diferentes pases a los siguientes medios de cultivo como Manitol, DNasa, MacConkey, Bilis esculina y EMB.

5.1 Manitol

El agar salado manitol es un medio selectivo que permite el crecimiento del género *Staphylococcus* e indica si la bacteria es capaz de hidrolizar el azúcar manitol (Maua, 2011).

En la preparación de este medio se debe suspender 111 gr de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente y calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta una temperatura entre 40-45°C y verter en placas estériles. Dejar solidificar a temperatura ambiente antes de su utilización. (Zimbro et al., 2009)

5.2 DNasa

Para la realización del agar DNasa se debe suspender 42 gramos de polvo en 1 litro de agua destilada, luego llevar a ebullición para una dilución completa. Se debe autoclavar a 121 °C durante 15 minutos y luego servir en cajas de Petri y dejar secar, posteriormente inocular una zona del medio de cultivo, luego llevar a incubar en aerobiosis durante 24-48 horas y finalmente se debe añadir a la caja de Petri 5ml de ácido clorhídrico, dejar que el ácido penetre en toda la superficie del medio durante 2 minutos y leer el resultado

Positivo: los organismos inoculados estarán rodeados de zonas transparentes de ADN despolimerizado

Negativo: el medio se observa opaco.

DNasa se utiliza para diferenciar microorganismos en base a la actividad de desoxirribonucleasa (ADNasa). Esta prueba se utiliza principalmente en la diferenciación de *Staphylococcus* que producen grandes cantidades de ADNasa extracelular. La mayoría

de las cepas de *Staphylococcus aureus* dan reacciones positivas con esta prueba. (Olmos, Garcia, Saéz & Valdezate. 2010)

5.3 MacConkey

Para un litro de agar MacConkey se debe pesar 50 gr del medio deshidratado, luego se coloca en una fiola y se disuelve en un litro de agua destilada. Después de 10 minutos de reposo se calienta mezclando constantemente hasta dejar hervir por 1 minuto.

Luego se coloca la fiola en el autoclave y se esteriliza a 121°C por 20 minutos. Culminado el tiempo, se saca de la autoclave y se deja enfriar para posteriormente verter en placas de Petri estériles frente al mechero de Bunsen, se dejan solidificar y se ponen en refrigeración a 2-8°C en forma invertida hasta su uso.

Es un agar selectivo para el aislamiento de bacilos gram negativos de fácil desarrollo aerobio y anaerobios facultativos, salmonellas, shigellas, bacterias coliformes a partir de muestras clínicas. Las sales biliares y el violeta cristal inhiben considerablemente la microbiota gram positiva. Permite diferenciar microorganismos que utilizan o no la lactosa.

La lactosa, junto con el indicador de pH rojo neutro, sirve para la comprobación de la degradación de dicho azúcar. En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es un hidrato de carbono fermentable, por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje de color del indicador de pH (rojo neutro) la absorción en las colonias y la precipitación de sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras (Savedra, 2017).

5.4 Bilis esculina

Suspender 64,5 gramos del polvo en un litro de agua destilada, mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente, dejar hervir durante un minuto hasta disolver completamente, luego esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, dejar enfriar a 45°C, mezclar bien, evitar la formación de burbujas y dispensar cuidadosamente en placas de Petri.

Agar Bilis Esculina es ideal para el aislamiento y diferenciación de enterococos intestinales, basado en la hidrólisis de la esculina en presencia de bilis. Los organismos positivos para hidrólisis de esculina hidrolizan el glucósido esculina en esculetina y dextrosa. La esculetina reacciona con el citrato férrico y da lugar a colonias marrón oscuro o negras. La tolerancia a la bilis y la habilidad de hidrolizar la esculina constituye un test seguro para la identificación presuntiva de enterococos. El color marrón (reacción positiva) alrededor de las colonias aparece después de 18-24 horas de incubación a la temperatura de 35.2 °C. La presencia de enterococos intestinales, es un indicador de contaminación fecal, especialmente cuando la contaminación se produjo mucho antes y las bacterias coliformes menos resistentes, incluyendo *Escherichia coli*, ya pueden estar muertas cuando se lleva a cabo el análisis. (Condalab, 2019)

5.5 EMB

Suspender 36 gramos de polvo en un litro de agua destilada, mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente, dejar hervir durante un minuto hasta disolver por completo, luego esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C, mezclar bien, evitar la formación de burbujas y dispensar cuidadosamente en placas de Petri. NO SOBRECALENTAR.

El uso de eosina y azul de metileno permite la diferenciación entre organismos fermentadores de lactosa y no fermentadores. La peptona proporciona nitrógeno, vitaminas,

minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. La sacarosa se agrega a la lactosa como un carbohidrato fermentable para detectar coliformes que fermentan la sacarosa más fácilmente que la lactosa. Los colorantes eosin Y y el azul de metileno son inhibidores parciales de bacterias Gram-positivas e indicadores de pH.

- Fermentadores: color azulado, pueden tener centro oscuro y brillo metálico.
- No fermentadores: colonias incoloras.

Las bacterias a buscar en este estudio son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Pseudomonas spp* y *Proteus spp*, y otras bacterias como: *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, de la cuales se llevará a cabo la caracterización por grupos, especies y características tintoriales (Gram) como se muestra en la Tabla 2.

5.6 API®

Debido a diferentes circunstancias, entre ellas, algunos recursos limitados y la pandemia presentada por el COVID19 durante el año 2019, no concluimos la caracterización final de las especies, sin embargo luego de extensas investigaciones reportadas por otros autores, a continuación se explica el procedimiento final para la caracterización de las bacterias por especie.

Para la caracterización de las bacterias por especie se utiliza un sistema de identificación automatizado API® el cual es un sistema estandarizado que permite el hallazgo de diferentes microorganismos como bacterias Gram positivos, Gram negativos y levaduras mediante diferentes pruebas bioquímicas.

Este sistema consiste en un dispositivo de plástico que contiene varios microtubos con diferentes medios de cultivo de acuerdo al tipo de prueba que se requiere. Algunas de las pruebas bioquímicas que permite este sistema son prueba de fermentación de

carbohidratos, determinación de la producción de H₂S (ácido sulfhídrico), determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras.

Existen diferentes dispositivos API® entre los que se destacan y fueron óptimos para el desarrollo de este trabajo como: API® 20E (figura 2) el cual identifica enterobacterias y otros bacilos gram negativos; API® STAPH (figura 3) que reconoce microorganismos del género *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Koccuria*; API®20 STREP establece bacterias del género *Streptococcus*; API®CORYNE que identifica patógenos del género *Corynebacterium*; API®20NE (figura 4) que permite reconocer bacilos gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias (Apiweb, 2010)

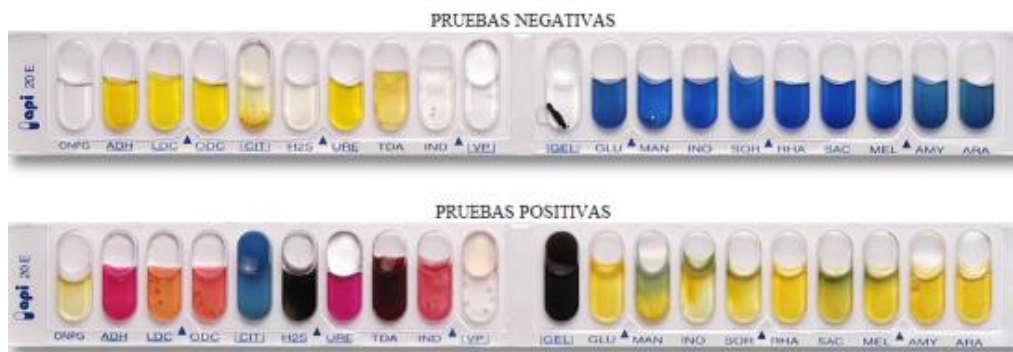


Figura 2. Diferencia entre prueba positiva y negativa en una enterobacteria.

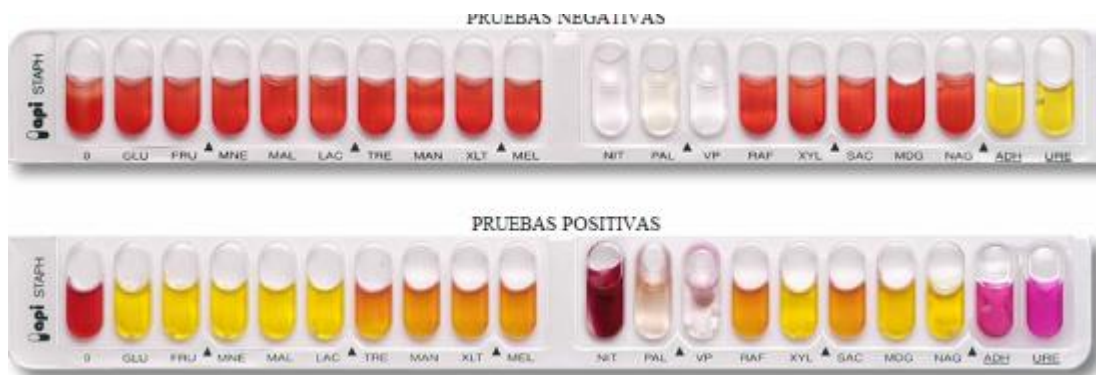


Figura 3. Diferencia entre prueba positiva y negativa de un *Staphylococcus*.



Figura 4. Diferencia entre prueba positiva y negativa de un bacilo gram (-).

Para llevar a cabo este sistema se toma un inoculo y se suspende en solución salina al 0.85%, esta suspensión se deposita en el dispositivo API en cada microtubo el cual tiene una cúpula donde se depositaron los diferentes reactivos, posteriormente se incubaron durante 18-24 horas a 37°C para obtener los resultados.

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado. La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-). (Apiweb, 2010).

5.7 Antibiograma

La caracterización incluirá el perfil de sensibilidad a los antibióticos de las diferentes bacterias aisladas e igualmente la resistencia que estos tengan.

El antibiograma disco-placa consiste en depositar discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos en la superficie de agar de una placa de petri

previamente inoculada con el microorganismo, tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde al agar radialmente formando un gradiente de concentración, transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición, posteriormente se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la concentración mínima inhibitoria (CMI), obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición.

Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano y la lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (Picazo, 2000).



Figura 5. Ejemplo de antibiograma (Cecenado & Saavedra 2009).

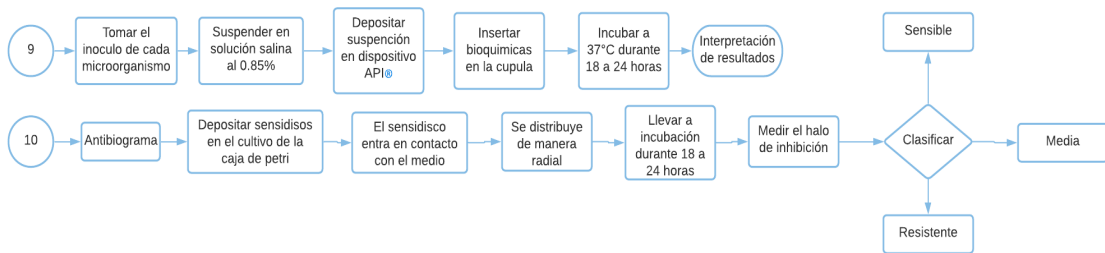
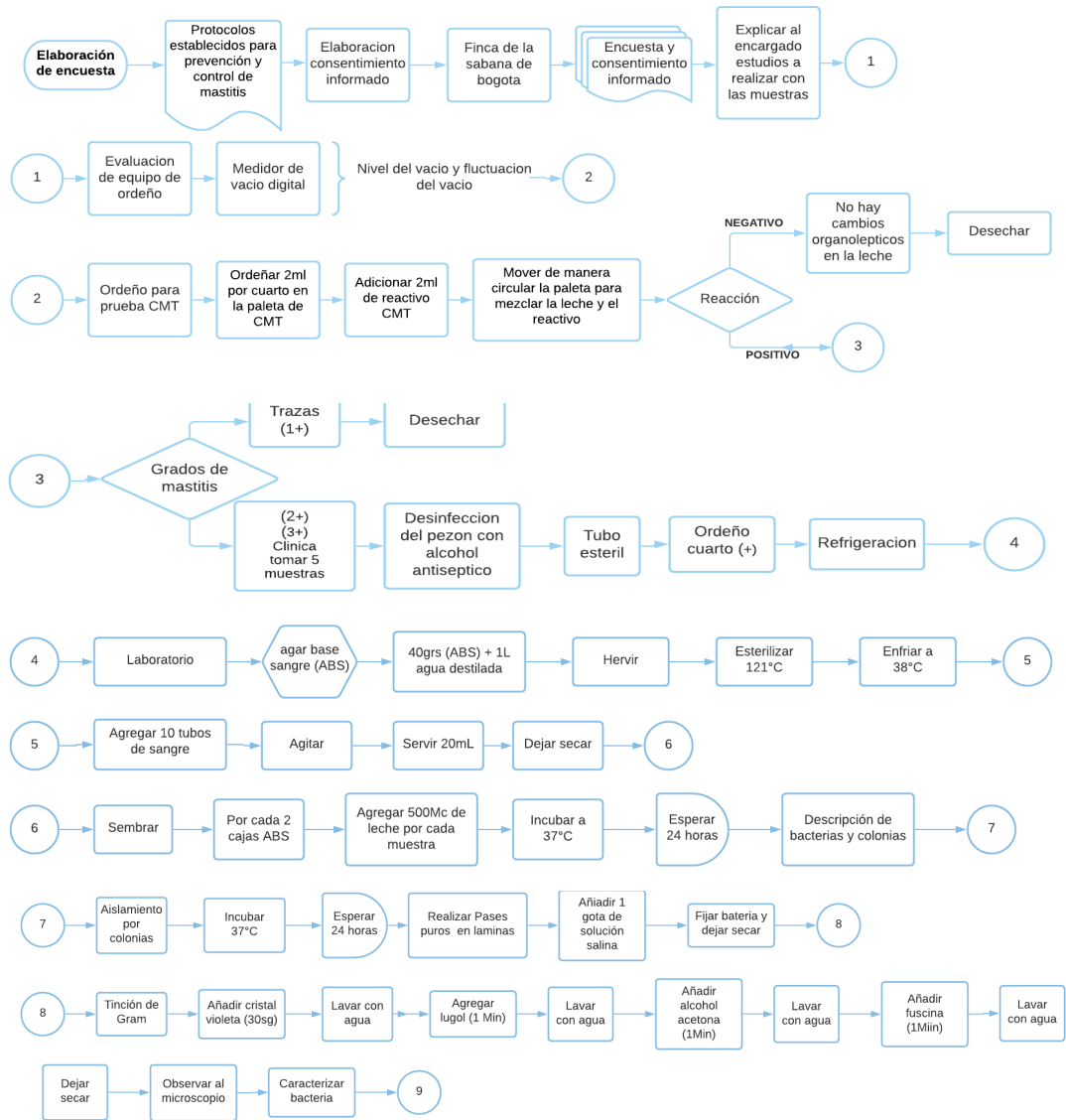
6. RESULTADOS

6.1 Resultado del protocolo

Se elaboró a manera de flujograma el protocolo para la caracterización de bacterias causantes de mastitis para hacer de este un proceso dinámico y ameno para los investigadores.

Tabla 3.

Resultado del protocolo: para la caracterización de bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica presentado mediante un flujograma



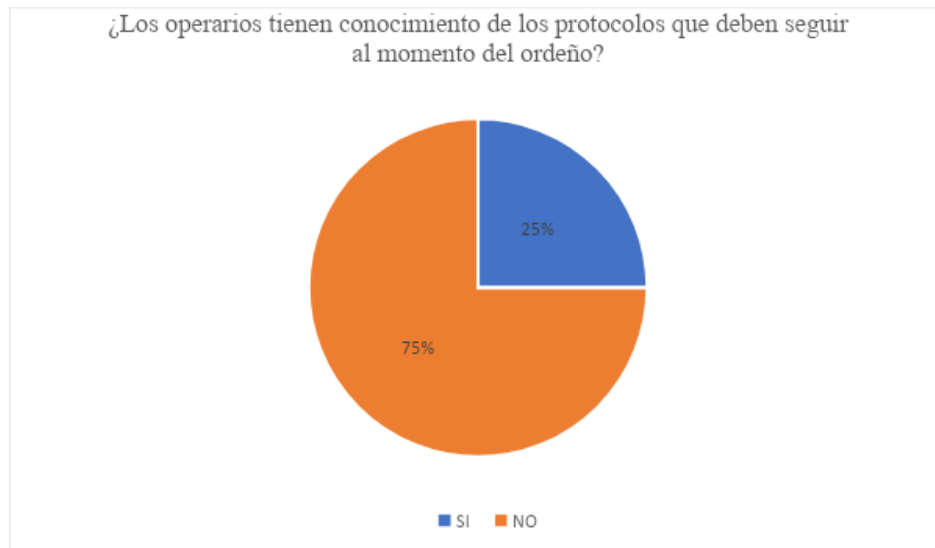
Se aplicó la encuesta previamente realizada a los establecimientos destinados para la toma de las muestras, para así corroborar de manera más detallada el proceso de pre ordeño, ordeño y post ordeño e identificar si existen falencias dentro de los mismos. De dicha encuesta a continuación presentamos los resultados.

6. 2 Resultados en encuestas

6.2.1 PROCEDIMIENTO PARA EL USO DE LOS EQUIPOS DE ORDEÑO

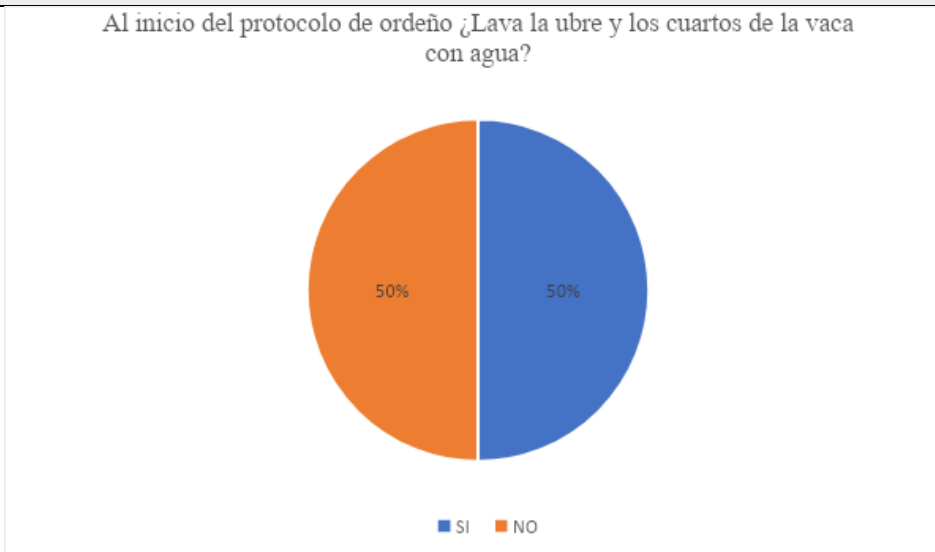


Del 100% de las fincas encuestadas el 75% respondió que el manejo de los equipos y el procedimiento si es realizado por operarios capacitados y el 25% respondió que no era realizado por operarios capacitados.

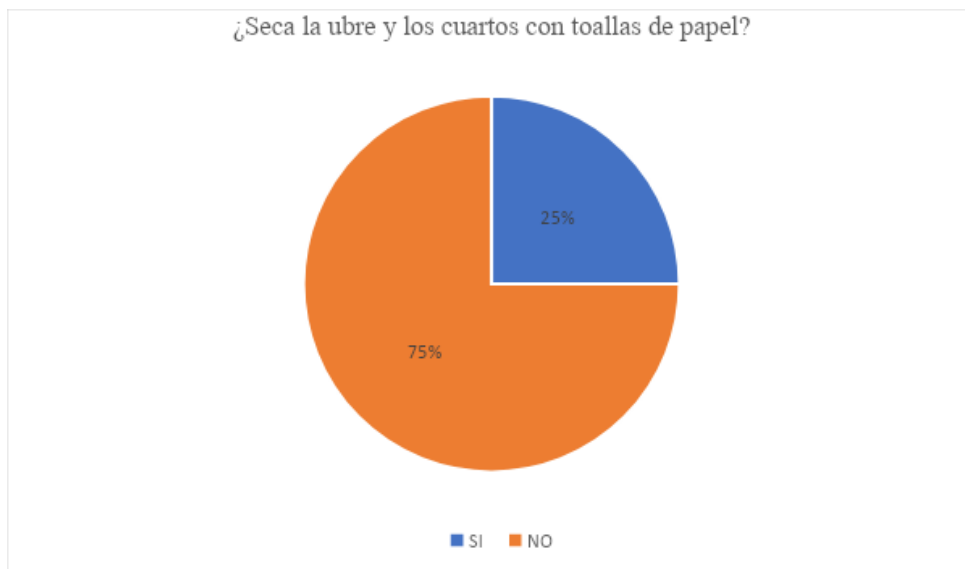


Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que los operarios tienen conocimiento de los protocolos que deben seguir al momento del ordeño y el 75% respondió que los operarios no tienen conocimiento.

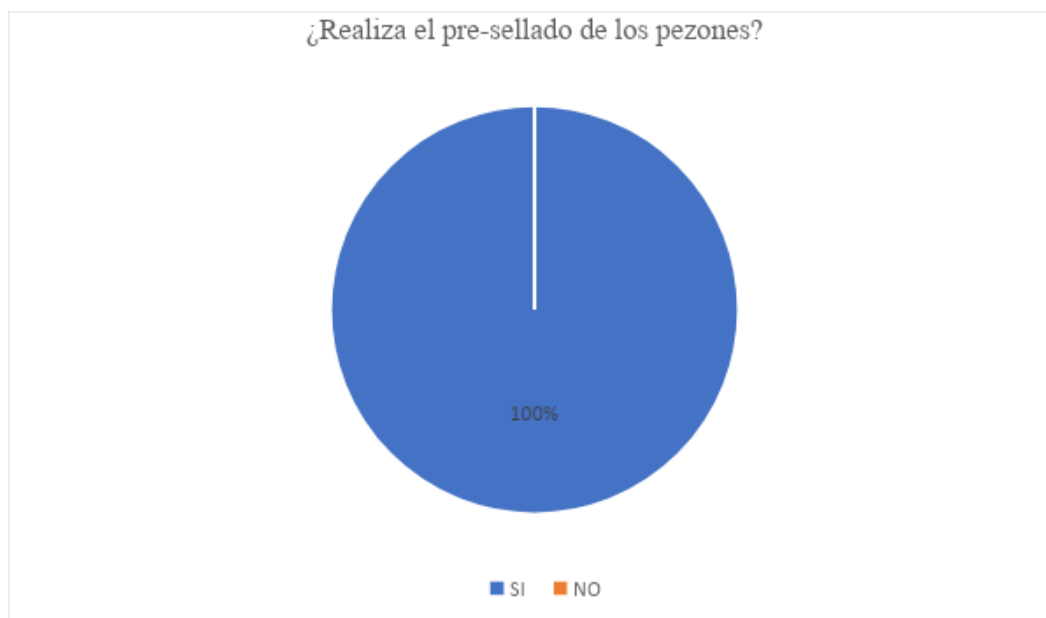
6.2.2 PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LAS VACAS A ORDEÑAR



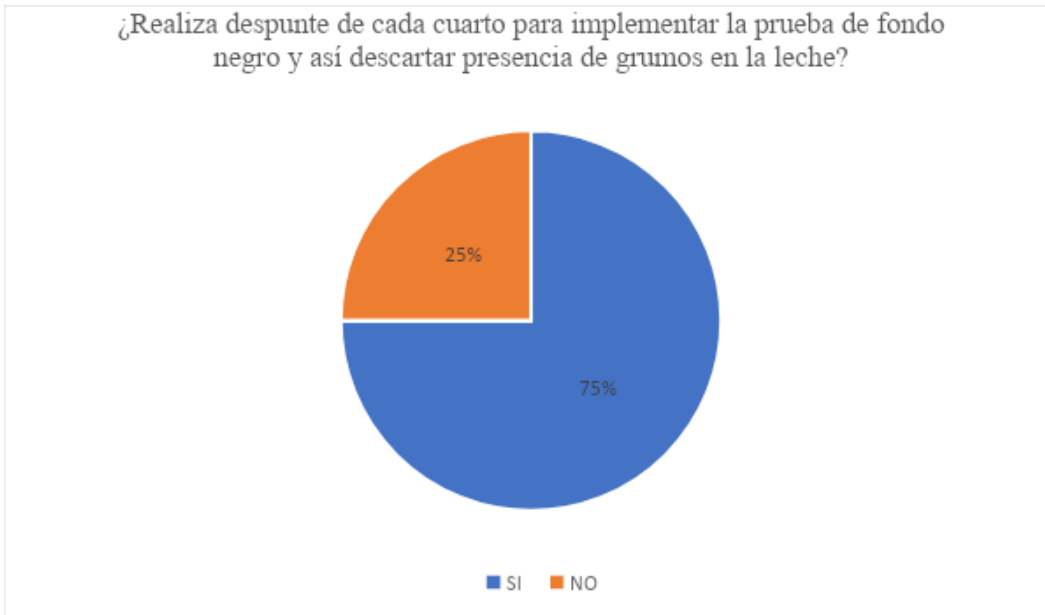
Del 100% de las fincas encuestadas el 50% respondió que al inicio del protocolo de ordeño si lavan la ubre y los cuartos de la vaca con agua y el 50% respondió que no.



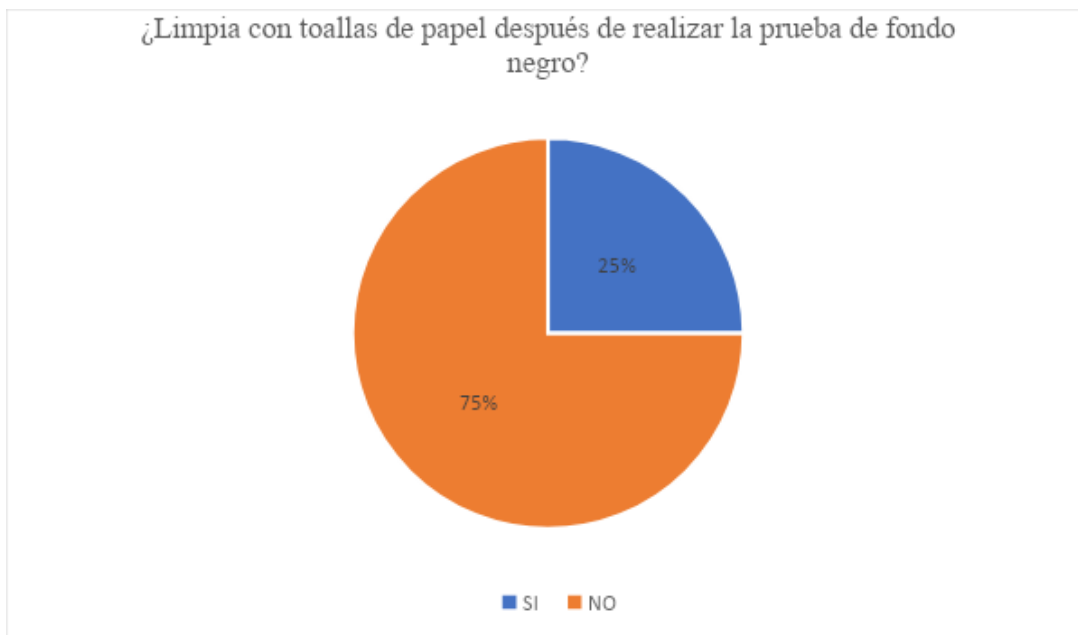
Del 100% de las fincas encuestadas el 25 % respondió que secan la ubre y los cuartos con toallas de papel y el 75% respondió que no secan la ubre.



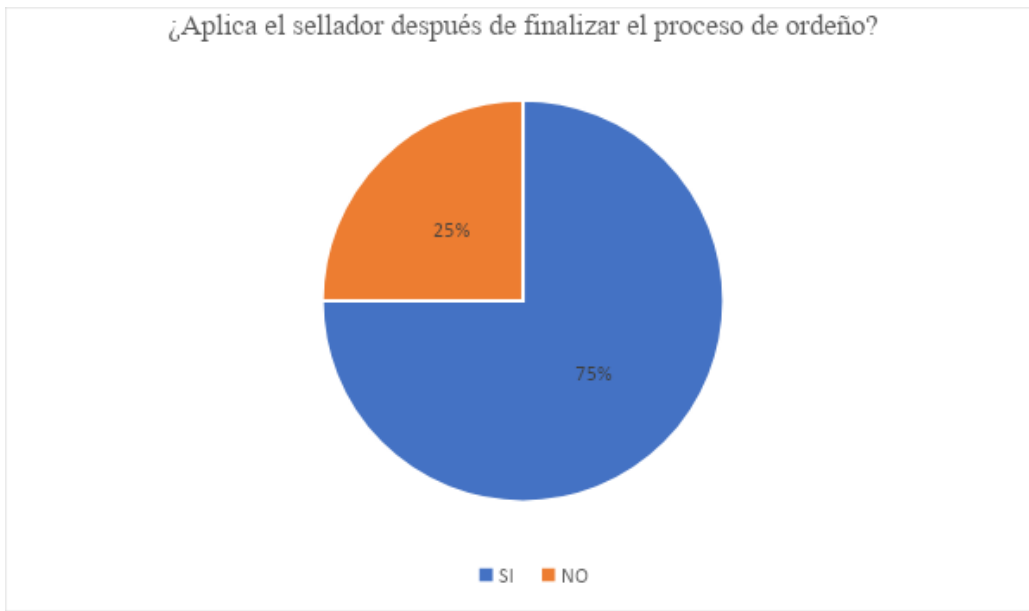
Del 100% de las fincas encuestadas el 100% respondió que realizan el pre-sellado de los pezones.



Del 100% de las fincas encuestadas el 75% respondió que realizan despunte de cada cuarto para implementar la prueba de fondo negro y así descartar presencia de grumos en la leche y el 25% respondió que no lo realizan.

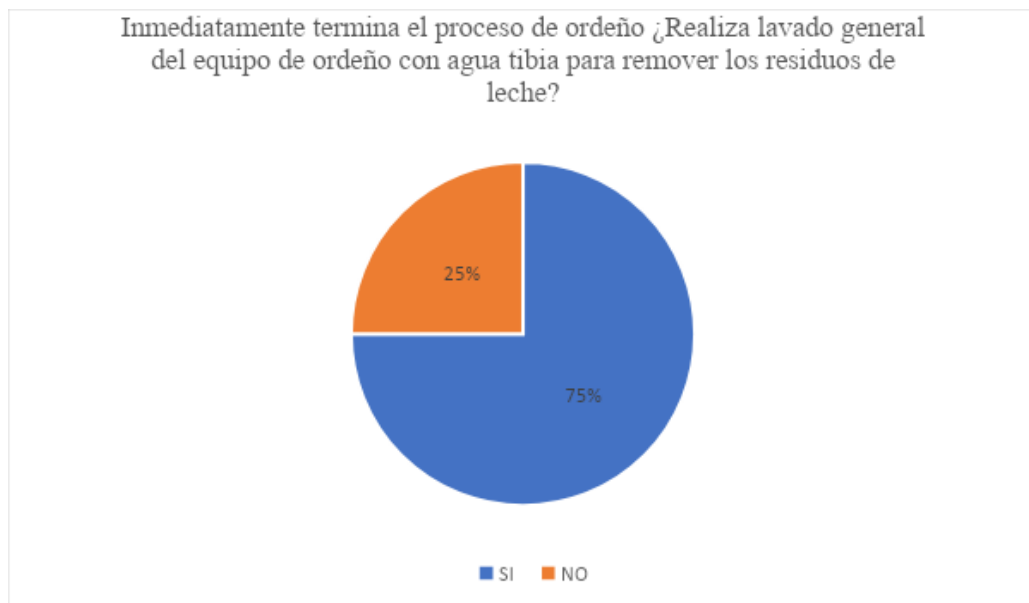


Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que si limpian con toallas de papel despues de realizar la prueba de fondo negro y el 75% respondió que no limpian.

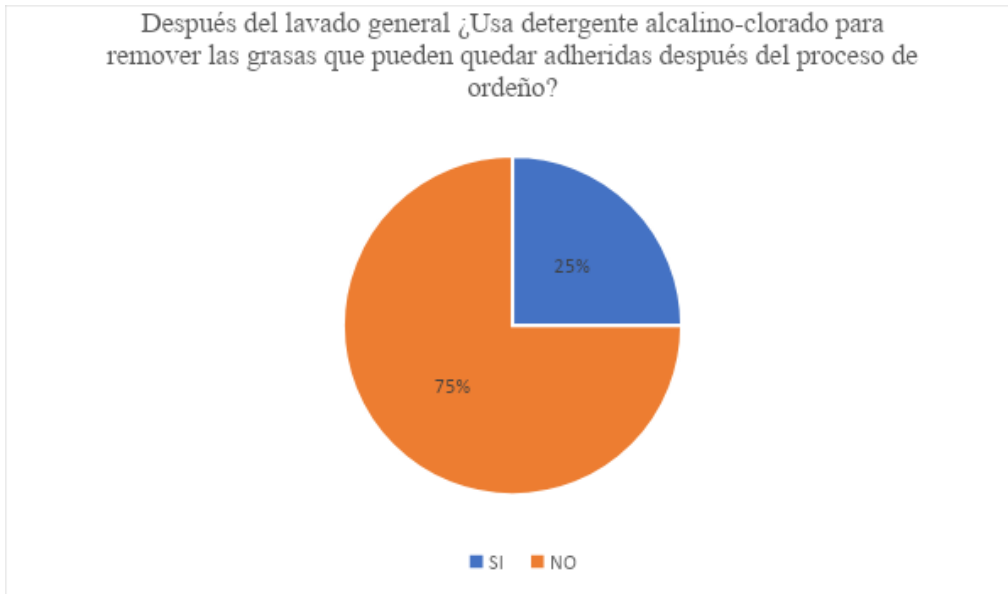


Del 100% de las fincas encuestadas el 75% respondió que sí aplica el sellador después de finalizar el proceso de ordeño y el 25% respondió que no lo aplican.

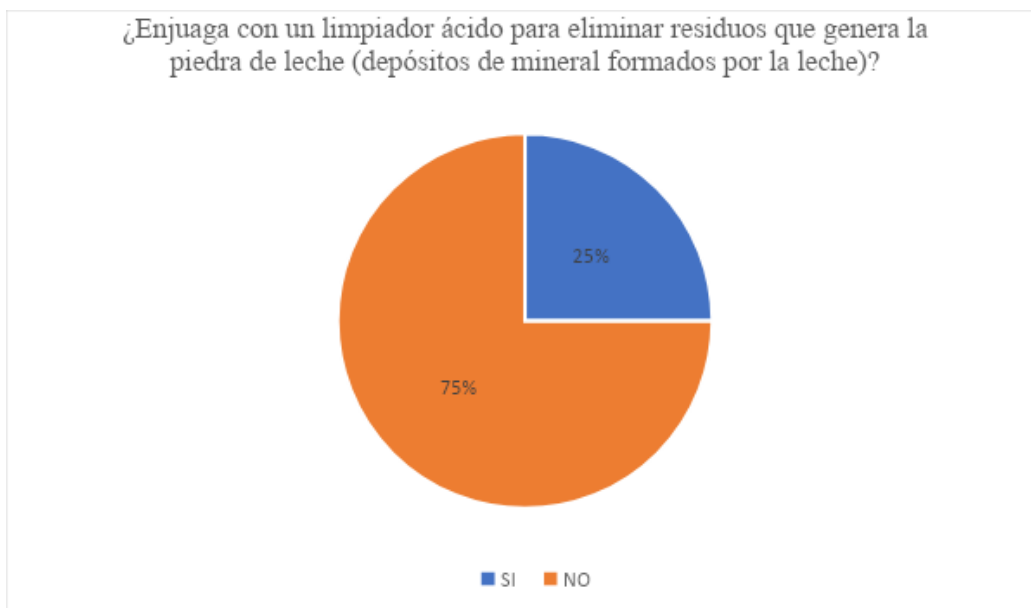
6.2.3 PROCEDIMIENTOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LOS EQUIPOS DE ORDEÑO Y SALAS DE ORDEÑO



Del 100% de las fincas encuestadas el 75% respondió que inmediatamente termina el proceso de ordeño realizan lavado general del equipo de ordeño con agua tibia para remover los residuos de leche y el 25% respondió que no lo realizan.

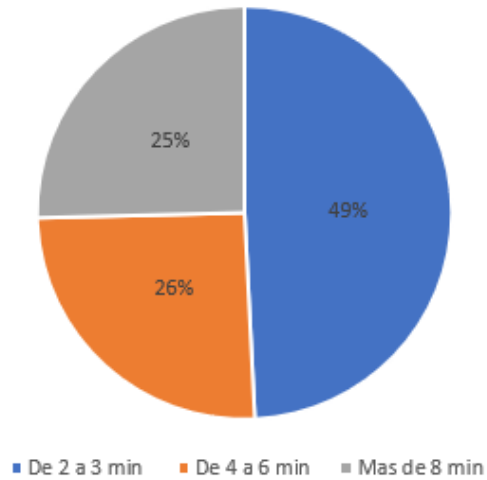


Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que usa detergente alcalino- clorado para remover las grasas que quedan adheridas después del proceso de ordeño y el 75% respondió que no lo usan este detergente.



Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que enjuaga con un limpiador ácido para eliminar residuos que generan piedra de leche y el 75% respondió que no enjuagan con limpiador ácido.

¿Cuánto tiempo dura el proceso de limpieza y desinfección de los equipos de ordeño?

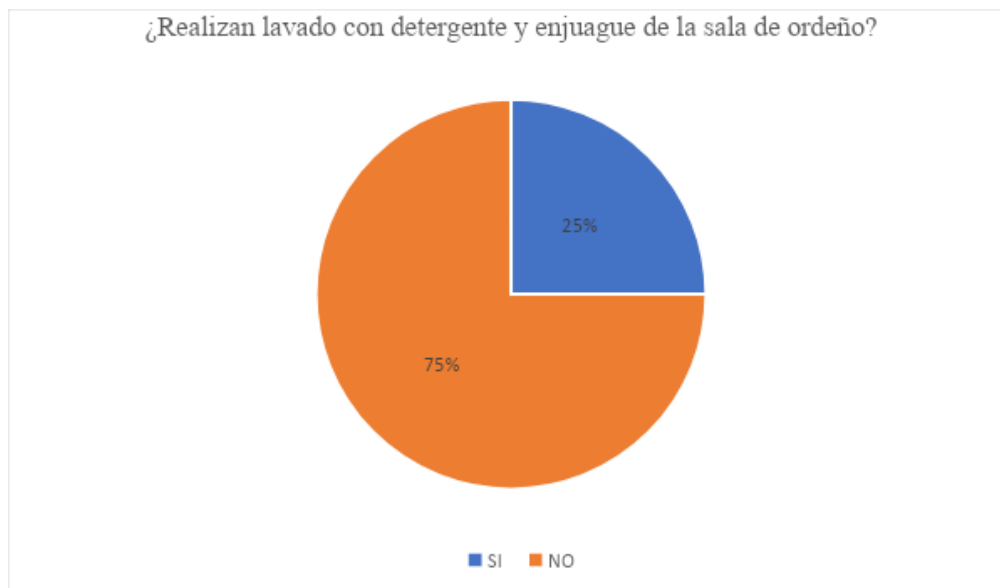


Del 100% de las fincas encuestadas el 49% respondió que el tiempo de limpieza y desinfección de los equipos de ordeño dura de 2 a 3 minutos, el 26% respondió que dura de 4 a 6 min y el 25% respondió que dura más de 8 minutos.

¿Realiza desinfección de las pezoneras antes y después de cada proceso de ordeño?



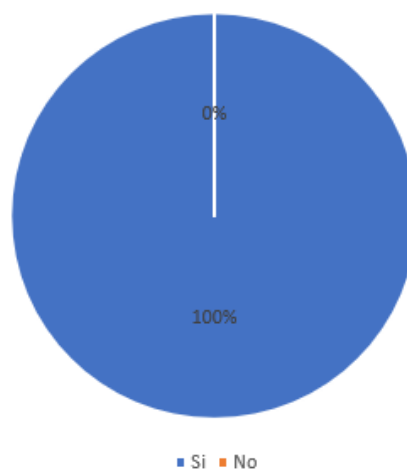
Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que realiza desinfección de las pezoneras antes y después de cada proceso de ordeño y el 75% respondió que no lo realiza.



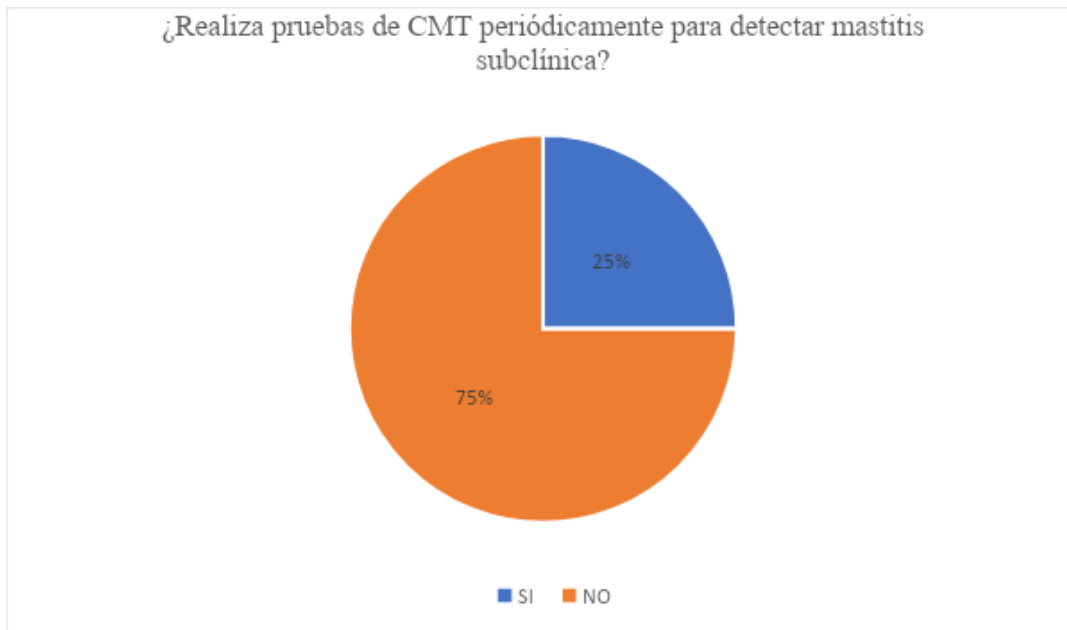
Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que sí realizan lavado con detergente y enjuague de la sala de ordeño y el 75% respondió que no lo realiza.

6.2.4 TRATAMIENTO DE MASTITIS CLÍNICA

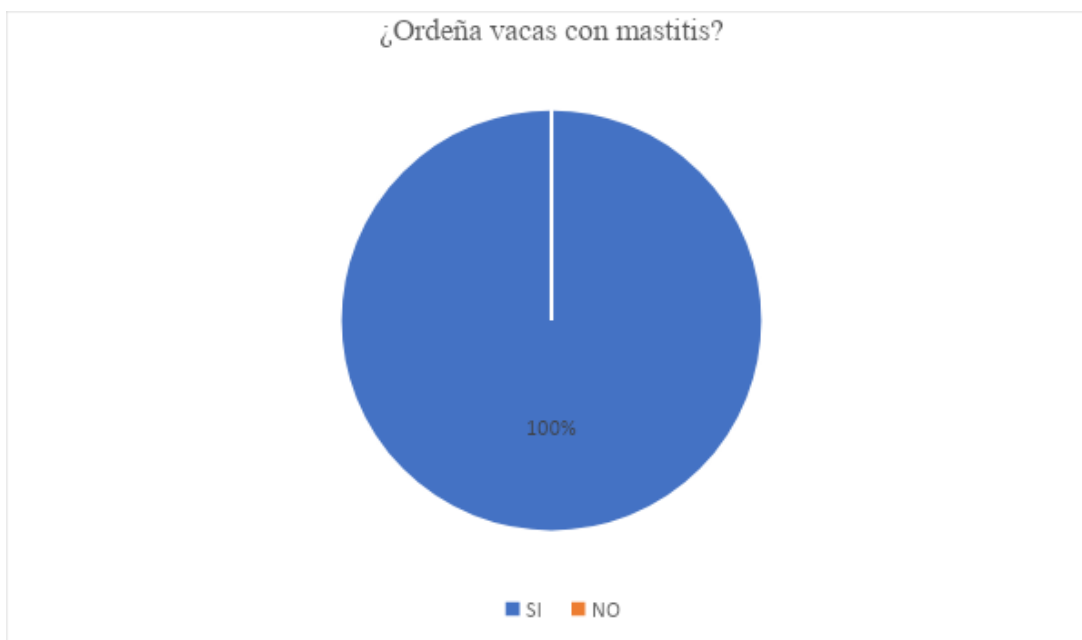
¿Tiene vacas con mastitis clinica?



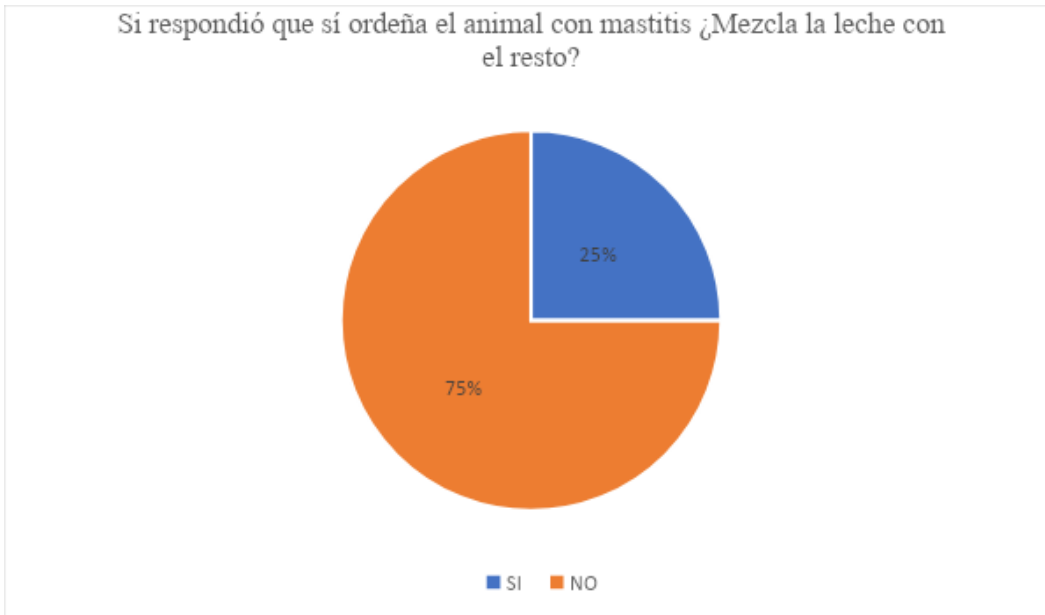
Del 100% de las fincas encuestadas el 100% respondió que sí tienen vacas con mastitis clínica.



Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que sí realizan pruebas de CMT periódicamente para detectar mastitis subclínica y el 75% respondió que no realiza.



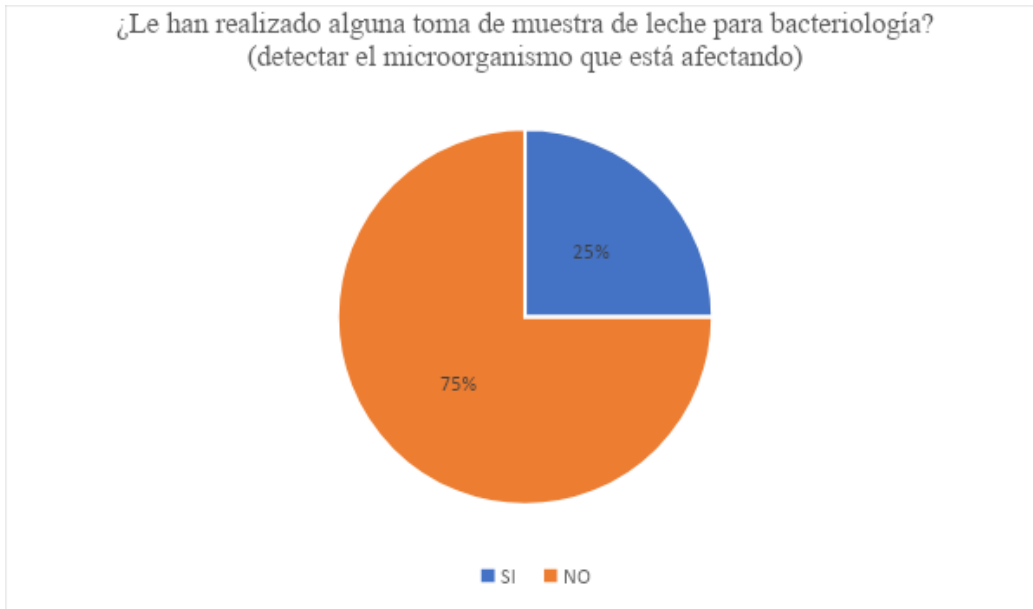
Del 100% de las fincas encuestadas el 100% respondió que si ordeñan vacas con mastitis.



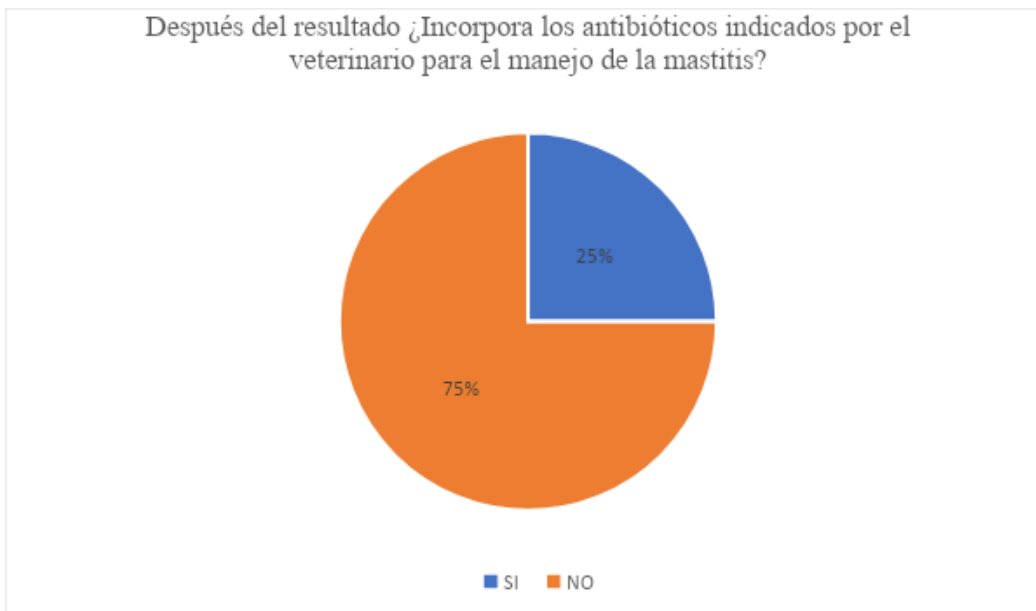
Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que si mezclan la leche de animales con mastitis con el resto de la leche y el 75% respondió que no la mezclan.



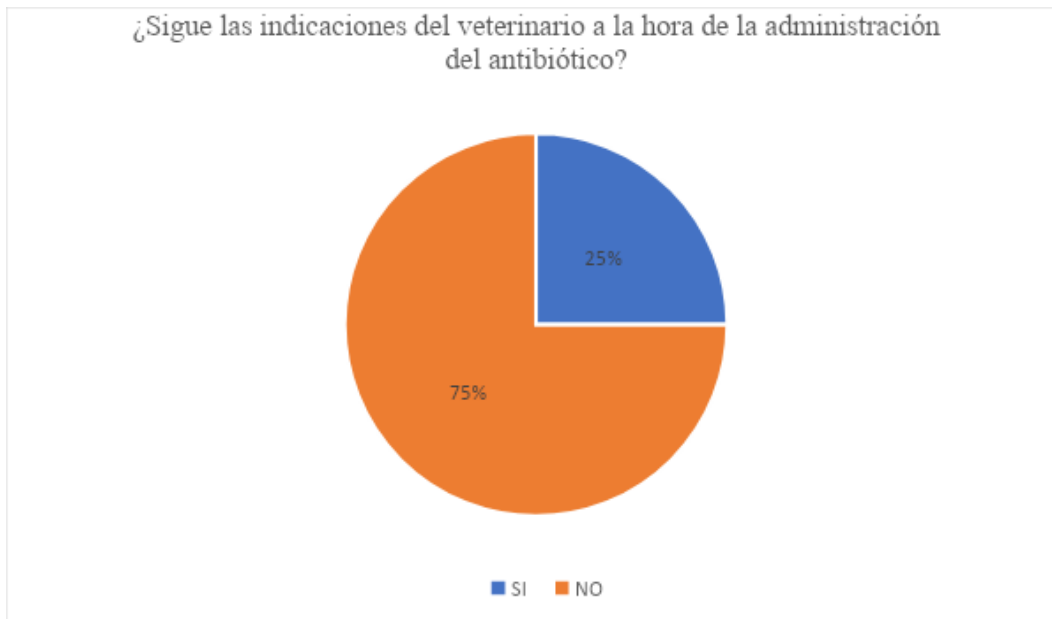
Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que si desechan la leche de vacas con mastitis y el 75% respondió que no la desechan.



Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que sí han realizado muestras de leche para bacteriología y el 75% respondió que no han realizado.



Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que sí incorpora los antibióticos indicados por el veterinario para el manejo de la mastitis y el 75% respondió que no.



Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que sí sigue las indicaciones del veterinario para la administración del antibiótico y el 75% respondió que no las siguen.

6.2.5 TRATAMIENTO DE VACAS SECAS QUE EJERCEN LOS ORDEÑADORES EN SUS FINCAS

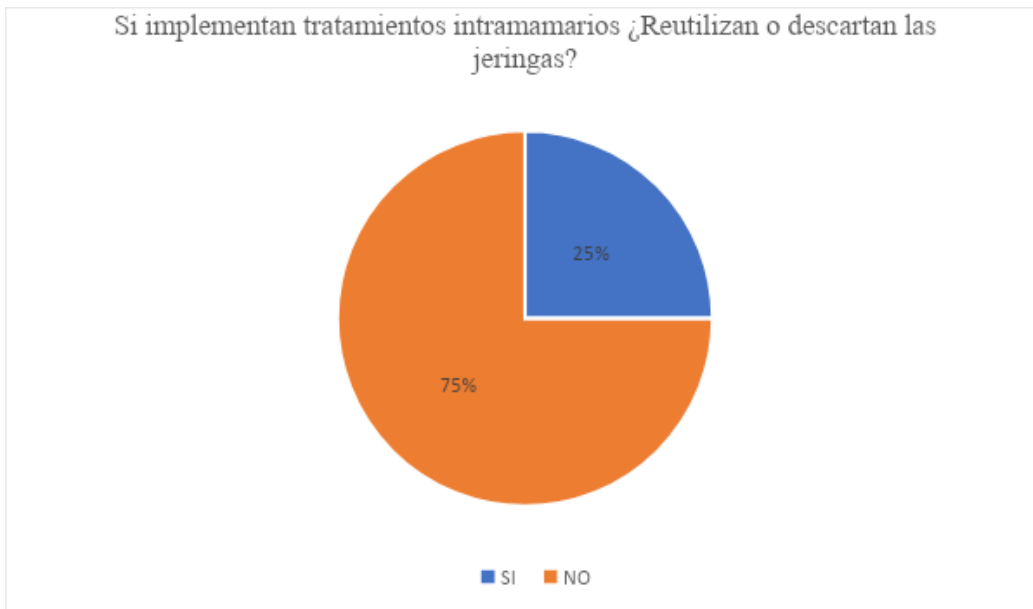
¿Realizan tratamiento de vaca seca?



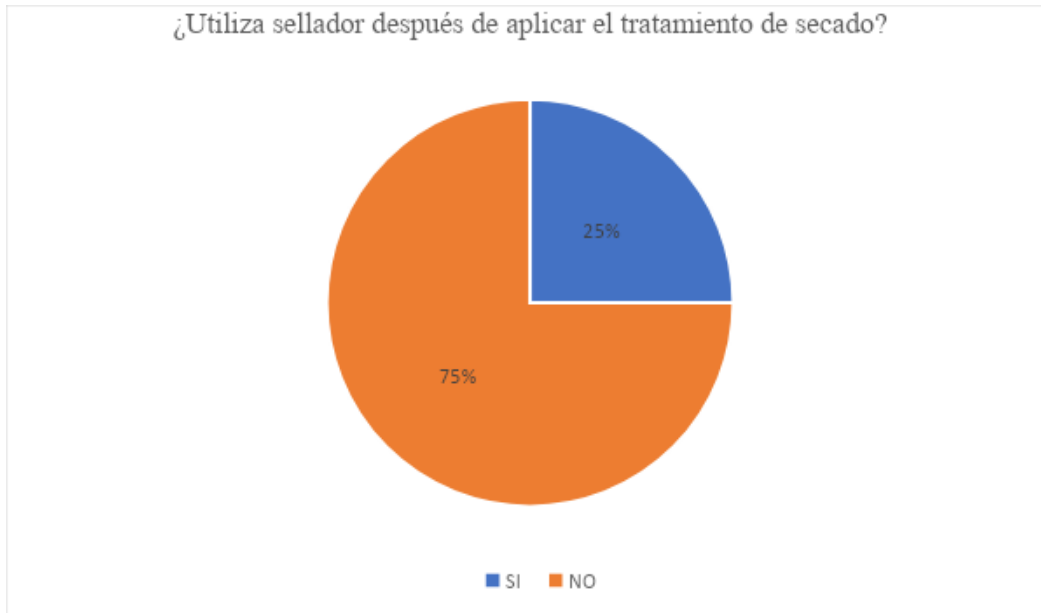
Del 100% de las fincas encuestadas el 100% respondió que sí realizan tratamiento de vaca seca.



Del 100% de las fincas encuestadas el 75% respondió que antes de realizar algún tipo de tratamiento si realiza la limpieza y desinfección de los pezones y el 25% respondió que no.

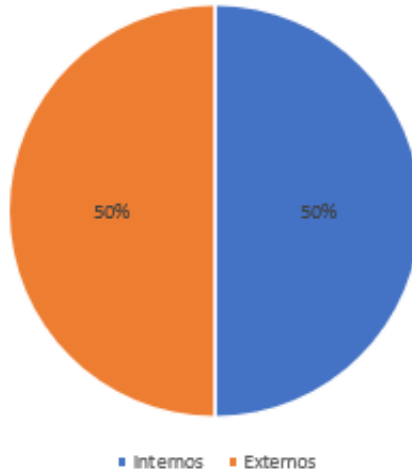


Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que cuando implementan tratamientos intramamarios reutilizan las jeringas y el 75% respondió que las descartan.



Del 100% de las fincas encuestadas el 25% respondió que sí utiliza sellador después de aplicar el tratamiento de secado y el 75% respondió que no utilizan.

¿Administra sellantes internos o externos?



Del 100% de las fincas encuestadas el 50% respondió que utiliza sellantes internos y el otro 50% respondió que utiliza sellantes externos.

Tabla 4.

Resultados de la encuesta

Conocimiento de los protocolos de manejo de equipos de ordeño	25%	75%
Limpieza y secado con toallas de papel periódico	25%	75%
Lavado y desinfección de la sala y equipos de ordeño	25%	75%
Llevar a cabo CMT y tratamiento antibiótico para mastitis	25%	75%
Reutilización de jeringas durante tratamientos	25%	75%

Teniendo en cuenta los resultados de la encuesta, seleccionamos algunas preguntas que principalmente influyen en la presentación de mastitis, se destacaron varios aspectos, entre ellos: el desconocimiento de los protocolos de manejo de los equipos de ordeño, el deficiente lavado y desinfección de los mismos, llevar a cabo incorrectamente el CMT así como el tratamiento para la mastitis, por último se resalta el hecho de que más de la mitad de las fincas estudio reutilizan las jeringas durante los tratamientos, todo esto recalca los factores más predisponentes en la problemática.

6.3 Resultados California Mastitis Test

CMT-total		
Vacas	101	404
Negativos	282	71,6%
Trazas	26	6,6%
1	26	6,6%
2	23	5,8%
3	37	9,4%
TOTAL	394	100,0%
Cuartos Funcionales	396	98%
Mastitis Clínica / Cuartos	2	1%
# Vacas con Mastitis Clínica	1	1%
Cuartos Perdidos	8	2%

Cuartos bajo riesgo (Neg y Trazas)	78,2%
Cuartos de alto riesgo (1, 2, 3)	21,8%
Cuartos Perdidos	2%
Cuartos con Mastitis clínica	0,5%

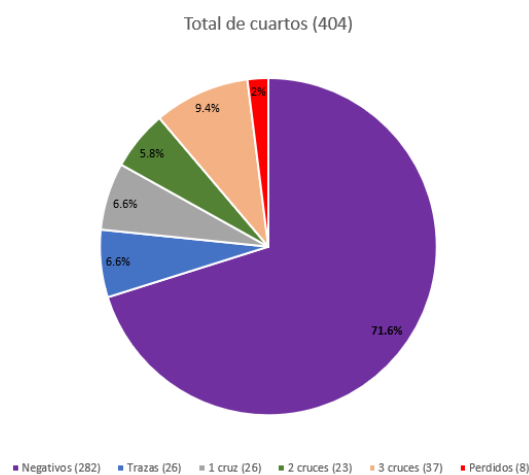


Figura 6. Representación gráfica del resultado global de la prueba California Mastitis Test realizada en las 4 fincas de la Sabana de Bogotá

Durante el presente estudio se evaluó una totalidad de 101 vacas de producción de leche, para una total de 404 cuartos o pezones, de los cuales se tuvieron los siguientes resultados al realizar el California Mastitis Test (CMT) y al evaluar clínicamente el estado de la ubre de cada animal. En mayor porcentaje (71.6%) es decir 282 pezones, se encontró como resultado negativo, lo cual indica que en gran medida el estado de la ubre de la mayoría de los animales es el ideal. En igual proporción se encuentran la clasificación de trazas y una cruz con el 6.6% (26 pezones) y el nivel 2 de la clasificación de la mastitis presentó un 5.8 % (23 de los cuartos evaluados). Por último la clasificación de tres cruces el nivel más alto de mastitis subclínica, presentó un promedio de 9.4% en decir un total de 37 cuartos. Dentro del total de pezones solo el 2% (8) estaban perdidos, lo cual se debía en su mayoría a traumas causados por los mismos animales. Se analizó que el estado de la ubre de estos animales es bueno pero no es el ideal, se puede mejorar si se lleva un protocolo de ordeño mucho mejor del que se evidenció en las diferentes fincas evaluadas.

6.4 Resultados en laboratorio

Después de tomar las muestras en campo, se trasladaron al laboratorio para procesarlas adecuadamente como se menciona en la metodología, a continuación se evidencian los resultados.

Tabla. 5

Las Martas: Resultado de las muestras en laboratorio

Nº muestra	Proveniencia	Nombre	Letra	Colonia	Catalasa		Morfología macroscópica	Morfología Microscópica		Hemolisis	RESULTADOS			
					Negativa	Positiva		Forma	Tinción		DNasa	Manitol	Macconkey	Bilis sculin
1	Decano	1559 AI	A	Colonia 2		X	Gris con halo de tamaño medio y forma redondeada	Coco	Gram positivo	gamma	Positivo	Positivo	/	/
2	Decano	1559 PI	B	Colonia 2		X	Transparente pequeña redondeada	Coco	Gram positivo	gamma	positivo	positivo	/	/
3	Decano	Negra AI	C	Colonia 1		X	Gris pequeña redondeada en forma de puntillado	Coco	Gram positivo	se descartó	Negativo	Negativo	/	/
4	Decano	Negra AI	D	Colonia 2		X	Blanca brillante pequeña redondeada	Coco	Gram positivo	gamma	Negativo	Negativo	/	/
5	Decano	68 AI	E	Colonia 1		X	Blanca color leche, grande plana	Coco	Gram positivo	gamma	positivo	Negativo	/	/
9	Decano	1559 PI	J	Colonia 1	X		Muy pequeña transparente redondeada en forma de puntillado	Coco	Gram positivo	alfa	/	/	/	/
10	Decano	1559 AI	K	Colonia 1	X		Gris muy pequeña redondeada en forma de puntillado	Coco	Gram positivo	alfa	/	/	/	/
6	Decano	68 PI	F	Colonia 2		X	transparente redondeada super mini	Coco	Gram negativo	gamma	/	/	Negativo	/
7	Decano	68 AI	G	Colonia 3		X	Gris oscura pequeña	Coco	Gram negativo	gamma	/	/	Negativo	/
8	Decano	68 PI	H	Colonia 1	X		Transparente mediana redondeada con resalto	Coco	Gram negativo	gamma	/	/	Negativo	/
11	Decano	68 AI	L	Colonia 2		X	Amarilla puntillado super pequeña	coco	Gram negativo	alfa	/	/	Negativo	/

Durante el primer estudio y aislamiento bacteriano se determinó que el 100 % de los microorganismos hallados y observados al microscopio tenían forma de cocos, de este porcentaje el 63.6% eran cocos gram positivos, de los cuales el 71,4% fueron gamma hemolíticos y el 28.5% fueron alfa hemolíticos, solo el 20% fue positivo y creció en agar DNasa y manitol; por otro lado el 36.3% eran muy pocos cocos gram negativos de los cuales el 75% fueron gamma hemolíticos y el 25% fueron alfa hemolíticos, el 100% de estos no crecieron en agar Macconkey.

Tabla. 6

El Espino: Resultado de las muestras en laboratorio

Nº muestra	Proveniencia	Nombre	Letra	Colonia	Catalasa		Morfología macroscópica	Morfología Microscópica		Hemolisis	RESULTADOS			
					Negativa	Positiva		Forma	Tinción		DNasa	Manitol	Macconkey	Bilis sculin
12	Colanta	294 PI	A	Colonia 1	X		Gris puntillado brillante pequeña	Coco	Gram positivo	alfa	/	/	/	Negativo
16	Colanta	271 PI	E	Colonia 2	X		Amarilla mediana puntillado redonda	Coco	Gram positivo	gamma	/	/	/	Negativo
17	Colanta	0718 PI	F	Colonia 1	X		Plana transparente pequeña hemolítica	Coco	Gram positivo	beta	/	/	/	Negativo
20	Colanta	285 PD-AD	J	Colonia 2	X		Blanca mediana redonda	Coco	Gram positivo	gamma	/	/	/	Negativo
22	Colanta	635 PD-AD	L1	Colonia 1	X		Gris mate con halo, plana y botonada	Coco	Gram positivo	gamma	Negativo	Negativo	/	Negativo
26	Colanta	256 AI-AD-PD	N1	Colonia 1	X		blanca cremosa mediana	Coco	Gram positivo	gamma	Negativo	Negativo	/	Positivo
18	Colanta	0718 PI	G	Colonia 2		X	Transparente muy pequeña plana	Coco	Gram positivo	gamma	Negativo	Negativo	/	
19	Colanta	285 PD-AD	I	Colonia 1	X		blanca pequeña puntillada hemolítica	Coco	Gram positivo	beta	Negativo	Negativo	/	
24	Colanta	635 PD-AD	L4	Colonia 4	X		puntillada transparente muy pequeña	Coco	Gram positivo	beta	/	/	/	Negativo
25	Colanta	256 AI-AD-PD	N2	Colonia 2		X	blanca mediana redonda	Coco	Gram positivo	gamma	/	/	/	Negativo
13	Colanta	294 PI	B	Colonia 2	X		Transparente pequeña puntillado	Bacilos	Gram positivo	gamma	/	/	/	Negativo
14	Colanta	294 PI	C	Colonia 3	X		Gris mate plana grandota como un botón	Bacilos	Gram positivo	alfa	/	/	/	Negativo
15	Colanta	271 PI	D	Colonia 1	X		Gris mediana redondísima bordes bien	Bacilos	Gram positivo	alfa	/	/	/	Negativo
21	Colanta	285 PD-AD	K	Colonia 3	X		Transparente super mini redonda	Bacilos	Gram positivo	gamma	/	/	/	Negativo
23	Colanta	635 PD-AD	L2	Colonia 2		X	blanca lechosa amorfa mediana	Bacilos	Gram negativo	beta	/	/	/	Negativo

En el segundo aislamiento bacteriano se determinó que el 66.6% eran cocos en su morfología y de estos el 100% fueron marcados con tinción gram positiva, dentro de este

último porcentaje el 60% fue catalasa negativo y el 40% catalasa positivo, en cuanto al estudio de hemólisis, el 10% fue alfa hemolítico, el 30% beta hemolítico y el 60% gamma hemolítico. Solo el 10% creció en agar bilis esculino y el resto de agares presentaron un crecimiento negativo para estos microorganismos.

El 33.3% de este aislamiento bacteriano resultó en una morfología de bacilos de los cuales el 75% fueron gram positivos además de catalasa negativo y el 25% gram negativos acompañados de catalasa positivo. El 100 % de estos bacilos resultaron negativos en el crecimiento de medio bilis esculina.

Tabla. 7

La Granada: Resultado de las muestras en laboratorio

Nº muestra	Proveniencia	Nombre	Letra	Colonia	Catalasa		Morfología macroscópica	fología Microscop		Hemolisis	RESULTADOS			
					Negativa	Positiva		Forma	Tincion		DNasa	Manitol	Macconkey	Bilis sculin
29	Granada	Esperanza	C	Colonia 1		X	Mediana, amarilla, hemolítica, redonda	Coco	Gram +					
31	Granada	Andrea	E	Colonia 1		X	Amarilla, irregular	Coco	Gram +					
32	Granada	Andrea	F	Colonia 2		X	Blanca, irregular	Bacilo	Gram -					
27	Granada	Coral	A	Colonia 1		X	Grande, irregular, amarillo claro	Bacilo	Gram -					
28	Granada	Clementina	B	Colonia 1	X		Mediana, blanca, redonda.	Coco	Gram +					
30	Granada	Esperanza	D	Colonia 2	X		Pequeña, blanca, puntillado, redonda	Coco	Gram -					

En el tercer estudio de aislamiento bacteriano se evidencio que el 66.6% tienen morfología de coco, de los cuales el 75% son gram positivos y el resto de porcentaje son gram negativos; el 43.4% del aislamiento bacteriano presentaba morfología de bacilo de los cuales en su totalidad eran gram negativos y catalasa positivo.

Debido a la presentación de la pandemia por el SARS CoV-2 los estudios mencionados anteriormente tuvieron que ser pausados y quedar en pendiente para su futura realización.

Tabla 8:*Resultado de morfología y tinción Gram bacteriana*

Finca	Coco Gram (+)	Coco Gram (-)	Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (-)
#1	63,6%	36,3%	0%	0%
#2	66,6%	0%	24,9%	8,32%
#3	49,9%	16,6%	0%	33,4%
#4	100%	0	0	0

En los resultados de bacteriología se observó que en las 4 fincas se encontraron predominantemente bacterias Cocos Gram Positivas, en la primera finca el 63,6 % y por el contrario no se presentaron Bacilos Gram Positivos y Gram Negativos, en la segunda finca también se presentaron los Cocos Gram Positivos en mayor proporción en un 66,6%, en la tercer finca aproximadamente el 50% y en la cuarta finca se encontró en un 100% de estas bacterias.

Tabla. 9

La Manuelita: Resultado de las muestras en laboratorio del antibiograma.

Nº muestra	Proveniencia	Nombre	Cultivo bacteriano	Antibiograma	Resultado
33	Manuelita	Italia (036)	Staphylococcus aureus	Cefquinome	SENSIBLE
				Cloxacilina	INTERMEDIO
				Penicilina	INTERMEDIO
				Ampicilina	SENSIBLE
				Amoxicilina	INTERMEDIO
				Cefalexina	SENSIBLE
				Cefalonium	SENSIBLE
34	Manuelita	Barina (17)	Streptococcus agalactiae	Cefquinome	SENSIBLE
				Cloxacilina	INTERMEDIO
				Penicilina	INTERMEDIO
				Ampicilina	SENSIBLE
				Amoxicilina	SENSIBLE
				Cefalexina	SENSIBLE
				Cefalonium	SENSIBLE
35	Manuelita	Africana (15)	Streptococcus agalactiae	Cefquinome	SENSIBLE
				Cloxacilina	INTERMEDIO
				Penicilina	SENSIBLE
				Ampicilina	INTERMEDIO
				Amoxicilina	INTERMEDIO
				Cefalexina	SENSIBLE
				Cefalonium	SENSIBLE

En este estudio de antibiograma se puede determinar que algunos de los patógenos más comunes causantes de mastitis han creado resistencia al antibiótico cloxacilina en un gran porcentaje de los pacientes, antibióticos como la amoxicilina, penicilina han sido usados de manera indiscriminada lo cual ha creado resistencia intermedia a diferentes patógenos y se puede evidenciar en este estudio. Los patógenos han creado una pobre resistencia a antibióticos como la cefalexina y la ampicilina, que se tienen que usar de manera indicada para que no se llegue a una resistencia en un futuro cercano.

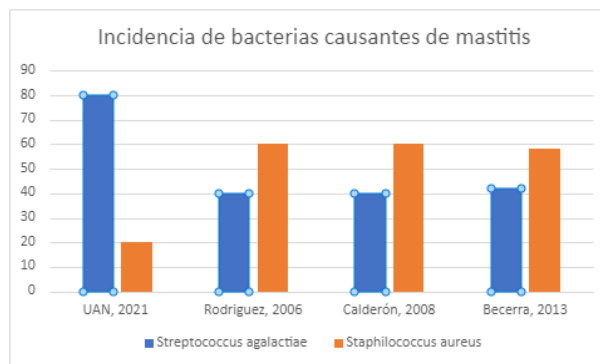


Figura 7. Incidencia de bacterias causantes de mastitis en Colombia

La gráfica indica la comparación con tres estudios realizados en Colombia acerca de las bacterias causantes de mastitis predominantes en Mastitis bovina y nuestro trabajo.

36	Manuelita	Villa Maria (153)	Streptococcus agalactiae	Cefquinome	SENSIBLE
				Cloxacilina	RESISTENTE
				Penicilina	INTERMEDIO
				Ampicilina	SENSIBLE
				Amoxicilina	INTERMEDIO
				Cefalexina	SENSIBLE
				Cefalonium	SENSIBLE
37	Manuelita	Paula (94)	Streptococcus agalactiae	Cefquinome	SENSIBLE
				Cloxacilina	RESISTENTE
				Penicilina	SENSIBLE
				Ampicilina	SENSIBLE
				Amoxicilina	INTERMEDIO
				Cefalexina	SENSIBLE
				Cefalonium	SENSIBLE
38	Manuelita	Inglaterra (039)	Streptococcus agalactiae	Cefquinome	SENSIBLE
				Cloxacilina	INTERMEDIO
				Penicilina	INTERMEDIO
				Ampicilina	SENSIBLE
				Amoxicilina	INTERMEDIO
				Cefalexina	SENSIBLE
				Cefalonium	SENSIBLE

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo algunas limitaciones en su alcance y por ende no se pudo concretar la caracterización completa, sin embargo los resultados arrojados determinan con toda seguridad que la mastitis es un problema bastante considerable en la Sabana de Bogotá debido a la falta de implementación de protocolos adecuados a cada sistema de ordeño.

Debido a que la sabana de Bogotá presenta una constante variación climática predominada por las precipitaciones pluviales, ha permitido identificar como en otros estudios realizados en la zona, que está dentro de los principales factores predisponentes causantes de mastitis, esto se pudo identificar en varias de las fincas estudio mediante la observación a nivel de los pezones y pezuñas, los cuales no se encontraban en condiciones higiénicas y que podrían desencadenar posibles microorganismos dentro de los cuales se encuentran los patógenos ambientales causantes de mastitis.

Es importante resaltar que la mastitis es un problema que no solo se encuentra presente en la Sabana de Bogotá sino también en hatos lecheros de diferentes países además de que es influenciada por diferentes factores.

En otros estudios como el realizado por Rodríguez. G en el año 2006 titulado “Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la sabana de bogotá, colombia”, se identificó al *Staphylococcus aureus* en mayor proporción y en menor proporción a *Streptococcus agalactiae*, a pesar de que nuestro estudio es poco representativo a causa de las pocas muestras que pudimos obtener, identificamos que fue inversamente.

Con respecto a los resultados de la encuesta los operarios afirmaban cumplir paso a paso el ordeño sin embargo en la práctica se observó que no realizaron el proceso de

preparación adecuadamente. En base a otros estudios realizados en Colombia, observamos que los protocolos dentro de la rutina de ordeño y los factores ambientales son los principales desencadenantes de la presentación de mastitis clínica y subclínica. (Calderón & Rodríguez, 2008; Becerra et al, 2013).

Un estudio realizado en el 2009 por Duran & Duarte, identifica porcentajes considerables de que al momento de realizar el presellado y el sellado los operarios reinciden en el mal manejo del protocolo de ordeño.

En nuestro trabajo se evidenció que predominaron las bacterias cocos gram positivas. Estos resultados coinciden con lo señalado por otros autores en Colombia que señalan que las bacterias predominantes son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

8. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos durante el estudio concluimos la relevancia que tiene este modelo para la caracterización de bacterias causantes de la mastitis clínica y subclínica no solo para las fincas de la Sabana de Bogotá sino también en todas las industrias lecheras para poder identificarlas y dirigir de manera oportuna los tratamientos.

Es un protocolo que ayuda a disminuir la incidencia y prevalencia de la mastitis en hatos que han venido con este problema desde tiempo atrás y que no han manejado los tratamientos adecuados dependiendo de la susceptibilidad de las bacterias que están involucradas.

En la aplicación de la encuesta concluimos que la falta de conocimiento de los protocolos durante el proceso de ordeño hace que se presenten más a menudo los problemas de mastitis, por esto la prueba de CMT es y seguirá siendo una herramienta muy valiosa, ya que gracias a esta se identifica de manera eficiente los casos de mastitis subclínica dentro del hato.

El resultado obtenido de 101 vacas evaluadas fue del 21.8 % de vacas con mastitis subclínica valor de gran importancia que nos demuestra lo fundamental que es realizar la prueba de CMT periódicamente.

Durante todo el estudio, se concluye que el protocolo instaurado para la caracterización de las bacterias causantes de mastitis es una excelente opción para los hatos problema que inciden una y otra vez sin saber cual es el patógeno de base al cual se debe atacar. Finalmente mediante la realización del protocolo se demostró apto para instaurar un tratamiento adecuado una vez caracterizada la bacteria y disminuir la resistencia antibiótica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adkins, P & Middleton, J. (2018). Methods for Diagnosing Mastitis. ELSEVIER. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 34 (3), Pp 479-491. Recuperado el 04 de julio del 2019 <https://ezproxy.uan.edu.co:2063/science/article/pii/S0749072018300367> Base de datos: ScienceDirect.
- Apiweb® [CD-ROM] BioMérieux. 2010. Sistemas Miniaturizados API®. Recuperado el 21 de noviembre de 2020.
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacologia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf
- Becerra R, Carvajal Z, Pulido M, Porras J & Vargas J. (2013). Prevalencia de bacterias causantes de mastitis en fincas lecheras de Toca (Boyacá, Colombia). *Revista ciencia y agricultura* Vol 11 (1).
- Bedolla, CC; Ponce de León, Mer. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. . *Revista Electrónica de Veterinaria*, 04(4), Pp 1-26.
Recuperado el 10 de agosto del 2019
<http://www.redalyc.org/pdf/636/63611952010.pdf> Base de datos: REDVET.
- Calderon, A, MVZ. MS & Rodriguez, V, Bacteriologa, MS. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense(Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.
Recuperado el 05 de agosto del 2020
- Calderón, R. A; Rodríguez, R.V; Arrieta, B. G & Máttar, V. S. (2011). Prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Montería (Colombia): etiología y susceptibilidad antibacteriana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), Pp 19-28. Recuperado el 14 de Agosto de 2019 de

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-

06902011000100004&lng=en&tlng=es. Base de datos: ScieELO.

Cecenado, E & Saavedra, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma:

conceptos generales (I). *Desde el laboratorio a la finca*. 7(4). [Figura 5]

[https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-el-](https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma-S1696281809719274)

[antibiograma-interpretacion-del-antibiograma-S1696281809719274](https://www.elsevier.es/es-revista-anales-pediatria-continuada-51-articulo-el-antibiograma-interpretacion-del-antibiograma-S1696281809719274)

Condalab. (2019). Agar bilis esculina ISO. Recuperado el 20 de noviembre del 2020.

Condalab. (2019). Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB). Recuperado: 20 Noviembre 2020.

Contreras, G. A. (2009). Alternativas en el manejo de la mastitis en novillas. *Revista*

Medicina Veterinaria y Zootecnia. 14(1), Pp 2. Recuperado el 04 de julio de 2019

http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_

[LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=)

[7&docId=GALE%7CA214895322&docType=Article&sort=Relevance&contentSegmen](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=)

[t=ZSPS&prodId=IFME&contentSet=GALE%7CA214895322&searchId=R3&userGrou](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=)

[pName=uanna&inPS=true](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=) Base de datos: Gale OneFile: Informe académico.

Cotrino, V. (2009). Estrategias de diagnóstico, control y prevención de mastitis. *Revista*

Medicina Veterinaria y Zootecnia.56(3), Pp 2. Recuperado el 04 de julio de 2019

http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_

[LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=)

[10&docId=GALE%7CA298966655&docType=Article&sort=Relevance&contentSegme](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=)

[nt=ZSPS&prodId=IFME&contentSet=GALE%7CA298966655&searchId=R2&userGro](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=)

[upName=uanna&inPS=true](http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=) Base de datos: Gale OneFile: Informe académico.

Duran, J & Duarte, S. (2009). Diseño y aplicación de un programa de buenas prácticas de

ordeño para mejorar la calidad higiénica de la leche en hatos de la Sabana de Bogotá.

Universidad de la Salle. Facultad de ciencias agropecuarias. Recuperado el 12 de Mayo de 2021

<https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1118&context=zootecnia>

Ebert, F; Staufenbiel, R; Simons, J & Pieper, L. (2017). Randomized, blinded, controlled clinical trial shows no benefit of homeopathic mastitis treatment in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 100(6), Pp 4857-4867. Recuperado el 02 de agosto de 2019
<https://ezproxy.uan.edu.co:2063/science/article/pii/S0022030217302497>. Base de datos: ScienceDirect.

Goli, M; Ezzatpanah, H; Ghavami, M; Chamani, M; Aminafshar, M; Toghiani, M & Eghbalsaied, S. (2012). The effect of the main pathogens evaluated by multiplex PCR causing subclinical mastitis in somatic cell profiles. *Tropical Animal Health Production*. 44(7), Pp 1673–1680. Recuperado el 02 de agosto de 2019.
<https://ezproxy.uan.edu.co:2097/article/10.1007/s11250-012-0123-3> Base de datos: Springer.

Gonzalo, Ángel, J. 2015. Sistemas de Ordeño Mecánico (Funcionamiento) – TV Agro. Recuperado el 10 de agosto del 2019
<https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=RG8DKOMc300> TV AGRO.

Martínez, E, P. E. (2015). Evaluación de dos dosis de ozono en el tratamiento de mastitis bovina. *Universidad central del ecuador facultad de medicina veterinaria y zootecnia carrera de medicina veterinaria y zootecnia* Recuperado el 07 de agosto del 2019 <https://pdfs.semanticscholar.org/1c2b/d6fd6a2b1a6dbdca8d9e06588a11a51461a9.pdf> Base de datos: Semanticscholar.

Maua, Y. (2011) Aspectos prácticos del diagnóstico de los patógenos causantes de mastitis. *Laboratorio de microbiología veterinaria DCV - UCLA*. Recuperado el 18 de noviembre del 2020. Página 3

- Olmos, A; García, C; Saés, J & Valdezate, S. (2010). *Procedimientos en microbiología clínica*. Métodos fenotípicos de identificación bacteriana. 1. Pág 7. Recuperado el 20 de noviembre del 2020.
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Ortiz, T; Gutierrez, S; Rodriguez, H & Olivera, M. (2014). Manual de buenas prácticas de ordeño. Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Agrarias. Pág 23-24 Recuperado el 20 de noviembre de 2020
- Picazo, J. (2000). *Procedimientos en microbiología clínica*. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de antimicrobianos. Pág 4-5. Recuperado el 20 de noviembre del 2020.
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Rodríguez Martínez German. (2006). Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. Universidad de La Salle *Rev Med Vet. 2006;(12): 35-55* Recuperado el 11 de noviembre del 2019
<https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1124&context=mv>
- Rodriguez, A & Arenas, R. (2018) *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. Ciudad de México, Vol 16, Pg 166. Recuperado el 20 de noviembre del 2020
- Roman Gustavo, Observaciones sobre la industria lechera en la sabana de Bogotá, *revista de medicina veterinaria ayte. del dpto. de zootecnia* Recuperado el 11 de noviembre del 2019 <https://revistas.unal.edu.co/article/download>
- Ruegg, Pamela. (2018). Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 34(3), Pg 413-425.
Recuperado el 2 de agosto de 2019 de

<https://ezproxy.uan.edu.co:2063/science/article/pii/S0749072018300318> Base de datos: ScienceDirect.

Ruiz, A, F; Tobón, C; Olivera, M. (2010). Detección y seguimiento de la mastitis en un hato de ganado Brahman en el trópico bajo colombiano. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*.25(1). Recuperado el 08 de agosto del 2019.

<https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/324735/2078212>
5 Base de datos: Universidad de Antioquia, Facultad de ciencias agrarias.

Ruiz, R. (2011). Mastitis bacteriana en ganado bovino: Etiología y técnicas de diagnóstico en el laboratorio. *Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes UNAM*.
Recuperado el 07 de agosto del 2019.

http://www.ammveb.net/articulos/Mastitis_bacteriana.pdf Base de datos: UNAM

Savedra, S. (2017). Preparación de medios de cultivo. *Programa de bacteriología y laboratorio clínico*

Salas, P; Calle, S; Falcon, N; Pinto, C & Espinoza, J. (2013). Determinación de residuos de antibióticos betalactámicos mediante un ensayo inmunoenzimático en leche de vacas tratadas contra mastitis. *Revista de investigaciones Veterinarias del Perú*. 24(2).
Recuperado el 2 de agosto de 2019.

http://ezproxy.uan.edu.co:2217/ps/retrieve.do?tabID=T002&resultListType=RESULT_LIST&searchResultsType=SingleTab&searchType=BasicSearchForm¤tPosition=15&docId=GALE%7CA371190631&docType=Article&sort=Relevance&contentSegment=ZSSF&prodId=IFME&contentSet=GALE%7CA371190631&searchId=R3&userGroupName=uanna&inPS=true Base de datos: Gale OneFile: Informe académico.

Sans, S. (2011) Prácticas de Microbiología (2a edición), *Universidad de la Rioja*. I-I.4(Página 20) II-II.2 (Página 42) Recuperado el 20 de noviembre del 2020

Servet. (2020). Test de California. [Tabla 1]. Recuperado el 20 de noviembre del 2020..

<https://www.servetalavera.es/wp-content/uploads/CMT.pdf>

S.N. (2017). Práctica 18. Siembra en agar sangre. Prácticas de microbiología. [Figura 1].

Recuperado el 20 de noviembre del 2020.

<https://fiestadelosmicroorganismos.wordpress.com/2017/02/26/practica-18-siembra-en-agar-sangre/>

Trujillo M; Gallego A; Ramírez N; Palacio L. (2010). Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño, *Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia* Recuperado el 11 de noviembre del 2019.

<https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/324626/20781904>

Velásquez, V, C; Vega, V, J. (2012). Calidad de la leche y mastitis subclínica en establos de la provincia de Huaura, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1).

Recuperado el 10 de agosto del 2019.

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000100008)

91172012000100008 Base de datos: Scielo Perú.

Zimbro, M; Power, D; Miller, S; Wilson, G & Johnson, J. (2009). *Manual of Microbiological Culture Media*. 2nd edition. Sect 3 Pág 345. Recuperado el 20 de noviembre del 2020.

<https://www.trios.cz/wp-content/uploads/sites/149/2016/08/DIFCO-A-BBL-MANUAL-2.pdf>

Anexo 1. Actividad encuesta

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Caracterización de las bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica en fincas lecheras ubicadas en la sabana de Bogotá.

Nombre de la finca	
Dirección de la finca	
Propietario	
Teléfono de contacto	

Número de vacas totales	
Litros de leche al día	
Número de terneros	
Número de vacas en ordeño	

Nº	Procedimiento para el uso de los equipos de ordeño	SI	NO
1	¿El manejo de los equipos y el procedimiento de ordeño es realizado por operarios capacitados ?		
2	¿Los operarios tienen conocimiento de los protocolos que deben seguir al momento del ordeño?		

Nº	Procedimientos de limpieza y desinfección de las vacas a ordeñar.	SI	NO
1	Al inicio del protocolo de ordeño ¿Lava la ubre y cuartos de la vaca con agua?		
2	¿Seca la ubre y los cuartos con toallas de papel?		
3	¿Realiza el pre-sellado de los pezones?		
4	¿Realiza despunte de cada cuarto para implementar la prueba de fondo negro y así descartar presencia de grumos en la leche?		
5	¿Limpia con toallas de papel después de realizar la prueba de fondo negro?		
6	¿Aplica el sellador después de finalizar el proceso de ordeño?		

Nº	Procedimientos de limpieza y desinfección de los equipos de ordeño y salas de ordeño	SI	NO
1	Inmediatamente termina el proceso de ordeño ¿Realiza lavado general del equipo de ordeño con agua tibia para remover los residuos de leche?		
2	Después del lavado general ¿Usa detergente alcalino-clorado para remover las grasas que pueden quedar adheridas después del proceso de ordeño?		

3	¿Enjuaga con un limpiador ácido para eliminar residuos que genera la piedra de leche (depósitos de mineral formados por la leche)?		
4	¿Cuánto tiempo dura el proceso de limpieza y desinfección de los equipos de ordeño?		
5	¿Realiza la correspondiente desinfección de las pezoneras antes y después de cada proceso de ordeño?		
6	¿Realizan lavado con detergente y enjuague de la sala de ordeño?		

Nº	Tratamientos de mastitis clínica	SI	NO
1	¿Tiene vacas con mastitis clínica?		
2	¿Realiza pruebas de CMT periódicamente para detectar mastitis subclínica?		
3	¿Ordeña vacas con mastitis?		
3	Si respondió que sí ordeña el animal con mastitis ¿Mezcla la leche con el resto?		
4	Si respondió que no mezcla la leche con el resto ¿Desecha la leche de la vaca con mastitis?		
5	¿Le han realizado alguna toma de muestra de leche para bacteriología? (detectar el microorganismo que está afectando)		
6	Después del resultado ¿Incorpora los antibióticos indicados por el veterinario para el manejo de la mastitis?		
7	¿Sigue las indicaciones del veterinario a la hora de la administración del antibiótico?		

Nº	Tratamiento de vacas secas que ejercen los ordeñadores en sus fincas	SI	NO
1	¿Realizan tratamiento de vaca seca? ¿Con qué producto?		
2	Antes de realizar algún tipo de tratamiento ¿Realiza la limpieza y desinfección de los pezones?		
3	Si implementan tratamientos intramamarios ¿Reutilizan o descartan las jeringas?		
4	¿Utiliza sellador después de aplicar el tratamiento de secado?		
5	¿Administra sellantes internos o externos?		

Anexo 2. Consentimiento informado



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Consentimiento informado apoderados

Yo _____, una vez informado sobre los procedimientos que se llevaran a cabo, de la importancia de los mismos para la investigación de la caracterización de bacterias causantes de mastitis clínica y subclínica en vacas lecheras en la sabana de Bogotá, otorgo de manera libre mi consentimiento a _____.

- ✓ Permiso el ingreso a el establecimiento
- ✓ Permiso la elaboración de la prueba de CMT (California Mastitis Test)
- ✓ Permiso la toma de muestra de leche de las vacas en ordeño positivas al CMT para que sean evaluadas en el laboratorio

Aceptó realizar la encuesta que es con el objetivo de estudiar los procedimientos en la rutina de ordeño, el funcionamiento de los equipos de ordeño, procedimientos de limpieza y desinfección de equipos de ordeño, corrales y sala de ordeño, tratamientos de mastitis clínica y tratamiento de vacas secas que ejercen los ordeñadores en sus fincas.

Los responsables nombrados anteriormente adquieren el compromiso de entregar los resultados del laboratorio al productor o propietario del establecimiento.

Nombre
Documento

Nombre
Documento

Anexo 3. Planilla para CMT

TEST DE MASTITIS POR CUARTOS

NOMBRE DE LA FINCA: _____

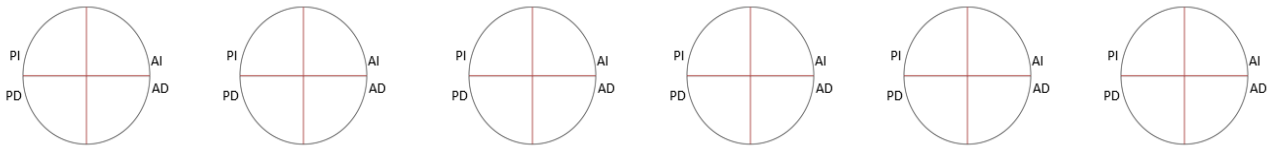
UBICACIÓN: _____

PROPIETARIO: _____

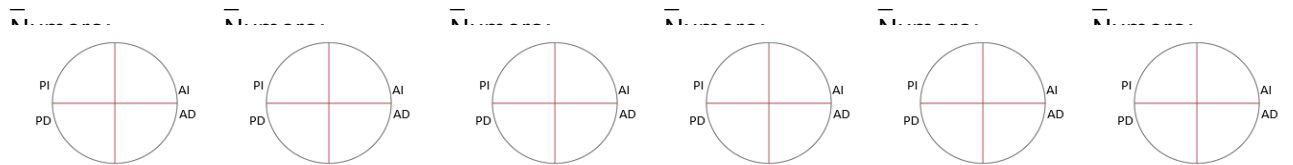
NÚMERO DE VACAS EN
ORDEÑO: _____

Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____

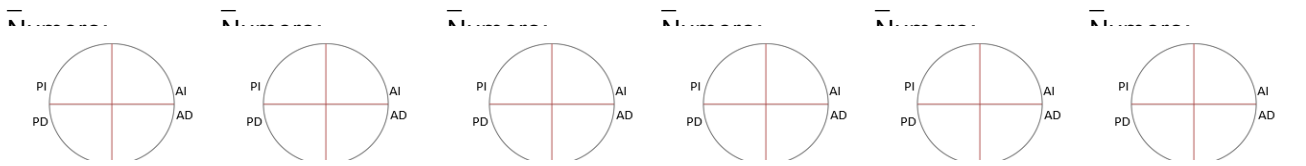
Numero: _____ Numero: _____ Numero: _____ Numero: _____ Numero: _____ Numero: _____



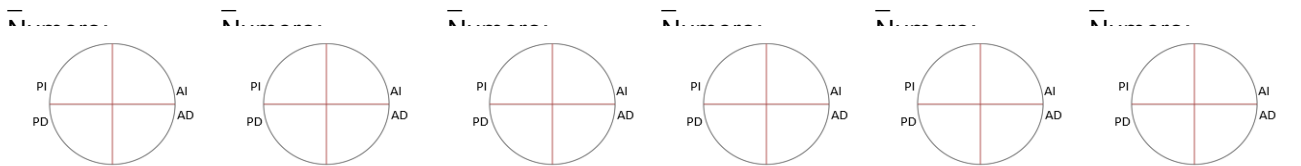
Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____



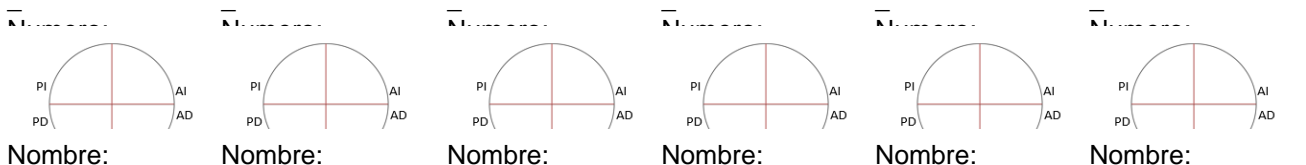
Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____



Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____



Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____



Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____ Nombre: _____

