

# EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO EN EL CONTROL DE LAS MAMITIS BOVINAS

Escobal, I\*; Esnal, A\*; García\*, M<sup>a</sup>; Marco, J.C.\*\*

\* **Análítica Veterinaria.** Aritz Bidea, 18, bajo. 48100 Mungia-Bizkaia. Tfno/Fax: 94/6744251.

\*\* **Dpto. de Sanidad.** Gobierno Vasco. Tfno: 94-4881516.

## I. INTRODUCCIÓN

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

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

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

Desde finales de los años 80, con la progresiva puesta en marcha de los laboratorios interprofesionales en la mayoría de Comunidades Autónomas, se han incluido otros criterios de calidad, además de los relativos a la composición físico-química de la leche, tales como calidad bacteriológica (higiénica), calidad celular (mamitis) y ausencia de inhibidores (antibióticos, antiparasitarios, plaguicidas, desinfectantes, etc..). Como consecuencia, hoy en día existe un soporte suficiente de información sobre la calidad de la leche, así como las condiciones mínimas de receptibilidad de los ganaderos, para que los programas de mejora de calidad de la leche sean viables y rentables.

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

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

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

Establecidos estos criterios, el número genérico de muestras lácteas individuales necesarias para el diagnóstico de la problemática de mamitis sería de 10 en explotaciones de

tamaño pequeño y medio (hasta 50 vacas en ordeño). En explotaciones de mayor tamaño el porcentaje de cuartos a muestrear variará entre 10 y 3 %, siendo menor a medida que aumenta el tamaño del rebaño.

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

- 1.- Lavado del área del esfínter del pezón, sólo en los casos en los que la suciedad sea excesiva.
- 2.- Desinfección del esfínter del pezón con una torunda de algodón impregnada en etanol.
- 3.- Repetir la desinfección si la suciedad observada así lo aconsejara.
- 4.- Desechar los dos primeros chorros de leche emitidos (esta operación podría no realizarse si se quiere estimar infecciones del canal del pezón).
5. Recoger un único chorro de leche, emitido horizontalmente para evitar la contaminación por partículas del aire y/o suciedad, en tubos de boca estrecha y cerrados rápidamente con el tapón, que se habrá mantenido entre los dedos boca abajo.
6. Refrigerar inmediatamente las muestras, o congelarlas si se va a demorar su envío al laboratorio más de 48 horas. Aunque la congelación preserva la mayoría de microorganismos patógenos durante varias semanas, sus principales inconvenientes son los posibles resultados falsos negativos en las mamitis colibacilares, debido a la escasa excreción bacteriana, y la imposibilidad de realizar un recuento celular fiable.

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

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

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

- **Realización del California Mastitis Test (CMT)**, exclusivamente a las vacas preseleccionadas con datos individuales de recuento. Si no existen datos de RCI, se realizará el CMT a la totalidad del efectivo, o a un porcentaje significativo de vacas en ordeño (mínimo 20%), según sea el tamaño de la explotación.

- **Tomar muestras asépticas de cuarterones** con la reacción más intensa al CMT, de las vacas previamente seleccionadas. Si se sospecha la implicación de *S. aureus* y/o *Str. agalactiae*, puede ser aconsejable tomar muestras de los cuatro cuarterones por separado, indicando la reacción correspondiente al CMT. Eso es debido, a que no siempre el cuarto CMT más intenso, es el que alberga la infección.

- **Detección de mamitis crónicas.** Para ello, se llevará a cabo la palpación mamaria para

la detección de lesiones, y se recabará información del ganadero sobre las vacas con episodios de mamitis clínicas de repetición en la misma lactación. (2 o más casos) o en lactaciones consecutivas (3 o más casos). En ambos casos se considerarán vacas con mamitis crónicas.

- **Diagnóstico de nuevas infecciones.** Se obtendrá prioritariamente a partir de las muestras de leche de las vacas de primer parto, con elevaciones del recuento celular (RCI >200.000 cel/ml)

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

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

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

Respecto a las limitaciones señaladas, se propone la toma de varias muestras lácteas en ordeños consecutivos (3-5 muestras, que posteriormente pueden mezclarse en el laboratorio para abaratar el coste del análisis) con el propósito de aumentar la sensibilidad del cultivo, y la congelación inmediata de las misma y su mantenimiento en estas condiciones hasta su envío al laboratorio, para así estimar adecuadamente los niveles de infección.

Este método operativo objetiva la interpretación del cultivo de tanque en base a los niveles detectados, ya que evita que la multiplicación bacteriana por una inadecuada conservación de la muestra de leche de tanque enmascare la presencia de determinados microorganismos y/o proporcione niveles de contaminación de los mismos, alejados del original. Se ha constatado que la muestra suplementada con el conservante azidiol, empleado en la rutina de los análisis de calidad de leche en los laboratorios interprofesionales, es una alternativa muy interesante ya que preserva los niveles iniciales de contaminación por patógenos y en definitiva, estima más aproximadamente la prevalencia de los mismos. De cualquier modo, a nuestro juicio, la ausencia de crecimiento de patógenos contagiosos es una estimación válida de su ausencia y/o baja prevalencia, y por el contrario, niveles elevados de cualquiera de los agentes contagiosos o ambientales, permite considerar un problema relevante ocasionado por los mismos.

### III. EL CULTIVO BACTERIOLÓGICO Y SU INTERPRETACIÓN

La mayoría de microorganismos causantes de mamitis, se encuentran sobre la propia

vaca (piel de la ubre, tracto genital o respiratorio, heces...), así como en el entorno de la misma. Este hecho es un factor primordial a la hora de la interpretación de los aislamientos, de modo que la fiabilidad de los resultados va a ir en función directa a la calidad del muestreo.

En las muestras individuales de leche, nuestra metodología consiste en la utilización de un sólo medio cultivo enriquecido con sangre (Agar sangre: Columbia + 5% de sangre de carnero, o Agar sangre suplementado con esculina, sustrato que permite una primera discriminación de las especies microbianas). El empleo de varios medios selectivos para los diferentes microorganismos (*S. aureus*, otros estafilococos, estreptococos, enterobacterias hongos ...), está desaconsejado por motivos de coste, de dificultad de interpretación (pueden proporcionar cultivo positivos varios microorganismos) y sobre todo no supone una solución a un muestreo defectuoso. Excepción a este comentario sería la solicitud específica de algunos agentes contagiosos, básicamente *Str. agalactiae* (medios TKT, Edwards, Granada ...), *S. aureus* (Baird Parker, Manitol Salt) y *Mycoplasma* (Hayflick), sin embargo, debería simultanearse el cultivo en agar sangre, para evitar que otras infecciones mamarias pasaran desapercibidas.

Respecto al volumen de inóculo, 10 µl (0,01 ml), proporciona una sensibilidad del cultivo de 100 ufc/ml., y bajo nuestro punto de vista, en las condiciones habituales es la mejor alternativa. Incrementar el volumen, conduce a una mayor proliferación de contaminantes; sin embargo, ante la sospecha de mamitis colibacilares y/o el cultivo de algunos agentes en medios selectivos, se puede incrementar el volumen hasta 100 µl (0,1 ml), con lo que la sensibilidad aumenta (10 ufc/ml). Como medida para incrementar la sensibilidad del cultivo, se ha propuesto la preincubación de las muestras de leche, de modo que el cultivo permita la detección de microorganismos excretados por debajo del valor umbral del mismo. Consiste en el enriquecimiento del cultivo mediante incubación a 37°C durante 18 horas, de la propia leche, o de una dilución de la misma al 1/10. Como inconveniente de esta práctica, es que permite también la multiplicación de posibles contaminantes, de modo que sólo es válida ante una correcta recogida de la muestra.

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

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

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

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

- La etiología de las mamitis es por una sola especie microbiana. Varios autores han informado, y nuestra experiencia así corrobora, que más del 90% de infecciones de un cuarterón son producidas por un solo microorganismo, y rara vez por dos o tres (aprox. 5% y 1% respectivamente). Como excepción, en las mamitis de verano es común la plurietiología, asociándose *A. pyogenes* a varios anaerobios (*P. indolicus*, *Bacteroides* spp ...).

- La mayor densidad del cultivo no se asocia necesariamente con la gravedad de la infección. La excreción bacteriana es variable en la propia dinámica de la infección, y concretamente en las mamitis colibacilares la reacción inflamatoria puede incluso ocasionar la desaparición total de las bacterias.

- La negatividad del cultivo puede atribuirse a varios aspectos, algunos ya comentados. De índole etiológica, destacan las mamitis por enterobacterias, microorganismos inhabituales y/o de crecimiento lento; no obstante, la principal causa es la aplicación de tratamiento antibióticos en las horas previas al muestreo.

- Muestras contaminadas: se definen como tales las que contienen tres o más tipos microbianos (excepción ya avanzada de las mamitis de verano). La única alternativa que vemos factible en estas muestras, es la de intentar discriminar la presencia de *Str. agalactiae*, por su carácter de patógeno mamario estricto, y de *S. aureus*, siempre que se observen varias colonias de morfología compatible. En ningún caso se recomienda la identificación y el antibiograma correspondiente de microorganismos cuya procedencia pueda ser ambiental, ya que los resultados muy probablemente contribuirán a tomar decisiones erróneas.

- Solicitud de cultivos específicos para microorganismos inhabituales (hongos, micoplasmas, *Nocardia* ...). Hay que partir de la base, que la riqueza del medio general (agar sangre) es suficiente para su aislamiento. Como excepción, los microorganismos anaerobios, pero no por un déficit nutricional del agar sangre, sino por causa de sus condiciones especiales de incubación. De cualquier modo, se expone a continuación algunas de las características de las mamitis por microorganismos de baja prevalencia (< 1% del total de aislamientos), cuyo aislamiento suele ser esporádico.

a) Mamitis fúngica: son muy inusuales, y en la inmensa mayoría de casos como consecuencia de la aplicación antihigiénica de cánulas intramamarias. Debe desecharse la idea de la relación causa-efecto entre la contaminación de los piensos, ensilados o forrajes y en particular por hongos, con la presentación episodios clínicos de mamitis clínica. Después de investigar varias sospechas en este sentido, y de revisar la literatura existente, cabe la posibilidad de que cualquier cambio nutricional produzca un efecto inmunosupresor (con los ensilados está constatado), y que mamitis subclínicas evolucionen a clínicas. Sin embargo en el análisis bacteriológico de éstas, se aíslan microorganismos habituales, mientras que en muestras recogidas no asépticamente, se constatan contaminantes (*Bacillus*, enterobacterias, y ocasionalmente especies saprófitas de hongos).

En las mamitis fúngicas verdaderas, si se trata de levaduras, se ha descrito la posible eliminación natural de la infección, aunque se puede favorecer la curación recurriendo a especialidades antifúngicas. Los casos más graves son los ocasionados por *Aspergillus fumigatus*, y sus posibilidades de curación muy reducidas.

b) Mamitis por micoplasmas. Los brotes clínicos pueden sospecharse por la aparición de varios casos de mamitis clínicas purulentas que comprometen a varios cuarterones. Pueden existir síntomas asociados de artritis y neumonía. La primera verificación, consiste en el análisis de los casos clínicos, así como de muestras de mezcla de los cuatro cuarterones de vacas de nueva incorporación, que en muchos casos son las responsables de la introducción de la infección.

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

c) Mamitis por *Leptospira*. Son compatibles los casos de mamitis hemorrágicas, acompañados de fiebre y otros signos de infección sistémica. En las vacas recién paridas, puede acontecer la rotura de vasos sanguíneos y eliminación de leche hemorrágica por alguno de los cuarterones. Realice el CMT, y ante reacciones positivas puede solicitar cultivo convencional y si hay varios casos simultáneamente el análisis de *Leptospira*.

d) Mamitis clínicas purulentas. Además de los casos clásicos de mamitis de verano, se debe sospechar de microorganismos anaerobios cuando la leche mamítica proporciona olores desagradables. En cualquier caso, la solicitud de cultivo de *Nocardia*, algas del G° *Prototheca*, micobacterias, debería efectuarse sólo en casos clínicos con induración mamaria y fibrosis difusa y ante la negatividad de cultivo de los microorganismos habituales.

#### IV. EL ANTIBIOGRAMA

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

La decisión sobre el antimicrobiano a emplear en lactación, una vez cumplido el requisito de sensibilidad “in vitro”, debe tomarse considerando la clasificación de la actividad base de los antimicrobianos y los aspectos farmacocinéticos según su potencial de distribución en la ubre, tras su administración parenteral e intramamaria propuestos por Ziv (1980), que se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1: Actividad y farmacocinética de los antimicrobianos empleados en el tratamiento de la mamitis bovina**

Antimicrobiano	Actividad				Distribución mamaria	
	Estreptococos	Estafilococos	Enterobacterias	Micoplasmas	Parenteral	Intramamaria
Penicilina G	+++	+	-	-	++	++
Penetamato	+++	+	-	-	+++	+++
Ampicilina	+++	+	+ / ++	-	++	+++
Amox + Clavulanico.	+++	+++	+++	-	++	+++
Cloxacilina	++	+++	-	-	++	++
Cefalosporinas 1ª / 2ª	+++	+++	+ / ++	-	++	++
Cefalosporinas 3ª / 4ª	++	++	+++	-	++	++
Estreptomina	+	++	+	-	+	+
Kanamicina/Neomicina	+	++ / +++	++	-	+	+
Gentamicina	+	+++	++	-	+	+
Quinolonas 1ª (Flumequine)	-	+++	++	-	++	?
Quinolonas 3ª (enrofloxacin)	+ / -	+++	+++	+++	+++	?
Oxytetraciclina	+	++	+ / ++	++ / +++	++	++
Macrólidos/lincosamidas	+ / ++	+++	-	+++	+++	+++
Sulfamidas	+	+++	++ / +++	-	++ / +++	+++
Rifampicina	++	++	-	-	?	+++
Novobiocina	+	+++	-	-	++	+++
Colistina	-	-	+++	-	+	+

Actividad: +++: excelente; ++: Aceptable; +: baja; -: Muy baja/nula;

Distribución: +++: Buena; ++: Limitada; +: Baja

A efectos prácticos, y una vez desechados temporalmente los antibióticos que muestren resistencias, se deben recomendar como primera elección de tratamiento de las mamitis clínicas, aquellas formulaciones que posean principios activos clasificados en el antibiograma como sensibles, y cumplan los requisitos antes mencionados. Además, dos son los aspectos a tener en cuenta “a posteriori”: que la curación de las infecciones por *S. aureus* es sensiblemente inferior al resto de agentes, a pesar de la sensibilidad en el antibiograma, y que regularmente se deben realizar muestreos periódicos para evaluar modificaciones en los patrones de sensibilidad del

antibiograma.

La elección del tratamiento de secado, se basará principalmente en la etiología predominante de las mamitis subclínicas.

**Bibliografía recomendada**

Farnsworth, R.J. Microbiological examination of bulk tank milk. update on Bovine mastitis. *Veterinary Clinics of North America*. Vol 9: nº 3: 469-474. (1993)

Marco, J.C; Luengo, Y.; Pérez del Río, M.C. Aportaciones al conocimiento de la situación actual de las mamitis bovinas en Bizkaia. *Diputación Foral de Bizkaia*. (1990).

Poutrel, B. Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthode de controle. En *Les mammites bovines*. Recueil de Médecine Vétérinaire. Nº special: 495-511. (1985).

Ziv, G. Drug selection and use in mastitis: systemic vs. local therapy. *J.A.V.M.A*.176. (1980).