

# INCUBACION DE LA LECHE Y COMPARACION DE DOS MUESTREOS EN EL DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE LA MASTITIS. <sup>a</sup>

Laura E. Zapata Salinas <sup>b</sup>  
 Marcelo Perez Dominguez <sup>c</sup>

## RESUMEN

Se tomaron muestras estériles de 38 vacas en dos días consecutivos. Se realizó el análisis bacteriológico y se les aplicó el conteo de células somáticas por microscopía directa. El porcentaje de cuartos individuales que resultaron no infectados en muestras incubadas y no incubadas fue del 34% y 29%. En muestras incubadas, se obtuvo 32% de no infectadas y 42% en las no incubadas. Para cuartos individuales se detectaron 66% (sin incubar) y 71% (incubadas), de muestras infectadas. En muestras compuestas los porcentajes de infección en muestras sin incubar fueron de un 58% e incubadas del 68%. Se concluye que las leches se deben incubar antes, pues en el análisis bacteriológico existe una mayor recuperación de microorganismos diferentes a *Streptococcus* y que afectan a la glándula mamaria. Para *Streptococcus agalactiae* no hubo diferencias entre el tipo y número de muestras analizadas, la incubación antes de la siembra no tuvo ningún efecto en el aislamiento y por lo tanto, su diagnóstico es confiable si se aísla de una muestra compuesta recién tomada.

La industria lechera en México ha padecido, a lo largo de su desarrollo histórico, un gran número de problemas producto de su deficiente organi-

zación, y ha provocado un escaso desarrollo y una inadecuada vinculación con respecto a las necesidades reales del país. El Plan Nacional de Desarrollo 1983-1988<sup>6</sup>, en atención a esta problemática impulsará entre otras acciones la productividad y la modernización de la producción pecuaria, mediante las campañas zoonosanitarias y de interés epidemiológico.

Uno de los problemas más importantes que enfrenta esta industria, es la presencia de mastitis en los hatos lecheros causante de cuantiosas pérdidas económicas calculadas en siete mil millones de pesos anuales<sup>6,10</sup>. Estas infecciones tienen su origen cuando los microorganismos (virus, micoplasmas y bacterias) invaden la glándula mamaria. Otro posible origen es uso equivocado o indiscriminado de antibióticos que propician la aparición de agentes patógenos resistentes a éstos. Por lo antes descrito y para evitar o disminuir las pérdidas económicas provocadas por la mastitis, es necesario un diagnóstico eficaz, preciso y oportuno de la misma, sobre todo en los casos

<sup>a</sup> Recibido para su publicación el 12 de noviembre de 1987.

<sup>b</sup> Centro Nal. de Invest. en Microbiología. Proyecto Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes. Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, D.F., A.P. 41-652. C.P. 05110.

<sup>c</sup> Proyecto Mastitis - Minerales. INIFAP. Sector Pecuario. Km. 15.5 Carretera México-Toluca. C.P. 05110.

de presentación subclínica donde se utilizan las pruebas de California, Wisconsin y conteo de células somáticas en la leche<sup>8</sup> -

En la actualidad existen controversias entre los criterios a seguir para determinar cuándo una glándula mamaria esta infectada; estas divergencias existen tanto en los procedimientos de muestreo como en el diagnóstico bacteriológico. Por un lado, algunos autores sugieren que el análisis bacteriológico de una sola muestra de leche es suficiente para establecer el estado infectivo de la glándula mamaria<sup>4</sup>, mientras que otros opinan que el aislamiento de la misma bacteria, en dos muestreos consecutivos, es indispensable para considerarla infectada<sup>7</sup>. El análisis basado en una sola muestra de leche de los cuatro cuartos<sup>5</sup>. se contrapone con el análisis con muestras individuales de cada glándula mamaria.

Otros autores mencionan que hay más posibilidad de contaminar las muestras en pruebas individuales cuando se toma una sola muestra de leche. Por el contrario, cuando el número de bacterias infectantes sea tan baja entonces la leche de esa muestra, al mezclarse con la de los otros cuartos, se diluirá y disminuirá así la posibilidad de detectar a las bacterias<sup>1</sup>.

Existen también diferentes opiniones en cuanto a la conveniencia de incubar o no las muestras de leche antes de sembrarlas. Algunos autores dicen que las muestras deben conservar-

se frías o sembrarse en un lapso no mayor de 24 h<sup>1,3</sup>. Otros sugieren incubar las muestras a 37°C antes de sembrarse, esto permite el crecimiento de las bacterias, pues incrementa las posibilidades de ser identificadas<sup>8</sup>.

El objetivo es determinar cuál de los métodos descritos es más eficaz para detectar los agentes etiológicos infectantes de la glándula mamaria en los hatos lecheros.

Se identificará el organismo infectivo (o infectante), bajo las siguientes condiciones: a) Con un solo muestreo de leche de los cuatro cuartos (muestra compuesta), b) Con dos muestreos de leche (uno cada 24 h) de los cuatro cuartos (muestra compuesta), c) Con un muestreo individual de cada cuarto, d) Con dos muestreos (uno cada 24 h) individuales de cada cuarto, e) Comparación cuantitativa de la identificación de bacterias en muestras de leche no incubadas e incubadas, f) Se relacionará el contenido celular somático de la leche con el estado infectivo basado en los criterios arriba mencionados.

Se muestrearon 176 vacas en dos hatos, uno en Texcoco, Edo. de México y el otro en Tula, Hgo. Las muestras de leche fueron tomadas en la ordeña vespertina. Se realizó el enjuagado y secado perfecto de la ubre. El mealo del pezón se desinfectó con alcohol al 70%. El ordeño y toma de las muestras se hizo de acuerdo a las normas recomendadas por el National Mastitis Council<sup>1</sup>.

Se obtuvieron muestras individuales de leche de cada cuarto y también una muestra compuesta (de los cuatro cuartos). Los muestreos se realizaron dos días seguidos. Se obtuvieron los primeros chorros de leche en tubos estériles con tapón de rosca y se colocaron en cajas térmicas de poliuretano con hielo. De inmediato se transportaron al laboratorio y se conservaron en refrigeración (4°C). Al día siguiente se sembraron en agar sangre y se incubaron las leches a 37°C durante 4 h para sembrarse de nuevo en el agar.

Los criterios para considerar una vaca infectada fueron los establecidos en los objetivos y la identificación del género y especie de las bacterias se hizo de acuerdo a lo establecido por el National Mastitis Council<sup>1</sup>.

A todas las muestras de leche se les realizó un conteo celular somático di-

recto por medio de la tinción de Broadhurst<sup>2</sup>. Se hizo el análisis estadístico por medio de un modelo de efectos fijos, y los parámetros analizados fueron: incubación, ubre y muestreo y la doble y triple interacción entre ellos, sobre la respuesta de infección (positiva, negativa).

También se hizo la prueba de varianza<sup>9</sup>. El número de células somáticas fueron transformadas a su logaritmo natural y se correlacionaron con la infección de la glándula mamaria.

Los resultados en el Cuadro 1 presentan el porcentaje de infección basado en uno y dos muestreos incubados y sin incubar de la glándula mamaria en general y de muestras por cuarto, en donde muestras sin incubar, de un muestreo, sin infección de cuartos individuales obtuvo un 44%; en muestras compuestas un 29%. En el caso de dos

CUADRO I.- PORCENTAJE DE INFECCION BASADO EN DIFERENTES CRITERIOS\*

ESTADO INFECTIVO	MUESTRAS SIN INCUBAR				MUESTRAS INCUBADAS			
	UN MUESTREO		DOS MUESTREOS		UN MUESTREO		DOS MUESTREOS	
	C. I.	M. C.	C. I.	M. C.	C. I.	M. C.	C. I.	M. C.
	3	4	3	4	3	4	3	4
NO INFECCION	44 (67)	29 (11)	59 (90)	42 (16)	32 (49)	10 (4)	51 (77)	31 (12)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16 (25)	32 (12)	12 (19)	29 (11)	16 (25)	32 (12)	15 (23)	29 (11)
<i>Staphylococcus</i> spp	4 (6)	10 (4)	3 (4)	5 (2)	6 (10)	10 (4)	3 (4)	5 (2)
<i>Corynebacterium bovis</i>	31 (47)	21 (8)	26 (39)	21 (8)	33 (51)	26 (10)	30 (46)	29 (11)
<i>Corynebacterium</i> spp	---	---	---	---	1 (1)	---	---	---
<i>Micrococcus</i> spp	2 (3)	5 (2)	---	3 (1)	4 (6)	5 (2)	---	3 (1)
<i>Bacillus</i> spp	1 (1)	3 (1)	---	---	1 (1)	3 (1)	---	---
G -	1 (1)	---	---	---	5 (9)	10 (4)	1 (2)	---
<i>Lactobacillus</i> spp	---	---	---	---	---	3 (1)	---	3 (1)
Levaduras	1 (2)	---	---	---	1 (1)	---	---	---
T O T A L	100 (152)	100 (39)	100 (152)	100 (38)	99 (152)	99 (38)	100 (152)	100 (38)

\*1 y 2 MUESTREOS SIN INCUBAR E INCUBADAS

C.I. = Cuarto individual = muestra de cada glándula mamaria

M.C. = muestra compuesta = muestra de las 4 glándulas

( ) = Número de muestras.

CUADRO II.- PROMEDIO DE CELULAS SOMATICAS AL COMPARAR MUESTRAS SIN INCUBAR EN UNO Y DOS MUESTREOS.

ESTADO INFECTIVO	MUESTRAS SIN INCUBAR			
	UN MUESTREO		DOS MUESTREOS	
	C. I.	M. C.	C. I.	M. C.
	$\bar{x}$ Célis. Som.	$\bar{x}$ Célis. Som.	$\bar{x}$ Célis. Som.	$\bar{x}$ Célis. Som.
NO INFECCION	723,076 ( 9.77)	19,913(11.02)	1,911,462(10.53)	539,232(10.65)
<u>Streptococcus agalactiae</u>	25,910,329(15.92)	19,538,899(15.94)	26,618,021(15.72)	21,144,373(15.96)
<u>Staphylococcus spp</u>	350,317(12.23)	199,939(12.06)	455,722(12.43)	190,659(11.96)
<u>Corynebacterium bovis</u>	432,527(11.53)	189,506(10.17)	280,934(11.43)	374,343(11.97)
<u>Corynebacterium spp</u>	—	—	—	—
<u>Micrococcus spp</u>	86,303(10.77)	79,053(10.83)	—	288,314(12.57)
<u>Bacillus spp</u>	55,302(10.92)	7,130,364(15.77)	—	—
G-	0 ( 0 )	—	—	—
<u>Lactobacillus spp</u>	—	—	—	—
Levadura	162,758(11.77)	—	—	—

$\bar{x}$  céls. Som. - Promedio de células somáticas

(ln) - Logaritmo natural.

C.I. y M.C. - Igual cuadro I

CUADRO III.- PROMEDIO DE CELULAS SOMATICAS AL COMPARAR MUESTRAS INCUBADAS EN UNO Y DOS MUESTREOS.

ESTADO INFECTIVO	MUESTRAS INCUBADAS			
	UN MUESTREO		DOS MUESTREOS	
	C. I.	M. C.	C. I.	M. C.
	$\bar{x}$ Célis. Som.	$\bar{x}$ Célis. Som.	$\bar{x}$ Célis. Som.	$\bar{x}$ Célis. Som.
NO INFECCION	946,749( 9.50)	37,201(10.47)	1,760,333(10.30)	666,275(1.34)
<u>Streptococcus agalactiae</u>	22,960,388(15.73)	19,538,899(15.83)	21,372,839(15.62)	21,144,373(15.96)
<u>Staphylococcus spp</u>	245,532(11.77)	181,358(11.85)	455,722(12.43)	190,659(11.96)
<u>Corynebacterium bovis</u>	1,854,765(11.71)	158,107(10.60)	1,995,715(11.41)	328,051(12.02)
<u>Corynebacterium spp</u>	37,201(10.52)	—	—	—
<u>Micrococcus spp</u>	158,107(10.85)	223,206(12.23)	—	188,314(12.57)
<u>Bacillus spp</u>	55,302(10.92)	7,130,364(15.77)	—	—
G -	41,851( 8.03)	90,679(10.73)	18,600( 5.26)	—
<u>Lactobacillus spp</u>	—	18,600( 9.83)	—	18,600( 9.83)
Levadura	260,413(12.47)	—	—	—

$\bar{x}$  Célis. som. = Promedio de células somáticas.

(ln) = Logaritmo natural

C.I. y M.C. = Igual cuadro I

CUADRO IV.- INCUBACION.

MUESTREO	NO			SI			PROP.
	U	B	R E	U	B	R E	
	INDIVIDUAL COMPLETA PROP.			INDIVIDUAL COMPLETA PROP.			
1	.4408 (152)	.2895 ( 38)	.4105 (190)	.3224 (152)	.1053 ( 38)	.2789 (190)	.3447 (380)
2	.5921 ((52)	.4211 ( 38)	.5579 (190)	.5066 (152)	.3158 ( 38)	.4684 (190)	.5132 (380)
PROP.	.5164 (304)	.3553 ( 76)	.4842 (380)	.4145 (309)	.2105 ( 76)	.3737 (380)	.4289 (260)

CUADRO V.- ANALISIS DE VARIANZA.

ORIGEN DE LA VARIANZA	gl,	c.m.
Incubación (I)	1	2.3211**
Ubre (U)	1	4.0530**
I x U	1	0.0555
Muestreo (M)	1	5.3395**
I X M	1	0.0841
U X M	1	0.0003
I X U X M	1	0.0162
Error	752	0.023

\*\*Significativo  $P < .01$   
 gl.= grados de libertad.  
 c.m.=cuadrados medios.

muestras sin incubar de cuartos individuales y sin infección fue de un 59% y en muestras compuestas 42%. En donde se incubaron las muestras por 4 h con un muestreo sin infección se tiene un 32% y en muestras compuestas un 10% sin infección; con dos muestras de cuartos individuales tenemos un 51% sin infección y en muestras compuestas un 31% sin infección.

El mismo criterio se aplicó en el caso en que se lograron aislar microorganismos con mayor frecuencia co-

mo fue el caso de: *Corynebacterium bovis* en un 31% de muestras sin incubar y de un muestreo de cuartos individuales; de muestreos sin incubar de muestras compuestas se aisló en un 21%, de dos muestreos sin incubar de cuartos individuales 26% y de muestras compuestas de dos muestreos sin incubar un 21%. Para las muestras incubadas por 4 h se aisló de un muestreo 33% de cuartos individuales; de un muestreo de los cuatro cuartos 26%, de dos muestreos incubados 30% de cuartos individuales y un 29% de muestras compuestas.

*Streptococcus agalactiae* se obtuvo de muestras sin incubar de uno y dos muestreos de cuartos individuales y de muestras compuestas, un 16% de cuartos individuales y 32% de muestras compuestas; el 12% de dos muestreos de cuartos individuales y 29% de muestras compuestas. En muestras incubadas de un muestreo 16% de cuartos individuales y un 32% de muestras compuestas; de dos muestreos 15% de cuartos individuales y un 29% de muestras compuestas. En menor proporción se aislaron otras bacterias como *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Bacillus* spp, levaduras y gram negativos.

De uno y dos muestreos no hubo una diferencia representativa en cuanto a los microorganismos aislados pero al incubar las muestras, hay mayor recuperación de microorganismos como son *Micrococcus* spp, gram negativos, *Lactobacillus* spp, *Corynebacterium* spp, *Bacillus* spp.

En cuanto a células somáticas Cuadro 2 y 3 se observó que sin infección de un muestreo de cuartos individuales el  $\bar{x}$  de células somáticas fue de 723,076, en muestras compuestas de un muestreo sin incubar un  $\bar{x}$  de 19,913; de los muestreos de cuartos individuales sin incubar el  $\bar{x}$  de 1,911,462 y en muestras compuestas de dos muestreos sin incubar un  $\bar{x}$  de 539,232.

Para el caso de incubación de la muestra por 4 h se obtuvo sin infección de un muestreo de cuartos indi-

viduales un  $\bar{x}$  de células somáticas de 946,749 y en muestras compuestas 37,201; de dos muestreos de cuartos individuales incubados el  $\bar{x}$  es de 1,760,333 y en muestras compuestas de 666,275 células somáticas.

En lo referente a los aislamientos se puede decir, que tanto en muestras sin incubar como en incubadas fueron los *Streptococcus agalactiae* y los *Corynebacterium bovis* los que alcanzaron los mayores valores de células somáticas junto con sus logaritmos naturales ya que en el caso de *Streptococcus agalactiae* en muestras sin incubar de uno y dos muestreos se obtuvo de cuartos individuales 25,910,329 con un logaritmo de (15.92), en muestras compuestas 19,538,899 y un ln de (15.84), de dos muestreos de cuartos individuales 26,618,021 y un Le (15.72), en muestras compuestas 21,144,373 y un Le (15.96) en muestras incubadas por 4 h de un muestreo de cuartos individuales fue de 22,960,588 y un ln (15.78), en muestras compuestas 19,538,899 y un ln (15.83); de dos muestreos de cuartos individuales 21,372,839 y un ln (15.62) y de muestras compuestas de 21,144,373 con un ln (15.96).

Los *Corynebacterium bovis* de un muestreo sin incubar de cuartos individuales se obtuvo 432,527  $\bar{x}$  de células somáticas y un ln (11.53), en muestras compuestas sin incubar y de un muestreo se obtuvo un  $\bar{x}$  de 189,506 y un ln (10.17); de dos muestreos en cuartos individuales se obtuvo un  $\bar{x}$  de

280,934 con un ln (11.43), y en muestras compuestas de 374,343 células somáticas y un ln (11.97). En muestras incubadas por 4 h de un muestreo de cuartos individuales se obtuvo un  $\bar{x}$  de 1,854,765 con un ln (11.71) en muestras compuestas el  $\bar{x}$  fue de 158,107 y su Le (10.60); de dos muestreos incubados, para cuartos individuales fue el  $\bar{x}$  de 1,995,715 con un ln (11.41), en muestras compuestas de 328,051 células somáticas y un ln (12.02).

En el caso de las otras bacterias como son *Staphylococcus* spp, *Micrococcus* spp, *Bacillus* spp, gram negativos, levaduras y *Lactobacillus* spp el  $\bar{x}$  de células somáticas y logaritmos naturales (ln) estuvieron por abajo del promedio de las 300,000 células al igual que su ln, excepto en una muestra compuesta de un muestreo sin incubar *Bacillus* spp alcanzó un  $\bar{x}$  de células somáticas de 7,130,364 con un ln (15.77).

Como se puede apreciar a pesar de que en algunos casos el  $\bar{x}$  de células somáticas se vio elevado, su ln se mantuvo estable en los casos de incubada o no la leche a excepción de *Streptococcus agalactiae* que en muestras incubadas y sin incubar el  $\bar{x}$  de células fue el mismo.

Con base en el estudio estadístico por medio de efectos fijos el Cuadro 4 nos muestra las proporciones generales para la variable infección con respuesta (positiva, negativa) y el Cuadro 5 el análisis de varianza, donde se

observaron diferencias estadísticas en los efectos principales ( $P < 01$ ), la no incubación fue inferior a la incubación (48.9% contra 37%), ubre individual fue superior a ubre completa (47% contra 28%) y un muestreo 51% contra 34% de dos muestreos; no se encontraron diferencias estadísticas ( $P > .05$ ) en las interacciones entre efectos.

En los resultados obtenidos, tanto en muestras compuestas como en cuartos individuales, se observó un incremento significativo de glándulas mamaria no infectadas al tomar en cuenta el diagnóstico basado en dos muestras, por lo tanto disminuye el número de animales infectados con microorganismos no patógenos.

En cuanto a la toma de dos muestras el margen de error se ve disminuido y la influencia de contaminación puede eliminarse. El número de cuartos infectados es similar en los cuatro casos. El conteo de células somáticas es similar al de otros estudios<sup>8</sup>.

En el único caso donde no hubo cambios en el diagnóstico fue el de *Streptococcus agalactiae*.

Por lo anterior se concluye que se puede muestrear en dos formas de acuerdo al microorganismo que se pretenda aislar.

- 1) Para el caso de *Streptococcus agalactiae* se recomienda: a) Tomar una sola muestra (un solo día). b) Tomar leche de los cuatro cuartos (muestra compuesta). c) No incubar la leche.

- 2) Para aislar otras bacterias y diagnosticarlas como causantes de mastitis es necesario: a) Tomar dos muestras consecutivas (por dos días). b) Las muestras son por cuarto (muestreo individual). c) Incubarlas por 4 h y sembrar.

#### SUMMARY

This work was realized to due the different opinions about taking one or two milk samples, and the convenience of incubating the milk samples or not before the bacteriological analysis. Sterile samples from 38 cows were taken during two consecutive days. Next day the samples were seeded and incubated during four hours before seeding them again. Results showed 34% and 29% of non-infected individual quarters for incubated and non incubated samples the percentage of non infected was of 32%, and 42% for non-incubated. The samples with infection for individual quarters without incubating were 66% and 71% in compound samples or by cow, the samples without incubating was 58%, and 68% for those incubated. It can be concluded that milk samples must be incubated previously, because during the bacteriological assays a great recovery of microorganisms can be seen. For *Streptococcus agalactiae* there were not differences for the type and number of analyzed samples; the incubation before seeding had no effect on the isolation and the diagnosis.

#### LITERATURA CITADA

1. BROWN, R.W., BARNUM, D.A., JASPER, E.D. McDONALD, J.S. and SCHULZE W.C., 1981. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis, 2th ed. **National Mastitis Council Inc.** Washington, D.C.
2. CAMPOS, R.V., CASTILLO, R.F., MURILLO, S.E., PEREZ, D.M. y VELAZQUEZ, Q.F., 1981. Manual de Técnicas para el análisis físico-químico de la leche. INIFAP-SARH.
3. CARTER, G.R., 1978. Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology 2th ed. **Charles C. Thomas**, Springfield Illinois. USA. p.254.
4. JASPER, J.E. DELLINGER, J.D. and BUSHNELL, R.R., 1974. Agreement of duplicate samples of milk for the evaluation of quarter infection. **Am. J. Vet. Res.** 5: 1371.
5. MORSE, F.G., 1967. Studies of bovine mastitis. A bacteriological and correct method of culturing milk, for the detection of udder infection. Proceedings of the 71st Annual Meeting. United States Livestock Sanitary. ASSN USA p. 596.
6. PEREZ, M., 1982. Manual sobre ganado productor de leche. 1a. ed. **Editorial Diana**. México, D. F.
7. POSTLE, D.F., 1976. Observations on bacteriologic isolations from paire of quarter milk samples JAVMA, 168: 220.
8. SCHALM, O.W., CARROL, E.J. and JAIN, N.C., 1971. Bovine Mastitis. **Lea & Febiger**, Philadelphia USA pp. 94, 158 y 182.
9. SNEDECOR, G.W. and COCHRAN, W.G., 1973. Statistical Methods. 6th ed. the Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA p. 22.
10. TREJO, J.R., 1978. Consideraciones económicas de los efectos de la mastitis sobre la producción de leche. Curso de Actualización sobre Mastitis Bovina UNAM p. 27.