



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

Trabajo de Tesis

**Aislamiento de bacterias patógenas asociadas
a la presencia de mastitis, en vacas lecheras
de la finca Santa Rosa, junio-julio 2023**

Autores

Br. Javier Alfonso Flores Vélchez
Br. Denier Jurangel Urbina Álvarez

Asesor

Lic. Junior Chavarría Rivera MV.

Managua, Nicaragua
Septiembre, 2023



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

Trabajo de Tesis

Aislamiento de bacterias patógenas asociadas a la presencia de mastitis, en vacas lecheras de la finca Santa Rosa, Junio-Julio 2023

Autores

Br. Javier Alfonso Flores Vélchez
Br. Denier Jurangel Urbina Álvarez

Asesor

Lic. Junior Chavarría Rivera MV.

Presentado a la consideración del honorable comité
evaluador como requisito final para optar al grado de
Médico Veterinario en grado de licenciatura

Managua, Nicaragua
Septiembre, 2023

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por la decanatura de la Facultad de Ciencia Animal como requisito final para optar al título profesional de:

Médico Veterinario en grado de licenciatura

Miembros del Comité Evaluador

MSc. Deleana Vanegas
Presidente

MSc. Martha Rayo Rodríguez
Secretario

MSc. Varinia del Socorro Paredes
Vocal

Lugar y fecha: Managua, Nicaragua, 5 de Octubre 2023

DEDICATORIA

A **Dios**, en primer lugar, por la Sabiduría y fuerza de voluntad que me ha dado para seguir moviéndome a pesar de las adversidades.

A **mis padres** en especial a madre **Desely Alvares Obregón** y abuelos por el apoyo incondicional.

También a mis **hermanas, amigos y compañeros** que hicieron realidad esta tesis.

A mi **padraastro** por asesorarme y apoyarme en esta etapa de mi vida.

Denier Jurangel Urbina Álvarez

DEDICATORIA

Primero a **Dios** padre celestial por haberme dado la sabiduría para poder lograr culminar mis estudios, seguir en el camino del bien y no apartarme de él a pesar de todo.

A mi madre **Alba Rosa Vélchez Molina** que me brinda diariamente su apoyo incondicional, su amor maternal, sus consejos y su cobijo, que me sirve de ejemplo del profesional, padre de familia y calidad de persona que aspiro a ser.

A mi Abuela **Bernarda Pastora Molina Mendoza** por ser más que una madre conmigo, por haberme amado y corregido de pequeño, por enseñarme lo linda que es la vida con los abuelos, por haberme preparado para ser una persona independiente que se vale por sí misma.

A mi hermana **Lidia Pastora Flores Vélchez** por apoyarme en mi día a día, cuidar de mi como una amorosa hermana mayor y aconsejarme con la sabiduría de una misma.

A **Doña Amanda Vega**, por aconsejarme cada vez de tener la oportunidad, por motivarme, insistir y no rendirse con sus consejos que ayudaron mucho en mi crecimiento como persona.

Javier Alfonso Flores Vélchez

AGRADECIMIENTO

Agradecemos nuestro asesor de tesis, **Lic. Junior Chavarría Rivera MV** por brindarnos su valioso tiempo y comprensión, por guiarnos en el camino a seguir para lograr terminar esta etapa de la vida tan desafiante.

Agradecer a la **Universidad Nacional Agraria** por el voto de confianza y formar parte de este proyecto, facilitándonos las instalaciones como el laboratorio de Bromatología y Microbiología y el Centro académico de formación práctica bovino (CAFoP), también por aportar los recursos de materiales e insumos para dicha investigación.

Al Licenciado **César Quintero**, encargado del laboratorio Bromatología y Microbiología, por su apoyo incondicional y desinteresado, por enseñarnos y apoyarnos durante todo el proceso que conllevo la realización de este trabajo.

A los **colegas** que nos apoyaron en nuestra fase de campo, volviendo un poco más ligero y llevadero el trabajo.

Y a todos nuestros maestros por las lecciones que nos llevaron a la formación como Médico Veterinario.

Denier Jurangel Urbina Álvarez

Javier Alfonso Flores Vélchez

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCION	PAGINA
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	III
INDICE DE CONTENIDO	IV
INDICE DE CUADROS	V
INDICE FIGURAS	VI
INDICE ANEXOS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivo especifico	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
IV. MATERIALES Y METODOS	20
4.1 Ubicación del área de estudio	20
4.2 Diseño metodológico	20
4.3 Manejo del ensayo y metodología	21
4.4 Variables a evaluar	25
4.5 Materiales e instrumentos	26
V. RESULTADOS Y DISCUSION	27
VI. CONCLUSIONES	34
VII. RECOMENDACIONES	35
VIII. LITERATURA CITADA	36
IX. ANEXOS	41

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Variables a evaluar	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Ubicación del establecimiento del estudio	20
2.	Diagrama de la toma de muestra en leche cruda	22
3.	Algoritmo de identificación bacteriana	24
4.	Colonia de <i>Staphilococcus aureus</i> en Agar sangre 5%	27
5.	Colonia de <i>Corynobacterium spp</i>	28
6.	Colonia de <i>Klebsiella spp</i> en Agar MacConkey	29
7.	Frecuencia de bacterias según su tipo	30

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Preparación y especificación del agar MacConkey	41
2.	Preparación y especificación del Triple Azúcar Hierro (TSI)	42
3.	Preparación y especificación del citrato de SIMMONS	43
4.	Identificación macroscópica de <i>Klebsiella spp</i>	44
5.	Identificación macroscópica de <i>Corynebacterium spp</i>	44
6.	Identificación macroscópica <i>Staphilococcus aureus</i>	44
7.	Siembra en medios de cultivos agar sangre 5% y McC	44
8.	Preparación de los medios , área sucia	45
9.	Clarificación agar MacConkey	45
10.	Base cerebro corazón para agar 5%	45
11.	Medios utilizados en la investigación	45
12.	Limpieza y desinfección de los cuartos mamarios	46
13.	Toma de muestra leche cruda	46
14.	Vertimiento de agares sangre 5% y MacConkey	46
15.	Inoculación de agentes en agar triple azúcar	46

RESUMEN

El presente es un estudio no experimental, de corte transversal y alcance descriptivo, en donde pretendemos determinar la presencia de bacterias causantes de mastitis en bovinos, del Centro académico de formación práctica bovino (CAFoP), de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Para esto se realizaron estudios microbiológicos convencionales a muestras de leche extraídas al 100% de vacas en lactancia (30 animales); La toma de muestra y análisis de laboratorio se realizaron según las técnicas y algoritmos diagnósticos sugeridos por NMC (2017). Se reportaron crecimientos bacterianos en el 6 % de las muestras procesadas. Del 100% de muestras con crecimiento se identificó que el 60% correspondía a *Staphylococcus aureus*, seguido de *Corynebacterium spp* y *Klebsiella spp* ambas con 20%. Se determinó que el agente causal con mayor frecuencia de aislamiento fue *Staphylococcus aureus*, un agente que tiene más hábitat naturales que la mayoría de las bacterias que poseen acción patógena en la glándula mamaria, causa posible por la que este resultado se comparte con estudios similares realizados en la región; por su parte, *Klebsiella spp* y *Corynebacter spp*, se reportan, casi siempre, como producto de la contaminación del hombre y las malas prácticas higiénicas durante el ordeño, En consideración de que la principal fuente de contaminación descrita es esta, resulta lógico afirmar que la escasa aplicación de las Buenas Prácticas de Ordeño (BPO), pudiese ser la causa principal de la aparición de esta bacteria en los resultados de aislamiento; finalmente producto del estudio se consideró que es necesario el uso de otras pruebas bioquímicas de identificación como las validadas por Ruiz et al (2011), para la identificación de la bacteria *Corynebacter spp*.

Palabras Claves: leche, infección intramamaria, ordeño, lechería, vacas lactantes.

ABSTRACT

The present is a non-experimental study, with a cross-sectional section and a descriptive scope, which sought to determine the presence of bacteria causing mastitis in cattle from the Academic Center for Bovine Practical Training (CAFOP), of the National Agrarian University (UNA). For this, conventional microbiological studies were carried out on samples of milk extracted from 100% of lactating cows (30 animals); Sample collection and laboratory analysis were carried out according to the diagnostic techniques and algorithms suggested by NMC (2017). Bacterial growths were reported in 6% of the processed samples. Of the 100% of samples with growth, 60% were identified as *Staphylococcus aureus*, followed by *Corynebacterium spp* and *Klebsiella spp*, both with 20%. It is determined that the causal agent with the highest frequency of isolation was *Staphylococcus aureus*, an agent that has more natural habitat than the majority of bacteria that have pathogenic action in the mammary gland, a possible reason why this result is shared with similar studies carried out in the region; For their part, *Klebsiella spp* and *Corynebacterium spp* are almost always reported as a product of human contamination and poor hygienic practices during milking. Considering that the main source of contamination described is this, it is logical to affirm that poor application of Good Milking Practices (BPO), could be the main cause of the appearance of this bacteria in the isolation results; Finally, as a result of the study, it is considered necessary to use other biochemical identification tests such as those validated by Ruiz et al (2011), for the identification of the bacteria *Corynebacterium spp*.

Keywords: Milk, Intramammary infection, Milking, Dairy, Lactating cows.

I. INTRODUCCIÓN

En 2022 Pro Nicaragua, manifestó:

Nicaragua es un país centroamericano, altamente agropecuario, dentro de los rubros más importantes esta la producción cárnica y láctea. El sector ganadero y lácteo de Nicaragua aporta el 25 % del PIB y genera 650.000 empleos entre formales e informales en un país de 6,5 millones de habitantes, según datos de la Federación de Asociaciones Ganaderas de Nicaragua. (Pág. 2).

Otras fuentes como Ionita 2022 mencionó que:

En Nicaragua en el 2022 se estimó un crecimiento de 3% en la producción de leche, con 401,4 millones de galones y se esperan ingresos por exportación de 231\$ millones, en Nicaragua diariamente se ordeñan un total de 1,2 millones de vacas, de esta producción láctea el 61% se vende como leche fluida, el 36% se destina a la producción de productos derivados de la leche y el 3% se consume en las fincas. (Pág. 1).

La leche y sus derivados son productos importantes en la dieta de los nicaragüenses y sirve como fuente de ingresos para la población rural, a pesar de los problemas que enfrenta el sector.

Se han afirmado que existen “aproximadamente 140 especies de bacterias causantes de mastitis, que se dividen en patógenos, contagiosos y ambientales; dentro de los primeros, los principales son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma*; siendo su principal vía de entrada al canal del pezón” (Radostitset al., 2002 como se citó en Sánchez, 2015 pag.1).

En 2008, Gómez ha presentó el siguiente argumento:

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, que reduce la producción del volumen de leche, alterando su composición, incluso su sabor, además de elevar su carga bacteriana normal. Esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas a la industria lechera. Aunque en muchos casos hay tumefacción, calor, dolor y endurecimiento de la glándula mamaria, la mastitis no se identifica fácilmente, ni por examen visual ni por leche obtenida en la copa de ordeño. (Pág.176).

En 2006, Florencia ha descrito:

Los factores que predisponen a la presentación de la mastitis se encuentran: Mala rutina de ordeño o mala higiene en el ordeño, un funcionamiento erróneo de la ordeñadora, la existencia de heridas en los pezones y la presencia de patógenos en el ambiente que rodea a las vacas, otros factores determinantes son las situaciones de estrés como: las etapas de lactancia, climáticas, nutricionales, etc. (Pág.4).

En el presente estudio pretendemos determinar, mediante la aplicación de pruebas microbiológicas fenotípicas y bioquímicas, la presencia de los diferentes tipos de bacterias causantes de mastitis en el CAFoP – Bovino de la UNA; del mismo modo, se pretende analizar los posibles factores que favorecen la permanencia y diseminación de dichas bacterias.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la presencia de bacterias patógenas asociadas a la mastitis, en vacas lecheras encontradas en el centro académico de formación práctica bovino (CAFoP), de la Universidad Nacional Agraria (UNA).

2.1. Objetivos específicos

Identificar los tipos de bacterias causantes de mastitis, presentes en el CAFOP bovino, mediante la aplicación de pruebas microbiológicas fenotípicas y bioquímicas.

Calcular, según su tipo, la frecuencia de aislamiento de bacterias causantes de mastitis bovina en el CAFoP de la UNA.

Describir los posibles factores que favorecen la presencia de bacterias, causantes de mastitis, en leche cruda de bovinos en producción del CAFoP de bovino.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Mastitis Bovina

La mastitis es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria y es comúnmente una consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a la glándula a través del canal del pezón. Se caracteriza por diferentes cambios ya sea físicos o químicos de la glándula mamaria (Bolaños et al., 2012 como se citó en Sánchez, 2015 pag.1).

3.1.1 Etiología

En (2008) Gómez ha indicado:

La principal causa de esta enfermedad es infecciosa, aunque existen otras. Son diversos los agentes infecciosos productores de mastitis. En los bovinos los agentes comúnmente encontrados son: **Bacterias**, como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Nocardia asteroides*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Fusobacterium sp.*; **algas**, como *Prototheca sp.*; **hongos**, como *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon sp.* y *Candida sp.*; además de **levaduras**, como *Cryptococcus neoformans*, etcétera. (Pág. 176).

3.1.2 Patogenia

La infección intramamaria se presenta luego de que los microorganismos causantes de mastitis hayan penetrado en el canal del pezón se hayan multiplicado en el tejido productor de leche y hayan liberado toxinas La presencia de lo anterior y otros componentes provoca una serie de procesos inmunológicos en que los leucocitos (glóbulos blancos) se mueven desde el flujo sanguíneo hacia la leche para destruir a los microorganismos invasores. Asimismo, ingresan fluidos, suero de la sangre y del sistema linfático al cuarto infectado para diluir las toxinas bacterianas siendo esta la respuesta inflamatoria. (Philpot, et al., 2000, como se citó en Araúz 2022, Pág.6).

3.1.3 Clasificación de la mastitis

Ploog (2014) las mastitis se dividen en:

Mastitis Sub Clínica:

En esta fase hay una pequeña inflamación de la glándula mamaria, pero la leche y el cuarto tienen una apariencia normal. La vaca parece saludable, la ubre no muestra ningún signo de inflamación. A pesar de ello, los microorganismos y células blancas de la leche (células somáticas) que combaten las infecciones se encuentran elevados en gran número en la leche. (Pág. 1).

Mastitis clínica:

En los casos de mastitis clínica, el cuarto infectado en general se inflama, en algunas vacas se encuentra dolorido al tocarlo, la leche se encuentra visiblemente alterada por la presencia de coágulos, descamaciones, o suero descolorido y algunas veces sangre. En casos más severos (mastitis aguda), la vaca muestra signos generalizados: fiebre, pulso acelerado, pérdida de apetito, reducción aguda de la producción de leche. (Pág.1).

3.1.4 Factores pre disponentes

Condiciones en la estabulación

Según Zurita (2004) explica que:

Existen varios factores relacionados con la estabulación y particularmente con las condiciones de la cama del animal. Entre los más importantes están los traumatismos en la región mamaria, las lesiones de los pezones, que frecuentemente son colonizadas por estafilococos y/o estreptococos y se transforman en importantes reservorios de estos patógenos... cuando existen estas lesiones, se produce un aumento en la incidencia de mastitis y particularmente de la forma clínica de la enfermedad. Se han realizado varios estudios relacionados con las condiciones de la cama del animal y su incidencia en la enfermedad. (Pág. 2).

Etapa de lactancia

Existe un incremento de recuento de células somáticas en las primeras y últimas semanas de lactancia, distintos autores postulan que sería provocado por una mayor o menor dilución, asociada a las variaciones que experimenta la producción durante la lactancia. Es importante mencionar que, también se ha demostrado que el aumento en las infecciones intramamaria juega un papel importante en esta curva, ya que animales bacteriológicamente negativos no presentarían un aumento notorio de células somáticas (Laevens y col 1997 como se citó en Rivera 2014 Pág. 19).

Genética

La prueba de la relación entre el Recuento de células somáticas y la presencia de mastitis clínica la dan algunos estudios, la mayoría realizados por países escandinavos, que han estimado una correlación genética medianamente alta, alrededor del 70%. Este valor sugiere que hay una relación de orden genético entre la presencia de mastitis clínica y el RCS y que este último puede utilizarse como criterio de selección. Así, la selección genética de vacas con bajos Screening Cromosómico Completo (CCS) y la eliminación de 17 toros con hijas predispuestas a altos RCS se ha propuesto como un método para reducir la incidencia de mastitis. (Velásquez 2012, como se citó en Díaz, 2020 Pág.16).

Higiene durante el ordeño

En (2007) Solis describe:

Es importante realizar los procedimientos de higiene durante el ordeño como, lavado de la ubre y pezones con agua potable, desinfectantes, secado con toallas desechables antes de cada ordeño, higiene de la unidad de ordeño con especial atención en el interior de las pezoneras mediante la aplicación de chorro de agua y desinfección o sellado de los pezones con material que haya mostrado capacidad para bloquear el crecimiento y desarrollo microbiano, previenen la transmisión de microorganismos entre vacas y disminuye la población microbiana sobre la piel del pezón (Pág. 11).

3.2 Bacterias causantes de mastitis

3.2.1 Bacterias Gram Positivas

Staphylococcus aureus

En (2014) Calonge puntualiza:

El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo Gram positivo que pertenece al orden Bacillales, Familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*. Dentro del género se han descrito 48 especies. Los miembros del género *Staphylococcus* son cocos inmóviles que crecen formando racimos, generalmente anaerobios facultativos catalasa positivos. Son capaces de crecer en un amplio rango de ph y temperaturas y *S. aureus*, además, a altas concentraciones de cloruro sódico. La mayoría de las especies forman parte de la microbiota bacteriana existente en la piel y mucosas del hombre y los animales (primates, ungulados, carnívoros, roedores, lagomorfos, marsupiales y aves). (Pág. 17).

Staphylococcus Coagulasa-Negativa (SCN)

“Es un grupo muy versátil de estafilococos que podría afectar la salud de la ubre. Son cocos Gram-positivos con perfil coagulasa negativo. Algunos miembros de este grupo muestran un patrón hemolítico y otros no son hemolíticos. Este grupo incluye especies comunes de *Staphylococcus* como *Chromogenes*, *haemolyticus*, *simulans*, *equorum* y *epidermidis* asociadas comúnmente con el animal en nichos extra mamarios, y/o el medio ambiente, con una heterogeneidad amplia en las cepas aisladas dentro de un rebaño. La transmisión se produce por la contaminación de la ubre con el patógeno a través del contacto con el medio ambiente, las herramientas y las manos de los ordeñadores”. (Aguilar y Álvarez 2019 Pág.88).

Streptococcus agalactiae

“La fuente principal son las ubres infectadas, amígdalas y lesiones en la piel” (Pinzón, 1989). Puede ser contagiado de una vaca a otra durante el ordeño y las vacas pueden también llegar a ser infectadas por el medio ambiente. Este patógeno es muy capaz de sobrevivir en la boca, vagina y piel de los animales saludables que pastan. Debido a su situación medioambiental, los métodos de higiene normales y la terapia del antibiótico son menos eficaces previniendo las infecciones por *Streptococcus dysgalactiae* que las infecciones por otro patógeno contagioso (Vasi et al., 2000; Song et al., 2001 como se citó en Rivera 2014 Pág.16).

Streptococcus dysgalactiae

En (2017) National Mastitis Council Inc, detalla lo siguiente:

El *Streptococcus dysgalactiae* es un coco Gram-positivo, catalasa negativa, Generalmente es subclínica, estas infecciones son transitorias y no causan daños serios. Otros estreptococos, como el *uberis*, se localizan en piel y superficie de la ubre, así como en vejiga y vagina. Generalmente no se transmite de vaca a vaca durante el ordeño. (Pág.34).

Streptococcus uberis

Como Sánchez. y Argüello (2015) expresa en su texto:

El *Streptococcus uberis* se encuentra mayormente en la piel de la ubre de las tetas. Es un coco Gram-positivo, catalasa-negativo, facultativo anaerobio, no-beta-hemolítico que no forma esporas, y se organiza en cadenas cortas. Estos son organismos ambientales comúnmente encontrados en el estiércol y otras materias orgánicas, incluyendo el lecho. (Pág.13).

Enterococcus spp

Según National Mastitis Council, Inc. (2017) enuncia en su manual:

El *Enterococcus spp* son cocos Gram positivos, están involucradas en la mastitis bovina incluyen *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis* (anteriormente *S. faecalis*), *E. faecium* (anteriormente llamada *S. faecium*), *E. gallinarum* y *E. saccharolyticus* (anteriormente llamada *S. saccharolyticus*). Estos organismos han sido aislados del tracto intestinal, estiércol, infectados ubres, alimento, cama y en el ambiente lechero en general. Los informes sugieren que los síntomas clínicos y subclínicos mastitis por *Enterococcus spp* puede representar del 8 al 13% de todas las infecciones intramamarias bovinas. (Pág.41).

3.2.2 Bacterias Gram Negativas

Escherichia coli

De acuerdo con Musto (2013) alude que el género *Escherichia*:

Tiene cinco especies siendo la más común *Escherichia coli*, un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo prevalente en la flora intestinal del hombre y los animales de sangre caliente. Este microorganismo tiene características que le permiten vencer las defensas del huésped, ganar la competencia con otras bacterias de la flora intestinal y sobrevivir al medio colónico. (Pág.57).

Klebsiella spp

Según Hidalgo (2020) este género comprende 5 especies:

Klebsiella. pneumoniae, oxytaca, planticola, ozaenae, y rhinoscleromaas. Los patógenos más frecuentes son: *K. pneumoniae* y *K. oxytaca*. Ambos son bacilos Gram negativos inmóviles, capsulados, fermentadores de la lactosa y Voges-Proskauer positivo. *K. oxytaca* es, al contrario que *K. pneumoniae*, indol positivo, Catalasa positivo conocida como patógeno ambiental que repetidamente es aislada en granjas de ganado lechero. Crece bien en los medios de cultivo ricos en nutrientes, como el agar sangre y el agar chocolate. (Pág. 14).

Pseudomonas spp

Castillo (2015) especifica que el género:

Pseudomonas spp y otros como *Burkholderia* y *Stenotrophomonas* se encuentran estrechamente relacionados y constituyen un grupo que a menudo se denominan *pseudomonadales* . La mayoría de las cepas de este género son móviles gracias a la presencia de uno o más flagelos polares y suelen ser citocromo oxidasa positivos. El microorganismo más importante es *Pseudomonas aeruginosa*. Los miembros de este género se encuentran en el agua, suelos y plantas. Comúnmente ha sido encontrada en el entorno de granjas, particularmente en los suministros de agua y especialmente en la usada para el lavado de la ubre en el pre ordeño. (Pág.57).

Proteus spp

García (2013) indica que:

Proteo spp. puede llegar a producir colonias de enjambre gris que pueden cubrir toda la superficie de los medios en una placa de Petri. Los aislados producen un olor pútrido y las colonias no son hemolíticas. Puede residir en el entorno de la vaca en la cama, el alimento y el agua. (Pág.107).

Mycoplasma Bovis

Gómez (2008) afirma que *Mycoplasma bovis*:

Es un germen causante de brotes agudos de mastitis que, en su totalidad son incurables con la terapia conocida; la recuperación espontánea de los animales es la única opción de desaparecer la infección. Produce mastitis, en general, produce descenso agudo de la producción láctea. La eliminación de los animales afectados previa identificación es recomendable. Es un grupo pleomórfico de bacterias que carecen de la pared celular alrededor de su membrana celular que pueden aislarse de los tractos respiratorio y urogenital, sitios que pueden ser el reservorio primario y propagarse de vaca a vaca a través de la transmisión de aerosoles e invadir la ubre después de la bacteriemia; es una forma de mastitis. (Pág.177).

3.3 Pruebas estándares de identificación microbiológica

3.3.1 Medios de cultivos enriquecidos

Agar sangre

Este medio de cultivo es muy útil en los análisis microbiológicos, ya que, al ser un agar rico en nutriente, favorece el crecimiento de bacterias exigentes, además de dar una visualización clara de aquellas que hacen hemolisis, dando otro indicador para la diferenciación bacteriana. En este medio las virtudes de la peptona, la tripteina, el extracto de corazón y el extracto de malta para obtener colonias eugónicas. El agregado de 5% de sangre ovina, promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales (Laboratorios Britania s.a., 2021).

Agar infusión cerebro corazón

Medio solidó muy rico en nutrientes, ideal para el cultivo de múltiples tipos de bacterias y hongos, incluyendo aquellos de difícil desarrollo, las principales de nutrientes, nitrógenos, vitaminas y la fuente de carbono, están dados por la infusión de corazón vacuno, infusión de cerebro de ternera y la peptona. El agar cerebro corazón mantiene los mismos principios de los caldos de cerebro corazón solo con el añadido del agar para volverlo un medio sólido, este medio es ideal para el cultivo de estreptococos y otras bacterias exigentes. Se puede suplementar con sangre bovina o de cordero al 5% para permitir el desarrollo de hongos de difícil crecimiento o bacterias con un gran requerimiento nutricional. (Laboratorios Britania s.a., 2021).

3.3.2 Medios de cultivos selectivos

Agar MacConkey

Medio de cultivo usado idealmente para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos, todo esto hecho a partir de muestras clínicas, agua y alimentos, en este medio de cultivo, las peptonas aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa actúa como el hidrato de carbono fermentable, mientras que la mezcla de sales biliares y cristales de violetas sirven como agentes selectivos que inhiben el desarrollo de la flora Gram positivo (Laboratorios Britania s.a., 2021).

3.4 Pruebas bioquímicas

3.4.1 Agar Urea Base

Medio de agar que contiene peptona y dextrosa tamponada en contenido reducido. Este medio apoya el crecimiento de una manera ventajosa para los bacilos entéricos Gram-Negativos y fácilmente permite la observación de Ureasa. Este medio se puede usar en conjunto al TSI para la eficiente selección de colonias bacterianas de *Salmonella* y *Shigella*. La producción de urea es una prueba diferencial importante en la microbiología estándar. (Neogen culture Media, 2019).

3.4.2 Agar Sulfuro –Indol-Movilidad (SIM)

Usado en la diferenciación laboratorial de microorganismos productores de Indol, sulfuro de hidrógeno y en la movilidad en un entorno semisólido controlado, todas estas pruebas tienen una elevada utilidad a la hora de identificación y diferenciación de enterobacterias, especialmente en la *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* (NEOGEN culture Media, 2019).

3.4.3 Agar Lisina Hierro

Es un agar usado específicamente para la diferenciación de microorganismos, especialmente para *Salmonella spp.*, está basado en la decarboxilación y diseminación de la lisina, como también en la producción de ácido sulfhídrico. En este medio de cultivo es la peptona y el extracto de levadura aporta los nutrientes para el desarrollo bacteriano, la glucosa viene siendo el hidrato de carbono fermentable y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasas y deaminasa. Los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico son el citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio. El indicador de pH es el púrpura de bromocresol. (Laboratorios Britania s.a., 2021).

3.4.4 Agar Citrato de SIMMONS

Este agar por norma general es usado en la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía, en este medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno, y el citrato de sodio es la única fuente de carbono, ambos componentes considerados necesarios para el desarrollo microbiológico (Laboratorio Britania s.a., 2021).

3.4.5 Agar Motilidad Indol Ornitina (M.I.O)

El medio Motilidad-Indol-Ornitina es ampliamente utilizado para la diferenciación de los bacilos entéricos Gram-Negativos sobre la producción de indol, la actividad de la enzima Ornitina y decarboxilasa junto a la capacidad de motilidad, la actividad de Ornitina se manifiesta como un viraje hacia el color púrpura, en tanto la ausencia de dicha enzima produce un viraje de color amarillo, la motilidad es ampliamente observada como un desplazamiento en el desarrollo de la bacteria desde el punto de inoculación de la misma hacia distintas áreas del agar. Mientras que la producción de indol se verifica mediante la adición de algunas gotas de reactivo Kovacs en la superficie del medio (VALTEK S.A, 2018).

3.4.6 Agar caldo nutritivo

Medio no selectivo, contiene pluripectona (una mezcla de partes iguales de peptona de carne y de caseína) y extracto de carne que constituyen la fuente de carbono y nitrógeno necesarias para el adecuado desarrollo bacteriano. Puede ser utilizado, además, como pre enriquecimiento en la búsqueda de *Salmonella spp.* A partir de alimentos, ya que permite recuperar células dañadas, diluir metabolitos tóxicos y sustancias inhibitorias. Medio de cultivo utilizado para propósitos generales, para el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales. (Laboratorios Britania s.a., 2021).

3.4.7 Agar S.S (*Salmonella spp* y *Shigella spp*)

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial. La selectividad, está dada por la sal biliar y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los *coliformes* y el desarrollo invasor del *Proteus spp.* Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. (Casado y Torrico, 2012, pág. 16).

3.4.8 Agar C.L.E.D (Cistina Lactosa Electrolito Deficiente)

El medio C.L.E.D. (Cistina Lactosa Electrólito Deficiente) está recomendado para el recuento e identificación presuntiva de los microorganismos de las vías urinarias. Su bajo contenido en electrolitos evita la invasión de los cultivos por *Proteus spp.* La presencia de lactosa en su composición le confiere el carácter de medio diferencial, aunque la interpretación sea diferente al anterior medio por la incorporación de otro indicador: el azul de bromotimol. Las colonias lactosa positivas aparecerán de color amarillo y las lactosas negativas lo harán con un color verdoso, blanco o azulado. (Casado González y Torrico Cabezas, 2012, pág. 171).

3.5 Tinciones

3.5.1 Tinción GRAM

Prueba de laboratorio clásica y primaria utilizada para visualizar la morfología de las bacterias, también a su vez sirve para diferenciar las bacterias en 2 grupos, Gram + y Gram- todo esto basado en su fundamento de la coloración de las bacterias, todo esto sucede dependiendo de la composición y estructura de la pared bacteriana, ya que los colorantes usados durante este procedimiento se unen a la pared celular de la bacteria siendo dicha pared más soluble en bacterias Gram- que en Gram + dándoles de esta forma su diferenciación por color (González et al 2020, pág. 84).

3.6 Pruebas Serológicas

3.6.1 Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Guzmán (2007) detalla es un ensayo inmunoabsorbente:

El ensayo está ligado a enzimas y utiliza, como sus siglas lo indican, una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30 000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido. Algunos de los protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo. (Pág.1).

3.6.2 Reacción en cadena de las polimerasas (PCR)

Según Tamay y Velasquillo (2017) define al PCR como una técnica de laboratorio:

Esta técnica Permite la producción (amplificación) rápida de millones a miles de millones de un segmento específico de ADN, que así se podrá estudiar en mayor detalle. La PCR implica el uso de fragmentos cortos de ADN sintético, denominados cebadores, para seleccionar un segmento del genoma que se amplificará, y luego múltiples sesiones de síntesis de ADN para amplificar ese segmento. La amplificación del ADN nos permite estudiar la molécula del ADN en detalle en el laboratorio. (pág.2).

3.7 Otras pruebas Bioquímicas

3.7.1 Prueba INDOL

La prueba de indol es un ensayo cualitativo utilizado para diferenciar microorganismos en base a la capacidad para separar indol a partir de L-triptofano. Es necesario el crecimiento previo del microorganismo en estudio en medios de cultivo con alto contenido de L-triptofano, como ser los medios semisólidos SIM Medio Britania y MIO o el medio líquido Agua Triptona. Al agregar el reactivo de Ehrlich al medio de cultivo, el indol generado se combina con el grupo aldehído del p-dimetilamino benzaldehído del reactivo incorporado y se forma un complejo de color rojo. (Laboratorios britania s.a., 2021).

3.7.2 Rojo de metilo y Voges Proskauer

Proskauer (2011). alude que estas pruebas:

Se realizan para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía ácido mixta o con producción de un producto final neutro (acetoína) por la vía butanodiólica. El Caldo R.M.V.P. Polipeptona 7,0 g, Glucosa 5,0 g, Fosfato dipotásico 5,0 g, Agua destilada 1000,0 mL. El resultado de Prueba de Voges Proskauer: La aparición de un color rosado constituye una reacción positiva indicadora de la presencia de acetoína, producto de la fermentación de la glucosa. El resultado Prueba de Rojo de Metilo: Una coloración roja, indicadora de la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de la glucosa, constituye un resultado positivo, una coloración amarilla constituye una reacción negativa. (Pág.3).

3.7.3 Prueba de fermentación del manitol

Krug (2017) cataloga al Agar-Manitol como un medio salado:

Es un medio altamente selectivo para aislamiento de estafilococos patógenos en cultivos mixtos. Este medio aprovecha la capacidad de los estafilococos de desarrollarse en presencia de una alta concentración de NaCl (7,5%) y la del estafilococo aureus de fermentar el manitol. Las colonias de estafilococo aureus forman un halo amarillo en el Agar circulante, lo que indica la producción de ácido a partir del Manitol (Pág.3).

3.7.4 Prueba de CAMP

Olmos (2010) relata que esta sirve principalmente para:

Determinar la capacidad de un microorganismo para producir una proteína conocida como factor CAMP. La proteína produce un efecto sinérgico con la β -hemolisina de *S. aureus* sobre eritrocitos ovinos y bovinos que se observa como un fenómeno ilitico en la interseccion de los dos microorganismos cuando se siembran en proximidad. Como alternativa se puede utilizar el CAMP inverso. En esta prueba la hemolisis producida por algunos microorganismos se inhibe por la β -hemolisina de *S. aureus* (por ejemplo, la produccion de fosfolipasa D de *Arcanobacterium haemolyticum* o la fosfolipasa E de *Rhodococcus spp.*) (Pág.8).

3.7.5 Prueba Oxidasa

Cernero y Canton (2011) plantean que:

La prueba oxidasa sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Solo aplica en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerúfila (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa. (Pág. 6).

3.7.6 Prueba Catalasa

Bello y Velázquez (2015) recalcaron que la Catalasa:

Es un reactivo utilizado en la prueba, es el peróxido de hidrogeno al 30% y tomar una prueba de bacteria a partir de una colonia aislada si se observara el burbujeo generalmente intenso significa que hay producción de oxígeno por lo tanto se entiende que hay presencia de enzima catalasa. La catalasa es una enzima que posee la mayoría de bacterias aeróbicas descompone el peróxido de hidrogeno agua y oxígeno. (Pág.55).

3.7.7 Prueba Coagulasa

Femat y Pérez (2017) destacan que la prueba Coagulasa:

Es una proteína producida por varios microorganismos que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina. Un resultado de coagulasa positivo indica que la muestra contiene *Staphylococcus aureus*. La coagulasa reacciona con la protrombina en la sangre. El complejo resultante se llama estafilotrombina, y permite que la enzima proteasa convierta el fibrinógeno en fibrina. Esto hace que se coagule la sangre. La coagulasa estrechamente relacionada con la superficie de la bacteria *S. aureus* y puede revestir su superficie con fibrina al entrar en contacto con la sangre. (Pág.3).

3.7.8 Sistemas miniaturizados API

Gutiérrez (2010) señala que los sistemas miniaturizados API®:

Son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo con el tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación del hidrólisis de la gelatina, entre otras. Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos Gram negativos. Es una galería conformada por 20 microtubos. (Pág.1).

3.7.9 Sistema Microgen GN A y GN B

Hooker (2009) ha menciona que las tiras reactivas de micropocillos GN A y GN B:

Se utilizan juntas para producir un sistema de 24 sustratos para identificar bacilos Gram negativos no fastidiosos (oxidasa negativa y positiva) además de todas las actualmente especies reconocidas de la familia Enterobacteriaceae (28 géneros). La permutación de los sustratos metabolizados se puede interpretar utilizando el Software del sistema de identificación Microgen (MID-60) para identificar el organismo de prueba. La tira de prueba de micropocillos GN A está diseñada para la identificación de oxidasa negativa, nitrato positivo fermentadores de glucosa que comprenden los géneros más comunes de la familia Enterobacteriaceae. (Pág.20)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el Centro Académico de formación práctica bovina (CAFoP – Bovino) y el Laboratorio de Bromatología, ambos ubicados en la Facultad de Ciencia Animal perteneciente a la Universidad Nacional Agraria (UNA) y que se encuentra en el departamento de Managua; sobre la pista Sabana Grande – Mercado Mayoreo en las Coordenadas 12°08'15.6" Latitud Norte y 86°09'57.4" longitud Oeste. La temperatura promedio anual es de 34 °C. La altitud de 83 msnm y con unas precipitaciones anuales de 5,000 mm.



Figura 1: Ubicación del establecimiento del estudio
Fuente: (Google maps, 2023)

4.2. Diseño metodológico

La presente investigación es de tipo no experimental, de corte transversal y alcance descriptivo y con esta se pretendió realizar pruebas microbiológicas convencionales para el cultivo y aislamiento de bacterias que se han reportado como causantes de mastitis en vacas lecheras.

Se seleccionaron el total de vacas en lactancia, que en el momento del estudio incluía a 30 animales, a los cuales se le extrajeron muestras de leche de sus cuartos mamarios individualmente; para los animales que se incluyeron en el ensayo se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

- Vaca en lactancia.
- Sin alteraciones morfológicas y funcionales en sus cuartos mamarios.

Criterios de exclusión:

- Animales bajo tratamientos antibióticos o enfermedad clínica
- Alteraciones morfológicas y funcionales que comprometan sus cuartos mamarios.
- Vaca de categorías diferentes a la lactancia.

4.3. Manejo del ensayo y metodología

El estudio se realizó en dos etapas: campo y laboratorio, la primera contempló los procedimientos de toma de muestra, embalaje y transporte al laboratorio, y la segunda etapa consistió en la realización de los ensayos microbiológicos para el cultivo, aislamiento e identificación de bacterias. Ambas etapas estuvieron regidas por los procedimientos y las técnicas sugeridas por la National Mastitis Council (NMC) en el Manual de Laboratorio Handbook Mastitis Bovina (2017).

Debido a la capacidad del laboratorio para el procesamiento de muestras, los muestreos y procesamiento se realizaron con cinco individuos por semana hasta completar el total de animales en lactancia.

4.3.1 Fase de campo

Toma de muestra

La recolección de muestras se realizó acorde al procedimiento descrito por la NMC (2017), la cantidad de muestra sugerida fue de dos a cinco mililitros (ml), por cada cuarto mamario, una vez recolectados fueron almacenados en frascos estériles y conservados en un termo con hielo.

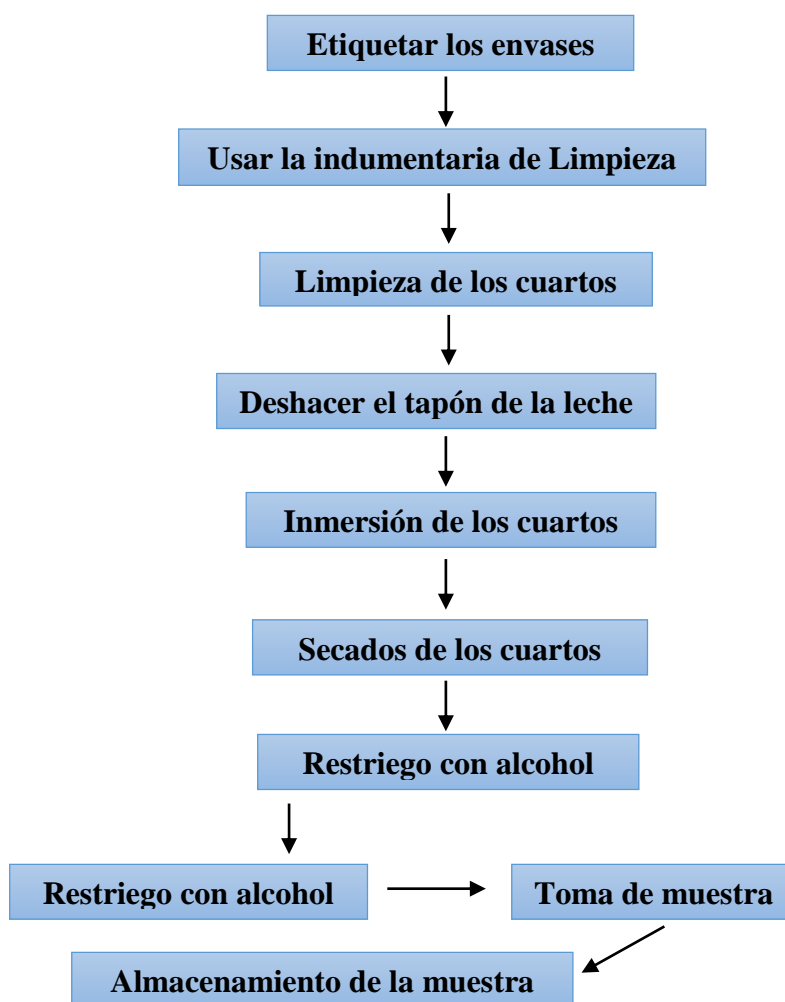


Figura 2. Diagrama de la toma de muestra en leche cruda (Toma de muestra y embalaje).

Las muestras se identificaron colocando el número de arete de trazabilidad del animal seguido de la identificación del cuarto mamario muestreado de la siguiente manera: Anterior derecho (AD), Anterior Izquierdo (AI), Posterior derecho (PD) y posterior izquierdo (PI).

4.3.2 Fase de laboratorio

Preparación de medios de cultivos y pruebas bioquímica

Se prepararon múltiples medios de cultivos; según sus propiedades estas fueron usados para el crecimiento primario, aislamiento o identificación de los agentes.

Las preparaciones de estos se realizaron según las indicaciones del fabricante; los medios utilizados fueron:

- Agar Mac Conckey: Se utilizo Mac Conckey Agar Liofilchem® (Anexo.1)
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI): Se utilizó Triple Sugar Iron Agar Neogen® (Anexo.2)
- Agar Citrato de Simmons: Se utilizó SIMONS Citrate Agar Neogen® (Anexo.3)
- Agar Sangre 5%: Para la preparación de agar sangre se siguieron las indicaciones de Berrios y Martínez (2018), y se agregó como una modificación la utilización de sangre bovina en remplazo de la sangre humana, este cambio se realizó por lo sugerido por NMC (2017)
- Prueba coagulasa: La prueba coagulasa se preparó según lo sugerido por Viana Martín, D. (2015) donde recomienda extraer la sangre de conejo, depositarla en tubos estériles con EDTA y centrifugar a 1000 g por 10 minutos, una vez obtenido el plasma, depositarlo en viales.

Siembra e identificación de bacterias

Para la siembra de las bacterias se tomó una muestra de leche cruda y se procedió a realizar una siembra típica por agotamiento en los medios de cultivo Agar sangre 5% y Agar MacConkey, una vez inoculados los medios, se llevaron a incubación a una temperatura entre 35 a 37 grados centígrados, y se realizó lectura de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas.

Al visualizarse crecimiento de bacterias en los medios, se realizó la caracterización fenotípica macroscópica de las colonias sugerida por la NMC (2017) y posteriormente se procedió a realizar de la tinción de Gram, como método de caracterización fenotípica microscópica.

Para las identificaciones bioquímicas se siguió al algoritmo de identificación el cual se elaboró a partir de las sugerencias de la NMC (2017).

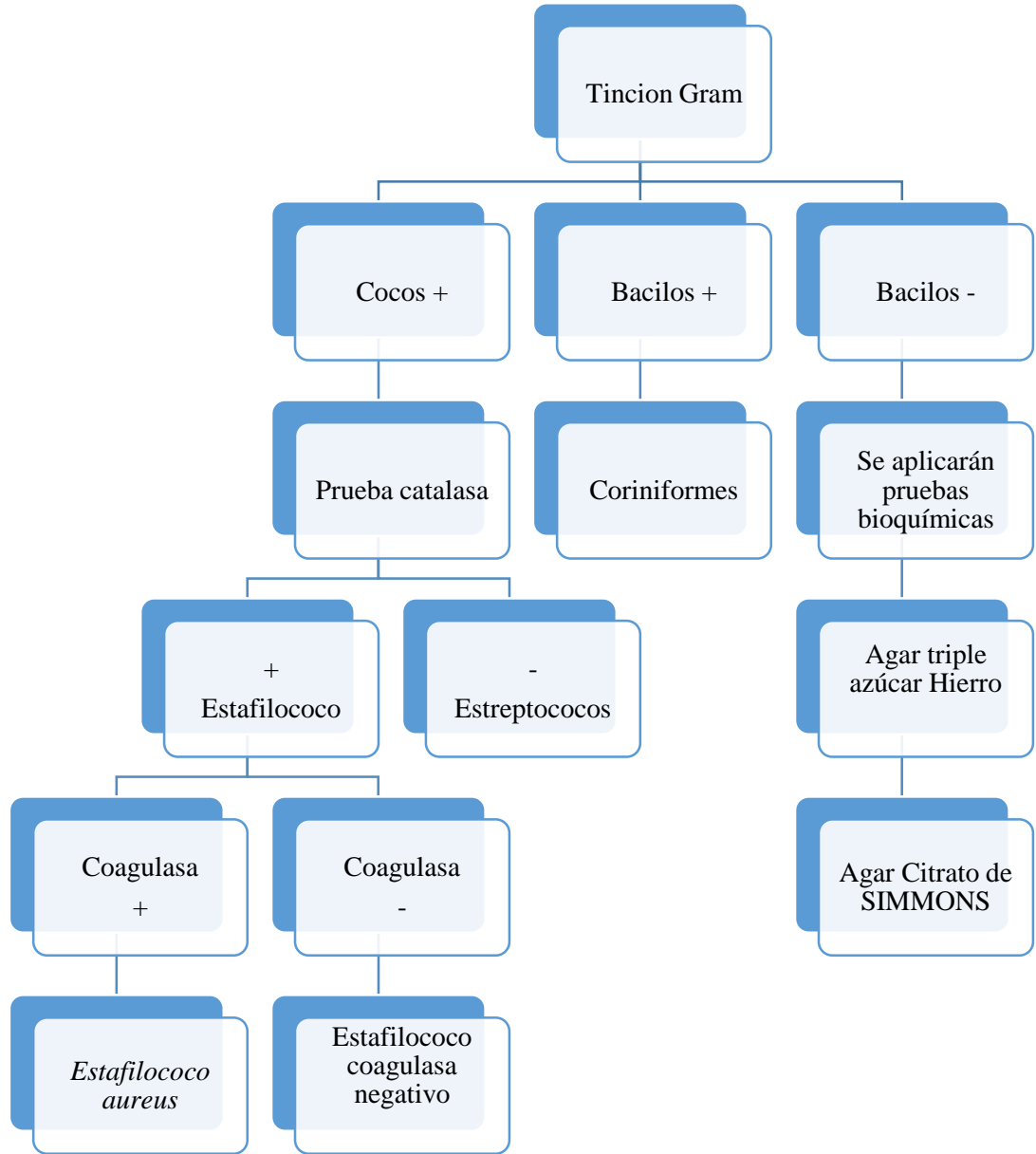


Figura 3 Algoritmo de identificación

4.4. Variables evaluadas

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Valores	Forma de medición
Bacterias causantes de mastitis aisladas en el CAFoP	Bacterias según su caracterización fenotípica e identificación bioquímica	Bacterias aisladas en las muestras de bovinos del CAFoP	Las bacterias afectantes del cuarto mamario más comunes según la NMC (2017): <i>-Streptococcus Spp</i> <i>-Staphylococcus aureus</i> <i>-Coagulase Negative Staphylococci</i> Bacterias Gram Negativa <i>-Escherichia coli</i> <i>-Klebsiella Spp</i> <i>-Enterobacter spp</i> <i>-Serratia spp</i> <i>-Pseudomonas Spp</i> <i>-Proteus Spp</i> <i>-Pasteurella Spp</i> <i>Mycoplasmas Spp</i>	Pruebas microbiológicas y Bioquímicas

La frecuencia de bacterias patógenas causantes de mastitis en el CaFop bovino	La medición exacta de la cantidad de colonias del mismo tipo encontrado	El porcentaje de bacterias según su tipo presentes en ganado lechero del CaFop bovino	Proporción de bacterias encontradas, según su tipo, expresado en porcentaje	Cálculo de porcentaje: $\frac{Gbact * 100}{NMP}$ <p>Donde:</p> <p>Gbact: Es el número de muestras pertenecientes a un solo tipo</p> <p>NMP: número total de muestras positivas a bacterias patógenas</p>
---	---	---	---	--

Cuadro 1. Variables que se tomaron en cuenta durante la investigación usadas.

4.5. Materiales e instrumentos

Materiales: Vasos recolectores, papel toalla, alcohol 7%, yodo 7%, algodón Médico, gasa estéril, marcadores, hielo, guantes, jabón líquido, tubos recolectores de sangre con anticoagulante, jeringa 20 ml, placas Petri, punta de pipetas, tubos de vidrio de borosilicato 5 ml, papel craft, masking tape, desinfectante Virkon®, atomizador, encendedor, gorros Quirúrgicos, mascarillas quirúrgicas, matraz de Erlenmeyer, agitador de madera, agar Citrato de Simmons, agar Mac Conkey, agar Triple Azúcar Hierro, agar cerebro, vasos de medios, portaobjetos, tinción de Gram, catalasa, coagulasa, conejo, botas, gabachas, papelería, cinta de marcación, papel Parafilm.

Instrumentos: Microscopio, incubadoras, autoclave, balanza Analítica, pipeta 100-1000 micro litros, termo, mecheros de alcohol, tabla de campo, agitador Magnético, asa Microbiológica (Redonda) y refrigeradora.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Tipos de bacterias aisladas durante el estudio

Staphilococcus aureus

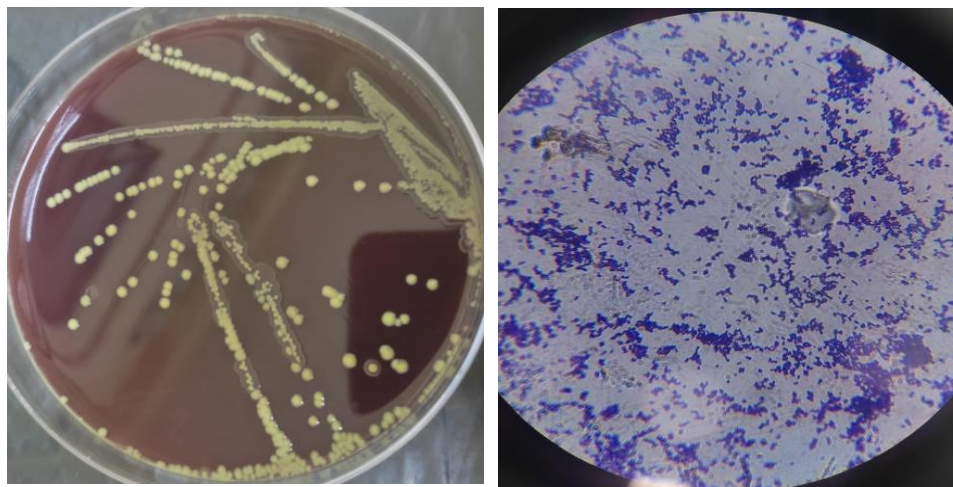


Figura 4 Colonia de *Staphilococcus aureus* en Agar Sangre 5% (en la imagen se puede observar las características macroscópicas del crecimiento bacteriano en agar sangre y morfológica microscópica de la colonia)

Se reportaron crecimientos bacterianos en el 6 % de las muestras procesadas (5 de 120 muestras), en las cuales se diferenciaron tres colonias diferentes:

La primera colonia, se registró en el 60% de muestras positivas (tres muestras), se presentó con crecimiento en Agar Sangre, se observó de un color amarillento a gris, con tamaño por colonia de 3 mm, apariencia lisa y que se acompañaba en todos los casos de un halo alfa hemolítico (Figura 4), dichas características coinciden con lo descrito por Castañeda et al (2002) que afirma que:

Esta bacteria produce en agar sangre colonias blanco-grisáceas y ocasionalmente doradas, con un diámetro de 3 a 5 mm. Regularmente se observan zonas típicas de hemólisis. La α hemolisina produce una zona clara con una hemólisis completa, mientras que la β -hemolisina causa una zona clara delimitada con una hemólisis incompleta. (Pág. 36)

En cuanto al tiempo de crecimiento de esta colonia, se registraron dos de los tres crecimientos a las 24 horas y una a las 48 horas después de la siembra.

De forma complementaria se encontró en la tinción de Gram que la colonia estaba conformada por coco Gram positivo, catalasa positivo y coagulasa positivo, por lo que se concluye que la identificación de la bacteria corresponde a *S. aureus*, por lo descrito por los autores como Pellegrino et al (2011) donde se aisló principalmente el agente patógeno en Agar sangre 5% , y los sospechoso de ser *S.aureus* se identificaron en base a su morfología y características microscópicas; usando también pruebas complementarias como producción de catalasa, coagulasa y crecimiento a 39 grado centígrados.

Corynebacterium spp

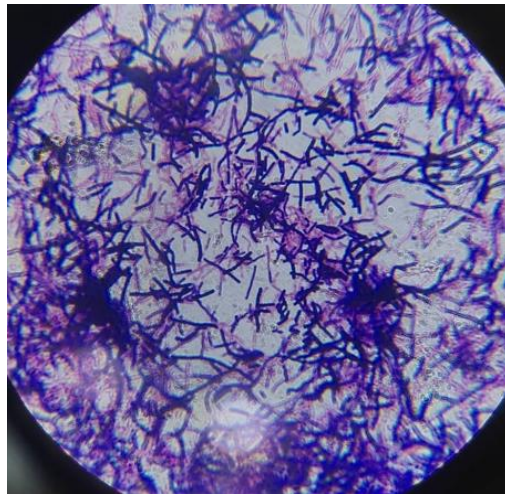


Figura 5 Colonia de *Corynebacterium spp* (En la imagen se pueden observar las características microscópicas de una colonia de *Corynebacterium spp*.)

La segunda colonia que se registró creció en un 20% de muestras positivas (una muestra), con crecimiento en agar sangre 5% como colonias de coloración blanca, opaco, con formas circulares, colonias de un tamaño pequeño de 2 mm, no presentando un halo hemolítico. Se encontró en la tinción de Gram como un Bacilo Ovalado Gram positivo, corto, pleomorfo, catalasa positiva. El tiempo de crecimiento se registró a las 48 horas de haber iniciado la incubación, todas estas características macroscópicas, como el tiempo de crecimiento coinciden en lo descrito por Quinn et al (2011) para *Corynebacterium spp*. productor de mastitis.

A pesar de que el tiempo de crecimiento y la morfología que coinciden con lo descrito por Quinn et al (2011), se considera que es necesario el uso de otras pruebas bioquímicas de identificación como las validadas por Ruiz et al (2011), para poder asegurar la presencia de este agente.

Klebsiella spp



Figura 6 Colonia de *Klebsiella spp* en Agar MacconKey (se observa el crecimiento de *Klebsiella spp* en Agar MacConkey, donde se puede diferenciar sus características macroscópicas).

La tercera colonia correspondió al restante 20% de muestras positivas, se registró en agar Macconkey de color rosado, con un tamaño promedio de colonia de 3mm, con una apariencia mucoides, sin presencia de un halo hemolítico, con un ligero olor fétido. En cuanto al tiempo de crecimiento se registró a las 48 horas.

En tinción de Gram se encontró como un Bacilo Gram negativo; Para esta colonia se aplicaron las pruebas en Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) y Agar Citrato de SIMONS, siendo que la colonia era fermentadora de glucosa, lactosa y/o sacarosa, productora de gas y Citrato positivo, que según lo sugerido por NMC (2017) se puede atribuir a la bacteria *Klebsiella spp*.

Comparando el estudio realizado por Ayala et al (2003) en donde los autores usan como metodología de identificación el cultivo de la muestra en Agar MacConkey, la implementación de pruebas bioquímicas (TSI, SIMMONS y Movilidad) usadas en este estudio también, llegando a resultados muy similares, concluyendo luego de esas pruebas a la identificación de la colonia como *Klebsiella spp*.

5.2 Frecuencia de bacterias patógenas asociadas a la presencia de mastitis según su tipo

La bacteria con mayor frecuencia de aislamientos fue *S. aureus* con un 60%, seguido de *Corynebacterium spp.* y *Klebsiella spp.* ambos con 20%

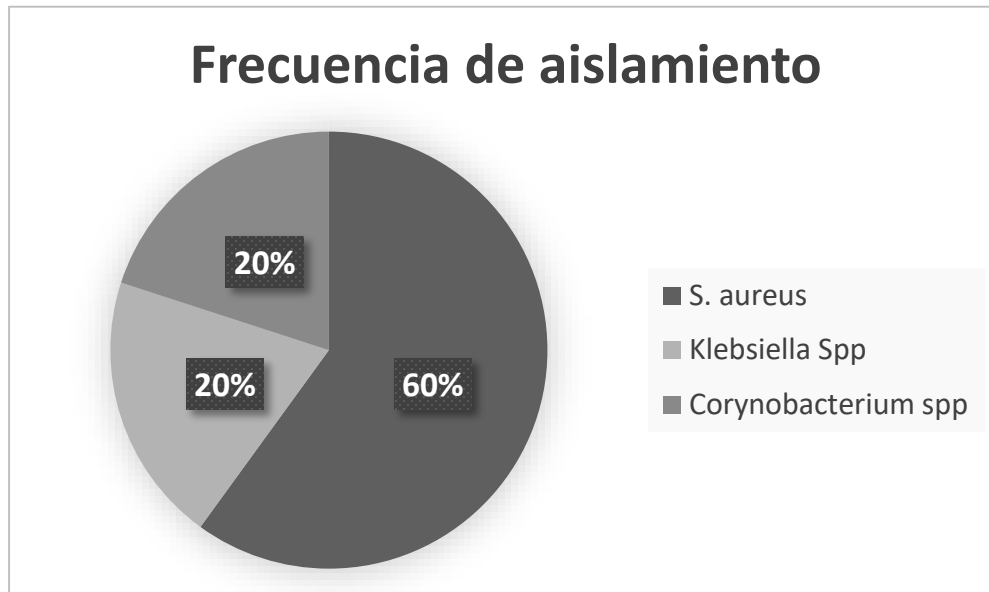


Figura 7 Frecuencia de bacterias según su tipo.

Los resultados de la frecuencia de aislamiento fue similar a lo reportado por Calderón y Rodríguez (2008) que registró a *Staphylococcus aureus* como el patógeno con más frecuencia dando un total de aislamiento del 29% y *Corynebacterium bovis* con el 8.44%, siendo considerado el porcentaje restante infecciones mixtas y coincidiendo también en lo descrito por Calderon et al (2010) en donde se vislumbra como resultado que el agente patógeno con mayor frecuencia de aislamiento fue *Staphylococcus aureus* 87.84% , el segundo *Streptococcus uberis* con un 3.64%, y en tercer lugar con el 2.13% *Streptococcus agalactiae* y *Corynebacterium bovis*.

Teniendo una ligera similitud y contraste al mismo tiempo con lo reportado por Barreal (2015) que describe a *Corynebacterium spp.* con una frecuencia de aparición del 17,14%, *Staphylococcus aureus* 28,40%, entero bacterias 11,67% teniendo la similitud en el principal

agente patógeno y el contraste en donde *Corynebacterium spp* no comparte la misma frecuencia de aparición que bacterias comensales.

Por otra parte Trujillo et al (2011) reportó en su estudio que las bacterias aisladas con más frecuencia fueron *Streptococcus disgalactiae* 29.5% , *Staphilococcus coagulasa* negativos 23%, *Staphylococcus aureus* 10.3%, *Echerichia coli* y *corynebacterium* con un 1.3% siendo la frecuencia de *Staphylococcus aureus* muy baja en comparación con nuestro estudio, teniendo mayor frecuencia otra bacteria Gram positiva como es el *Streptococcus* y coincidiendo con lo reportado por Ramírez et al (2001) donde el reporta que el 47% de su aislamiento pertenece a *Streptococcus agalactiae*, 14.6% *Staphilococcus coagulasa negativo*, 13% *Staphilococcus aureus*, 1.8% *Escherichia coli* , no teniendo reporte de aislamiento por parte de *Corybocaterium* y *Klebsiella spp*.

En cambio Sánchez et al (2017) reportó que el porcentaje de los agentes causales con mayor frecuencia fueron *Staphilococcus coagulasa negativa* con 46.7%, seguido de *Staphilococcus aureus* 31.1% , *Streptococcus spp* 20.7% , *Klebsiella* 0.5% y *Escherichia coli* 1% manteniendo las frecuencias más altas de aparición entre las bacterias Gram positivas.

5.3 Factores asociados a la presencia de bacterias causantes de mastitis

Según Stanchi (2007) “*Staphylococcus aureus* son comensales de piel y mucosa en especial digestivas y rinofaríngea. Es el microorganismo más extendido que existe y difusión en la naturaleza es extraordinaria”. (Pág.45).

Comparando el estudio realizado por Sessler (2011), ha confirmado que esta bacteria:

Es un microorganismo ambiental, viven alrededor de la vaca y acceden a la ubre en los intervalos entre los ordeños, las fuentes de este microorganismo se encuentran en el entorno, por ejemplo: Estiércol, agua estancada, cánulas intramamarias, cama, piso, máquinas de ordeño, piel de pezones y ubres. (Pág. 8).

Lo anterior descrito podría ser la explicación del por qué este microorganismo fue aislado con tanta frecuencia en el presente estudio ya que los animales del CAFoP Bovino de la UNA se encuentran expuestos a pocas medidas higiénicas y de sanitización de las instalaciones, y durante el ordeño, el cual se podría decir se realiza de forma “tradicional”.

Las faltas de métodos higiénicos predisponen a las infecciones intramamarias puesto que se desarrollan cambios fisiológicos, convirtiendo a la ubre en un órgano más susceptible a los microorganismos, se debe señalar que ninguna raza es más predispone que la otra. (Lopez, 2003, Pág.28).

En cuanto al género *Klebsiella ssp.* Leopardo (2016) Menciona que “esta bacteria se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, es huésped habitual saprófito del hombre y de los animales, forma parte del microbiota normal del intestino. Es así que las heces son la fuente más significativa de las infecciones”. (Pág. 69).

Ortiz (2007) Manifiesta que “*Klebsiella ssp* suele aparecer en las camas del aserrín; sin embargo, ya que puede aparecer en heces, no se descarta su aparición en camas que usen estiércol” (Pág 2).

En consideración de que la principal fuente de contaminación descrita es el hombre, resulta lógico afirmar que la escasa aplicación de las Buenas Prácticas de ordeño (BPO), pudiese ser la causa principal de la aparición de esta bacteria en los resultados de aislamiento; no se puede obviar que existen otras posibles fuentes como las instalaciones “Rústicas” que suponen ser un hábitat propicio para la proliferación de estos agentes.

Mayen (2019) reitero que la aplicación de las buenas prácticas de ordeño:

Se involucra la planificación y realización de una serie actividades estas se deben realizar durante todo el proceso de ordeño. Donde sugiere 2 condiciones básicas para un buen ordeño en las cuales recalca que el personal debe estar saludable libre de enfermedades zoonóticas e infectocontagiosas además debe prevalecer una buena higiene personal y portar una vestimenta adecuada además indicó que las instalaciones deberán contar un lugar específico de ordeño con paredes y pisos de fácil limpieza y desinfección. (Pág.10).

“Con respecto al hábitat *Corynebacterium spp* muchas especies son comensales de membranas mucosas y puede sobrevivir durante meses en el ambiente, también puede vivir en cisternas de letina”. (Quinn et al 2011, Pág.207).

Aguilar y Álvarez (2019) Expresaron lo siguiente:

El *Corynebacterium spp* como agente patógeno, se propaga por contacto o fomite durante el ordeño. Generalmente limita su colonización al canal del pezón, resultando en mastitis subclínica que se manifiesta por un ligero aumento en el recuento de células somáticas y una ligera reducción en la producción de leche, la desinfección de pezones después del ordeño por inmersión de pezones en desinfectantes es muy eficiente para eliminación de esta bacteria. (Pág. 88).

VI. CONCLUSIONES

Se reportaron crecimientos bacterianos en el 6 % de las muestras procesadas. Del 100% de muestras con crecimiento del 60% correspondía a *Staphilococcus aureus*, 20% a *Corynobacterium spp* y 20% *Klebsiella spp* .

El agente causal con la mayor frecuencia de aislamiento fue *Staphilococcus aureus*, similar a lo reportado en la región; este agente tiene más hábitat naturales que la mayoría de las bacterias que poseen acción patógena en la glándula mamaria, pudiendo llegar a encontrarse, según lo reportado, en las camas, conductos mamaros, piel, etc.; características por las cuales se le atribuye una elevada frecuencia de aislamientos en estudios similares.

Klebsiella spp y *Corynobacter spp* encontrados en el presente estudio en menor porcentaje, se reportan, casi siempre, como producto de la contaminación del hombre y las malas prácticas higiénicas durante el ordeño, En consideración de que la principal fuente de contaminación descrita es el hombre, resulta lógico afirmar que la escasa aplicación de las Buenas Prácticas de ordeño (BPO), pudiese ser la causa principal de la aparición de esta bacteria en los resultados de aislamiento.

A pesar de que el tiempo de crecimiento y la morfología se considera que es necesario el uso de otras pruebas bioquímicas de identificación como las validadas por Ruiz et al (2011), para la bacteria *Corynobacter spp*.

VII. RECOMENDACIONES

Al CAFoP:

- Se recomienda realizar periódicamente la prueba de campo CMT, estas contribuyen como indicador preventivo sobre la presencia mastitis subclínica, siendo positiva dicha prueba nos indicaría la presencia de bacterias patógenas.
- Capacitar a los operarios del CaFop para evitar el uso indebido de antibióticos, ya que pueden generar falsos negativos en pruebas de campo, como también crear resistencia bacteriana a antibióticos a largo plazo.
- Establecer programas de capacitación para orientar a los ordeñadores a cómo realizar las buenas prácticas de ordeño o BPO.
- Construir una mejor infraestructura puesto que sus instalaciones son básicas para ser un centro académico de formación.

A la investigación:

- Uso de pruebas más sensibles y específicas, como biología molecular o pruebas bioquímicas.
- Realizar un análisis de la influencia de factores de manejo y ambientales en la aparición de bacterias patógenas.
- Realizar un estudio entre la correlación de presencia y aparición de mastitis y valorar la resistencia antimicrobiana de las bacterias encontradas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar , F., y Alvarez , A. (2019). *Mastitis bovina. Machala: UTMACH.*
- Alessandro, M. (5 de 10 de 2015). *MacConkey Agar.*
http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/10029_IFU.pdf
- Aráuz, R. (2022). *Diagnóstico de patógenos productores de mastitis mediante prueba AccuMast® en vacas seleccionadas por las técnicas CMT y Draminski en Ganadería San Gabriel, Departamento de Jinotega.* Universidad Nacional Agraria , Managua .
- Bello Velazquez , E. E., y Gonzalez Venecio , G. J. (2015). *Manual de practicas de Bacteriología y Micología Veterinaria .* Tuxapan Varacruz : FCBA.
- Berrios, K., y Martinez, P. (2018). *Bacterias aisladas en muestras de otitis en caninos (Canis lupus familiaris) remitidos al Laboratorio Veterinario (LABVET) en el periodo de enero 2015 - febrero 2018.* Trabajo de Graduacion , Universidad Nacional Agraria , Managua.
- Casado González , M., & Torrico Cabezas , G. (5 de Septiembre de 2012). *Medios de cultivo en el laboratorio de microbiología*
<https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Castillo, S. (2015). *“aislamiento e identificación de pseudomonas spp. y patrón.* UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. Quito : UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Cernero , E., y Canton , R. (10 de Marzo de 2011). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.*
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
- Díaz Mayorga, D. A. (2020). *Determinación de la incidencia de mastitis bovina en dos fincas de la comarca Piedra Sembrada, Camoapa, departamento de Boaco, Sembrada, Camoapa, departamento de Boaco, .* UNA : Managua .
- Femat Esquivel , K. R., López Domínguez , M., & Pérez Martínez , L. A. (2017). *Catalasa y Coagulasa.* Durango : Facultad de ciencias Químicas .
- Florencia. (26 de septiembre 2006). *La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche.* Instituto nacional de tecnología agropecuaria.
<https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>
- García, R. L. (2013). *Manual de Teoría Microbiología II.* Managua Nicaragua: 1a ed. -- Managua.

- Gomez, M. E. (2008). *Enciclopedia Bovina*. Mexico DF: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Gonzales Melendez , R. C., Cuevas, B. E., Cortez Cruz, M. E., & Orduña Sanchez, M. (2020). *Las Tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico* . Ciudad de Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico .
- Gutiérrez. (21 de Julio de 2010). *Sistemas miniaturizados api*®. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf
- Guzmán Vázquez, E. (1 de marzo de 2007). *Las pruebas de Elisa*. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf>
- Hidalgo, A. (2020). *Evaluación de desinfectantes para la inhibición de microorganismos Pseudomonas*. FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, Quito .
- Hooker, M. (12 de 05 de 2009). *Microgen™ GnA+B-ID System*. <https://www.kemitekskimya.com.tr/files/101200b4084682.pdf>
- Ionita, E. (23 de Agosto de 2022). *El sector lechero en Nicaragua*. <https://www.veterinariadigital.com/noticias/el-sector-lechero-en-nicaragua/>
- Krug,R. (17 de junio de 2017). *Chapman - mannitol salt agar*. https://commerce.bi-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/53647_2014_04_ES.pdf
- Laboratorio Britania s.a. (03 de 2021). *Simmons Citrato Agar*. https://www.britanialab.com/productos/producto/2/medios_de_cultivo_deshidratados/-/328/simmons_citrato_agar
- Laboratorios Britania s.a. (02 de 2021). *Lisina Hierro Agar*. https://www.britanialab.com/productos/producto/2/medios_de_cultivo_deshidratados/-/285/lisina_hierro_agar
- Laboratorios Britania s.a. (03 de 2021). *Agar Mac Conkey*. https://www.britanialab.com/productos/producto/25/medios_de_cultivo_listos_para_usar_en_placas/-/243/mac_conkey_agar
- Laboratorios britania s.a. (03 de 2021). *T.S.I Agar*. https://www.britanialab.com/productos/producto/2/medios_de_cultivo_deshidratados/-/332/tsi_agar_triple_sugar_iron_agar_
- Laboratorios Britania s.a. (04 de 2021). *Cerebro Corazon Infusion Agar*. https://www.britanialab.com/productos/producto/2/medios_de_cultivo_deshidratados/-/357/cerebro_coraz_n_infusi_n_agar
- Laboratorios Britania s.a. (11 de 2021). *Sangre Agar*. https://www.britanialab.com/productos/producto/25/medios_de_cultivo_listos_para_usar_en_placas/-/267/sangre_agar_base_columbia_

- Leopardo, H. A. (2016). *Bacterias de Importancia Clínica* . Buenos Aires .
- Musto, A. (2013). *Manual de microbiología y parasitología*. Buenos Aires Argentina: Universidad Nacional Arturo Jauretche.
- National Mastitis Council, Inc. (2017). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis* . Minnesota .
- Neogen culture Media. (24 de 05 de 2019). *Urea Agar Base*.
<https://www.neogen.com/es/categories/microbiology/urea-agar-base-christensen/>
- NEOGEN culture Media. (29 de 5 de 2019). *SIM Medium*.
https://www.neogen.com/es/categories/microbiology/sim-medium/?min=FS_SL_NCM0277A
- Ploog, J. T. (23 de octubre de 2014). *Mastitis en Ganado Lechero: Etiología, Tipos y Tratamientos Modernos*. <https://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/mastitis-en-ganado-lechero-etilogia-tipos-y-tratamientos-modernos#:~:text=1.,muestra%20ning%C3%BAAn%20signo%20de%20inflamaci%C3%B3n>.
- Pro Nicaragua. (05 de Abril de 2022). <https://pronicaragua.gob.ni/es/noticias/2845-nicaragua-entre-los-6-abastecedores-carne-en-eeuu/>
- Proskauer. (1 de enero de 2011). Proskauer.pdf.
http://portal.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/proskauer.pdf
- Rivera, A. (2014). *Determinación de la Prevalencia de Mastitis Subclínica en ganado Reyna, Rancho Los Peiranos, Nandaime, Granada*. Universidad Nacional Agraria , Managua.
- Sanchez , E. (2015). *Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos*. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA, Managua.
- Sara, P. (2015). *Staphylococcus aureus : efecto de las coagulasas en el conejo*. Tesis de Grado , Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia .
- Solis, Bermudes, M. (2007). *Utilización de la Solución Hipertónica (agua de mar) en el Tratamiento de la Mastitis Bovina en la Finca "Guadalupana", del Municipio de Nagarote, Mangua : UNA*.
- Tamay , D., y Velasquillo , C. (30 de agosto de 2017). *Fundamentos de la reacción en cadena. Obtenido de Fundamentos de la reacción en cadena*:
<https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
- Valls, D., Y Baldris Nacente, R. (4 de 28 de 2011). *Handbook of microbiological culture media*.
https://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/scharlau_mikrobiologiai_kezikonyv.pdf
- VALTEK S.A. (03 de 2018). *Medio M.I.O*. <https://www.valtek.cl/fichas-tecnicas/>

- Zurita Arevalo , L. (2004). *Mastitis bovina con especial énfasis en la realidad nacional. Santiago de Chile : Facultad de ciencias agrarias .*
- Lopez, G. Z. (2003). *Diagnostico comparativo de mastitis en leche bovina por tres pruebas de campo: California mastitis Test (CMT), acidez(NaOH), y reductasa en los municipios de la concordia, San Rafael del Norte y San Sebastian de Yali. Jinotega .*
- Barreal López , L. (2015). *ESTUDIO COMPARADO DEL COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLOGICO DE LOS PRINCIPALES ORGANISMOS AISLADOS DE MASTITIS BOVINA EN GALICIA.* Galicia: Universidad Santiago de Compostela.
- Calderon , A., & Rodriguez , V. C. (2008). *Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano condiboyacense (Colombia).* *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 582-289.
- Calonge, C. P. (2014). *Detección y caracterización de Staphylococcus aureus procedentes de animales.* Obtenido de <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/e0a09a2c-3d79-42e3-8594-ccd871e7853d/content>
- Gonzales Ayala , M., Romero Lopez, L. A., & Seeligman Molina, J. A. (2003). *EVALUACION DE CUATRO EXTRACTOS BOTANICOS (RUDA ruta graveolens L, AJO Allium sativum, ACHIOTE Boixa orellana, y TOMATILLO Lycopersicum esculentum Miller var.), COMO UNA FUENTE ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LAS BACTERIAS MAS FRECUENTES EN LOS PROCESOS DE M.* San Salvador : UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.
- Lopez, G. Z. (2003). *Diagnostico comparativo de mastitis en leche bovina por tres pruebas de campo: California mastitis Test (CMT), acidez(NaOH), y reductasa en los municipios de la concordia, San Rafael del Norte y San Sebastian de Yali. Jinotega .*
- M Trujillo, C., Gallego, A. F., Ramírez, N., & G Palacio, L. (2011). *Prevalencia de mastitis en hatos lecheros del oriente antioqueño.* *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 24, 11-18. doi:http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902011000100003&lng=en&tlng=es
- Mayen, Z. (2019). *Manual de buenas practicas de ordeño .* Ciudad de Guatemala .
- Olmos, A. F. (2010). *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio.* jEIMC .
- Ortiz, D. (07 de 09 de 2007). *Mamitis por Klebsiella.* Obtenido de Mamitis por Klebsiella: https://www.revistafrisona.com/Portals/0/articulos/n158/A15803.pdf?ver=V5xU5D3xbp_TF8JDxf4gbQ%3d%3d
- Pellegrino, M. S., Frola, I. D., Odierno, L. M., & Bogni, C. I. (2011). *Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de staphylococcus aureus aisladas de leche(Bovine Mastitis: Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus strains isolated from milk).* *REDVET*, 1-14.

- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S., & Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial* . Hoboken, Nueva Jersey: WILEY-BLACKWELL.
- Ramírez , N., Gaviria , G., Arroyave, O., Sierra , B. B., & Benjumea, J. (2001). Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquio. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14, 76-87.
- Ruiz, A. K., Ponce, P., Gomes, G., Mota , R. A., Sampaio, E., Lucena, E. R., & Benone, S. (2011). PREVALENCIA DE MASTITIS BOVINA SUBCLINICA Y MICROORGANISMOS ASOCIADOS: COMPARACION ENTRE ORDEÑO MANUAL Y MECANICO, EN PERNAMBUCO, BRASIL. *Revista de Salud Animal* , 57-64.
- Sánchez Bonilla , M. D., Gutierrez Murillo, N. P., & Posada Almanza, I. J. (2017). Prevalencia de masititis bovina en el cañon de anaime, región lechera de colombia, incluyendo etiologia y resistencia antimicrobiana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29, 226-239.
- Sánchez., E. A., & Argüello Sánchez, J. (10 de 2015). *Estudio comparativo entre los métodos diagnósticos*. Obtenido de <https://repositorio.una.edu.ni/3214/1/tnl73r457.pdf>
- Sessler, D. P. (2011). *identifacion de los genes Sed y Sei de staphylococcus aureus para el dIganostico de masttis bovina* . Varacruz .
- Stanchi, ´. O. (2007). *Microbiologia Veterinaria* . Buenos aires : Grafica Guadalupe .

IX. ANEXOS

Anexo 1. Preparación y especificación del Agar MacConkey



MacConkey Agar

ENGLISH

Selective and differential medium for detection of Enterobacteriaceae from clinical samples and other materials, according to USP/EP/JP.

DESCRIPTION

MacConkey Agar is a slightly selective medium giving excellent differentiation between lactose-fermenting and lactose-nonfermenting Gram-negative enteric bacilli, from faeces, urine, foodstuffs, waste water and other materials of sanitary importance.

This medium is prepared according to recommendations of the harmonized USP/EP/JP method for the detection of *E. coli* in non sterile pharmaceutical products.

TYPICAL FORMULA	(g/l)
Pancreatic Digest of Gelatin	17.0
Peptone from Meat	1.5
Peptone from Casein	1.5
Lactose	10.0
Sodium Chloride	5.0
Bile Salts	1.5
Agar	15.0*
Neutral Red	0.03
Crystal Violet	0.001
Final pH 7.1 ± 0.2 at 25°C	

* Adjusted according to gel strength to meet performance specifications.

METHOD PRINCIPLE

Pancreatic digest of gelatin and peptones from meat and casein provide amino acids, nitrogen, carbon, vitamins and minerals for organisms growth. Lactose is the fermentable carbohydrate. Sodium Chloride maintains the osmotic balance of the medium. Bile salts and crystal violet are the selective agents, inhibiting Gram-positive organisms and allowing Gram-negative bacteria to grow. Agar is the solidifying agent. Neutral red is the pH indicator.

PREPARATION

<u>Dehydrated medium</u>	Suspend 51.5 g of the powder in 1 liter of distilled or deionized water. Mix well. Heat to boil for 1 minute shaking frequently until completely dissolved. Sterilize in autoclave at 121°C for 15 minutes.
<u>Medium in bottles</u>	Melt the content of the bottle in a water bath at 100°C (loosing the cap partially removed) until completely dissolved. Then screw the cap and check the homogeneity of the dissolved medium, if it is the case turning the bottle upside down. Cool at 45-50°C, mix well avoiding foam formation and aseptically distribute into Petri dishes.

Anexo 2. Preparación y especificación del Triple Azucar Hierro (TSI)

Intended Use

Triple Sugar Iron (TSI) Agar is used for the differentiation of microorganisms on the basis of dextrose, lactose, and sucrose fermentation and hydrogen sulfide production. Triple Sugar Iron (TSI) Agar is not intended for use in the diagnosis of disease or other conditions in humans.

Description

This is a modification of the Krumwiede and Kohn medium of 1917 which differentiates some of the *Enterobacteriaceae* on the basis of four reactions; fermentation of lactose, glucose and sucrose and H₂S production. This medium should be used in conjunction with a urease test to eliminate *Proteus* spp. when screening for *Salmonella* spp.

Typical Formulation

Beef Extract	3.0 g/L
Yeast Extract	3.0 g/L
Peptone Mixture	20.0 g/L
Sodium Chloride	5.0 g/L
Lactose	10.0 g/L
Sucrose	10.0 g/L
Glucose	1.0 g/L
Ferric Citrate	0.3 g/L
Sodium Thiosulphate	0.3 g/L
Phenol Red	0.025 g/L
Agar	12.0 g/L

pH: 7.4 ± 0.2 at 25°C

Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

Precaution

Refer to SDS

Preparation

1. Suspend 65 grams of the medium in one liter of purified water.
2. Heat with frequent agitation and boil for one minute to completely dissolve the medium.
3. Dispense into tubes.
4. Autoclave at 121°C for 15 minutes
5. Allow to set as a slope ensuring that the slant is over a butt approximately 3 cm deep.

Revision: 1 Effective Date: 5/11/2023

Anexo 3. Preparación y especificación del Citrato de SIMMONS

Simmons Citrate Agar (NCM0168)

Intended Use

Simmons Citrate Agar is used for the differentiation of microorganisms on the basis of citrate utilization in a laboratory setting. Simmons Citrate Agar is not intended for use in the diagnosis of disease or other conditions in humans.

Description

Koser first developed a liquid medium for differentiating coliforms from fecal coliforms. Fecal coliforms were unable to use citrate as the sole source of carbon and inorganic ammonium salt as a sole source of nitrogen. Non-fecal coliforms, such as *Enterobacter aerogenes* could use citrate in such a medium with resultant alkalinity. Liquid medium had the disadvantage of appearing turbid when a large inoculum was used, although no growth had taken place. This observation led Simmons to devise a solid medium that eliminated the problem with turbidity.

Simmons Citrate Agar is a modification of Koser's medium, with the addition of bromothymol blue and 1.5% agar. Organisms able to metabolize citrate grow luxuriantly. The medium is alkalized and changes from green to deep blue in 24 – 48 hours. *Escherichia coli* either do not grow at all on this medium or grow so sparsely that no change in reaction is apparent. Simmons Citrate Agar is recommended for differentiation of enteric Gram-negative bacilli from laboratory specimens, water samples, and food samples.

Typical Formulation

Ammonium Dihydrogen Phosphate	1.0 g/L
Dipotassium Phosphate	1.0 g/L
Sodium Chloride	5.0 g/L
Sodium Citrate	2.0 g/L
Magnesium Sulfate	0.2 g/L
Bromothymol Blue	0.08 g/L
Agar	15.0 g/L

Final pH: 6.9 ± 0.2 at 25°C

Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

Precaution

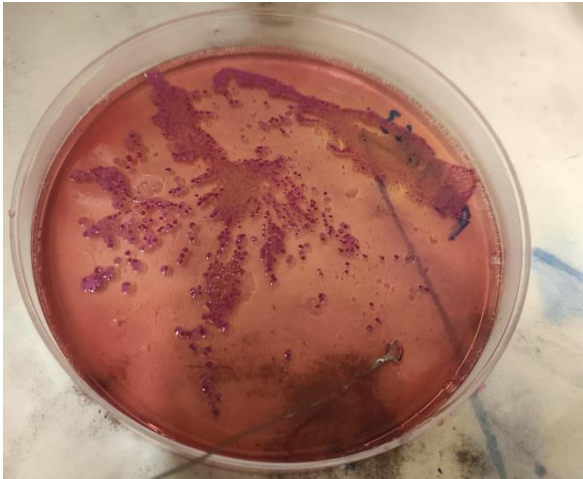
Refer to SDS

Preparation

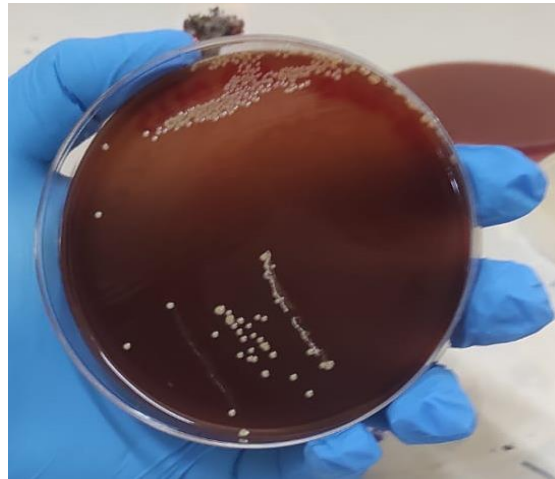
1. Suspend 24.2 g of the medium in one liter of purified water.
2. Heat with frequent agitation and boil for one minute to completely dissolve the medium.
3. Dispense into tubes and autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. After autoclaving, allow medium to solidify in a slanted position.

Revision: 0 Effective Date: 11/19/2021

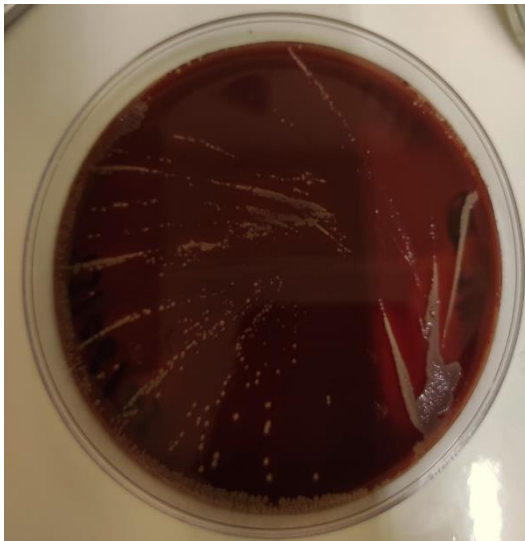
Anexo 4. Identificación macroscópica
Klebsiella spp.



Anexo 5. Identificación macroscópica
Corynebacterium spp.



Anexo 6. Identificación macroscópica
Staphylococcus aureus.



Anexo 7. Siembra en medios de
cultivos agar sangre 5% y McC



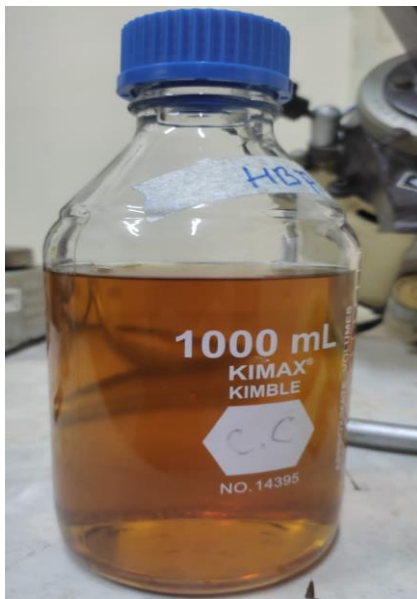
Anexo 8. Preparación de los medios, área sucia



Anexo 9. Clarificación Agar MacConkey



Anexo10. Base cerebro corazón para Agar sangre 5 %



Anexo 11. Medios utilizados en la investigación



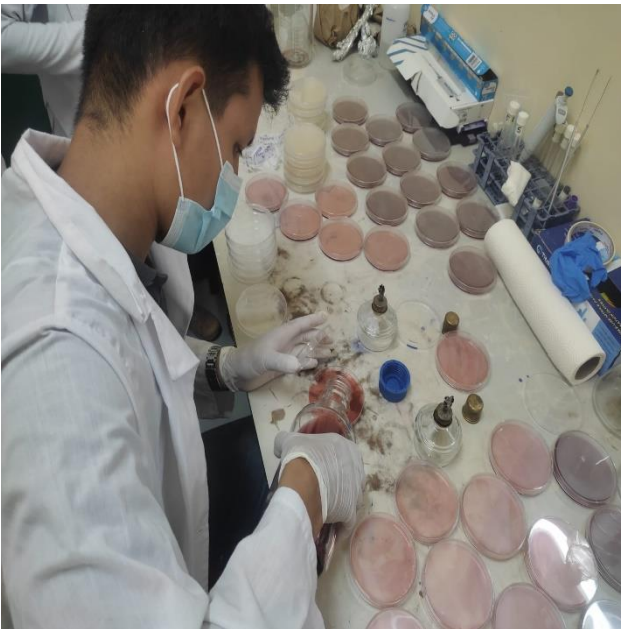
Anexo 12. Limpieza y desinfección de los cuartos mamarios



Anexo 13. Toma muestra leche



Anexo 14. Vertimiento de agares sangre 5% y MacConkey



Anexo 15. Inoculación de agente en Agar triple azúcar

