

Facultad de Ciencias Veterinarias de la
Universidad Nacional de La Plata

Especialización en Diagnóstico Veterinario
de Laboratorio

**“Aislamiento e identificación de bacterias vinculadas a
mastitis bovina en leche cruda comercializada por
el tambo Complejo Agropecuario Casilda”**

Autor: Eugenia Isabel Coda Zabetta

Director: Gabriela Giacoboni

Codirector: Sandra Bernardi

Asesores Técnicos: Milagros López -Hiriart, Marisa Musto

INDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
2. Hipótesis de trabajo.....	5
3. Objetivos.....	5
4. Materiales y Métodos.....	6
4.1 Establecimiento y animales.....	6
4.2 Muestreo.....	8
4.3 Siembra, cultivo e identificación de Colonias.....	9
4.4. Análisis estadístico.....	12
5. Resultados	12
6. Discusión.....	20
7. Conclusiones.....	22
8. Bibliografía.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Sala de ordeño.....	4
Figura 2: CLEPL y vista predio del tambo	5
Figura 3: Foto satelital de la Facultad de Cs.Vet.y localización del tambo.....	7
Figura 4: Vacas Holando Argentino pertenecientes al tambo.....	7
Figura 5: Tanque de frío (leche cruda).....	8
Figura 6: Procedimiento de siembra de placas.....	10
Figura 7: Placas identificadas listas para incubar por 48 hs.....	10
Figura 8: Crecimiento bacteriano agar sangre (A) y en EMB (B y C).....	13
Figura 9: Pruebas bioquímicas para identificar <i>Enterobacter cloacae</i>	14
Figura 10: Pruebas bioquímicas para identificar <i>Escherichia coli</i>	15
Figura 11: Colonias bacterianas crecidas en medio TKT.....	16
Figura 12: Prueba de CAMP.....	16
Figura 13: Placa de DNAsa positiva	17
Figura 14: Cantidad total de bacterias identificadas en leche cruda	19
Tabla 1:Parámetros estadísticos descriptivos expresados por bacteria identificada.....	18

1. Introducción

Las condiciones de higiene y sanidad en las explotaciones lecheras tienen un efecto importante en la calidad microbiológica de la leche, cuanto mayores sean los cuidados aplicados a la obtención higiénica de dicho fluido y a la sanidad de los animales productores de ella, menor será la contaminación y carga microbiana en la misma. Asimismo, corrales libres de estiércol y lodo, salas de ordeño limpias, equipos de ordeño funcionando de manera adecuada y una rutina de ordeño correcta, resultarán en una baja incidencia de mastitis, lo cual se manifestará con bajos valores en los recuentos de células somáticas. Este recuento indica la concentración de leucocitos (macrófagos, linfocitos y neutrófilos) y células epiteliales en un mililitro de leche y es el método clásico aceptado por diversos países para monitorear el estado de salud de la glándula mamaria (Hernández Reyes y Bedolla Cerdeño, 2008).

La leche contiene pocas bacterias al extraerla de la ubre de una vaca sana, sin embargo, durante el ordeño, se puede contaminar a de la piel y áreas contiguas a la ubre, como también todo lo que provenga del medio ambiente, como el estiércol, el suelo, así como del lecho en el que descansan los animales, y a través del polvo, aire, agua e insectos (particularmente moscas) (Mariscal y col., 2013). Probablemente las dos fuentes de contaminación más significativas sean el equipo y utensilios empleados en la obtención y recolección de la leche, así como las superficies que entran en contacto con el producto, incluidas las manos de los ordeñadores y del resto del personal. La calidad microbiológica de la leche cruda cambia significativamente durante su manejo y transporte, particularmente cuando no se cuenta con los medios para su enfriamiento inmediato una vez obtenida (Mariscal y col., 2013). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2012) en sus normativas básicas sobre seguridad alimentaria y nutricional impone los manipuladores deben usar gorros, mascarillas y guantes adecuados. Indicando también que es importante cuidar que el personal se tape la entrada de la nariz, en muchos casos por incomodidad esto no se

respeto y es habitual que los manipuladores dejen libres sus fosas nasales, lo que permite la salida de *S. aureus*. Una de las características de esta bacteria es su resistencia a múltiples antimicrobianos utilizados habitualmente para su tratamiento, lo cual complica el manejo veterinario llegando a tener que vender todas las vacas infectadas para así erradicar el foco de infección. Asimismo, otro punto de extrema gravedad es la termorresistencia que tiene la enterotoxina que produce, razón por lo cual el proceso de pasteurización de la leche obligatorio para el consumo humano no alcanzaría a garantizar la destrucción de la misma. Una situación de alta gravedad como la comentada obliga a los manipuladores a implementar las medidas higiénicas sanitarias necesarias tendientes a disminuir la diseminación del *S. aureus* (Fagundes y col., 2010; Camussonea y Calvino, 2013).

La gran diversidad de bacterias causantes de mastitis bovina se debe a las características epidemiológicas y ambientales de los microorganismos. Entre las bacterias más frecuentes se encuentran *Streptococcus agalactiae* (*St. agalactiae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus hyicus* (*S. hyicus*), *Mycoplasma* spp., *Staphylococcus coagulans* negativos (SCN), *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus uberis* (*St. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*St. dysgalactiae*) y *Enterococcus* spp. (Rodríguez Pérez y Muñoz Ganoza, 2017; Sumon y col., 2017).

La mastitis subclínica es una afección de la ubre que no manifiesta signos evidentes en la glándula mamaria, por lo cual la vaca se observa sana. Su aparición se debe a la proliferación de microorganismos que generan una inflamación de la ubre, y se detecta porque se registra una reducción en la producción de leche, además de detectar alteraciones en la composición del producto por presencia de células blancas y bacterias (Fernández Bolaños y col., 2012).

Esta presentación de la enfermedad es la más persistente en el ganado lechero. Para identificar estos casos de mastitis se hace necesario utilizar técnicas de laboratorio como conteo de células somáticas y cultivo bacteriológico (Birhanu y col., 2017).

La Universidad Nacional de Rosario (UNR) cuenta con una explotación lechera pequeña, mostrativa, ya que su principal objetivo es funcionar como módulo productivo académico para los estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria y de la orientación optativa del último año de los estudiantes de nivel secundario de la Escuela Agrotécnica Libertador General San Martín dependiente de la misma Universidad. Ambas instituciones a través de la Asociación Cooperadora son responsables del Complejo Agropecuario Casilda del cual es parte el tambo mencionado. La leche producida se comercializa como leche cruda, en su mayor parte, solo una pequeña fracción se reserva para abastecer al comedor de la Escuela y al Sector de Industria para la realización de quesos y dulce de leche. Es de vital importancia que los trabajadores, en sus distintas áreas de trabajo comprendan y conozcan que la responsabilidad de esta explotación, además de que sea sustentable, debe producir un alimento de buena calidad. Aquí nace el interés de contar con un control propio de la calidad de leche cruda y para ello, entre otros, los controles básicos deben tender a minimizar la cantidad de microorganismos, más aun conociendo que alguna de ellas tiene la capacidad de generar enfermedad en humanos, y otras desarrollan enfermedad en las vacas lecheras ocasionando mermas en la producción.

En el Complejo Agropecuario, junto a la sala de ordeño funciona el Laboratorio del Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras (CLEPL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario, destinado a reproducción y sanidad (Fig. 1, 2). En el mismo, se realizan pruebas para evaluar la calidad de semen bovino tanto en muestras frescas como dosis congeladas; se clasifican embriones bovinos a transferir; se realizan lectura de citologías endometriales, pruebas de mastitis y hemogramas.

Dar este primer paso en el estudio bacteriológico de la leche de tanque permitiría contar con información relevante de la calidad del producto del tambo experimental de la UNR y tener la seguridad de la calidad de la leche de consumo y comercialización.

Fig. 1. Sala de ordeño



Fig.2. CLEPL y vista del predio del tambo



2. Hipótesis de trabajo

En la leche de tanque que comercializa el tambo del “Complejo Agropecuario Casilda” se encuentran bacterias gram positivas como *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp y gram negativas (enterobacterias), como potenciales agentes causales de mastitis clínicas y subclínicas, contaminantes del producto y contagiosos

3. Objetivos

- Emprender, organizar e instaurar el diagnóstico bacteriológico en el laboratorio del Centro Latinoamericano de Estudios de Problemáticas Lecheras en la Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Rosario.

- Aislar e identificar por pruebas fenotípicas los microorganismos que comúnmente causan mastitis subclínicas y clínicas en leche de tanque en el tambo del Complejo Agropecuario Casilda de la Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Escuela Agrotécnica de la UNR.

4. Materiales y Métodos

4.1 Establecimiento y animales

El trabajo se realizó en el tambo del Complejo Agropecuario Casilda (CAPC) formado por la Facultad de Ciencias Veterinarias y Escuela Agrotécnica Libertador General San Martín dependientes de la Universidad Nacional de Rosario. Ubicado sobre Ruta S26 (-33.067252, -61.152611) de la ciudad de Casilda, provincia de Santa Fe (Fig. 3).

El CAPC cuenta con 40 vacas Holando Argentino en ordeño (Fig.4), con una producción promedio anual de entre 18 y 22 litros por vaca por día y con un sistema de pariciones continuo. La alimentación de los animales se basa en verdeos, forrajes conservados y concentrado. Tiene un sistema de ordeño en espina de pescado con seis (6) bajadas, extracción manual y la leche se deriva directo al tanque de frío.

Fig.3. Foto satelital de la Facultad de Ciencias Veterinarias De la UNR y localización del tambo

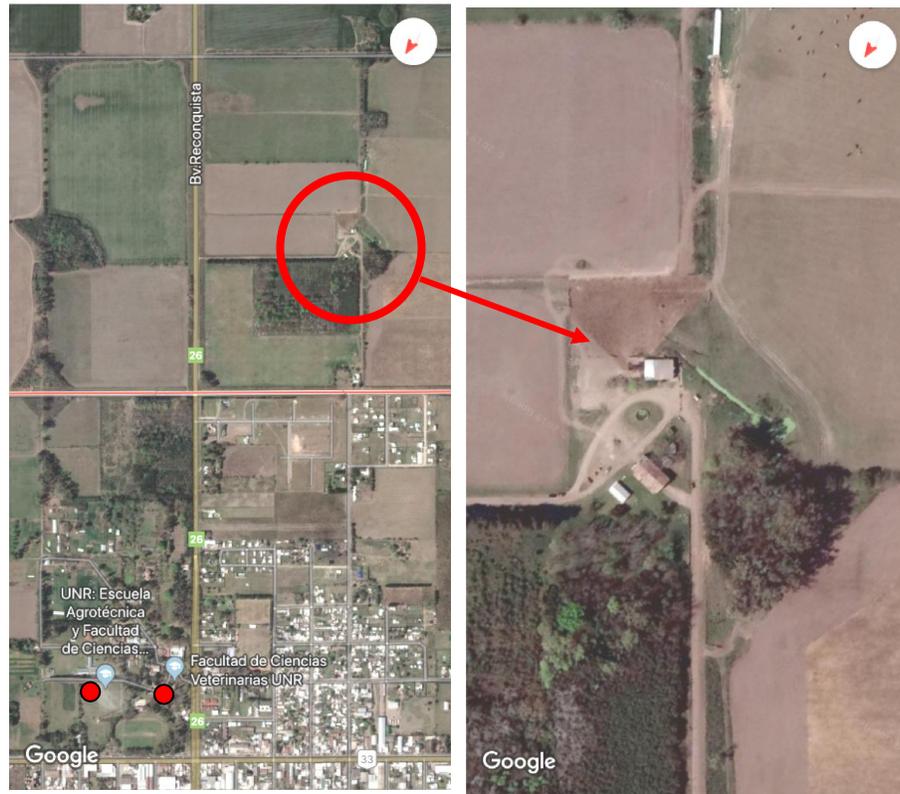


Fig.4 Vacas Holando Argentino pertenecientes al tambo



4.2. Muestreo

Se procesaron en total 30 muestras de leche de tanque (Fig. 5). Fueron tomadas una vez al día respetando siempre el mismo horario y tuvo lugar desde el 1 al 30 de octubre de 2018. Previo a la toma de muestra, se verificó que la temperatura de la leche fuese siempre menor a 4°C y que el agitador estuviese prendido al menos durante 5 minutos antes de realizarla. Se realizó desde la tapa superior del tanque de frío utilizando un cucharón de acero inoxidable esterilizado con alcohol 96° y flameado posteriormente. La leche se recolectó en recipientes estériles de 100 ml de capacidad, descartables y con tapa a rosca, los que luego de ser debidamente rotulados, se trasladaron refrigerados (5- 7°C) hasta el laboratorio para su procesamiento.

Fig.5. Tanque de frío (leche cruda)



4.2. Siembra, cultivo e identificación de colonias

Para la siembra de las muestras se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar Manitol Salado (AMS) a pH $7,4 \pm 0,2$ (Laboratorio W. Brizuela S.A, Córdoba), agar Levine Eosina-Azul de Metileno (EMB) (Laboratorio W. Brizuela S.A, Córdoba) y agar Tripticasa Soya (ATS) (Laboratorio W. Brizuela S.A, Córdoba), agar sangre (AS) (provistas por el Laboratorio Britania S. A. Buenos Aires) y Edwards modificado (TKT)(provistas por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario).

De cada muestra de leche obtenida, se sembraron 10 μ l con espátula Drigalsky en cada uno de los medios de cultivo tanto enriquecido (AS) como diferenciales y selectivos para enterobacterias (EMB), estafilococos (AMS) y estreptococos (TKT). Posteriormente las placas se llevaron a estufa de cultivo a 37°C por 48 horas (Fig. 6 y 7). Una vez pasado el tiempo se procedió a retirarlas de la estufa y a su observación a ojo desnudo con el fin de hacer el reconocimiento macroscópico de las colonias y su conteo.

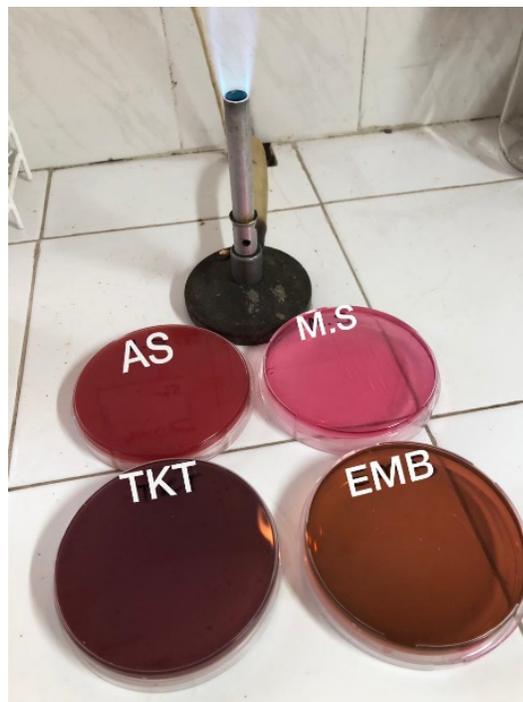
Con el fin de establecer una primera clasificación en bacterias y determinar su morfología, se utilizó una coloración de Gram (Laboratorios Britania S.A, Bs. As).

Según los requerimientos nutricionales, se repicaron los desarrollos bacterianos para obtener cultivo puro en ATS o AS.

Fig.6. Procedimiento de siembra de placas



Fig. 7. Medios utilizados para siembra de muestras de leche.



AS: agar sangre; AMS: agra manitol salado; EMB: agar eosina azul de metileno

Como prueba de inicio para la identificación de los bacilos Gram negativos, se realizó la prueba de la oxidasa mediante el uso de discos (Laboratorios Britania S.A, Buenos Aires) y así separar en dos grandes grupos: bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF)(oxidasa +) y las enterobacterias (oxidasa -). Las colonias negativas a la prueba de oxidasa se cultivaron en diferentes medios para la realización de las pruebas bioquímicas: UREA, *Sulfide-Indole-Motility* (SIM), *Triple Sugar Iron Agar* (TSI), Citrato de Simmons (CITRATO), *Lisyn Iron Agar* (LIA), Rojo de Metilo-VogesProskauer (RM/VP). Luego de su incubación (MacFaddin 1980) se procedió a la lectura e interpretación de las mismas (Bergey's 1974). Para realizar este estudio tanto la batería de pruebas bioquímicas, reactivos e indicadores de pH fueron provistos por el Hospital Provincial San Carlos de la localidad de Casilda.

A las bacterias que resultaron Gram positivas se les realizó la prueba de la catalasa, y a las que resultaron positivas se les hizo la prueba de la coagulasa. Para ello se sembró una colonia en 0,5 ml de caldo cerebro corazón a 37°C 12 horas para luego agregarle 0,5 ml de plasma de equino. Se incubaron a 35°C por 4 horas y se observó si se formó o no el coágulo inclinando ligeramente el tubo. Aquellas cuya lectura fue negativa, se re-incubaron a temperatura ambiente y se leyeron después de las 18 horas. (Koneman y col., 1999). Posteriormente se realizaron diferentes pruebas para la identificación fenotípica de *Staphylococcus coagulasa* positivos: RM/VP, fermentación de azúcares (manitol, manosa, trehalosa y la prueba de la DNAsa (Fig.13) ya que existen algunas cepas que pueden producir reacciones débiles o ser coagulasa negativos (Koneman y col., 1999). *S. aureus* produce DNAsa y endonucleasa termoestable, ambas enzimas hidrolizan el ácido nucleico. La DNAsa puede ser detectada sembrando en forma de mancha densa varias colonias del microorganismo en el medio específico para determinarla, que contiene el colorante metacromático azul de toluidina O. Luego de ser incubadas durante 24 horas a 35°C, si al ser observada se ve un halo, por debajo y alrededor del inóculo, que viró del azul intenso al rosa, indica hidrólisis de DNA del *S. aureus* (Koneman y col., 1999).

La observación de las colonias crecidas en el medio de cultivo TKT, medio selectivo que tiene en su composición esculina, permitió hacer una primera diferenciación entre las colonias esculina positivas o negativas (oscuras y claras respectivamente). Posteriormente, se les realizó la prueba de CAMP. La misma consistió en realizar la siembra en agar sangre de una estría central de *S. aureus* productor de β -hemolisina, y en forma perpendicular a esta las cepas de *Streptococcus* aisladas, se incubaron a 35°C durante 18 a 24 hs (Koneman y col., 1999).

Finalmente, para cada bacteria identificada se realizó el conteo de colonias y el mismo se expresó como UFC/ml (1 colonia hallada corresponde a 1×10^2 UFC/ml).

4.3. Análisis estadístico

Para cada bacteria identificada en leche cruda se calculó la distribución de frecuencia en cada uno de los días del muestreo armando un histograma para cada microorganismo. Con el fin de describir estadísticamente la presencia de las bacterias aislados se estimó para cada caso: la media y el valor máximo y mínimo de referencia, el promedio y su desvío estándar considerando todos los muestreos realizados. Se utilizó la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer HSD para comparar las medias de las diferentes bacterias aisladas ($P < 0.05$).

5. Resultados

Se observaron las siembras en los medios enriquecidos y se compararon con los medios selectivos correspondientes (descritos en el apartado Materiales y Métodos) (Fig. 8, 9 y 10).

Fig. 8. Crecimiento bacteriano agar sangre(A) y en EMB (B y C)



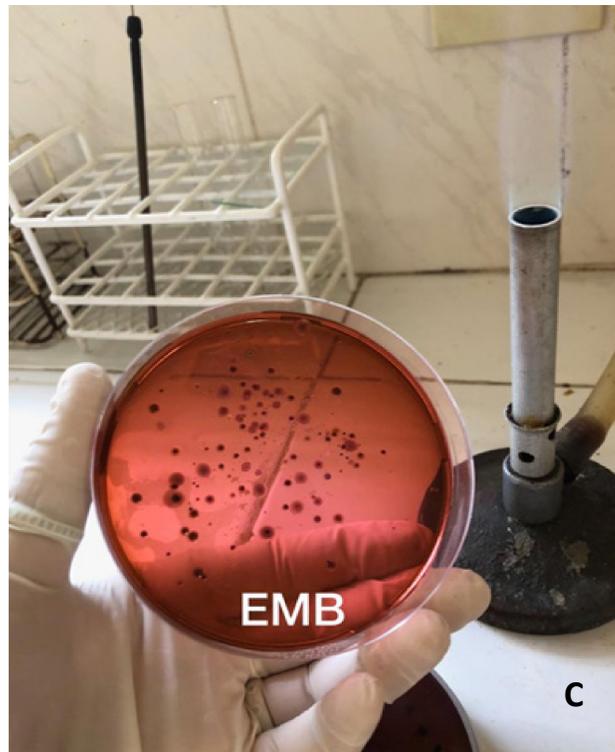


Fig. 9. Pruebas bioquímicas para *Enterobactercloacale*

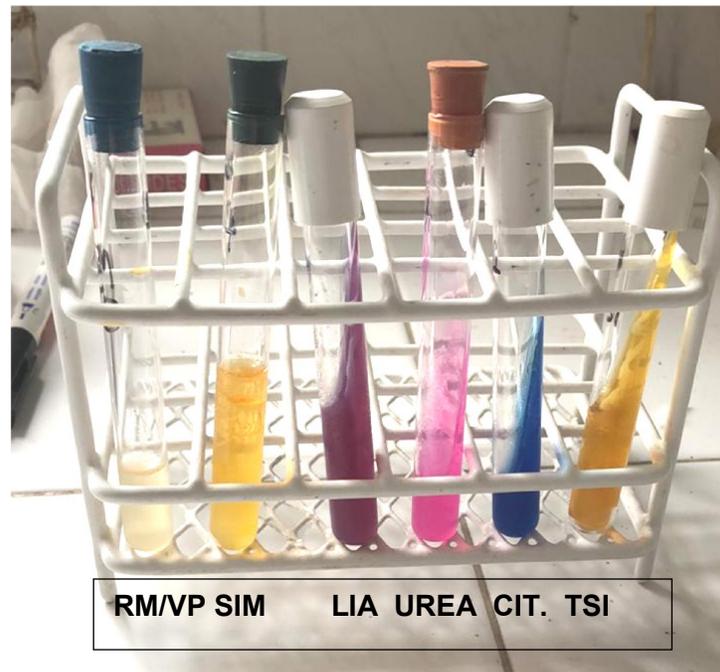


Fig. 10. Pruebas bioquímicas para identificar *Escherichia coli*



Enterobacter cloacae: 3×10^5 UFC/ml

Citrobacter spp.: 1×10^5 UFC/ml

E. coli: 1×10^5 UFC/ml

Hafnia alvei: 1×10^5 UFC/ml

A las Gram (+) que dieron negativas a la prueba de la catalasa, y que en el medio TKT (Fig. 11) crecieron como colonias claras se les realizó la prueba de CAMP (Fig. 12) de las cuales aquellas que generaron hemólisis en punta de flecha (CAMP positivas) fueron identificadas como *St. agalactiae*; a las que fueron CAMP negativas y esculina negativas como *St. dysgalactiae*, y las colonias oscuras (negras) esculina positivas y CAMP negativas fueron identificadas como *St. uberis*.

Fig. 11. Colonias bacterianas crecidas en medio TKT

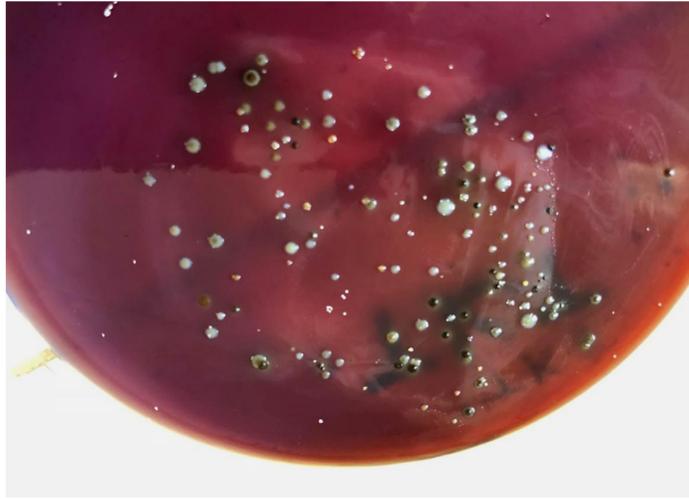


Fig. 12. Prueba de CAMP

Fig. 13. Placa de DNAsa positiva



El conteo de las bacteria identificadas como Gram positivas arrojó los resultados siguientes:

St. agalactiae: 2×10^5 UFC/ml

St. dysgalactiae: 8×10^5 UFC/ml

St. uberis: 2×10^5 UFC/ml

S. aureus: 2×10^5 UFC/ml

El *St. dysgalactiae*, en promedio, es la bacteria que fue encontrada en mayor cantidad, el *Enterobacter cloacae* y *S. aureus* tuvieron una representación intermedia mientras que el resto de las bacterias (*St. agalactiae* y *St. uberis*, *Hafnia alvei*, *E. coli* y *Citrobacter* spp) fueron encontradas en un número significativamente menor (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros estadísticos descriptivos expresados por bacteria identificada

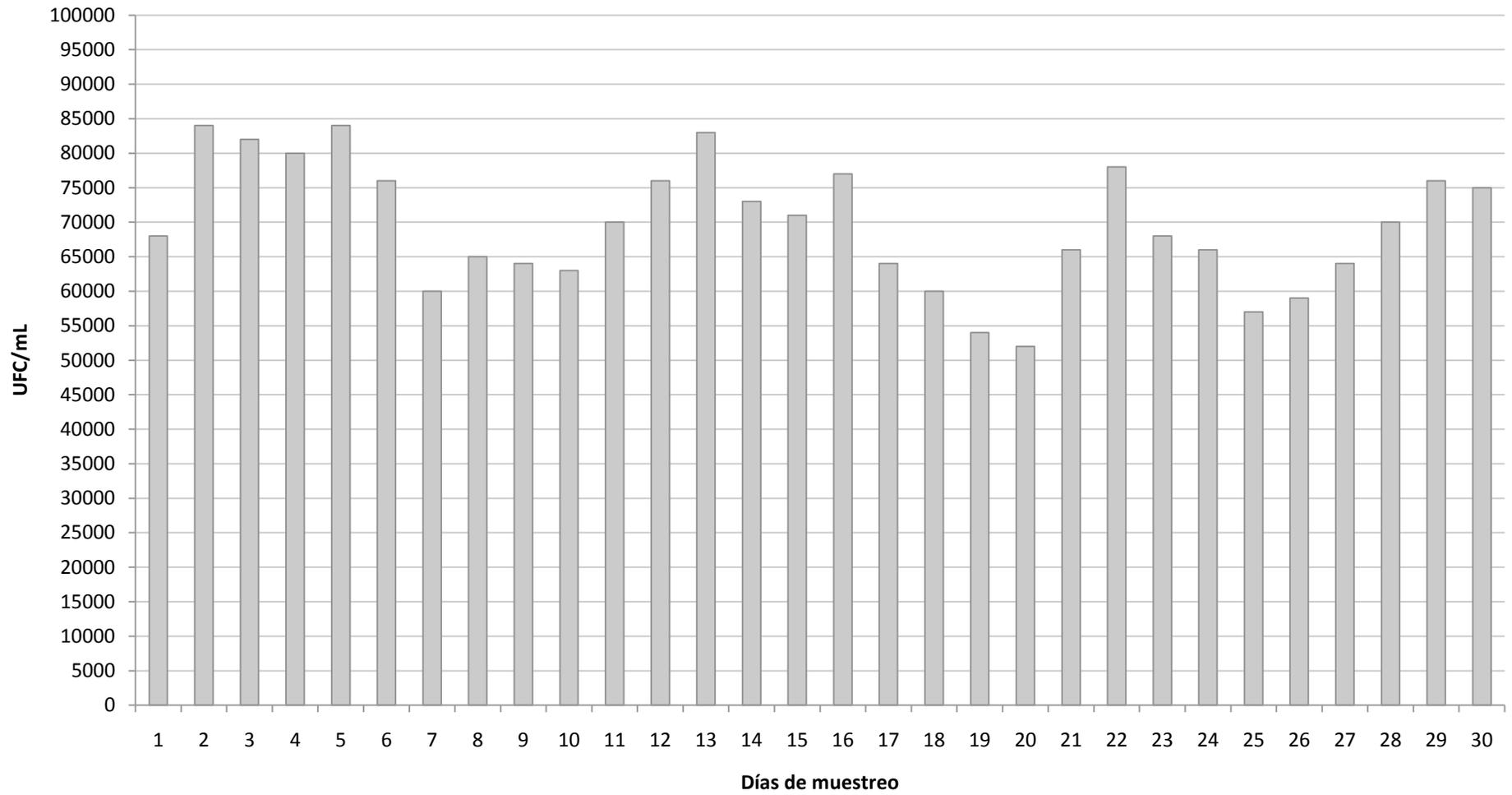
Bacteria	Mna (v.máx-v.mín)	X \pm DS
<i>Enterobacter cloacae</i>	10 (16 - 4)	10 \pm 4 b
<i>Citrobacter spp</i>	5 (10 - 0)	4 \pm 3 c
<i>E. coli</i>	4,5 (7 - 2)	4 \pm 2 c
<i>Hafnia alvei</i>	5 (12 - 0)	5 \pm 4 c
<i>St. agalactiae</i>	6 (9 - 2)	6 \pm 2 c
<i>St. dysgalactiae</i>	27 (33 - 20)	27 \pm 3a
<i>St. uberis</i>	5 (9 - 2)	6 \pm 2 c
<i>S. aureus</i>	7 (15 - 3)	8 \pm 3 b

Letras distintas en columna indican diferencias significativas (P<0,05)

(Mna):Mediana; **(v.máx-v.mín):** valor máximo y valor mínimo, **X \pm DS** promedio y desvío estándar

Con el fin de conocer la carga bacteriana diaria se calculó el número total de UFC/ml de leche cruda para cada día del tiempo de muestreo. Con esos resultados se realizó un histograma (Fig. 14).

Fig. 14. Histograma del total de UFC/ml de leche cruda por día de muestreo



6. Discusión

La mastitis o inflamación de la glándula mamaria es una enfermedad con alta incidencia en los rodeos lecheros y constituye una de las causas que ocasiona fuertes pérdidas económicas en todas las producciones del mundo, puesto que provoca una baja en el rendimiento de leche debido a la necesidad de dar tratamiento antimicrobiano prolongado llegando, a veces, a desechar tempranamente algunas vacas. Suele ser reconocida como la enfermedad más costosa de los tambos y su mayor impacto es adjudicado a la de tipo infecciosa, causada principalmente, por la presencia de *S. aureus* y *St. agalactiae* entre otros patógenos (Bedolla y Ponce de León, 2008). La bibliografía consultada demuestra que la mayor prevalencia de microorganismos corresponde a *Staphylococcus* spp, mientras que la menor compete a los *Streptococcus* spp (Fariá y col., 2005; Ruiz y col., 2011; Rodríguez Pérez y Muñoz Ganoza, 2017). Las bacterias aisladas en leche cruda que tuvieron mayor presencia en el transcurso del muestreo realizado fueron *St. dysgalactiae* con una diferencia estadísticamente significativa respecto de *Enterobacter cloacae* y *S. aureus*, y a su vez de un tercer grupo de bacterias, de menor aparición, formado por *Hafnia alvei*, *E. coli*, *Citrobacter* spp, *St. agalactiae* y *St. uberis*. La identificación de *St. dysgalactiae* y *uberis*, *E. coli* y *Enterobacter cloacae* permitirían suponer condiciones deficientes de higiene como ser pisos sucios, ambiente húmedo, presencia de moscas, acumulación de estiércol. Además de un inadecuado tratamiento de heridas en pezones y resto de la glándula durante el proceso de extracción de la leche en el establecimiento analizado. Resultados que coinciden con trabajos anteriores al estudiar la asociación entre el recuento de células somáticas y los microorganismos aislados en leche de novillas y vacas con mastitis subclínica (Rally col., 2013; Alekish, 2015; Sumon y col., 2017). En cambio, el aislamiento demostrado de *S. aureus* y *St. agalactiae* (patógenos contagiosos) puede considerarse un indicador de la existencia de vacas infectadas y por tanto de la presencia de vacas con mastitis, situación compleja ya que impacta no solo en la calidad microbiológica de la leche, sino también que provoca pérdidas económicas de importancia,

análisis que se fundamenta en lo desarrollado por investigaciones previas de diversos autores (Bedolla y Ponce de León, 2008; Ruiz y col., 2011).

Además de los mencionados microorganismos, coincidiendo con lo demostrado por Moreno (2009) también fueron aislados *Hafnia alvei* y *Citrobacter* spp, siendo común encontrarlas en el agua, suelo y alimentos y son categorizados como patógenos oportunistas poco comunes; aunque debe tenerse en cuenta que constituyen parte de la microbiota normal de los mamíferos. Su aparición indica falta de cuidado en la higiene y secado de pezones y pezoneras antes de ordeñar cada una de los animales y contaminación con alimento por presencia de comederos en la sala de ordeño (Moreno, 2009), tal como ocurre en las instalaciones del tambo objeto de estudio del presente trabajo.

En lo que respecta al control de calidad de la leche de tanque, existen valores aceptables para cada grupo de bacterias. En nuestro país los valores propuestos por la mayoría de los laboratorios proponen que *St. agalactiae* debe estar ausente, otros estreptococos deben estar entre 500 y 700 UFC/ml, *S. aureus* menos de 50 UFC/ml, otros estafilococos en menos de 300 UFC/ml y *E. coli* menos de 100 UFC/ml. En general, también es una práctica común en Argentina, considerar que 10.000 UFC/ml totales es el valor de referencia y por lo tanto, un valor igual o inferior al mismo indica que la leche producida es de buena calidad (Lucas y Lucas, 2011).

Por los valores encontrados en este estudio (52 y 84 mil UFC/ml), y tomando los valores de referencia de Lucas y col. (2011), la leche producida en el tambo analizado supera ampliamente el límite que otorga una buena calidad bacteriológica de la leche y la convierte en una leche de baja calidad por su elevada carga bacteriana.

Estos valores superiores a los establecidos están evidenciando, sobre todo, higiene insuficiente de pezones pre-ordeño y suciedad en el sistema de leche y operadores.

Por todo lo comentado, la prevención es la pieza clave en el control de mastitis (contagiosa o medioambiental), y más importante incluso que el tratamiento. Otros autores sostienen que como medidas de prevención de esta inflamación deben mencionarse: desinfección de

pezones antes y después del ordeño; ordeñar las vacas infectadas al final; cumplir con buenas prácticas de higiene durante todo el proceso y mantener en buen estado la máquina de ordeñar; hacer uso del tratamiento de secado y descartar vacas con mastitis crónica. Sin olvidar una buena alimentación de los animales y agua de buena calidad, al igual que disponibilidad de instalaciones cómodas y en buen estado (Bedolla y Ponce de León, 2008; Molinieri y col., 2009).

Todas las técnicas utilizadas para el aislamiento e identificación de bacterias relacionadas a las mastitis bovinas se pusieron a punto en el laboratorio del tambo y a partir de este trabajo podrán realizarse controles periódicos de la calidad microbiológica de la leche cruda producida, hasta ahora nunca realizados y de vital importancia para mejorar nuestro módulo productivo. No obstante, los resultados evidencian la necesidad de profundizar los estudios referidos a la calidad microbiológica de la leche, mejorar el procedimiento para identificar las especies bacterianas, incorporar nuevas técnicas y métodos para aislar otros tipos bacterianos que pueden estar presentes y que por razones diversas no fueron parte del presente proyecto.

7. Conclusiones

Según los resultados encontrados se concluye que la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *dysgalactiae* y *uberis* (bacterias Gram positivas) y enterobacterias como *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae* y *Hafnia alvei* (bacterias Gram negativas) permite determinar que la leche cruda analizada contiene contaminantes y agentes vinculados a la presencia de mastitis en las vacas del rodeo.

Además de alertar sobre la presencia de microorganismos infecciosos, el estudio microbiológico aportó datos de gran interés y fundamentales para analizar cómo se está trabajando y controlar el proceso de ordeño y sistema de leche. Información valiosa para programar cambios en las actividades desarrolladas en el tambo tendientes a mejorar la salud de los animales y a minimizar la carga bacteriana no deseable en la leche de tanque.

S. aureus es común en el canal interno del pezón, mientras que los *Streptococcus* residen en la superficie de la piel de la ubre. La vía principal de transmisión de estos microorganismos es de un animal enfermo a otro sano, situación que se agudiza cuando no es adecuada la limpieza de la ubre y cuando las pezoneras también se encuentran mal higienizadas. Además, *S. aureus* puede estar relacionado a falta de limpieza en las manos o brazos del ordeñador y en sus secreciones nasales y/o bucales (Fernández Bolaños y col., 2012).

8. Bibliografía

1. Andresen H. Mastitis: prevención y Control. Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú. 2001, 12(2): 55–64.
2. Alekish M O. The association between the somatic cell count and isolated microorganisms during subclinical mastitis in heifers in Jordan. VetMed (Praha). 2015; 60(2): 71–76.
3. Bedolla C C y Ponce de León M E R. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 2008; 9 (4) <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408.html>
4. Bergey's. Manual of Determinative Bacteriology. 8th edition. Edited by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, 1974.
5. Birhanu M, Leta S, Mamo G, Tesfaye S. Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. BMC Res Notes 10,767-782. doi.org/10.1186/s13104-017-3100-0. 2017.
6. Camussonea C M y Calvino L F. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. Rev.Argent.Microbiol. 2013; 45(2):119-130.
Fagundes H, Barchesi L, Nader Filho A, Menezes Ferreira L, Fernandes Oliveira C A. Occurrence of *staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 2010; 41: 376-380.
7. FAO y FIL. Guía de buenas prácticas en explotaciones lecheras. Directrices FAO: Producción y Sanidad Animal. N°8. <http://www.fao.org/docrep/015/ba0027s00.pdf>.
8. Faría J, Valero K, D'Pool G, García A, Allara M. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. RevCient FCV-LUZ 2005; 15: 227-234.
9. Fernández Bolaños O F, Trujillo Graffe J E, Peña Cabrera J J, Cerquera Gallego J y Granja Salcedo Y T. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. Revista

- Veterinaria REDVET 2012; 13 (11). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111112.htm>.
10. Hernández Reyes JM y Bedolla Cedeño JLC. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. REDVET 2008; (IX) 9. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n0909-08/090904.pdf>.
 11. Keefe G P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. Can Vet J 1997; 38:429-437.
 12. Kirk J y Mellenberger R. Programa de control de mastitis para vacas lecheras infectadas con *Streptococcus agalactiae*. Sitio argentino de Producción Animal. 2016. http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/122-Programa_Streptococcus.pdf
 13. Koneman E W, Allen S D, Janda W M, Schreckenberger P C, Winn W C. Diagnóstico microbiológico. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 5ta Edición. 1999.
 14. Lucas V y Lucas M. Análisis de leche de tanque, una herramienta útil para el monitoreo de mastitis y calidad de leche. Producir XXI 2011; 20(241): 24-28.
 15. MacFaddin JF. Prueba bioquímica para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 1980.
 16. Mariscal P C A, Ibáñez R A, Gutiérrez, M F D. Características microbiológicas de leche cruda de vaca en mercados de abasto de Trinidad, Bolivia. Agrociencias Amazonia2013; 1(2), 18-24.
 17. Molineri A I, Signorini M L, Cuatrin A L, Canavesio V R, Neder V E, Russi N B, Bonazza J C, Calvino L F. Calidad bacteriológica y relación entre grupos bacterianos en leche de tanque de frío. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 2009; 8 (2): 75-86.
 18. Moreno C. Retrato Microbiológico: *Hafnia alvei*. RevChillInfect. 2009; 26 (4), 355.

19. Rally V L M, Miranda E S, Castilho I G and Camargo C H. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *J. DairySci*2013; 97: 829–837.
20. Rodríguez Pérez R, Muñoz Ganoza E. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias causantes de mastitis en bovinos de un establo de Trujillo, Perú. *RevInvVet Perú* 2017; 28(4), 994-1001.
21. Ruiz A K, Ponce P, Gomes G, Mota R A, Sampaio E, Lucena E R, Benone S. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Rev. Salud Anim.* 2011; 33(1), 57-64.
22. Sumon S M M R, Ehsan M A, Islam M T. Subclinical mastitis in dairy cows: somatic cell counts and associated bacteria in Mymensingh, Bangladesh. *J Bangladesh AgrilUniv*2017; 15(2), 266–271. doi: 10.3329/jbau.v15i2.35073.