

EL USO DEL CULTIVO EN LA GRANJA PARA MEJORAR EL TRATAMIENTO DE MASTITIS

Cómo empezar, cómo sacar muestras de leche estéril,
cómo cultivar bacterias y cómo diagnosticar
los resultados

GRADOS DE SEVERIDAD DE LA MASTITIS

Mastitis clínica es una infección de la ubre en la cual se observan síntomas. El nivel de la infección o severidad puede ayudar a los administradores de la granja a tomar decisiones para el tratamiento. El grado de la enfermedad y los síntomas presentes dependerán de muchos factores como el estado nutricional o inmunológico de la vaca, el patógeno responsable de la inflamación y una variedad de factores ambientales tales como la limpieza, la humedad y la temperatura. Los casos moderados a severos pueden ser desagradables para la vaca.

NON-SEVERO

1 = LEVE



1 + 2 = MODERADO



1 **LECHE ANORMAL**
La leche tiene un aspecto acuoso, con copos o coágulos.

2 **UBRE ANORMAL**
Signos de inflamación:
Hinchazón, calor, dureza, rojez o dolor.

SEVERO

1 + 2 + 3 = SEVERO



3 **COMPORTAMIENTO ANORMAL**
Reducción en la producción de leche, fiebre, pérdida del apetito, ojos hundidos, diarrea, deshidratación o reducción en la movilidad.

INSTALACIÓN DE UN LABORATORIO DE CULTIVO EN GRANJA

El cultivo en granja requiere un espacio de trabajo designado sólo para ese propósito. Idealmente, ese lugar debería estar una habitación limpia y bien iluminada y en una zona con poco tráfico. Debe haber un mesón y un área de almacenaje con suficiente espacio y que a la vez puedan ser desinfectados fácilmente. No se puede permitir alimentos en esa zona por razones de salubridad.

INCUBADORA

- o Una pequeña incubadora debe ser comprada para crear un ambiente ideal para el crecimiento bacteriano.
- o Mantener la incubadora a 37°C o 98.6°F.
- o Un termómetro debería ser mantenido adentro de la incubadora todo el tiempo y debería ser revisado diariamente.
- o La humedad debe mantenerse a 75% a través de la colocación de un recipiente con agua dentro de la incubadora. El nivel del agua debe ser revisado y cuando sea necesario más agua debe ser agregada.

REFRIGERADOR

- o Un refrigerador debe ser comprado para el almacenamiento de placas de cultivo y para guardar las muestras de leche. Este refrigerador no debe ser utilizado para guardar alimentos para personas u animales.

EQUIPO

- o Para el cultivo en la granja, se utilizan hisopos estériles para inocular la muestra de leche en la placa de cultivo en vez de ansas estériles utilizadas en los laboratorios de calidad de la leche. El hisopo absorbe 0,1 ml de leche cuando es sumergido por 10 segundos en el recipiente con leche.
- o Guantes desechables deben ser usados siempre que se manejen materiales de laboratorio.
- o Placas de cultivo
- o Gasa cuadrada y empapada con alcohol al 70% para la desinfección de los pezones y la superficie de la mesa de trabajo
- o Recipientes para la muestra de leche deben ser usados sólo una vez
- o Marcador permanente
- o Bolsas de bioseguridad
- o Cloro
- o Una nevera portátil con hielo para el transporte de muestras de leche hacia el área del laboratorio.

ELIMINACIÓN DE LAS PLACAS DE CULTIVO

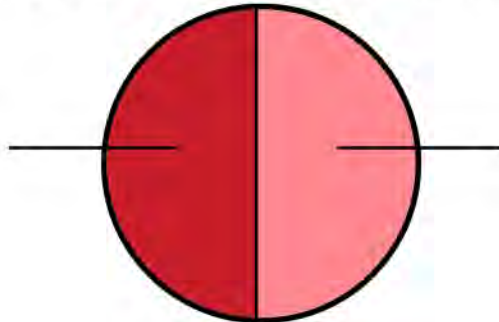
- o Otra cosa que se debe considerar cuando se instala un laboratorio es como se realizará la eliminación de residuos. Use bolsas anaranjadas de bioseguridad para descartar materiales infecciosos tales como muestras de leche y placas de cultivo.
- o Estos residuos del laboratorio deben ser eliminados de acuerdo a las regulaciones locales. En algunos lugares las placas deben ser lavadas con cloro y luego eliminadas normalmente.
- o Si usted tiene preguntas acerca del protocolo, pregúntele al veterinario del rebaño que trabaja en su área.

SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Bi-placas

Resultados: Bacterias Gram-positivo, bacterias Gram-negativas, sin crecimiento o contaminadas

Agar Factor
Crecimiento de bacterias
Gram-positivas

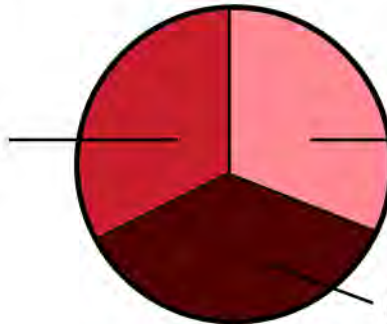


Agar MacConkey
Crecimiento de bacterias
Gram-negativas

Tri-placas

Resultados: Especies de estafilococo, estreptococo, bacterias Gram-negativas, sin crecimiento o contaminadas

Agar Factor
Crecimiento de bacterias
Gram-positivas



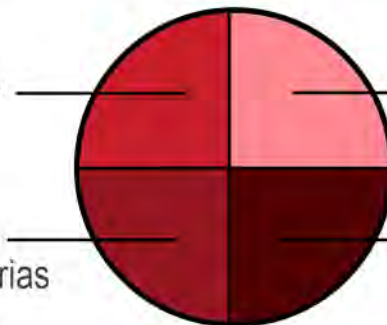
Agar MacConkey
Crecimiento de bacterias
Gram-negativas

Agar Modified TKT (MTKT)
Crecimiento de estreptococos

Quad-placas

Resultados: Especies de estafilococo, estreptococo, bacterias Gram-negativas, sin crecimiento, contaminadas u otros

Agar sangre
Crecimiento de la mayoría de
las bacterias



Agar MacConkey
Crecimiento de bacterias
Gram-negativas

Agar Factor
Crecimiento de bacterias
Gram-positivas

Agar Modified TKT (MTKT)
Crecimiento de estreptococos

CÓMO OBTENER UNA MUESTRA DE LECHE ESTÉRIL O ASEPTICA

Todo el proceso para llevar a cabo el cultivo en la granja depende absolutamente de lo bien que se haya obtenido la muestra de leche. Si este paso no se realiza correctamente, el resto del proceso no tendrá sentido. Siga estos pasos para ayudar a recoger una muestra de leche estéril.



CÓMO OBTENER UNA MUESTRA DE LECHE ESTÉRIL O ASEPTICA

1

Después de detectar el caso de mastitis, rotule un recipiente (cerrado) estéril con el número de la vaca, el cuarto afectado y la fecha.



2

Seque la ubre (con una toalla) para remover residuos sueltos.

3

Aplique la solución de presellado por un tiempo de contacto de 20-30 segundos para desinfectar la piel del pezón.



4

Seque el pezón con una toalla por vaca.

5

Despunte 3 a 4 chorros de leche para eliminar las bacterias del canal del pezón.



CÓMO OBTENER UNA MUESTRA DE LECHE ESTÉRIL O ASEPTICA

6

PASO MÁS
IMPORTANTE.

Restriegue
vigorosamente la
punta del pezón con
una gasa empapada
en alcohol al 70%.



7

Obtenga y coloque la
muestra de leche en
el recipiente
rotulado.



8

Ponga la muestra
leche inmediatamente
en una nevera o
refrigerador hasta que
esta sea cultivada en
la placa.



CÓMO PREPARAR O INOCULAR LAS PLACAS DE CULTIVO

Antes de cultivar una placa, compruebe que todos los materiales y equipos están listos y accesibles:

- o Placas de cultivo
- o Hisopos estériles
- o Muestras de leche y gradilla para las muestras
- o Guantes desechables limpios
- o Gasa empapada en alcohol al 70%

Limpie con gasa y alcohol al 70% el espacio de trabajo para eliminar las bacterias ambientales ya que de otra manera las placas de cultivo se podrían contaminar. Al momento de cultivar las placas, asegúrese de lavarse siempre las manos y la usar guantes desechables limpios.

Descongele las muestras congeladas a temperatura ambiente. Para esto las muestras deben ser colocados encima de un mesón por lo menos una hora antes que sean cultivadas en las placas. No descongele las muestras congeladas con agua caliente o en el microonda.

Rotule un lado de la placa de cultivo con el número de la vaca, el cuarto afectado y la fecha.

Mezclar bien la muestra de leche invirtiéndola varias veces. Sumerja un hisopo de algodón estéril en la muestra y espere 5 segundos para que esta se empape con leche. Mueva el hisopo sobre la superficie del agar, utilice un movimiento de atrás para adelante desde la parte superior hacia debajo de la palca de cultivo. Sumerja de nuevo el hisopo en la muestra de leche por cada parte de la placa de cultivo que necesite cultivar. Cubra inmediatamente la placa y tape de la muestra de leche después que haya cultivado la placa a fin de evitar la contaminación.

Congele las muestras de leche para que estén disponibles para realizar pruebas posteriores de confirmación.

Coloque las placas de sobre la superficie de trabajo o mesón por 5-10 minutos para permitir que la leche se absorba en el agar.

Invierta todas las placas de modo que el lado del agar este mirando hacia arriba, de tal manera que el agua que se condense se acumule en la tapa de la placa y que no gotee sobre el agar y que pueda interrumpir el crecimiento bacteriano.

Coloque las placas al revés en la incubadora e incube las placas a 37° Celsius (98 grados Fahrenheit) durante 24 horas. Las bacterias necesitarán un mínimo de 24 horas para crecer antes que las placas puedan ser leídas.

Bote la basura y desinfecte el área de trabajo (mesón).

CÓMO PREPARAR O INOCULAR LAS PLACAS DE CULTIVO

Tenga todos los materiales listos para el cultivo:

Muestras de leche

Placas de cultivo

Hisopo estéril

Guantes

Gaza empapada con alcohol al 70%

Bolsas de bioseguridad

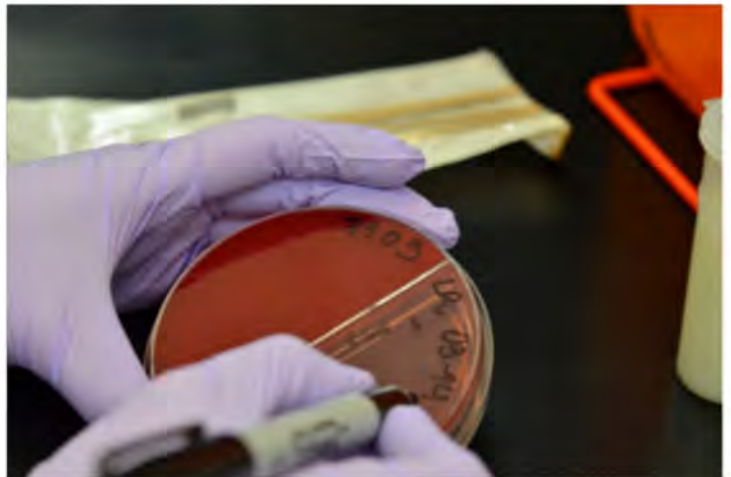


Rotule un lado de una placa nueva de cultivo con lo siguiente:

Número de la vaca

Cuarto afectado

Fecha



Mezclar bien la muestra de leche invirtiéndola varias veces.



CÓMO PREPARAR O INOCULAR LAS PLACAS DE CULTIVO

Sumerja un hisopo de algodón estéril en la muestra y ruede el hisopo entre sus dedos hasta que este se empape completamente con leche.



Inocule una parte de la placa de cultivo utilizando un movimiento en zigzag con el hisopo.



Sumerja de nuevo el hisopo en la muestra de leche por cada parte de la placa de cultivo que necesite cultivar.



CÓMO PREPARAR O INOCULAR LAS PLACAS DE CULTIVO

Inocule el resto de las partes de la placa de cultivo.



Coloque las placas de cultivo que han sido inoculadas en la incubadora (la tapa mirando hacia la rejilla) e incube las placas por 18 a 24 horas a 37°C.



CÓMO LEER LAS PLACAS DE CULTIVO

El propósito de llevar a cabo el cultivo en la granja no es sólo para hacer crecer bacterias sino para garantizar que nuestro diagnóstico sea correcto para que podamos determinar si el tratamiento con antibióticos será útil.

PRIMER PASO: EVALUAR EL CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento bacteriano toma como mínimo 24 horas de incubación antes que se puede observar la placa. Después de las 24 horas, la primera pregunta que debemos hacernos es: ¿Hay algún crecimiento en las placas?

Sin crecimiento

Hay varias razones por lo que esto sucede. Primero, puede ser que el cuartero no este infectado o que la infección ya haya sido eliminada por el sistema inmunológico del cuerpo. Asimismo, la manipulación no apropiada o errores de laboratorio pueden causar que no haya crecimiento en la placa. Por último, los organismos fastidiosos que requieren medios especiales tales como *Mycoplasma* también pueden causar una infección pero no crecerán en placas de cultivo estándar (ejemplo: placas de cultivo en la granja).

SEGUNDO PASO: LA INTERPRETACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Si hay un crecimiento en la placa, la segunda pregunta que debemos hacernos es: ¿Cuántos tipos diferentes de colonias bacterianas hay?

Contaminado

Si hay más de 2 tipos de colonias entonces la placa ha sido contaminada. Cuando esto sucede, el cuartero se puede volver a muestrear utilizando una técnica adecuada para la recolección de muestras de leche y luego se cultiva de nuevo la muestra.

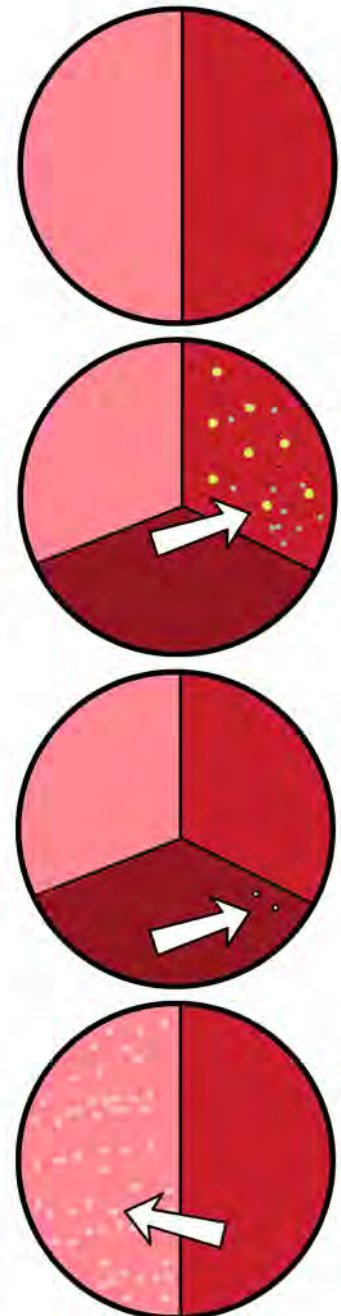
Si hay de 1 a 2 tipos de colonias, el número de "unidades formadoras de colonias" debe ser evaluado. A "ufc" son bacterias que al crecer forman una zona pequeña, circular y elevada sobre la placa de cultivo.

Crecimiento no es significativo

Menos de 3-5 ufc por tipo de colonia bacteriana significa un crecimiento no es significativo. Esto significa que las bacterias presentes en la placa de cultivo son muy pocas en número como para haber causado la mastitis.

Verdadera infección

Cuando hay 3-5 o más de ufc por tipo de colonia se dice que hay una verdadera infección y por lo tanto, se puede realizar una identificación de las colonias. A veces puede haber una verdadera infección que tiene un contaminante. Siempre y cuando el contaminante tenga un crecimiento que no es significativo aún se puede identificar el crecimiento bacteriano como una verdadera infección.

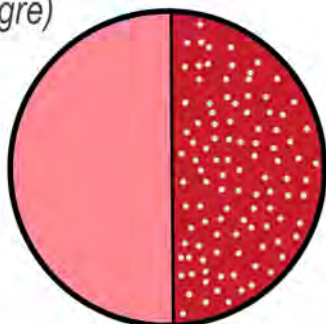


CÓMO IDENTIFICAR ESPECIES DE ESTAFILOCOCO

Es importante la determinación de la causa de la mastitis ya que no todos los casos de mastitis se benefician de la terapia con antibióticos. Por ejemplo, las bacterias Gram-positivas, tales como *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativo se comportan de manera diferente en la vaca y producen respuestas diferentes a raíz de la terapia. La capacidad de identificar entre las especies puede ayudarnos a tomar decisiones de tratamiento apropiadas en relación al manejo de la mastitis en las vacas.

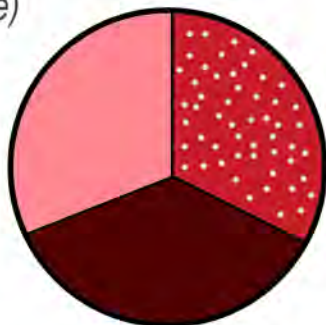
Bi-placas

Bacterias Gram-positivas (solamente crecen en el agar Factor o agar Sangre)



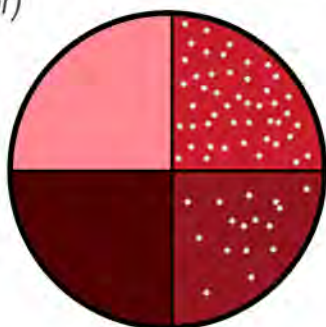
Tri-placas

Esfilococcus (solamente crecen en el agar Factor o agar Sangre)



Quad-placas

Estafilococos (crecimiento en el agar Sangre y agar Factor)

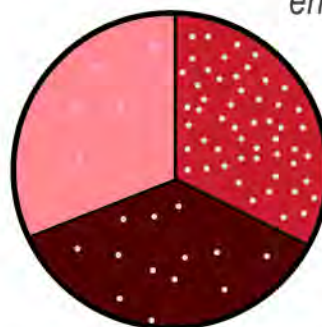


Staphylococcus aureus (zona de hemólisis)



Contaminación

Una placa contaminada (crecimiento bacteriano en todos los agares)

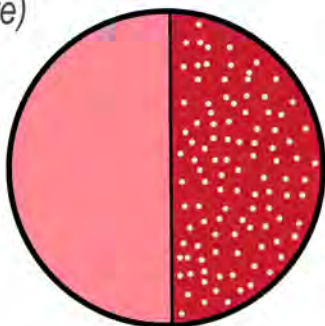


CÓMO IDENTIFICAR ESPECIES DE ESTREPTOCOCO

Las especies de estreptococos son una causa común de la mastitis y frecuentemente están asociados con altos recuentos de células somáticas y en algunos casos están asociados con mastitis clínica. Los estreptococos son organismos Gram positivos que también crecen en el medio ambiente. Aprenda a identificar estreptococos en Bi-placas, Tri-placas y Quad-placas utilizando agares selectivos en su laboratorio de cultivo en granja.

Bi-placas

Bacterias Gram-positivas (solamente crecen en el agar Factor o agar Sangre)



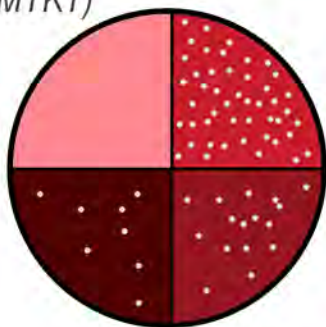
Tri-placas

Streptococcus (crecen en el agar Factor y agar MTKT)



Quad-placas

Streptococcus (crecimiento en el agar Sangre, agar Factor y agar MTKT)

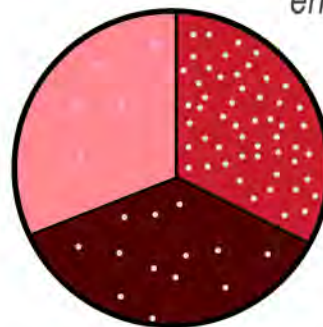


Streptococcus agalactiae (zona de hemolisis en agar MTKT)



Contaminación

Una placa contaminada (crecimiento bacteriano en todos los agares)

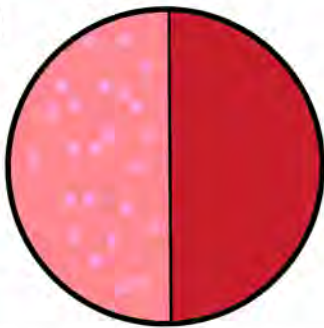


CÓMO IDENTIFICAR ESPECIES QUE SON GRAM NEGATIVAS

Las bacterias Gram negativas no puede ser diferenciada a nivel de género (tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella* o *Enterobacter*) en las placas de agar que son utilizados en los cultivos en granja. Sin embargo, esas bacterias pueden ser identificadas como lactosa negativa o lactosa positiva de acuerdo al color que fermentan la lactosa en el agar MacConkey. A menudo infecciones causadas por bacterias Gram negativas se resuelven por sí solas. Por lo tanto, no siempre es necesario tratar esas infecciones con antibióticos. Recuerde que siempre es recomendable consultar a su veterinario local al momento de tomar estas decisiones.

Bi-placas

Bacterias Gram-negativas (solamente crecen en el agar MacConkey o agar Sangre)



Triplate

Lactosa positiva (colonias rosadas crecen en el agar MacConkey)

Escherichia coli
Klebsiella



Lactosa negativa (colonias blancas/amarillas crecen en el agar MacConkey)

Enterobacter



Quad-placas

Bacterias Gram-negativas (solamente crecen en el agar MacConkey o agar Sangre)



Contaminación

Una placa contaminada (crecimiento bacteriano en todos los agares)



¿QUÉ PUEDE SALIR MAL?

Contaminación

Uno de los problemas que puede ocurrir fácilmente en los laboratorios de cultivo en las granjas, es que la muestra de leche se contamine durante la recolección, manipulación o inoculación de esta en la placa de cultivo. La contaminación puede ser difícil de detectar en medios selectivos ya que muchos contaminantes no son capaces de crecer allí. La prevención es la clave para reducir el número de placas que se contaminen.

La contaminación durante la recolección de la muestra puede ocurrir si las ubres no están debidamente desinfectadas antes del muestreo, si el pezón, la cola de la vaca, u otra fuente con estiércol entra en contacto con el recipiente para la muestra o si después del muestreo el recipiente para la muestra no fue cerrado rápidamente.

La contaminación durante la manipulación de la muestra puede ocurrir si la muestra no se coloca en una nevera durante el transporte al laboratorio o si se deja la muestra afuera del refrigerador por más de una hora antes de que la muestra sea sembrada en la placa de cultivo.

La contaminación durante la inoculación de las placas puede suceder cuando el personal no usa guantes desechables limpios, cuando los hisopos estériles se dejan al descubierto o cuando los hisopos entran en contacto con material que no está esterilizado o cuando las placas no son cubiertas inmediatamente después de ser inoculadas.

Referencia: Si hay más de un 5% de contaminación en las placas de cultivo, los procedimientos utilizados para sacar muestras de leche estériles deberán ser evaluados y los cambios o entrenamientos apropiados deberán ser realizar.



Fracaso del control de calidad

Otro problema que puede influir en el valor de los resultados de los cultivos es el fracaso en los procedimientos de control de calidad del laboratorio.

La temperatura de la incubadora debe mantenerse a 37° Celsius o 98.6° Fahrenheit. Las bacterias que causan enfermedades no crecerán adecuadamente si la temperatura de la incubadora es demasiada baja o alta. Esto puede dar lugar a muestras en donde no se observe crecimiento bacteriano o diagnósticos errados de cultivo.

La humedad de la incubadora debe permanecer alta también. Un recipiente con agua debe mantenerse adentro de la incubadora y ese recipiente debe rellenarse a menudo para mantener los niveles de humedad favorables para el crecimiento bacteriano.

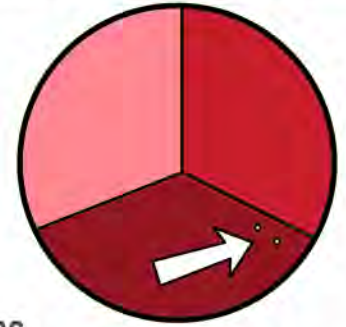
¿QUÉ PUEDE SALIR MAL?

Referencia: Los resultados del cultivo en la granja deberían ser comparables a los resultados del laboratorio de calidad de la leche en intervalos específicos para evaluar la calidad de la interpretación en la granja. Los resultados no van a ser idénticos pero deben coincidir, en general, alrededor del 80% de las veces.

Crecimiento no es significativo
Menos de 3-5 ufc por tipo de colonia

Exageración en la interpretación del crecimiento bacteriano

En los laboratorios de diagnóstico reales cerca de un 25 a 40% de las muestras de leche de vacas con mastitis clínica serán muestras sin crecimiento bacteriano o con un crecimiento bacteriano que no es significativo. Es común que algunas bacterias de la piel de los pezones o bacterias que procedan del proceso de muestreo crezcan en las placas, sin embargo aquellas bacterias que crecen en placas de cultivo contaminadas y donde se observe un crecimiento que no es significativo, no deben ser consideradas como causantes de la mastitis. El tratamiento antibiótico no debe ser basado en las placas contaminadas o con un crecimiento bacteriano que no es significativo.



Referencia: Usted puede confiar en la identificación bacteriana y en la elección del tratamiento para un caso de mastitis sólo cuando se observan de 1 a 2 tipos de colonias con al menos 3-5 unidades formadoras de colonias.

El fracaso al no utilizar la información correctamente

El problema más común en los laboratorios de cultivo en las granjas es que los agricultores no utilizan los resultados de los cultivos para realizar la toma de decisiones de tratamiento. El valor de cualquier prueba diagnóstica se basa en el valor económico de la intervención que se hace. Si no se toman en cuenta los resultados de los cultivos en granja para tomar decisiones en un tiempo real, el laboratorio no tendrá el impacto que debería tener en la granja y por lo tanto no se reducirá el uso y los costos de los antibióticos y por ende, se perderá el valor de realizar el cultivo en la granja.

Referencia: Trabaje a la par con su veterinario para diseñar e implementar los protocolos de tratamiento más apropiados para su granja. Recuerde que su veterinario y el laboratorio de calidad de la leche de su localidad están ahí para ayudarlo. Asegúrese de ponerse en contacto con ellos para contar con el apoyo y la responsabilidad en el mantenimiento de la calidad de su sistema de cultivo en las granjas.