

Diagnóstico Bacteriológico de Mastitis Bovina

**Liliana Tirante-Médica Veterinaria
Curso de Actualización en Mastitis Bovina
9 al 11 de Noviembre de 2006
Facultad de Ciencias Veterinarias – UNL
Esperanza-Santa Fe**

Diagnóstico de Mastitis

- **CCS**
- **CMT**
- **Conductividad eléctrica**
- **Pruebas Bioquímicas (NAGASA, Lactosa, etc.)**

El Diagnóstico etiológico de mastitis es el cultivo de leche de cuartos



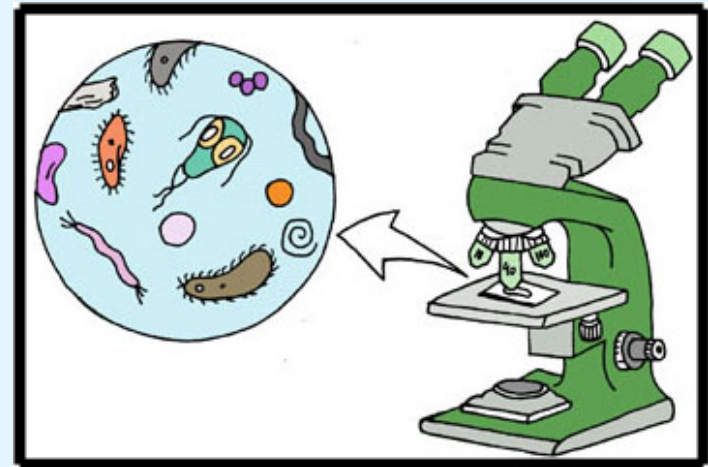
¿ La leche obtenida manualmente de un cuartero sano es estéril ?



-
- Flora normal del canal del pezón: *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Staphylococcus*, entre otros.
 - El ambiente en el que las muestras son tomadas (el tambo), no es aséptico
 - La piel de las manos del operador poseen una determinada flora microbiana

1er. Problema Diagnóstico

- ¿ Los microorganismos hallados en el cultivo provienen de una IIM o son contaminantes ?



-
- Toma de la muestra a través de maniobras asépticas
 - Procedimientos microbiológicos estandarizados.

Mastitis = Pérdidas Económicas

Diagnóstico debería tener un enfoque epidemiológico tomando como unidad el rodeo

2º Problema Diagnóstico

Programas de control de patógenos específicos

¿cuáles son las vacas que poseen IIM por esos patógenos?

-
- **Elección del tipo de muestras**
 - **Procedimientos microbiológicos**
 - **Desempeño de las Pruebas Diagnósticas**

Elección del tipo de muestra

Dependerá de los objetivos y posibilidades que tengamos

- Muestras de cuartos individuales
- Muestra compuesta de los cuatro cuartos
- Muestras de casos clínicos o subclínicos
- Muestras de todo el rodeo
- Muestras de un grupo de vacas

Muestras de Cuartos

- **Usos:** Se usa para cultivar casos clínicos y subclínicos (cuartos “problema”), Vaquillonas.
- **Ventajas:** Es óptima para el diagnóstico por menor cantidad de resultados falsos (positivos o negativos)
- **Desventajas:** mayor costo de materiales y mano de obra.

Muestras Compuestas de Cuartos

- **Usos:** cultivo masivo de todo el rodeo, cultivo de grupos de vacas.
- **Ventajas:** tiene menor costo de materiales y mano de obra
- **Desventajas:** mayor cantidad de resultados falsos (negativos o positivos)

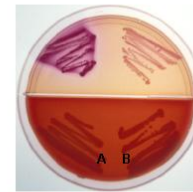
Muestreo total del rodeo

- Determinar prevalencia de los patógenos de mastitis
- Programas de erradicación de *Streptococcus agalactiae*.
- Programas de segregación de *Staphylococcus aureus*

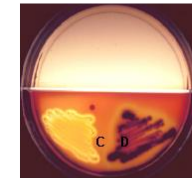
Muestreo parcial del rodeo

- Cultivo de vacas con altos CCS persistentes
- Cultivo de vaquillonas
- Cultivo de vacas al post parto
- Cultivo de casos clínicos

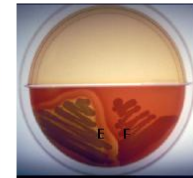
Procedimientos Generales para el Diagnóstico Bacteriológico



Coliforms



Streptococci

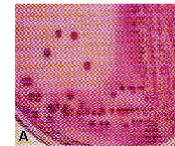


Staphylococci

Coliforms

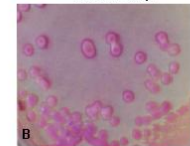


E. coli



pink zone around colonies

Klebsiella sp



pink center "fish eye"

Streptococci

Strep ag

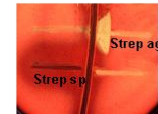


beta-hemolytic colonies

Strep sp



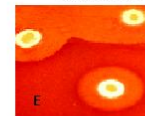
esculin positive



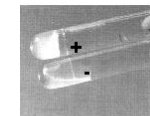
CAMP Test

Staphylococci

Staph aureus



alpha-hemolysis



Coagulase Test

Staph sp



Staph sp

Procedimientos Generales

- Agar Tripticasa Soya
- 0.1 % de esculina
- 5% de Sangre Bovina u Ovina

Incubación:

18 a 24 hs 1° lectura

48 hs 2° lectura

Procedimientos Generales

- **Muestra de un cuarto: 0.01 ml**
- **Muestra compuesta de cuartos: 0.05 a 0.1 ml**
- **Muestra de un cuarto clínico: 0.1 ml**

Muestras de MC

- Cultivo de 0.1 ml en Agar Sangre
- Incubación de la muestra 4 hs
- Cultivo de 0.1 ml en Agar Sangre y Agar Mac Conkey

Identificación de Patógenos de Mastitis

140 MO aislados

Alrededor de 20 MO más frecuentes

- Cocos Gram positivos
- Bacilos Gram Negativos
- Corynebacterias
- Mycoplasmas
- Otros microorganismos menos frecuentes

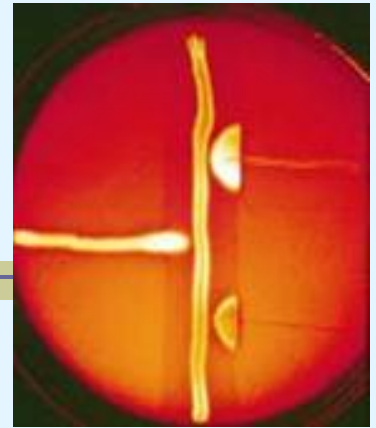
Cocos Gram Positivos

Catalasa negativos

- **Streptococos**
- Esculina (+)
 - ***Str. Uberis***
 - *Enterococcus*
 - Otros.
- Esculina (-)
 - *Camp* (+)
 - ***Str. Agalactiae***
 - *Camp* (-)
 - ***Str. Dysgalactiae*** (v)



Streptococcus agalactiae



■ **Patógeno contagioso**

- Reservorio son las ubres infectadas
- **Mastitis subclínicas** con episodios clínicos
- Se elimina en altas cargas en la leche (**UFC Tanque**)
- **Incrementa las Células Somáticas** del Tanque
- Alta sensibilidad a los antibióticos
- **Tasa de cura en lactancia : superior al 90%**
- **Erradicable**

Streptococcus uberis

- Origen ambiental
- Es el principal patógeno causante de MC en N.Zelanda, Gran Bretaña y uno de los principales en USA y Holanda (Zadoks. 2005)
- Infecciones de 3 a 4 semanas con episodio clínico.
- Se han reportado infecciones crónicas de larga duración

Streptococcus dysgalactiae

- Comportamiento dual (contagiosos y ambiental)

Otras especies

Streptococcus canis

- serología: Grupo G
- se lo ha asociado a brotes de MC

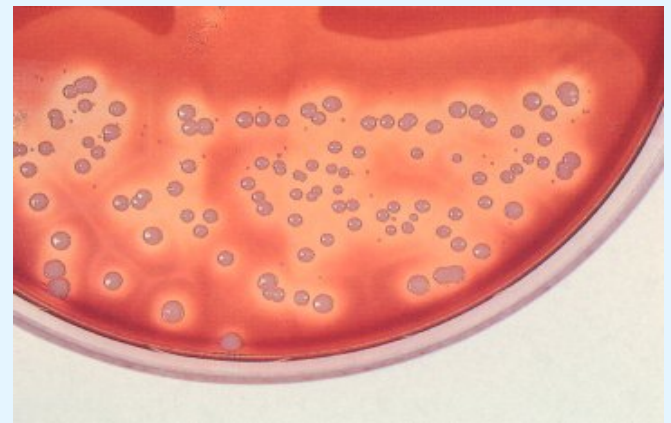
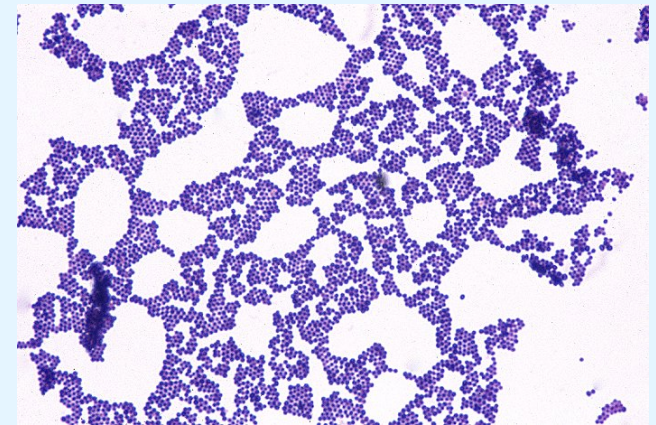
Enterococcus spp

- Relativa frecuencia. Gran resistencia a los antibióticos
- Persisten en la glándula.

Cocos Gram Positivos

Catalasa positivos

- **Staphylococcus**
 - Coagulasa (+)
 - ***Staphylococcus aureus***
 - Staph. Intermedius
 - Staph. hycus var. Hycus
 - Coagulasa (-)
 - **SCN**
 - Epidermidis
 - Cromógenes
 - Mas de 20 spp.



Staphylococcus aureus

- Es el patógeno contagioso más prevalente en todo el mundo
- Infecciones subclínicas con episodios de mastitis clínicas recurrentes
- Infecciones crónicas persisten en lactancias subsiguientes
- Puede ocasionar mastitis de tipo gangrenosa
- La tasa de cura bacteriológica en lactancia es del 20-30%

Bacilos Gram Negativos

- Fermentadores de Lactosa (Agar. Mac Conkey)
 - Coliformes
 - *Escherichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp*
- No fermentadores de Lactosa
 - *Pseudomonas spp.*
 - *Serratia spp.*

Coliformes

- **Patógenos ambientales**
- **Producen principalmente mastitis clínicas**
- **Las MC al periparto son más severas**
- **En un menor porcentaje, ocurren infecciones crónicas y subclínicas**

Escherichia Coli

Estudio de IIM recurrentes causada por E.Coli en 300 rodeos lecheros

- 18 meses – 6227 vacas hicieron casos de MC

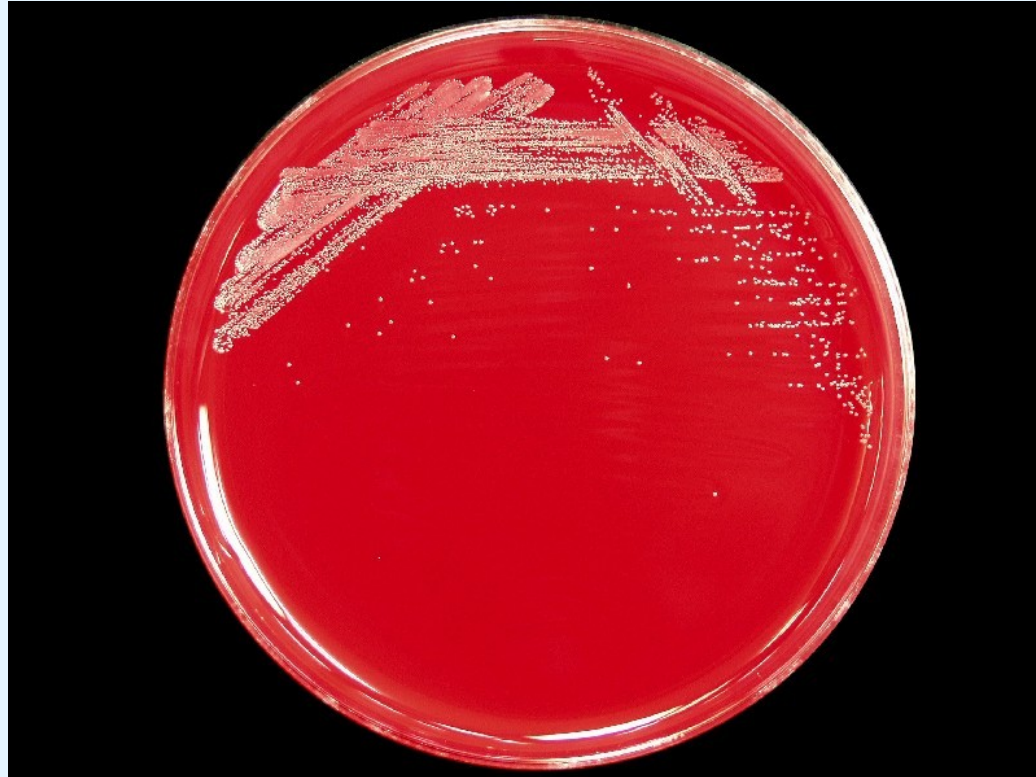
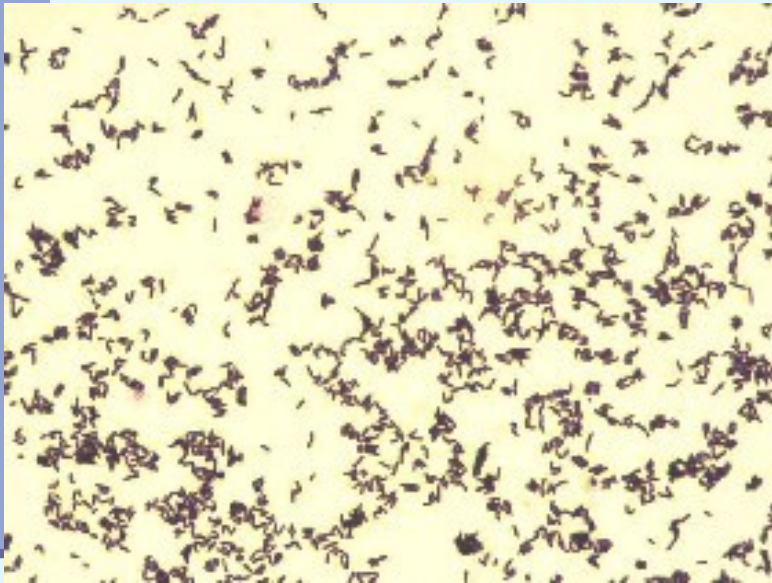
1946 Vacas hicieron 2247 casos por E. coli /209 vacas, >1 caso

- 4.77 % de todos los casos de E. coli persistieron.
- 2.98 % de todos los casos por E coli se aisló el mismo genotipo en otro cuarto.
- 13. 04% de todos los episodios de mastitis por E.Coli tuvieron un episodio clínico recurrente ocasionado por un genotipo diferente

Patrones de Infección

Lam. 1997		Casos clínicos			
Patógeno	Número aislam.	Agudos	Agudo crónico	Crónico	Subclínico
<i>E. Coli</i>	105	89	6 (20)	4 (4)	6
<i>S. aureus</i>	171	21	18 (24)	23 (33)	109
<i>S.dysgalac.</i>	80	31	10 (16)	11 (15)	28
<i>S. uberis</i>	79	28	10 (12)	11 (21)	30

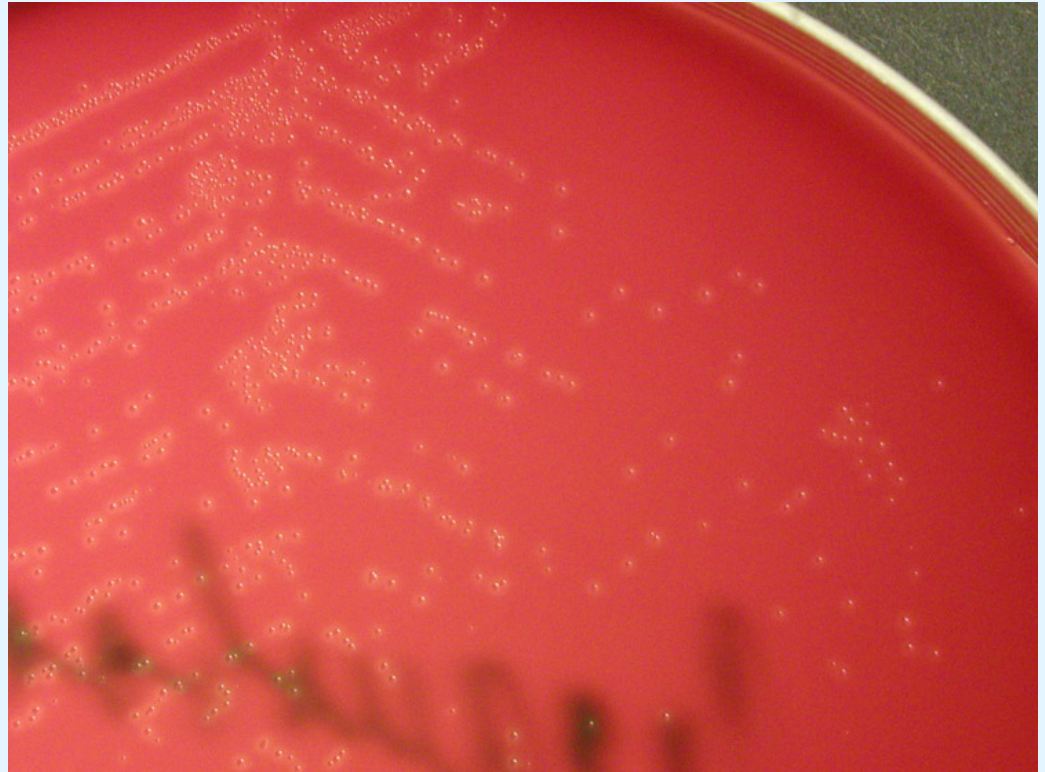
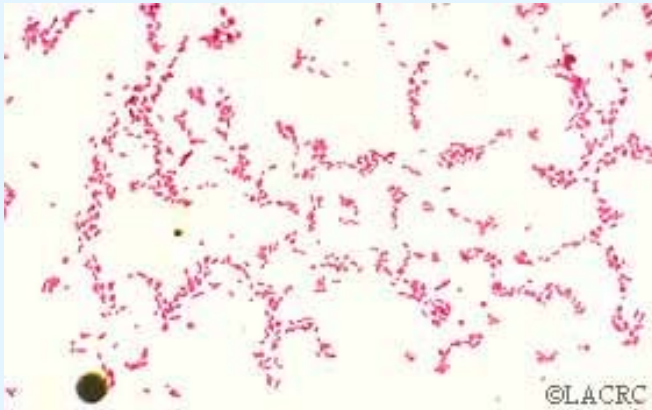
Corynebacterium bovis



Corynebacterium bovis

- Patogenicidad limitada (principalmente canal del pezón)
- Causan enfermedad subclínica y en ocasiones MC
- Sumamente contagioso
- Eleva el nivel de CS en forma moderada
- 20 al 30 % de los cuartos serán infectados al menos 1 vez.
- Efecto protector para otros patógenos?

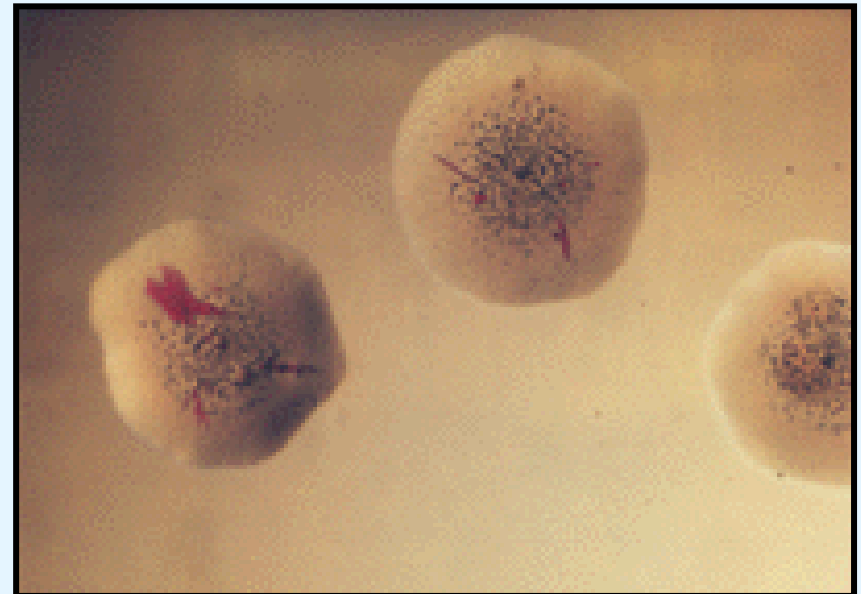
Arcanobacterium pyogenes



- Mastitis Clínicas con abscesos Difícil de curar
- Mastitis de verano

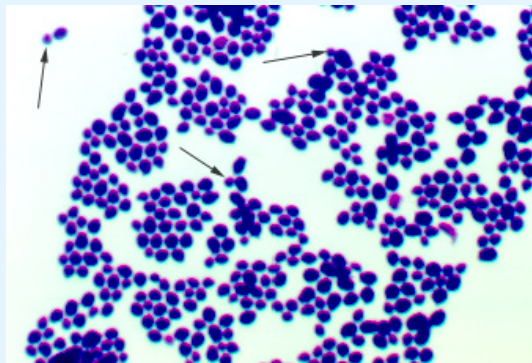
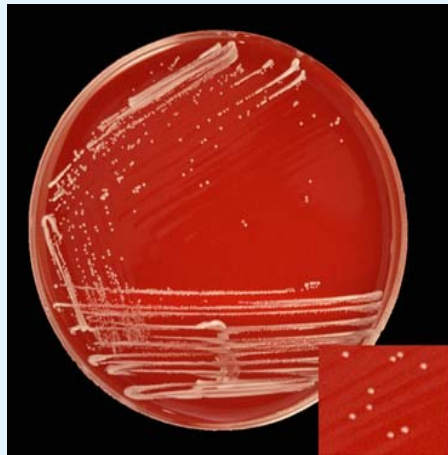
Mycoplasma spp.

- Patógeno contagioso
- Requiere medios especiales de cultivo
- No se busca rutinariamente
- Se desconoce su prevalencia en nuestros rodeos

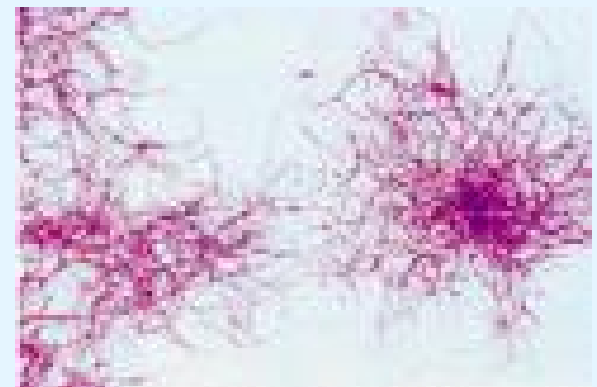


Otros Microorganismos

Levaduras



Nocardia spp.



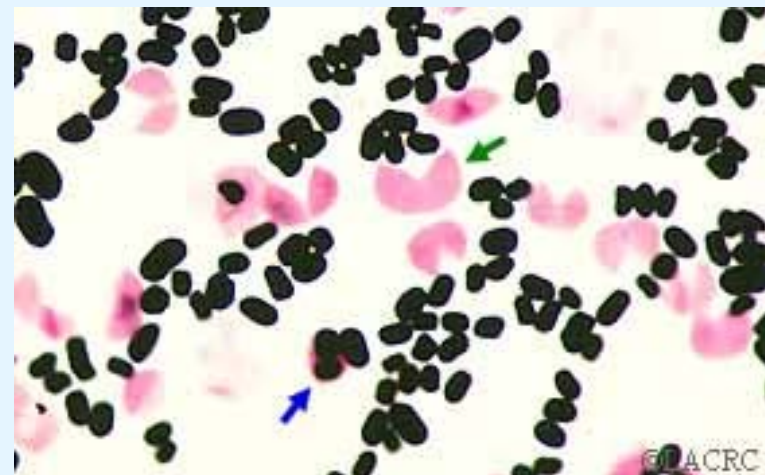
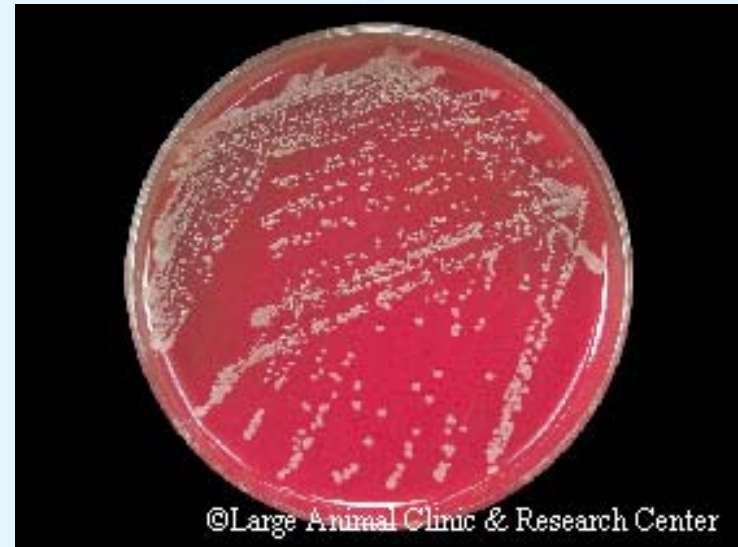
Levaduras y *Nocardia spp.*

- **Son ambientales afectan habitualmente a pocas vacas**
- **Su presencia muchas veces indica problemas de manejo**
- **Exceso de tratamientos ATB**
- **Maniobras de aplicación no asépticas**
- **Producto contaminado**

Prototheca spp.

Alga aclorofílica

- Está presente en el ambiente
- Produce MC
 - Luego de una aplicación no aséptica



Que hacer con estos casos?

■ Levaduras

■ Remisión espontánea

- SUSPENDER TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

■ *Nocardia spp.*

- REFUGO DEL ANIMAL

**Desempeño de las pruebas
diagnósticas**

Validez de las pruebas

- Habilidad para distinguir entre los individuos que poseen un enfermedad de aquellos que no la poseen.
 - Sensibilidad (Se)
 - Especificidad (Sp)

Validez de las pruebas

- Sensibilidad (Se)

Habilidad de un test para identificar correctamente aquellos individuos que poseen la enfermedad (enfermos)

- Especificidad (Sp)

Habilidad de un test para identificar correctamente aquellos individuos que no poseen la enfermedad (sanos)

Como sabemos que tan válido es un test ?

Comparándolo con una prueba que sea mucho mas exacta:

“ Prueba de Oro ”

Como se calcula ?

Resultados de mi prueba	Status verdadero determinado por una prueba de oro	
	ENFERMOS	SANOS
Positivos	Verdaderos	Falsos positivos
Negativos	Falsos negativos	Verdaderos negativos

Se: $VP / (VP + FN)$

Sp: $VN / (VN + FP)$

Población de 1000 personas, en la que 100 personas tienen la enfermedad y 900 están sanos.

Resultados de mi prueba	Status verdadero determinado por una prueba de oro		Totales
	Infectados	No Infectados	
Positivos	A = 80	B = 100	180
Negativos	C = 20	D = 800	820
Totales	A+C = 100	B+D = 900	1000

$$Se: 80/100 = 0.80$$

$$Sp: 800/900 = 0.89$$

1- Se = Falsos Negativos

1- Sp = Falsos Positivos

Sensibilidad - Especificidad

Son atributos de las pruebas

Valor Predictivo

(VP+) Es la probabilidad de que un animal positivo en el test sea un animal ENFERMO

(VP-) Es la probabilidad de que un animal Negativo en el test sea un animal SANO

El Valor Predictivo de las pruebas esta condicionado por dos factores

- Prevalencia verdadera de la enfermedad (estimada)
- Especificidad del test

Relación entre VP(+) y Prevalencia

Ejemplo: sensibilidad= 99% - Especificidad = 95 %

Prev.	Resultado del test	Enfermos	Sanos	Totales	VP (+)
1 %	+	99	495	594	99/594
	-	1	9,405	9,406	17%
	Totales	100	9,900	10,000	
5 %	+	495	475	970	495/475
	-	5	9,025	9,030	51%
	totales	500	9,500	10,000	

Teorema de Bayes

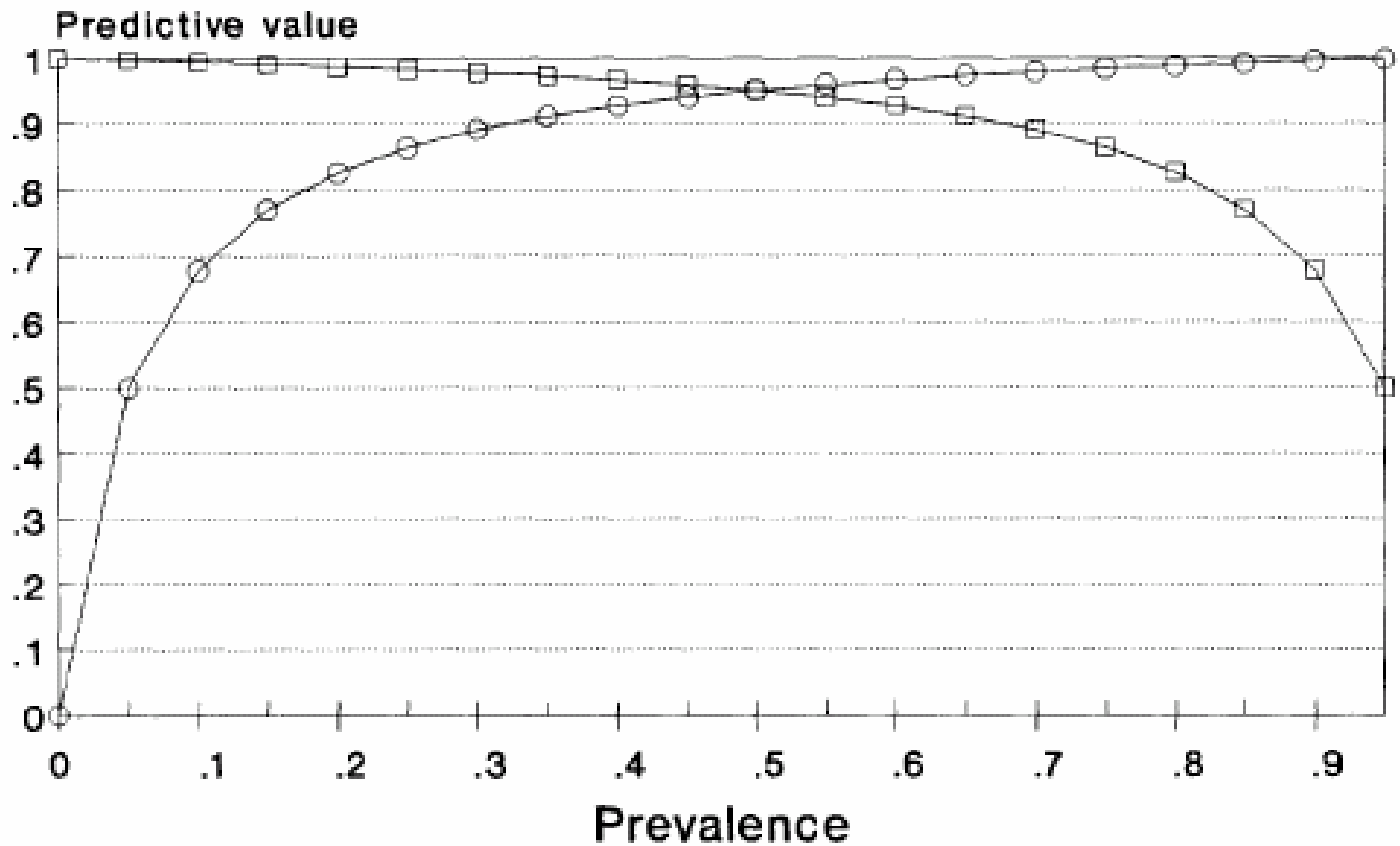


Figure 1. Effect of disease prevalence on negative (◻) and positive (○) predictive values, from Bayes' Theorem (1). Sensitivity and specificity are both 95%.

Relación entre VP(+) y Especificidad

Ejemplo: sensibilidad= 100% - Prevalencia : 10%

Sp.	Resultado del test	Enfermos	Sanos	Totales	VP (+)
70 %	+	1,000	2,700	3,700	1000/ 3700
	-	0	6,300	6,300	27%
	Totales	1000	9000	10,000	
95 %	+	1,000	450	1,450	1,000/1450
	-	0	8,550	8,550	69%
	totales	1,000	9,000	10,000	

Sensibilidad del Cultivo

- (Lam. 1996). Se : 0.01 ml - única muestra compuesta : *Staph. aureus*, del 63% (1 cuarto infectado)
- Buelow (1999) determinó Se y Sp del cultivo para *Staph. aureus*, usando distintos volúmenes de inóculos de muestras de cuartos y muestras compuestas, encontrando entre un 70 y un 80% de sensibilidad para el cultivo de un inóculo de 0.1 ml.

Sensibilidad del Cultivo para la detección de Staph. Aureus en mastitis subclínicas

- (Lam. 1996). 0.01 ml – muestras compuestas
 - 63% 1 muestra
 - 86% 2 muestras
 - 95 % 3 muestras
- Se: 0.58 a 0.89 cuando hubo entre 1 a 4 cuartos infectados

- Buelow (1999)
 - 75% a un 84% 0.1 ml muestra compuesta de cuartos
 - 60 % a 79 % 0.01 ml muestra de cuartos

Sensibilidad de cultivo para *Strep. agalactiae*

Dismore (1991).

- Muestras de cuartos:
 - 0.01 ml 98.8 %
- Compuestas :
 - 0.01 ml 96.5 %
 - 0.05 ml 98.8
- VP+ para *Strep. ag* = 97.7 – 100 %

Consideraciones finales

Muchas Gracias