

Estudiar el aislamiento y caracterización bioquímica de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* aislada de un bovino con mastitis de un hato del municipio de Algeciras - Huila

Maria del mar López rojas; Naira Alejandra Ortiz; Diana Acuña Plata

**Corporación universitaria del Huila - Corhuila
Facultad de medicina veterinaria y ciencias afines
Programa de Medicina veterinaria y zootecnia
Neiva – Huila - Colombia**

2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios primordialmente por estar con nosotras en cada paso que damos cuidándonos y dándonos fortaleza para continuar luchando por nuestros sueños , por la sabiduría, paciencia y las herramientas necesarias que nos dio para poder llevar a cabo este trabajo porque sin su ayuda no hubiese sido posible.

A nuestra directora de investigación Diana Acuña por brindarnos su acompañamiento, paciencia, tiempo, dedicación y conocimiento durante el transcurso de la carrera y del proyecto de investigación.

A los propietarios de los predios quienes nos brindaron la confianza necesaria para la realización de la investigación.

A mi madre María Eugenia Ortiz por su apoyo y confianza, a mi hija Shara Hurtado por ser el motor de mi vida y en especial a mi abuelita Adela Perdomo quien es y será mi voz de aliento en los momentos más difíciles, porque sin sus enseñanzas no hubiera podido continuar y por estar en los momentos más importantes de mi existencia.

A mi familia especialmente a mi madre Maritza rojas, mis hermanas Yaira López y Tatiana Feria Rojas. Mis amigos especialmente a Katherin Polania de quienes siempre he recibido su compañía y apoyo sincero, seres que han compartido junto a mi sus enseñanzas, alegrías y logros durante estos años, les deseo bendiciones.

A todas aquellas personas que de forma directa e indirecta aportaron su granito de arena no solo para la realización de este proyecto y culminación de mi carrera, si no para mi formación como persona y profesional, cuyos recuerdos perduraran en mí.

DEDICATORIA

A mi madre Maritza rojas córdoba por su esfuerzo realizado para que yo ahora este culminando esta etapa de mi vida, por su compañía, paciencia, apoyo, amor incondicional y confianza que siempre me ha brindado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado la mujer que soy... me faltarían palabras para agradecerle y dedicarle, te amo.

A mi abuela y madre María Mery córdoba, una bendición del cielo, por haber sido un pilar en mi formación como persona, quien me crio con dedicación, por su apoyo, compañía la cual disfrute al máximo. Aunque ya no está físicamente su cariño prevalece siempre en mi corazón, mi fortaleza y una parte importante de mi vida.

A mi hermana y amiga Yaira López por su cariño, compañía y apoyo incondicional, por ser mi base y ejemplo a seguir, por compartir conmigo mis alegrías, logros, tristezas, por alentarme cuando lo necesitaba.

A mi madre María Eugenia Ortiz por su ejemplo de superación, por su amor incondicional, porque gracias a ella y su apoyo pude cumplir esta etapa de mi vida, por sus consejos, enseñanzas, sus llamados de atención que han hecho que sea una mejor persona y madre, gracias a su fortaleza de siempre por impulsarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos que se me presenten en el camino...

A mi abuelita Adela Perdomo, que es mi mejor amiga, confidente y mayor bendición, al igual que mi abuelo Gustavo Ortiz, porque a pesar de que no estés a mi lado siempre serás mi mejor orgullo y ejemplo de vida, porque sé que desde el cielo nos cuidas.

A mi hija Shara Mildreth Hurtado por ser su madre, gracias a ello entendí el amor incondicional que se puede brindar, eres mi mayor motivación para salir adelante, eres mi mundo, eres mi todo y a tu lado he compartido alegrías, tristezas y triunfos que se multiplicaran a lo largo nuestros años.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3	JUSTIFICACIÓN	5
4	OBJETIVOS	7
4.1	OBJETIVO GENERAL:	7
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
5	ANTECEDENTES	8
6	FUNDAMENTO TEÓRICO	11
7	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	16
7.1	UBICACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO	16
7.2	TOMA DE MUESTRA DE LECHE	17
7.2.1	<i>Desinfección de Pezones:</i>	17
7.2.2	<i>Toma de la muestra.</i>	18
7.2.3	<i>Conservación y manejo de las muestras.</i>	19
7.3	AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i>	19
7.3.1	<i>Identificación de La Bacteria Stenotrophomonas maltophilia</i>	20
8	RESULTADOS	25
8.1	AISLAMIENTOS BACTERIANOS	25
8.2	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BACTERIA <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i>	26
8.3	AISLAMIENTOS BACTERIOLÓGICOS DE SUELOS	27
8.4	TABULACIÓN DE ENCUESTAS	28
9	DISCUSION	31
10	CONCLUSIONES	34
11	RECOMENDACIONES	35
12	BIBLIOGRAFIA	36

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Información Poblacional Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos 28

Gráfica 2. Alteración física de la leche. Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos 29

Gráfica 3. . Información Sitios de ordeño. Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andres Bajos 29

Gráfica 4. . Información higiene de la ubre antes y después del ordeño. Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos . 30

Gráfica 5. Información Higiene del ordeñador. Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos 30

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resultados análisis microbiológico de leches. Predios Algeciras, vereda Andes Bajos 25

Tabla 2. Caracterización bioquímica de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. Laboratorio de diagnóstico veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, sistema BBL cristal. 27

Tabla 3. Bacterias aisladas del análisis microbiológico de suelos. Predios Algeciras, vereda Andes Bajos 27

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Mapa del municipio de Algeciras Huila	16
Ilustración 2. Vacas con mastitis en los predios analizados.	17
Ilustración 3. Desinfección de pezones. Toma de muestra de leche en los predios analizados	18
Ilustración 4. Muestras de leche tomadas en los predios estudiados	19
Ilustración 5. Cepa de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> en agar Mc conkey (A) y Agar sangre (B)	20
Ilustración 6. Coloración de Bacilo Gram Negativo y prueba de Oxidasa Positiva cepa <i>S. maltphyli</i>	20
Ilustración 7. Sistema Crystal de identificación para Entericos /No fermentadores	21
Ilustración 8. Identificación bacterias aisladas en las leches examinadas. <i>Klebsiella oxytoca</i> en agar mac conkey(A), sistema BBL cristal (B)	23
Ilustración 9. Cepas de <i>E. Coli</i> y <i>Citrobacter koseri</i> aisladas de análisis microbiológico de suelo en agar Mac conkey.	24
Ilustración 10. Identificación bioquímica <i>Citrobacter koseri</i> con medios diferenciales	24

RESUMEN

En un predio lechero del municipio de Algeciras departamento del Huila -Colombia , se analizó microbiológicamente una leche procedente de un bovino con mastitis clínica, cuya ubre presentaba una lesión necrotizante, en la cual se aisló la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*, identificada mediante el método Cristal BBL, para conocer los posibles factores predisponentes a su presentación, se aplicó una encuesta epidemiológica al predio afectado y otros 2 alrededor del foco, se tomaron 14 muestras de leche de vacas con mastitis en los mismos y 3 muestras de suelos para tratar de aislar la *S. maltophilia*.

En el presente estudio se encontró, que la *S. maltophilia* es una bacteria que puede ser productora de mastitis cuyos factores predisponentes son las inadecuadas instalaciones para ordeño, la falta de higiene de los ordeñadores y la omisión del sellado de la ubre después del ordeño. Aunque esta bacteria no es común aislarla, se debe tener en cuenta como causante de mastitis (Ohnishi, 2012) y su importancia como una bacteria emergente y multi resistente (Dento, 1998) que ocasiona una disminución en la producción de leche, aumento de los costos de producción (medicamentos, asistencia técnica) lo que conlleva a un sacrificio temprano del bovino.

Palabras claves: Mastitis, Emergente, multiresistente, *Stenotrophomonas maltophilia*.

1 INTRODUCCIÓN

La mastitis es una enfermedad infectocontagiosa de la glándula mamaria, la cual se da gracias al ingreso de diferentes agentes patógenos como hongos, levaduras, bacterias a través del canal del pezón. Esta enfermedad puede cursar en forma subclínica como clínica. (Corbellini, S.F)

Las condiciones ideales para la producción de la mastitis en vacas son la exposición a factores predisponentes como el contacto con los reservorios de microorganismos inductores de mastitis, los cuales pueden estar en los sitios de pastoreo, las áreas de alojamiento, la manipulación o acumulación excesiva de heces y residuos orgánicos, el tipo de sistema de ordeño y su sistema de lavado, los días en leche y el número de partos, entre otros. Existen estudios que indican que el riesgo de presentación de mastitis clínica se puede incrementar cuando el manejo de potreros o establos de paridera permanecen encharcados o desaseados. En general, la limpieza e higiene de las instalaciones tiene una gran influencia sobre las tasas de mastitis clínica y subclínica (Zambrano, 2014), siendo esto último, la causa más común de sacrificio temprano de las vacas y pérdidas económicas a nivel mundial.

Esta enfermedad es altamente prevaleciente en el ganado lechero, y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy altas a todos los productores de leche en el mundo (Wellenberg, 2002) , debido a la disminución en el rendimiento de leche y un aumento en el número de tratamientos clínicos y desecho temprano de vacas (Ceron-Muñoz, 2002). Por lo que se ha reconocido, durante algún tiempo, como la enfermedad más costosa en los hatos lecheros (Correa, 2002).

En la actualidad se han reportado más de 100 microorganismos como causantes de infección intramamaria. La mayoría de las infecciones, incluidas las de importancia económica, son ocasionadas por especies de estafilococos, estreptococos y bacterias Gram-negativas. Las últimas son esencialmente coliformes. (Bedolla, 2008)

Clásicamente estos microorganismos causantes de-mastitis han sido divididos en patógenos contagiosos y ambientales; en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente dependiendo de su reservorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria infectada (Bradley, 2001).

Uno de los problemas que se tiene al enfrentar a la *S. maltophilia* es su gran resistencia frente a los antibióticos, esta resistencia se puede relacionar a la alta tasa de mutación de la bacteria, donde su mecanismo de resistencia se puede basar a su baja permeabilidad de la pared bacteriana, presencia de expulsión activa, y producción de enzimas (Soto, 2005), favoreciendo la multiplicación e infección de la glándula mamaria Y transmisión de una vaca a otra.

En el siguiente estudio, realizado en el municipio de Algeciras, vereda Andes bajos se caracterizó bioquímicamente una bacteria Gram negativa identificada como *Stenotrophomonas maltophilia*, aislada de una leche de un bovino hembra de 6 años con síntomas de mastitis , además se realizó 14 tomas de muestras de leche a bovinos con la enfermedad del mismo predio y alrededor del foco para verificar su posible presencia, se tomaron 6 muestras de suelo para tratar de la aislar la bacteria y se realizaron 3 encuestas epidemiológicas para buscar factores predisponentes a su presentación.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria de diferentes etiologías, y en el 90% de los casos son causados por bacterias, es vista como la principal enfermedad de las vacas lecheras en todo el mundo, causando pérdidas económicas tanto al productor como a la industria láctea, mediante la reducción de la cantidad y el deterioro de la calidad o incluso la pérdida total de la capacidad de secreción de la glándula mamaria.

Es importante destacar que la mastitis es una enfermedad altamente prevaleciente y que las pérdidas económicas afectan a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución en el rendimiento y un aumento en el número de tratamientos clínicos y desecho temprano de vacas, por lo que se ha reconocido, durante algún tiempo, como la enfermedad más costosa en los hatos lecheros (Cerón Muñoz et al., 2002). Además, induce a una disminución en la producción del 4 al 30% de leche, baja su calidad e incrementa los costos del cuidado de la salud del hato y un desecho prematuro de animales genéticamente mejorados, al mismo tiempo, los gastos que con lleva la administración de medicamentos por vía mamaria que son utilizados después de que la enfermedad llega a su término culminante. (Bedoya 2008).

La principal causa de la mastitis es infecciosa, son diversos los agentes que intervienen; las bacterias tales como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella sp*, *Staphylococcus sp*, *Pseudomonas sp*. entre otras, algas como la *Prototheca*, hongos como *Aspergillus sp* y levaduras como *Cryptococcus* y *cándida sp* entre otros. (Gaque, 2008).

Actualmente se ha realizado el aislamiento de *Stenotrophomona mantophilina* en mastitis bovina, aunque esta bacteria no se considera productora de esta; actualmente M. Onishi comprueba que esta bacteria es causante de mastitis en vacas y que aparte de esto presenta

dos características importantes: la primera se basa en la alta resistencia antibiótica gracias a diferentes mecanismos y la segunda es que se puede aislar de diferentes nichos ecológicos, por tal motivo es una bacteria de importancia gracias a su patogenicidad y daño que causa en la glándula mamaria produciendo grandes pérdidas económicas.

El uso indiscriminado y prolongado de antibióticos ha conducido a la selección de microorganismos patógenos resistentes a estos compuestos (Tresoldi et al., 2000). Uno de los principales mecanismos de resistencia exhibida por una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas bacterias es su capacidad de producir beta -lactamasas.

Estas enzimas inactivan penicilinas y cefalosporinas por hidrólisis del anillo de β -lactâmico (Brown et al., 1976). El grado de resistencia bacteriana depende de la cantidad de enzima producida, la capacidad de esta enzima para hidrolizar el antibiótico en cuestión y la velocidad con la que el β -lactâmico penetra en la membrana externa de las bacterias (Macedo et al., 2005).

Estudios realizados indican que el 65% de los bovinos hembras se vuelven improproductivas para el hato ya que esta bacteria de carácter Gram negativo, está presente en el medio ambiente y puede tener diferentes medios de ingreso a nivel del organismo que infecta.

3 JUSTIFICACIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad muy persistente en el ganado lechero, usualmente es tratada o prevenida con antibióticos intramamaria; representando una carga económica muy alta a los productores de leche en todo el mundo. Las pérdidas mundiales, anuales debido a la mastitis, se han estimado en 35 billones de dólares americanos (Wellenberg, 2002)

Durante varios años se ha venido hablando en Colombia sobre la mastitis como el principal factor depresor de la cantidad y la calidad de la producción de leche. Sin embargo, los ganaderos parecen ignorar el problema de la mastitis o lo consideran como un efecto transitorio dado por la escasa presentación de casos de mastitis clínica en los hatos y el poco compromiso de llevar a cabo procesos tecnificados para el control y la prevención de la enfermedad. (Rodriguez M, 2006)

El Huila tiene un censo pecuario de 188.511 hembras bovinas de las cuales 5.372 están en el municipio de Algeciras (ICA, 2016) susceptibles de padecer mastitis ya que esta jurisdicción está ubicada en la cordillera andina lo que le confiere un clima tropical adecuado para la proliferación de bacterias con una temperatura de 25°C y una humedad del 82%.

La resistencia bacteriana constituye uno de los problemas más relevantes en la terapia antimicrobiana de las mastitis sépticas bovinas, tanto en sus formas clínicas como subclínicas (Okolo, 1986). La *Stenotrophomonas maltophilia* es una bacteria multirresistente, Gram negativa que se ha aislado del suelo, el agua, los vegetales y los animales, así como en diferentes ambientes hospitalarios (agua de grifos, humidificadores, jabones y desinfectantes, catéteres, etc.), incluidas las manos del personal sanitario (Corzo, 2005), y actualmente en mastitis bovinas por M. Ohnishi et al en el 2011.

Por tal motivo es de suma importancia realizar diferentes investigaciones al respecto con el fin de identificar las diferentes causas, agentes patógenos que la ocasionan y por ende poder tomar las medidas necesarias para el control de la misma.

En el siguiente estudio, realizado en el municipio de Algeciras, vereda Andes bajos se caracterizó bioquímicamente una bacteria Gram negativa identificada como *Stenotrophomonas maltophilia*, aislada de una leche de un bovino hembra de 6 años con síntomas de mastitis , además se realizó 14 tomas de muestras de leche a bovinos con la enfermedad del mismo predio y alrededor del foco para verificar su posible presencia, se tomaron 6 muestras de suelo para tratar de aislar la bacteria y se realizaron 3 encuestas epidemiológicas para buscar factores predisponentes a su presentación.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Realizar el aislamiento y caracterización bioquímica de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* de un bovino con mastitis de un hato del municipio de Algeciras -Huila.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar bioquímicamente la bacteria de *Stenotrophomonas maltophilia* aislada de un bovino con mastitis.
2. Aislar la bacteria *S. maltophilia* del suelo del área de ordeño de los predios en donde se ha presentado mastitis.
3. Desarrollar una encuesta epidemiológica para investigar los factores predisponentes a la presentación de la *Stenotrophomonas maltophilia*
4. Generar una guía de manejo de ordeño para prevenir la mastitis bovina.

5 ANTECEDENTES

La Mastitis bovina es un complejo singular de enfermedades que causa una gran cantidad de pérdidas económicas a nivel mundial y en especial en las regiones con una producción lechera intensiva. La causa más común para un sacrificio temprano de las vacas lecheras son los problemas de salud de la glándula mamaria, además de problemas de fertilidad. El 26.5% de las vacas lecheras sacrificadas en el continente americano es debido a trastornos ocasionados por la mastitis. En el caso de Hesse en Alemania los problemas de mastitis son la segunda causa más común de eliminación (19.4%) de las vacas lecheras. (Wolter W., 1996), además de ser la enfermedad más costosa de la producción bovina actual (Marquez, 2015)

Si bien en Argentina, Sur América, no existen estadísticas actualizadas acerca de las pérdidas económicas que causa esta enfermedad, estimaciones realizadas durante la década del 70 indicaban mermas anuales por menor producción por valor de USD \$115 millones (Gonzalez, 1977), mientras que en la década del 80 se estimaban pérdidas por disminución de la producción de más de \$220 millones de dólares por año (Calvinho, 1983)

De un estudio de mastitis en Cuba es importante recalcar que se evaluó el estado clínico y microbiológico de la ubre en vacas lecheras, pertenecientes a 56 rebaños de la región occidental y central, mediante el examen clínico, aislamiento bacteriológico y prueba de california CMT. De los 12.274 cuartos analizados (3069 animales), el 18.02% estaban afectados por mastitis crónica y el 3.7% se encontraba atrofiado; 3.02% mostró mastitis clínica y el 45.1% mastitis subclínica; en tanto el 76.5% fue positivo a la prueba de california CMT, considerando la mastitis como una enfermedad compleja producto de la interacción de varios factores, resumidos en el animal, el medio ambiente y los microorganismos, donde el hombre juega un papel decisivo.

En un estudio de prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Montería (Colombia), mediante la prueba California para Mastitis (CMT), se evaluaron 4.260 cuartos pertenecientes a 1.065 vacas en 15 fincas manejadas bajo el sistema doble propósito. De los

cuartos se encontró que la mastitis subclínica por cuarto, en fincas administradas bajo el sistema doble propósito alcanzó una prevalencia del 9.54%. Se puede concluir que *Staphylococcus aureus* fue el principal agente etiológico, siendo sensible a los antibióticos más usados en programas de prevención y control de la mastitis bovina en el sistema de producción doble propósito.

En el año 2006 Rodríguez realizó una caracterización en 10 hatos de la Sabana de Bogotá donde se encontró pérdidas de hasta cinco litros por vaca y día en la etapa inicial de la lactancia. Hubo una clara evidencia de la persistencia de la depresión en la producción por el resto de la lactancia, estas infecciones fueron causadas por microorganismos mayores en un 52.72% por *S. agalactiae* en un 13.66% por *S. aureus*, 1.74% por *S. uberis* y *Nocardia asteroides* y un 31.86% por microorganismos menores como *S. Epidermidis*, *Corynebacterium bovis* y *Microsporum sp*

En el Huila, en el año 1996, se realizó un estudio sobre la situación sanitaria de la mastitis en bovinos de doble propósito en el norte del Huila donde se encontró que el 11.5% fueron infecciones mixtas con aislamientos frecuentes de *Staphylococcus coagulasa* negativos asociados a otras bacterias como *Corynebacterium sp* y *Enterobacter sp* y se presentaron con mayor frecuencia en las fincas de ordeño en establo. La prevalencia de *E. Coli* fue mayor en las fincas de ordeño de establo. Se concluyó que el 77.7% de las vacas y el 37.8% de los cuartos examinados estuvieron infectados. (Parra, 1996)

Otras revisiones relacionan bacterias que causan mastitis severa de manera esporádica y generalmente afectan solo a una vaca o a pocas en los hatos, podemos mencionar a *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasilienses* y *Nocardia jarcinica*, *Histophilus somni*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella mannheimia*, *Campylobacter jejuni*, *B. circus* y otras bacterias Gram negativas como *Citrobacter spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa* y *Serratia spp.* *Leptospira spp.*, incluyendo *Leptospira interrogans* serovariedad *pomona*, especialmente *Leptospira interrogans* serovariedad *hardjo*. Las bacterias anaerobias también se han aislado de casos de mastitis, generalmente

en asociación con otras bacterias facultativas, por ejemplo; *Peptostreptococcus indolicus*, *Prevotella melaninogenica*, *Eubacterium combesii*, *Clostridium sporogenes* y *Fusobacterium necrophorum*. Las infecciones por hongos están dadas por *Trichosporon spp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* and *Pichia spp.* Entre las levaduras se encuentran *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces spp.* y *Torulopsis spp.* Por último, hay algunas algas que también causan infecciones intramamarias como *Prototheca trispora* y *Prototheca zopfii*. (Romero, S,A)

M. Ohnishi en 2012, realiza una investigación donde se hace trece aislamientos de la bacteria *Stenotrophomona maltophilia* en mastitis en bovinos en Japón con el fin de evaluar la susceptibilidad y relación genética de esta bacteria. De los trece aislamientos doce de estos la *Stenotrophomona maltophilia* se aisló como agente principal causante de estas mastitis.

En un predio lechero del municipio de Algeciras departamento del Huila -Colombia , se analizó microbiológicamente una leche procedente de un bovino con mastitis clínica, cuya ubre presentaba una lesión necrotizante, en la cual se aisló la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*; aunque esta bacteria no es común aislarla, se debe tener en cuenta como causante de mastitis, esto se relaciona con el estudio de Ohnishi en el 2012 y su importancia como una bacteria emergente y multiresistente (Denton Miles, Jan. 1998) que ocasiona una disminución en la producción de leche, aumento de los costos de producción (medicamentos, asistencia técnica) lo que conllevó a un sacrificio temprano del bovino, por lo anterior se quiso investigar las características bioquímicas de la bacteria y los factores predisponentes a su presentación y de esta manera aportar para un mayor conocimiento sobre nuevas bacterias causantes de mastitis.

6 FUNDAMENTO TEÓRICO

Stenotrophomona maltophilia

es un bacilo gramnegativo, recto o ligeramente curvado, no formador de esporas, que presenta un tamaño aproximado de 0,4-0,7 μm de ancho por 0,7- 1,8 μm de largo, es considerada como bacteria móvil gracias a la presencia de varios flagelos polares. Aparecen como bacilos individuales o en parejas, no acumulando gránulos de poli- β -hidroxi-butirato en su interior. Macroscópicamente, en agar sangre se presenta en forma de colonias lisas, brillantes, bien delimitadas y de color blanco a amarillo pálido, con olor a amoníaco; aunque no está considerado como microorganismo β -hemolítico, puede producir una coloración grisácea-verdosa en las zonas de confluencia de crecimiento. *S. maltophilia* es un aerobio obligado cuya temperatura de crecimiento oscila entre 5° C y 40° C, siendo la temperatura óptima de 35° C; gran parte de las cepas de este microorganismo, que no todas, requieren metionina o cisteína para su crecimiento. (Lopez, 2009)

Bioquímicamente se caracteriza por producir una reacción negativa en la prueba de la oxidasa, oxidación de la glucosa y especialmente de la maltosa, y una producción extracelular de enzima DNAasa que puede tardar en detectarse entre 48 y 72 horas. Entre las pruebas bioquímicas positivas (más del 85% de los casos) destacan: síntesis de ornitina descarboxilasa, hidrólisis de la esculina, de la gelatina y del Tween 80. Pese a no ser muy activa metabólicamente, *S. maltophilia* puede metabolizar algunos sustratos inusuales como la estreptomycinina, por lo que ha sido investigada como potencial agente biodegradante. (Lopez, 2009)

En cuanto a su hábitat, *Stenotrophomonas maltophilia* es un organismo de localización ubicua capaz de colonizar diferentes nichos ecológicos; ha sido aislado en agua (agua embotellada, aguas residuales, lagos hipereutróficos, pozos y ríos), en suelo, en la rizosfera de diferentes vegetales (algodón, cítricos, maíz, trigo, etc.), en animales (animales de laboratorio, conejos, ovejas, peces, ranas y serpientes) y en alimentos (cerdos, huevos, leche y pescados congelados). (Casla, 2009)

También es interesante notar que la *Stenotrophomonas maltophilia* es una bacteria involucrada con la degradación de la queratina. Dado que un importante mecanismo inmune innato de la glándula mamaria bovina es la producción de un tapón de queratina que cubre el canal del pezón, la facultad de un microorganismo para degradar la queratina probablemente mejore su capacidad de colonizar los tejidos mamarios. (Casla, 2009)

En la resistencia múltiple de *S. maltophilia* participan diversos factores, como son la permeabilidad disminuida que impide la entrada de los antimicrobianos, la falta de un sistema de transporte para ese antibiótico, la existencia de sistemas de expulsión activa de antimicrobianos y la producción de enzimas hidrolíticas o inactivantes. Como en otros gramnegativos no fermentadores, el fenotipo multirresistente (MDR) se debe a fenómenos de corresponsencia (presencia de diferentes mecanismos de resistencia que confieren a la bacteria una sensibilidad reducida frente a un determinado grupo de antibióticos) y de resistencia cruzada (un único mecanismo bioquímico es el responsable de la resistencia de la bacteria frente a la mayoría de los miembros de una clase de antimicrobianos) (Casla, 2009)

La *Stenotrophomonas maltophilia* posee un gran mecanismo de resistencia donde se implica la disminución de la permeabilidad de la membrana externa de la pared bacteriana, la presencia de sistemas de expulsión activa y la producción de enzimas hidrolíticas o inactivantes, que ocasionan una gran resistencia a los B- lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas (*s. maltophilia* son sensibles al ácido nalidíxico y resistentes al norfloxacin o al ciprofloxacino). (Viruez, 2007), (Revollo 2007).

Mastitis bovina

Es una enfermedad de la glándula mamaria ocasionada por diferentes agentes etiológicos y causante de grandes pérdidas a nivel mundial por costos en tratamiento y desecho temprano de vacas.

La ubre es un gran cuerpo glandular, el cual sirve para la nutrición del becerro y consta de cuatro cuartos. Cada cuarto representa una unidad. Ello da como resultado que la enfermedad mastitis puede estar confinada a un cuarto, cada cuarto de la ubre consta del cuerpo glandular y el pezón. La ubre está formada por un sistema de conductos, compuestos por la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula, los canales lácteos y los alvéolos. Funcionalmente se diferencia la parte alveolar (porción glandular) del conjunto del alveolo y de la porción cisternal de la cisterna general, así como de los conductos lácteos. En los alvéolos, con un espesor de 0.1 mm en promedio es donde se produce la leche. La pared de un alveolo consta de la membrana basal, en donde se unen en el alveolo, en forma de canasta, las células mioepiteliales con las células epiteliales alveolares (células glandulares lácteas). Antes de la ordeña se encuentra una gran parte de la leche (60%) en la porción alveolar de la ubre. Esa leche puede únicamente ser liberada con ayuda de la hormona oxitocina que es producida en el lóbulo posterior de la hipófisis. (Wolter W., 1996).

El esfínter del canal del pezón impide la entrada de bacterias. La amplitud del canal del pezón se encuentra en una íntima relación con el funcionamiento del esfínter. El crecimiento del epitelio se dirige hacia el exterior en la desembocadura del canal del pezón, lo cual también sirve para evitar la entrada de bacterias. Mediante el flujo hacia fuera de la leche (por la ordeña o cuando el becerro mama) son expulsados los agentes patógenos del canal del pezón. La roseta de Füstenberg forma una corona en el paso del canal del pezón a la cisterna de este. Los pliegues de la roseta de Füstenberg no solo tienen una función mecánica como mecanismo de cierre sino también sirve como mecanismo de defensa en ese lugar. La queratinización intensiva del epitelio del canal del pezón forma una capa lactosada bactericida que representa una barrera muy efectiva contra agentes extraños. Si bien ese tapón de queratina será lavado casi completamente durante la ordeña y después de 2- 3 horas del ordeño se restablece completamente la función de defensa del canal del pezón. (Wolter 1996).

Los linfocitos, las células plasmáticas y los macrófagos se pueden encontrar en un número escaso en el tejido conjuntivo de la glándula mamaria bovina. En la ubre sana se observa un paso muy escaso de los granulocitos neutrófilos de la sangre hacia el epitelio alveolar y de ahí a la leche. En caso de que haya una invasión muy fuerte de bacterias se verá aumentado el número de granulocitos de los vasos sanguíneos. Entonces se verá aumentado el número de células somáticas en la leche. Diferentes mediadores químicos desencadenan esas reacciones inflamatorias como consecuencia de la acción de agentes patógenos o algún otro estímulo. (Wolter 1996).

La velocidad, el carácter y la intensidad de los síntomas clínicos, así como la duración y terminación de la inflamación de la ubre está determinada por: - La patogenicidad y virulencia del agente causal. - Los mecanismos de defensa de la vaca. - El nivel funcional de la glándula mamaria. - Y eventualmente la efectividad de un tratamiento. Independientemente de que agente patógeno sea el causante de la mastitis, existe una frase muy válida: La Mastitis es una enfermedad de factores. Únicamente con una interacción de factores favorables un agente patógeno puede infectar una ubre.

Este canal puede lesionarse debido a heridas en los pezones (por manejo deficiente), un ordeño muy brusco (defectos técnicos en el aparato de ordeño, los plásticos muy viejos, un ordeño ciego, defectos o deficiencias en la máquina de ordeño etc. Las concentraciones ambientales elevadas de bacterias hacen que el mecanismo de defensa de la ubre se debilite. Este problema puede ser debido a un ambiente muy antihigiénico en el establo, una higiene deficiente en el ordeño, una higiene deficiente de los pisos y superficies (las bacterias se reproducen mejor en los medios húmedos y cálidos).

Entre los factores de riesgo para que un microorganismo ingrese a la ubre y cause mastitis están: un medio ambiente sucio lo cual predispone la infección, equipo o material contaminado, lavado deficiente e inadecuado de la ubre, falta de sellado de los pezones, errores en la técnica de ordeño, entre otros. Una vez el microorganismo este en contacto con la ubre, invade el tejido, se prolifera e inflama produciendo la mastitis. Dependiendo de

la severidad y la duración, en uno o varios de los cuartos de la ubre, se puede encontrar fibrosis, edema inflamatorio y atrofia del tejido mamario. En casos graves puede haber gangrena y en la etapa terminal atrofia de la glándula (Gaque 2008).

Tipos de mastitis

La mastitis subclínica es una inflamación de la ubre sin síntomas externos reconocibles. El contenido de células somáticas esta elevado en dos de tres muestreos (con un intervalo de una semana) y se observa la presencia de patógenos de mastitis, la composición química de la leche esta alterada.

La mastitis aguda se observa con síntomas claros de una inflamación de la ubre, hay temperatura elevada, con dolores e inflamación. La leche está muy alterada macroscópicamente y con frecuencia los animales presentan fiebre. (Wolter 1996).

Otras bacterias del grupo de coliformes son un indicador del grado de contaminación fecal, derivado directamente del tracto intestinal de las vacas (Kruze, 2009); en épocas de lluvia existe un mayor riesgo para la contaminación de la glándula mamaria por coliformes, debido a que las vacas llegan sucias de estiércol a la sala de ordeño, donde la ubre húmeda puede contaminar las pezoneras (Andresen, 2001).

Los coliformes como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Enterobacter aerogenes* (*E. aerogenes*) y *Corynebacterium pyogenes* (*C. pyogenes*), también causan mastitis ambientales y son habitantes normales del tracto digestivo de los animales o se encuentran en el suelo. La infección con estos gérmenes se produce por la utilización de sondas, de cánulas contaminadas y el descuido en las medidas profilácticas como deficiente higiene de los pezones (lavado o presellado) y no sellado de los pezones, la aplicación de la terapia de la vaca seca (TVS) sin una desinfección del esfínter del pezón y la introducción total de la cánula. Las malas prácticas ganaderas en la implementación de las medidas profilácticas, hace que algunos de estos microorganismos puedan llegar a desarrollar signos sistémicos en la vaca y provocar la muerte.

7 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizó un estudio de tipo básico experimental, con un enfoque cualitativo, en cual se tomaron 14 muestras de bovinos hembras con mastitis y 3 muestras de suelo, en un periodo de dos meses, tanto en el predio donde se encontró la bacteria *S. maltophilia* como en 2 predios alrededor del foco ubicadas en el municipio de Algeciras vereda Andes bajos el Cual se encuentra ubicado a 1100msnm, una pluviosidad de 1200 mm al año, zona de vida: bosque húmedo tropical, temperatura promedio de 25°C y una humedad relativa del 82%.

Además, se aplicó una encuesta epidemiológica la cual permitió caracterizar las causas de la presentación de la *S. maltophilia* en la zona.

7.1 UBICACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO

Algeciras –Huila ubicada en la cordillera andina posee un clima tropical adecuado para la proliferación de bacterias con una temperatura promedio de 25°C y una humedad relativa del 82%,

Ilustración 1. Mapa del municipio de Algeciras Huila



Fuente: <http://huilaturistica.blogspot.com.co/2014/05/croquis-de-municipios-del-huila-mapas.html>

7.2 TOMA DE MUESTRA DE LECHE

Se tomaron muestras de leche a 14 bovinos con síntomas de mastitis clínica o subclínica con prueba de California Test positiva, teniendo en cuenta que la mastitis subclínica es una inflamación de la ubre sin síntomas externos reconocibles y la mastitis clínica se observa con síntomas claros de una inflamación de la ubre, con temperatura elevada, dolores e inflamación, la toma de muestra se hizo de la siguiente manera:

7.2.1 Desinfección de Pezones:

Los pezones se lavaron y desinfectaron para evitar contaminaciones cruzadas. Se utilizó una solución desinfectante con yodo a concentración de 60 ppm, seguido de un secado del pezón con una toalla desechable, después de esto se desecharon de 10 a 15 ml de leche de cada cuarto y Enseguida se limpió la punta del pezón y su orificio durante 10 a 15 segundos con una toalla desechable sumergida en alcohol para dar por terminada la desinfección, se utilizó una toalla por cada pezón.

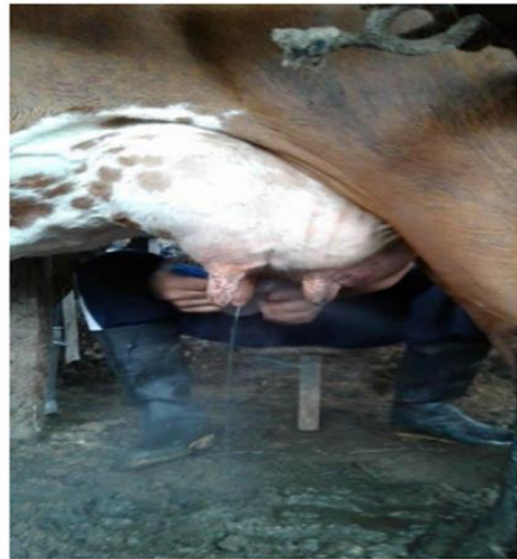


Ilustración 2. Vacas con mastitis en los predios analizados.

7.2.2 Toma de la muestra.

Se realizó un lavado de manos con su respectiva desinfección antes de manipular la ubre. El frasco recolector se colocó de forma horizontal evitando la contaminación. La toma de muestra se hizo con una presión mínima y se llenó dos tercios del contenedor.

Para la toma de muestra de suelo se realizó un reconocimiento de los potreros donde se encontraban los bovinos afectados, con un barreno se realizó la toma de suelo en forma zigzag, tomando 10 gramos en cada punto hasta completar 100 g, en una bolsa estéril para su transporte al laboratorio. Se hicieron 3 diluciones^a partir de una dilución madre de 1/10 (90 ml de agua peptonada + 10 gramos del suelo), se cultivó 1 cm de cada dilución en profundidad en agar Mc Conckey y agar Nutritivo, se incubó a 37°C X 18 horas luego se procedió a purificar el aislamiento tomando aquellas colonias lactosa negativa, oxidasa positiva y se procedió a aplicar las bioquímicas y su identificación mediante el sistema Cristal



Ilustración 3. Desinfección de pezones. Toma de muestra de leche en los predios analizados

7.2.3 Conservación y manejo de las muestras.

Cada frasco contenedor con muestra se identificó con el número del predio y la identificación de la vaca a la que pertenecían, siguiente a esto se transportaron en una cava con hielo adecuada hacia el laboratorio. El procesamiento de la muestra se realizó inmediatamente después de su llegada al laboratorio del Instituto Colombiano Agropecuario ICA Seccional Huila.



Ilustración 4. Muestras de leche tomadas en los predios estudiados

7.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA *Stenotrophomonas maltophilia*

Para el aislamiento bacteriológico de *Stenotrophomonas maltophilia* se utilizó Agar sangre preparado con sangre ovina al 5% y Agar Mc Conkey, en los cuales se hizo un inculo de la muestra de leche homogenizada y ambientada.

Estas placas se incubaron a 37°C x 18 horas para verificación de crecimiento de colonias grisáceas en agar sangre, y de colonias lactosa negativas en agar Mc Conkey.



Ilustración 5. Cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* en agar Mc conkey (A) y Agar sangre (B)

7.3.1 Identificación de La Bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*

Una vez se presumió la presencia de la bacteria por ser lactosa negativa en agar Mc conkey, bacilo Gram negativo, oxidasa positivo, móvil en medio SIM (medio de sulfuro indol para movilidad) , Lisina descarboxilasa positivo, se procedió a la realización de la identificación mediante el sistema Cristal , el cual es un método de identificación bioquímico que utiliza la degradación de sustratos específicos los cuales son detectados por varios sistemas indicadores, así , mediante la obtención de un código específico de acuerdo a las características bioquímicas y lectura mediante un software de BD se obtuvo la identificación de la bacteria.

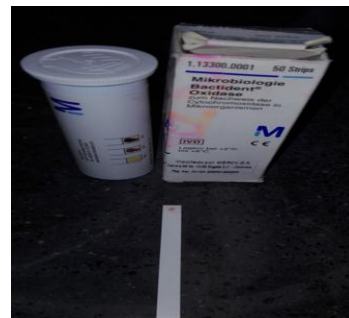
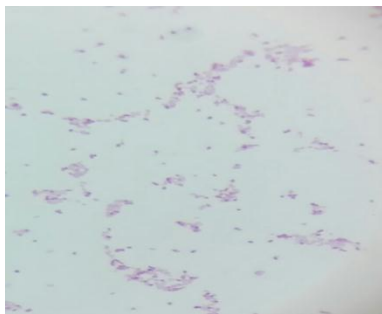


Ilustración 6. Coloración de Bacilo Gram Negativo y prueba de Oxidasa Positiva cepa *S. maltphyli*

BD BBL Crystal Entericos/No Fermentadores está basado en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un aislado para metabolizar los carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad de un organismo para metabolizar el sustrato siendo el oxígeno el aceptor final de electrones. Ambas reacciones se detectan normalmente mediante el uso de un indicador de pH en el sustrato del análisis. Los sustratos cromógenos al sufrir hidrólisis producen cambios de color que pueden ser detectados visualmente.

Ilustración 7. Sistema Crystal de identificación para Entericos /No fermentadores



Otras bacterias aisladas se identificaron con el mismo método y se les realizó pruebas básicas como:

Oxidasa: se utiliza para la identificación de microorganismos en función de su actividad citocromo c oxidasa. Un resultado positivo de la prueba suele significar que la bacteria puede utilizar oxígeno para la producción de energía mediante una cadena de transferencia de electrones.

Indol: que es un compuesto que se genera mediante la desaminación reductiva del triptófano y esta reacción es llevada a cabo por algunas bacterias que poseen las enzimas denominadas en su conjunto triptofanasas. Para detectar la producción de indol se utiliza el medio Caldo triptófano y la lectura de la prueba se realiza con el reactivo de

Kovacs (alcoholisoamilo, *p*-dimetilaminobenzaldehído, ácido clorhídrico concentrado) con el que el indol producido reacciona generando una coloración rosa intensa.

Citrato: cuyo metabolismo se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa

TSI Agar hierro – triple azúcar es un medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

LYA Agar hierro lisina es un medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico.

El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8. Por decarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta. La decarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesaria que la glucosa sea previamente fermentada. Los microorganismos que no producen lisina descarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 hs de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas,

y el fondo amarillo. La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro.

SIM, Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovács o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

Urea Aquellas bacterias que poseen la enzima ureasa, pueden utilizar el nitrógeno proveniente de la urea, la hidrolizan, liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, haciendo virar el indicador rojo fenol del amarillo al rojo.

(A)



(B)



Ilustración 8. Identificación bacterias aisladas en las leches examinadas. *Klebsiella oxytoca* en agar mac conkey(A), sistema BBL cristal (B)

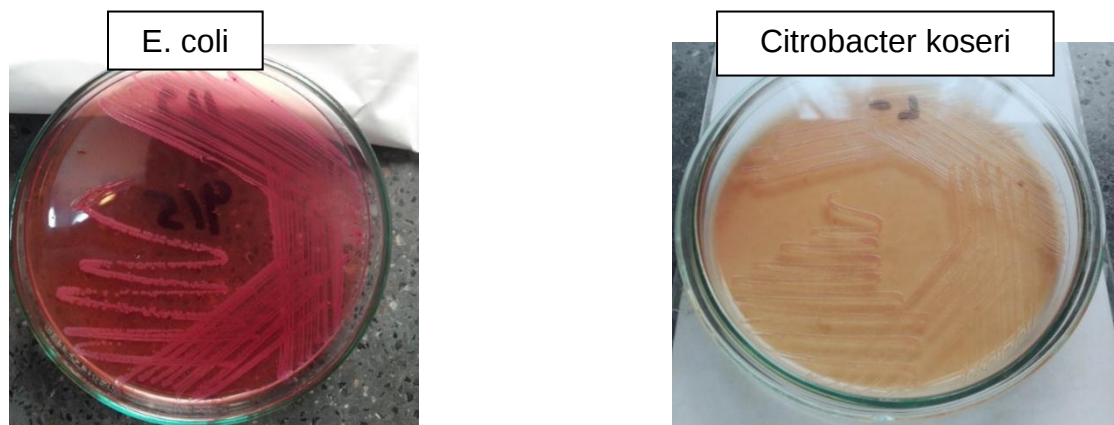


Ilustración 9. Cepas de *E. Coli* y *Citrobacter koseri* aisladas de análisis microbiológico de suelo en agar Mac conkey.

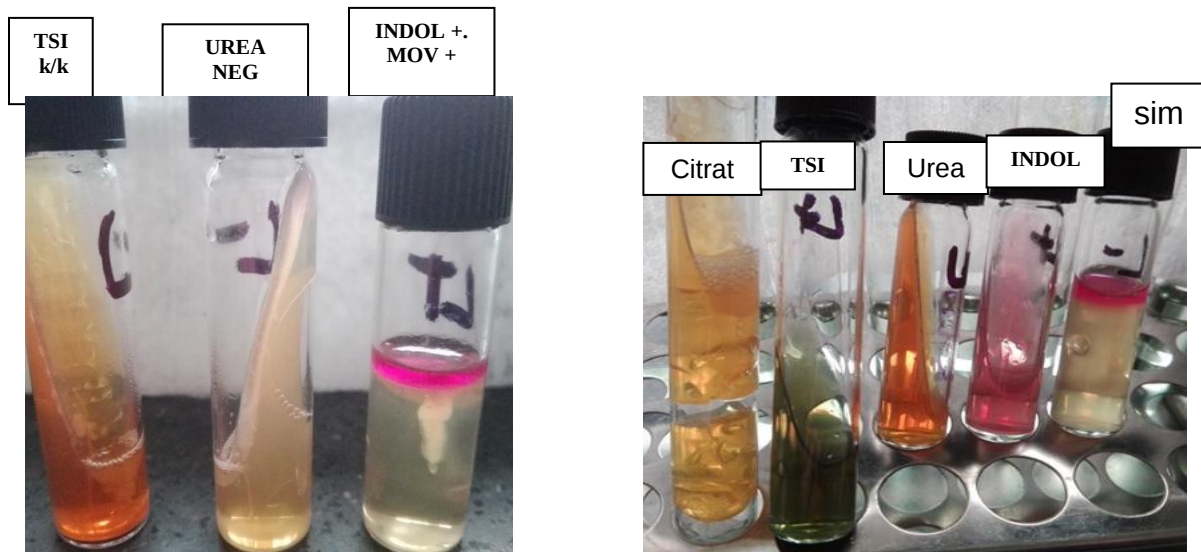


Ilustración 10. Identificación bioquímica *Citrobacter koseri* con medios diferenciales

8 RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los aislamientos bacteriológicos hechos de las 14 leches tomadas de bovinos hembras con mastitis clínica y 3 muestras de suelo de las fincas analizadas se muestran en las tablas 1 y 2, la caracterización bioquímica del aislado de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* en la tabla 3 y los resultados de las encuestas a través de gráficas.

8.1 Aislamientos bacterianos

MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS	BACTERIA AISLADA
LECHE FINCA 1-1	<i>E.coli</i>
LECHE FINCA 1-2	<i>Klebsiella oxytoca</i>
LECHE FINCA 1-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
LECHE FINCA 1-4	<i>Klebsiella oxytoca</i>
LECHE FINCA 2-1	<i>Acinetobacter sp</i>
LECHE FINCA 2-2	<i>Acinetobacter sp</i>
LECHE FINCA 2-3	<i>Bacilos Negativos no fermentadores miscelánea Cristal</i>
LECHE FINCA 2-4	<i>Citrobacter koseri</i>
LECHE FINCA 2-5	<i>No hubo aislamiento aerobio</i>
LECHE FINCA 3-1	<i>Klebsiella oxytoca</i>
LECHE FINCA 3-2	<i>Staphylococcus sp</i>
LECHE FINCA 3-3	<i>Staphylococcus sp</i>
LECHE FINCA 3-4	<i>No hubo aislamiento aerobio</i>
LECHE FINCA 3-5	<i>No hubo aislamiento aerobio</i>

Tabla 1. Resultado análisis microbiológico de leches. Predios Algeciras, vereda Andes Bajos

8.2 Caracterización bioquímica de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*

PRUEBA	CEPA <i>S. maltophilia</i> AISLADA EN EL LABORATORIO
Prueba de oxidasa	Positivo
Catalasa	Positivo
Crecimiento a 37°C	Positivo
Movilidad 37°C	Positivo
Indole	Negativo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Arabinosa	Negativo
Manosa	Negativo
Sucrosa	Negativo
Melobiosa	Negativo
Ramnosa	Negativo
Sorbitol	Negativo
Manitol	Negativo
Galactosa	Negativo
Inositol	Negativo
p-n-p-phosphate	Positivo
p-n-p α - β -glucoside	Positivo
p-n-p- β -galactoside	Positivo
Proline nitroanilide	Negativo
p-n-p bis-phosphate	Negativo
p-n-p-xyloside	Negativo
p-n-p- α -arabinoside	Negativo
p-n-p-phosphorylcholine	Negativo
p-n-p- β -glucuronide	Negativo
p-n-p-N-acetyl glucosaminide	Negativo

γ -L-glutamyl p-nitroanilide	Negativo
Esculin	Positivo
p-nitro-DL-phenylalanine	Negativo
Urea	Positivo
Glycine	Positivo
Citrato	Positivo
Malonic acid	Negativo
Triphenyl Tetrazolium chloride	Positivo
Arginine	Positivo
Lysine	Positivo
Agar Mc conkey	Crecimiento a 37°C – colonia Lactosa negativa
Agar sangre	Crecimiento a 37°C , colonias grisáceas

Tabla 2. Caracterización bioquímica de la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia*. Laboratorio de diagnóstico veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, sistema BBL cristal.

8.3 Aislamientos bacteriológicos de suelos

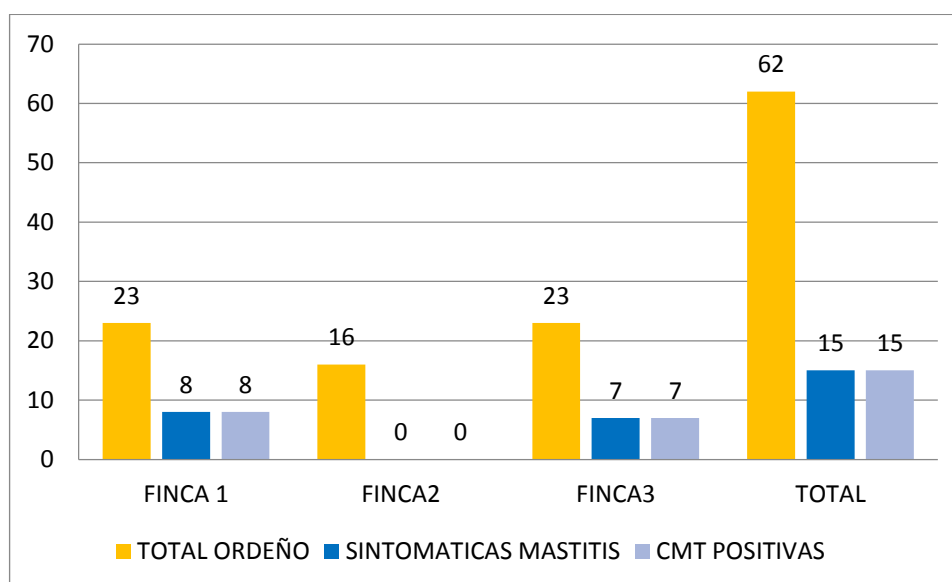
MUESTRA DE SUELOS	BACTERIA AISLADA
SUELO FINCA 1	<i>Klebsiella Oxytoca</i> , <i>E.coli</i> , <i>Pseudomona sp</i> , <i>Proteus sp</i> . <i>Citrobacter koseri</i>
SUELO FINCA 2	<i>Acinetobacter sp</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus sp</i>
SUELO FINCA 3	<i>Pseudomona sp</i> , <i>Proteus sp</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>

Tabla 3. Bacterias aisladas del análisis microbiológico de suelos. Predios Algeciras, vereda Andes Bajos

8.4 Tabulación de encuestas

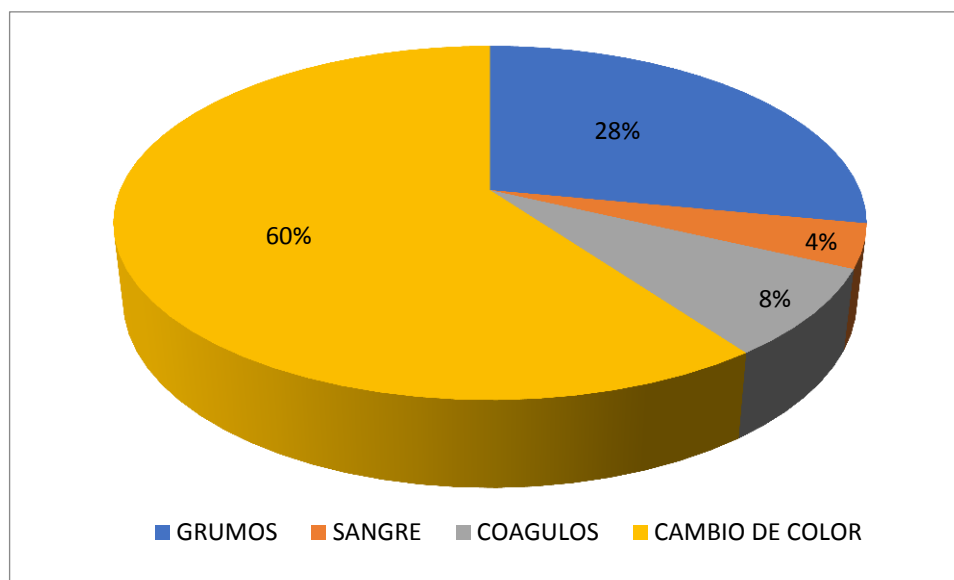
En las encuestas realizadas se incluyó preguntas que permitieron orientar epidemiológicamente la presentación de la mastitis por *S. maltophilia* en los predios analizados

Gráfica 1. Información Poblacional Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos



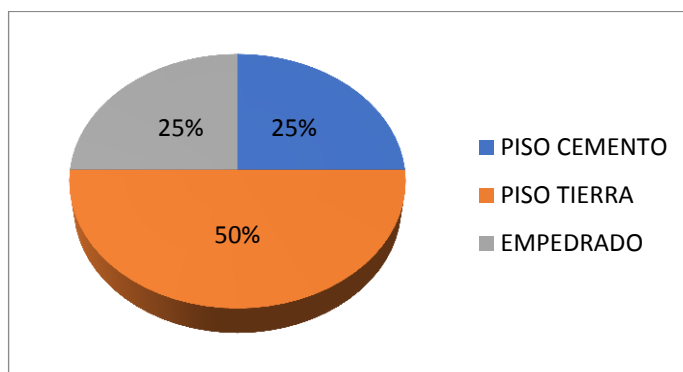
En las tres fincas estudiadas se encontró una población de bovinos para ordeño de 62 especímenes, 15 de ellos con mastitis clínica y positivos a la prueba de California test, es decir el 24.1%. Estos animales presentaban una ubre inflamada, rubor, dureza, dolor a la palpación y el bovino afectado por *S. maltophilia* presentaba necrosis.

Gráfica 2. Alteración física de la leche. Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos



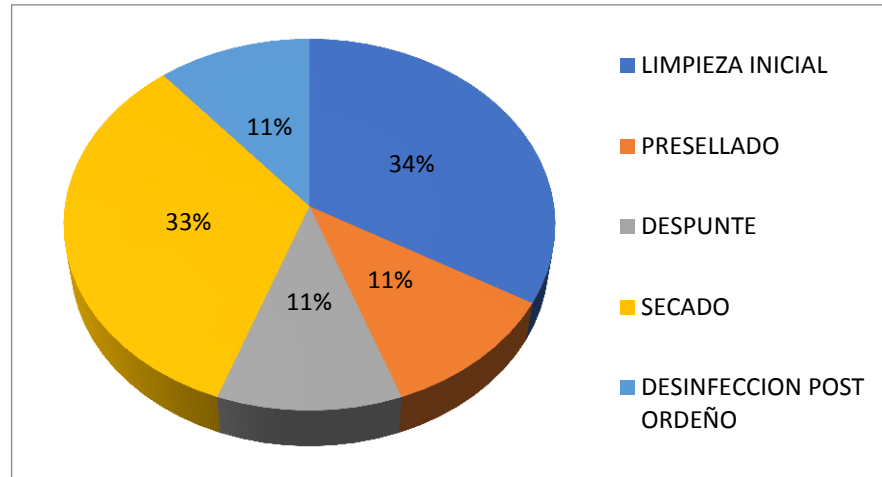
Las leches de los bovinos con mastitis presentaron cambio de color en un 60%, presencia de grumos 28 %, coágulos 8 % y sangre 4 %.

Gráfica 3. Información Sitios de ordeño. Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos



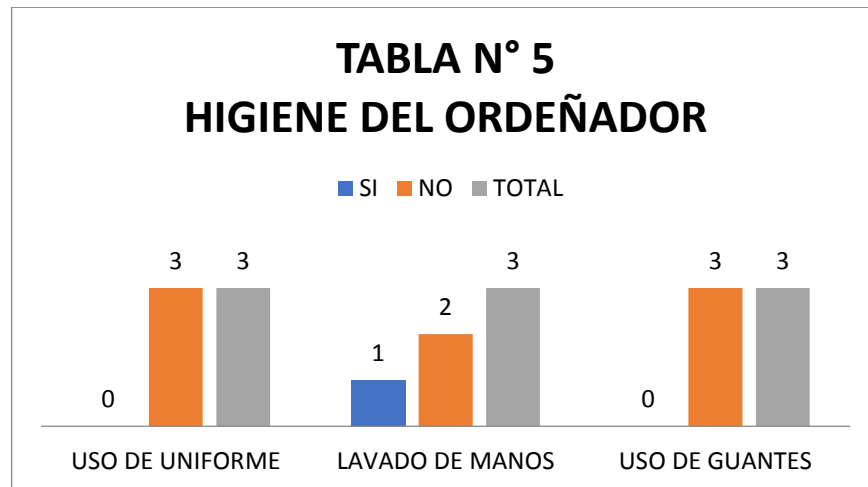
En cuanto al área de ordeño solo el 25% tenía piso de cemento, el 50% piso en tierra, el 25% empedrado.

Gráfica 4. Información higiene de la ubre antes y después del ordeño, en los 3 predios estudiados del municipio de Algeciras vereda Andes Bajos.



En la higiene de la ubre antes y después del ordeño el 34% hace limpieza inicial, el 11% presellado, el 11% hace despunte, el 33 % hace secado, y solo el 11% hace desinfección post ordeño.

5. Información Higiene del ordeñador. Predios estudiados municipio de Algeciras vereda Andes Bajos



En cuanto a la higiene del ordeñador se encontró que de todos los encuestados ninguno usa uniforme, el 33.3% se lava las manos antes del ordeño y ninguno usa guantes.

9 DISCUSION

La *S. maltophilia* es una bacteria Gram negativa, clasificada como tal en el año 1995 por técnicas moleculares PCR (Nesme Javier & Hoste Bart, 1995,), típicamente es encontrada en aguas, suelos y plantas (Carmody L, Mar. 2011) es considerada como oportunista, sin embargo, debido a aislamientos directos de infecciones se considera hoy como una bacteria emergente productora de patologías, ha sido aislada de animales; en caninos con enfermedad renal (S. Kralova-Kovarikova, 2012(7)), en equinos con infecciones respiratorias crónicas (S. Albini1, Juli 2009,) y en bovinos produciendo mastitis (Ohnishi, 2012).

En un predio lechero del municipio de Algeciras se analizó microbiológicamente una leche procedente de un bovino con mastitis clínica, cuya ubre presentaba una lesión necrotizante, en la cual se aisló la bacteria *S. maltophilia* y aunque esta bacteria no es común aislarla, se debe tener en cuenta como causante de mastitis y su importancia como una bacteria multiresistente (Denton Miles, Jan. 1998) que ocasiona una disminución en la producción de leche, aumento de los costos de producción (medicamentos, asistencia técnica) lo que conlleva a la eliminación del bovino, lo que sucedió en este caso.

Si bien la *S. maltophilia* pertenece a un grupo de bacterias encontradas comúnmente en el ambiente, se habla de que estos contaminantes ambientales llegan a producir infecciones y que están asociadas a la exposición que suele ocurrir normalmente fuera de la sala de ordeño. En el caso de la mastitis, el riesgo de infección aumenta cuando los pezones y la ubre se encuentran mojados y/o sucios, debido a que un mayor número de bacterias tienen la oportunidad de colonizar la glándula. (Zambrano, 2014).

los resultados del estudio son concordantes con los obtenidos por (Denton Miles, Jan. 1998), (ver tabla 1). Se aisló como cepa única de una muestra de leche analizada procedente del municipio de Algeciras vereda Andes Bajos por lo que se inició el estudio de investigación para buscar los factores predisponentes a la presentación de la mastitis

causada por esta bacteria. Este aislamiento de *S. maltophilia* como cepa única productora de mastitis, se correlaciona con los aislamientos realizados por (Ohnishi, 2012) de un brote en la zona de Nemuro Subprefectura de Hokkaido Prefecture, Japón, la cual posee un clima continental húmedo.

Otras bacterias relacionadas en la tabla 3 fueron aisladas de las muestras de leche analizadas en los predios vecinos al foco, estas bacterias que son consideradas como patógenos menores causan también mastitis, para (Ericsson, 2009) cualquier bacteria puede infectar la ubre y causar infección. Es necesario aclarar que la *S. maltophilia* no se aisló de otras leches analizadas ni del suelo, posiblemente por la necesidad de la bacteria de medios más selectivos como lo propuso (Bollet c, 1995)

Los factores de riesgo para la presentación de la mastitis bovina pueden ser del animal, ambiente o del agente patógeno, así como la incidencia de la infección aumenta con la edad, el manejo deficiente, alojamiento inadecuado, viabilidad, virulencia del agente y su susceptibilidad frente a los antimicrobianos (Nyman A. Ekman, 2007).

En el presente estudio encontró que e los predios no presentaba instalaciones adecuadas para el ordeño, esta situación acentúa la presencia de microorganismos en el sitio , las concentraciones elevadas de bacterias hace que el mecanismo de defensa de la ubre se debilita y la invasión de la misma se incrementa por un ambiente muy antihigiénico en el establo, una higiene deficiente de los pisos y superficies húmedas (Wolter W., 1996).

En cuanto a la higiene del ordeñador ningún operario utiliza indumentaria adecuada para el proceso, el 33.3% no realizaba la actividad mínima de lavado de manos, y ninguno utilizaba guantes, esto permite que haya un número más alto de bacterias que pueden colonizar la piel de la ubre y llegar a producir infección.

Se encontró además que el 33.3% de los predios realizaban un presellado y una desinfección adecuada postordeño, mientras que el 66.6% no realizaba ninguna de estas actividades las cuales son fundamentales para reducir las infecciones intramamaria. Para

(Fernandez M, 2008) esta práctica de presellado y desinfección postordeño debe ser habitual para el manejo del ganado lechero, además, para evitar la contaminación de bacterias ambientales se deben utilizar selladores con componentes germicidas y plastificantes que protejan la piel del pezón del medio ambiente.

Una infraestructura adecuada, un proceso apropiado de ordeño y una actividad postordeño donde se proteja la ubre, permitirá la disminución de bacterias ambientales como *S. maltophilia* que puedan colonizar la ubre, llegar a producir mastitis y evitar la pérdida temprana del bovino.

10 CONCLUSIONES

Si bien la *S. maltophilia* aún no es muy reconocida como una bacteria patógena causante de mastitis, en el estudio se concluye que este microorganismo puede actuar como agente único y producir infección de la ubre, ya que de la muestra de leche analizada fue aislada como cepa única microbiológicamente y fue capaz de producir daño en el tejido mamario del bovino.

La infección producida por la bacteria *S. maltophilia* pudo presentarse debido al deficiente manejo en el proceso del ordeño como en la inadecuada higiene del ordeñador, de la ubre, y de las instalaciones.

La falta de la actividad postordeño es un factor predisponente para la colonización de bacterias ambientales en la ubre lo que puede conllevar a infecciones intramamaria por lo que el uso de soluciones desinfectantes y tapones químicos en el canal de la ubre se hacen necesarios.

11 RECOMENDACIONES

A la hora de disminuir la infección intramamaria es de gran ayuda mejorar el manejo del ordeño, garantizando la sanidad de la ubre y reduciendo la introducción de microorganismos provenientes de cualquier fuente. Para tal fin es de suma importancia que las zonas donde se encuentran los animales antes del ordeño estén en condiciones higiénicas que reduzcan el riesgo de infección, es decir: sin acumulación de estiércol u otra materia indeseable, por otro lado, se recomienda la realización de estudios posteriores en otras zonas para la identificación de la *stenotrophomona mantophilia* teniendo en cuenta su importancia como causante de mastitis y su sensibilidad a los antibióticos; *S. mantophilia* es una bacteria emergente de gran importancia.

12 BIBLIOGRAFIA

- Andresen, H. (2001). Mastitis diagnosticoy control. *Rev Inv Vet Perú*, (12-2) 55-64.
- Antón, D., Araque, Y., De Donato, M., & Medina, B. y. (2005). Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Kasmera v.33 n.2 Maracaibo jul. 2005*, versión impresa ISSN 0075-5222.
- Bedolla, C. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, Vol. IX, Nº 4.
- Bollet c, D. R. (1995). A Simple Method for Selective Isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol.* , 1653-4.
- Bradley, J. y. (2001). Adaptation of *Escherichia coli* to theBovine Mammary Gland . . *Journal of Clinical Microbiology*, 39:1845 -1849.
- Calvinho, L. (1983). MASTITIS EN ARGENTINA: EVOLUCIÓN EN LOS ÚLTIMOSDIEZ AÑOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS. *Com. Fed. Lechería Arch. Lechería Asociación Argentina de Lucha contra Mastitis.*, 6-73.
- Carmody L, T. S. (Mar. 2011). Reassessment of *Stenotrophomonas maltophilia* Phenotype. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, ,, p. 1101–1103.
- Casla, L. M. (2009). *ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE NUEVAS ALTERNATIVAS EN EL TRATAMIENTO DE " STENOTROPHOMONAS MANTOPHILIA"*. Madrid: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
- Ceron-Muñoz, M. T.-B.-G. (2002). Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. *J. Dairy Sci.* , 85:2885-2889.
- Corbellini, C. N. (xxx). LA MASTITIS BOVINA Y SU IMPACTO SOBRE LA CALIDAD DE LA LECHE. *INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA*.
- Correa, M. G. (2002). O-serogroups, eae gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology.* , 85:125-132. .
- Denton Miles, K. K. (Jan. 1998). Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 57-80.
- Ericsson, H. L.-M. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis an ageent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology* , 90-97.

- Fernandez M, L. R. (2008). Disminucion en la incidencia de mastitis en ganadovacuno con aplicacion de un sellador de barrera experimental. *Agronomia constarisence* , 111.
- Gonzalez, R. G. (1977). Investigacionen mastitis subclinicas. *Re. Med.Vet*, 58:431-438.
- ICA. (2016). *Censo pecuario nacional* . Bogota: Instituto Colombiano Agropecuario ICA .
- Kruze. (2009). Efectos de la mastitis subclinica en algunos hatos dela cuenca lchera del Alto Chicamocha/Departamento de Boyaca. *Revista de Medicina veterinaria* , N.17.
- Lopez, M. (2009). *ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE NUEVAS ALTERNATIVAS EN EL TRATAMIENTO DE “STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA”* . España : UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID .
- Marquez, a. c. (2015). importancia economica de la mastitis. *researchgate*.
- Nesme Javier, V. M., & Hoste Bart, S. J. (1995,). Diversity and Genetic Relatedness within Genera Xanthomonas and Stenotrophomonas Using Restriction Endonuclease Site Differences of PCR-amplified 16S rRNA Gene. *Systematic and applied microbiology Volume 18, Issue 1*, Pages 127-135.
- Nyman A. Ekman, T. E. (2007). Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. *Preventive veterinary medicin*, 142-160.
- Parra, M. (1996). Situacion Sanitaria en bovinos de doble proposito en el norte del departamento del Huila . *Revista Nataima , investigacion CORPOICA* , Segundo semestre .
- Rodriguez M, G. (2006). Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto economico en algnos hatos de la sabana de bogota, Colombia. *Revista de medicina veterinaria, Universidad de la salle*, 35-55.
- Romero, R. (S,A). *MASTITIS BACTERIANA EN GANADO BOVINO: ETIOLOGÍA Y TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO*. Mexico : Universidad Autonoma de Mexico , Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes.
- S. Albin1, C. A. (Juli 2009,). Stenotrophomonas maltophilia isolated from the airways. *Schweiz. Arch. Tierheilk*, 323 – 328.
- S. Kralova-Kovarikova, R. H. (2012(7)). Stenotrophomonas maltophilia urinary tract infections. *Veterinary Medicine*,57, 380-383.
- Soto, J. A. (2005). STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA microorganismo multidrogo- resistente emergente. *Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina U.M.S.A.* .

- Viruez, S. R. (2007). STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA MICROORGANISMO MULTIDROGO-RESISTENTE EMERGENTE. *Revista Scientifica* , año 5.
- W. Wolter, C. V. (s.f.). mastitis bovina. mexico.
- Wellenberg, G. J. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology Article* 2361, 2-21.
- Wolter W., C. V. (1996). La mastitis bovina. En C. V. Wolter W., *La mastitis bovina*. Guadalajara Mexico : Universidad de Guadalajara.
- Zambrano Varon, J. (2014). Aproximación epidemiológica para el diagnóstico de la Mastitis Bovina. *IV SEMINARIO INTERNACIONAL DE LA CALIDAD DE LA LECHE Y PREVENCIÓN DE LA MASTITIS*, (pág. 5). Bogota.