

EVALUACIÓN DE MÉTODOS MANUALES DE LAVADO Y DESINFECCIÓN DE PEZONERAS ENTRE VACAS: COMPARACIÓN DE DOS MEDIOS DE CULTIVOS

Evaluation of manual washing and disinfection methods of teatcups between milking cows: a comparison of two media cultures

Armando Hoet S.*

Gabriela Carruyo*

Osiris Castejón*

Elsy Gutiérrez**

Marcos Bravo**

* Facultad de Ciencias Veterinarias

** Centro de Investigación Estudiantil de Veterinaria (CIEV)

Universidad del Zulia. Apdo. 15252, Delicias 4003-A

Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

Se comparó la eficiencia de dos medios de cultivos, Agar Sangre Bovino al 5% (ASB) y Manitol Salado Rojo de Fenol (MSRF), usados para la siembra en la técnica no destructiva de muestreo de superficies con la cual se evalúan los métodos de lavado y desinfección de pezoneras entre vacas. Se realizaron 40 lavados y desinfecciones manuales de pezoneras entre vacas durante 5 rutinas de ordeño normales. Se tomaron muestras del interior de las pezoneras de una unidad de ordeño, antes y después del lavado de éstas. De cada muestra se sembraron 2 placas de ASB, en una se dispersó 0,1 cc sin diluir y en la otra 0,1 cc de la muestra diluida 1:10 en buffer fosfato salino; también fueron sembradas 2 placas de MSRF con la misma muestra y procedimiento. Todas las placas se incubaron a 37°C/48 horas y posteriormente se procedió a determinar la posibilidad de cuantificar o no la reducción bacteriana en cada uno de los lavados, y así establecer el porcentaje de eficiencia en forma individual para cada medio de cultivo. Se concluyó que en el MSRF se pudo calcular el porcentaje de reducción bacteriana en un 90% de las veces, contra sólo un 15% del ASB; lo que al aplicar la Prueba Z para proporciones se evidenció una diferencia significativa a favor del MSRF. En base a estos resultados se recomienda el uso del MSRF en la técnica de

muestreo de superficie, cuando ésta sea utilizada bajo condiciones tropicales.

Palabras claves: Pezoneras, lavado-desinfección, vaca, cultivos.

ABSTRACT

This trial compared the efficiency of two media culture, Bovine Blood Agar 5% (BBA) as well as Manitol Salt Phenol Red (MSPR) used to culture samples from surfaces by no destructible techniques for the evaluation of washing methods and disinfection of teatcups in milking cows. A total of 40 washes and teatcups disinfections by hand were done among cows during 5 milking routines. Inner teatcups samples per unit of milking were taken before and after washing them. Each sample (0,1 cc) was cultured into two different BBA, one undiluted and the other diluted 1:10 in phosphate buffer saline; in addition, the same sample was also cultured in MSPR. All of the sample plates were incubated at 37°C for 48 hr, and afterwards, the bacterial reduction was determined on everyone of the washes, for then calculate the individual percent of efficiency on each medium. Results indicated that the use of MSPR was 90% effective in calculating bacterial reduction, against only a 15% for BBA. Z Test was highly significant between methods. This result suggested the appropriate use of MSPR when performing surface sampling techniques in tropical environments.

Key words: Teatcups, washing-desinfection, cows, cultures.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de lavado y desinfección de pezoneras han ido evolucionando desde los muy simples, tales como enjuagar la unidad de ordeño con agua caliente [12], pasando por los manuales que usan una solución desinfectante [12, 13] (balde individual, tonel central, etc.); hasta llegar a los muy complejos métodos automáticos de cuatro ciclos (agua-desinfectante-agua-aire) o de cinco ciclos (agua-desinfectante-reposo-agua-aire) [8, 10].

Los reportes sobre las técnicas o procedimientos para evaluar esos métodos de lavado y desinfección son relativamente nuevos [6, 14, 15, 16], estando aún en desarrollo y tratando en lo posible de estandarizarlos; lo cual es sumamente difícil debido a las características cambiantes que existen en cada unidad y zona productora.

Es importante destacar que sobre los métodos de lavado y desinfección de pezoneras entre vacas durante el ordeño no existe mucha información, es por ello que tampoco existe una amplia bibliografía sobre las técnicas que se usan para evaluar su desempeño.

La técnica no destructiva de muestreo de superficies [2] para el análisis microbiológico del interior de las pezoneras, que permite cuantificar el grado de contaminación o carga bacteriana que posee una unidad de ordeño, es la actualmente recomendada para ser usada en la evaluación del funcionamiento de los métodos de lavado y desinfección de pezoneras entre vacas durante una rutina de ordeño normal [8].

Una vez cuantificadas las cargas bacterianas del interior de las pezoneras de una unidad de ordeño, antes y después del lavado y desinfección; se puede determinar el porcentaje de Reducción Bacteriana a través de la siguiente fórmula: [11]

% de Reducción Bacteriana = % RB.

$$\%RB = \frac{\text{No.U.F.C.pretratamiento} - \text{No.U.F.C.postratamiento}}{\text{No.U.F.C.pretratamiento}} \times 100$$

El objetivo del presente trabajo fue comparar dos (2) medios de cultivos, agar sangre al 5% y manitol salado rojo de fenol, usados para la siembra de muestras obtenidas a través de la técnica no destructiva de muestreo de superficies antes señalada; con la finalidad de determinar cual de los dos medios facilita cuantificar en Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) la carga bacteriana del interior de las pezoneras antes y después del lavado y desinfección de éstas; lo cual permite a su vez calcular el porcentaje de reducción de la carga bacteriana de las pezoneras al evaluar un método manual de lavado y desinfección a las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y Rebaño

La finca lechera donde se realizó este experimento se encuentra ubicada en el sector El Mecocal, Municipio Miranda, Costa Oriental del Lago de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

El rebaño lechero utilizado lo conformaban 120 vacas en ordeño distribuidas en cuatro (4) grupos básicos: vacas de alta, media, baja producción y vacas con mastitis clínica; dichos grupos fueron ordeñados en el orden antes mencionado, a excepción del grupo con mastitis clínica, el cual se ordeñó a mano y no se consideró en este trabajo, dejando un total de 116 animales dentro del ensayo. Cada grupo fue heterogéneo con respecto a edad, raza, y número de partos.

El sistema de ordeño fue de tipo mecánico (un híbrido de Alfa-Laval) con ocho (8) puestos de ordeño a la par con pasante, ordeñando aproximadamente unos 15 animales por puesto. Durante el trabajo se utilizaron pezoneras nuevas (SURGE^R) en el puesto de ordeño del cual se tomaron las muestras.

Este rebaño padecía de un 47% de mastitis subclínica y de un 3,33% de mastitis clínica; aislándose principalmente *Staphylococcus aureus* de los cuartos afectados. Todos estos datos fueron obtenidos mediante la prueba de California para mastitis y cultivos que se ordenaron mensualmente en dicha finca por el Servicio de Clínica Ambulatoria, de la Policlínica Veterinaria Universitaria de la Universidad del Zulia.

Rutina de ordeño

Una vez asegurada la vaca a ser ordeñada en su puesto, se realizó una rutina de ordeño en base a la secuencia, tiempos e higiene que se recomienda para dicho procedimiento [5, 7, 10, 12].

Lavado y desinfección de las pezoneras previo al ordeño

Con el objetivo de eliminar la carga bacteriana preexistente en el interior de las pezoneras o forros se procedió, previo al ordeño, a lavarlas primero con agua y jabón líquido, y luego con jabón iodado cepillando vigorosamente en cada oportunidad. Posteriormente los forros fueron sumergidos en una solución iodada (50 ppm) durante una hora, retirándose de la misma diez minutos antes de iniciarse la rutina, para colocarlas en la unidad de ordeño. Justo antes de comenzar la rutina se tomó la muestra Preordeño y se remitió al laboratorio.

Lavado y desinfección manual de las pezoneras entre vacas durante el ordeño

El método que se usó para el lavado de la unidad de ordeño es el denominado método de balde individual, el cual se describirá a continuación:

Una vez finalizado el ordeño de una vaca y retirada la unidad ordeñadora de ésta, las pezoneras eran sumergidas por completo tres veces en una solución desinfectante a base de yodo (50 ppm), agitándolas fuertemente y de dos en dos, antes de ser usadas en la siguiente vaca; repitiéndose todo este proceso durante toda la rutina de ordeño. Ya realizado el lavado de la unidad de ordeño, ésta era colocada en su sitio de descanso boca abajo para que las pezoneras se escurrieran y secaran.

Cada unidad ordeñadora poseía su propio balde individual al pie de ésta, el cual era preparado al inicio del ordeño con la solución desinfectante.

Toma de la muestra

Las muestras se tomaron de la unidad de ordeño en las siguientes etapas:

-Antes de iniciar el ordeño. Dicha muestra se denominó PREORDEÑO, la cual se realizó con el fin de probar la esterilidad y calidad de los materiales usados.

-Después de finalizado el ordeño de una vaca, y antes de realizar el lavado y desinfección manual de las pezoneras. Dicha muestra se denominó PRELAVADO.

-Posterior al lavado y desinfección manual de las pezoneras y antes de ordeñar a la siguiente vaca. Dicha muestra se denominó POSLAVADO.

Las muestras Prelavado y Poslavado se tomaron individualmente y cada dos (2) vacas a lo largo de todo el ordeño.

El procedimiento que se usó para recolectar las muestras se basó en el método descrito por McDonald y col. [8]; el cual se usa para determinar la eficiencia del lavado y desinfección de las pezoneras. Por ello se siguieron los siguientes pasos:

Prelavado: Una vez ordeñada la vaca y retirada la unidad de ordeño, se sacudió el exceso de leche del interior de las pezoneras boca abajo. En seguida se introdujo un hisopo de algodón estéril y seco de 6 pulgadas de longitud, y se rotó en la misma dirección dos veces en la superficie interna de cada una de las pezoneras de la unidad de ordeño, en el lugar donde se estima que la punta del pezón entra en contacto con la pared.

Inmediatamente el hisopo se colocó en un tubo estéril con tapa de baquelita; el cual contenía 0,5 cc de infusión cerebro corazón como medio de transporte. Una vez identificado el tubo, se colocó en una gradilla dentro de una cava con abundante hielo picado.

Finalizada la toma de las muestras, se transportaron al laboratorio de Diagnóstico de Mastitis en la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de LUZ*, en donde se conservaron a -20°C, hasta el día si-

guiente cuando fueron sembradas; transcurriendo un lapso no mayor de 12 a 16 horas desde la colección a la siembra.

Poslavado: Realizado el lavado y desinfección manual de las pezoneras se repitió el mismo procedimiento señalado en el Prelavado.

Las muestras recolectadas se obtuvieron de cinco (5) ordeños consecutivos separados por una semana entre cada uno de ellos, durante los meses de septiembre y octubre de 1994.

Procesamiento de las muestras en el laboratorio

Siembra de las muestras: El primer medio de cultivo utilizado para la siembra de las muestras fue el agar sangre de bovino al 5%, usado por McDonald y col. [8]; este medio permite el crecimiento no selectivo de cualquier microorganismo mesófilo, aerobio estricto o anaerobio facultativo [9].

El segundo medio de cultivo utilizado fue el manitol salado rojo de fenol, el cual permite el crecimiento semiselectivo de microorganismos mesófilos, halófilos moderados y aerobios estrictos o anaerobios facultativos [9]. Además de facilitar la identificación del *S. aureus*, el cual es uno de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina [1, 3, 4, 5, 10, 12], y por ello es muy importante su detección.

En agar sangre:

-Muestras sin diluir: Las muestras se descongelaron a temperatura de laboratorio, y una vez que alcanzaron la temperatura ambiente se procedió a la siembra, usando un procedimiento basado en la metodología descrita por McDonald y colaboradores [8] como parte de una técnica para evaluar la eficiencia de los sistemas de lavado y desinfección.

El procedimiento seguido se describe a continuación: el tubo conteniendo al hisopo sumergido en el medio de transporte se agitó vigorosamente en un vortex por 30 segundos. Seguidamente se retiró el hisopo con una pinza estéril y se extrajo el contenido líquido del mismo, por presión y torsión contra las paredes internas del tubo; para luego desechar dicho hisopo.

Seguidamente se tomó 0,1 cc de la muestra contenida en el tubo, y se diseminó uniformemente sobre toda la superficie de una placa (100 mm) de agar sangre bovina al 5%, usando para ello una varilla de vidrio en "L". Luego dicha placa se incubó a 37°C por 48 horas.

-Muestras diluidas: De cada muestra se procedió a realizar una dilución 1:10, con el objeto de que si en la muestra sin diluir no se podía cuantificar la carga bacteriana tanto en el prelavado como en el poslavado, debido a una alta carga de microorganismos, se pudiera contar en las placas sembradas con la muestra diluida, y poder así determinar la posibilidad de cuantificar la reducción de la carga bacteriana para un tratamiento específico; por lo tanto donde se presentara dicho caso se tomarían en su defecto los resultados del prelavado y poslavado diluido.

* Universidad del Zulia.

La secuencia utilizada fue la siguiente:

Una vez sembrada la muestra sin diluir, se tomó 0,1 cc de la misma muestra y se dispensó en un tubo estéril debidamente identificado, el cual contenía 0,9 cc de buffer fosfato salino (B.F.S.), pH 7,2. En seguida se procedió a homogeneizar la muestra en el B.F.S., para luego tomar nuevamente 0,1 cc del contenido del tubo; esa cantidad de la muestra diluida se colocó en una placa de agar sangre, repitiéndose todo el procedimiento de siembra antes descrito.

En manitol salado: Sembradas las muestras en las placas de agar sangre, tanto en la forma sin diluir como la diluida; se procedió a realizar la misma secuencia antes descrita para sembrar las placas de manitol salado, usando para ello la misma muestra con la que se sembró en el agar sangre.

Contaje de colonias: Terminado el período de incubación se procedió al conteo de las colonias que crecieron en cada una de las placas sembradas. Para ello se usó un contador de colonias (Darkfield Colony Counter, Quebec^R); y en los casos de duda se usó una lupa estereoscópica.

Procesamiento de los datos

Cada rutina completa de ordeño, donde se trabajó todo el rebaño, se consideró como una repetición en la cual se realizaron aproximadamente 15 ordeños por cada unidad ordeñadora; donde el muestreo de dichas unidades era cada dos ordeños, teniendo un total de ocho (8) muestras por cada repetición. Señalando que este trabajo se realizó en base a cinco (5) repeticiones, obteniendo un total de 40 muestras provenientes de las vacas que se ordeñaron al azar.

Los datos obtenidos se procesaron usando los siguientes pasos:

1) Los resultados del conteo de colonias por placa, prelavado y poslavado en cada ordeño (o tratamiento), fueron recopilados en unas tablas diseñadas para tal fin, usando los siguientes criterios:

Aquellas placas que permitieron un conteo en forma clara, debido a que las colonias estaban bien definidas, separadas y en un número menor o igual a cuatrocientas (400) por placa, eran consideradas y anotadas como Contables (C) [8]. Por el contrario, aquellas placas que tenían colonias confluentes o de crecimiento invasivo que no permitían un contaje ade-

cuado, o que el número de colonias era sumamente alto, mayor de cuatrocientas (400) colonias, eran consideradas y anotadas como Incontables (I).

2) Se estudió la posibilidad de calcular el porcentaje de reducción de la carga bacteriana del interior de las pezoneras, en cada uno de los ordeños (o tratamientos) muestreados; determinando dicha posibilidad en forma individual para las muestras sin diluir y para las diluidas, correspondientes a cada medio de cultivo.

Dicho estudio se basó en los cuatro (4) tipos de relaciones que se pueden establecer entre los resultados del prelavado y el poslavado correspondientes a un ordeño (o tratamiento), las cuales se muestran en la TABLA I.

Siendo la última relación (Contable-Contable) la única que permitió calcular la reducción de la carga bacteriana, ya que aporta los datos numéricos necesarios para aplicar la fórmula del porcentaje de reducción bacteriana antes descrita.

Los resultados se registraron en una tabla individual para cada forma de dilución y medio de cultivo. En aquellos casos donde se perdía uno de los resultados, ya sea prelavado o postlavado de una misma muestra, no era posible realizar relación alguna, entonces dicha muestra no se tomaba en cuenta para determinar la posibilidad de calcular la reducción bacteriana.

3) Como se indicó anteriormente, de las mismas muestras correspondientes a un ordeño (o tratamiento) se realizó una dilución, con el objeto de que en aquellos casos de muestras sin diluir que NO era POSIBLE (N.P.) calcular la reducción bacteriana, se consideraba en su defecto los contajes obtenidos de las diluciones correspondientes.

Es por ello que en este paso se procedió a establecer las relaciones entre los resultados de las muestras sin diluir con los de su dilución correspondiente, con la finalidad de determinar si en esa muestra en particular era posible o no posible el cálculo de la reducción bacteriana; para ello se establecieron las combinaciones que se observan en la TABLA II.

Los resultados obtenidos al ejecutar estas combinaciones se anotaron en una tabla especial para ello.

4) Seguidamente se determinó la eficiencia para cada uno de los medios de cultivo empleados, mediante el porcenta-

TABLA I

RELACION ENTRE LOS RESULTADOS DEL PRELAVADO Y EL POSLAVADO

Tratamiento N°	Resultados en		Cálculo de la reducción bacteriana
	Prelavado	Postlavado	
XX	Incontable	Incontable	No Posible
XX	Incontable	Contable	No Posible
XX	Contable	Incontable	No Posible
XX	Contable	Contable	Posible

TABLA II

RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LA MUESTRA SIN DILUIR CON SU DILUCIÓN CORRESPONDIENTE

Trat. Nº	Resultados en las muestras		Cálculo de la reducción bacteriana
	Sin diluir	Diluidas	
XX	No Posible	No Posible	No Posible (en esta muestra)
XX	No Posible	Perdida	No Posible (en esta muestra)
XX	Perdida	No Posible	No Posible (en esta muestra)
XX	No Posible	Posible	Posible (en esta muestra)
XX	Posible	No Posible	Posible (en esta muestra)
XX	Posible	Posible	Posible (en esta muestra)
XX	Posible	Perdida	Posible (en esta muestra)
XX	Perdida	Posible	Posible (en esta muestra)

je (%) del total de las muestras procesadas en que fue posible calcular la reducción bacteriana.

5) Obtenidos los porcentajes de eficiencia para cada uno de los medios, éstos se confrontaron para evidenciar si existía diferencia significativa entre ellos; y de haberla, determinar cuál era el mejor. Para esto se realizó el análisis estadístico correspondiente.

Análisis estadístico

Se utilizó la Prueba Z de diferencias de proporciones para comparar los porcentajes de eficiencia, en el cálculo de la carga bacteriana del interior de las pezoneras, en el agar sangre respecto al manitol salado, cuya fórmula viene dada por:

$$Z_{cal} = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{P_1 Q_1}{n_1} + \frac{P_2 Q_2}{n_2}}}$$

donde:

P_1 = Porcentaje de eficiencia en el cálculo de la carga bacteriana en el agar sangre.

P_2 = Porcentaje de eficiencia en el manitol salado.

n_1 y n_2 = Tamaño de la muestra en ambos medios de cultivo.

$Q_1 = 100 - P_1$ (Porcentaje de ineficiencia en A. Sangre).

$Q_2 = 100 - P_2$ (Porcentaje de ineficiencia en M. Salado).

RESULTADOS

En agar sangre

Muestras sin diluir:

-*Prelavado*: De un total de 39 placas procesadas, 38 (97,44%) fueron consideradas incontables; y sólo 1 placa (2,56%) fue considerada contable, FIG.1; de las 38 placas incontables, 30 (78,95%) de ellas presentaron colonias invasivas de rápido crecimiento, que confluían entre sí lo que hacía im-

posible su conteo. Las restantes 8 placas (21,05%) no eran contables debido a que el número de U.F.C. era mayor de 400, lo que hacía perder la exactitud de el conteo.

-*Poslavado*: Se obtuvo un total de 40 placas procesadas, donde 8 (20%) fueron catalogadas como contables; y las otras 32 placas (80%) eran incontables, FIG. 1, de las cuales 29 (90,62%) se debió a la presencia de colonias invasivas y confluentes, y las 3 (9,38%) restantes presentaron mas de 400 colonias por placa.

-*Posibilidades para el cálculo de la reducción bacteriana*: Se determinó que en 39 relaciones establecidas entre los resultados del prelavado y el poslavado, de la muestra sin diluir en el agar sangre, no era posible calcular el porcentaje de reducción de la carga bacteriana; debido al alto número de placas incontables obtenidas tanto en el prelavado como en el postlavado, o en ambos, FIG. 2.

Muestras diluidas:

-*Prelavado*: Se obtuvieron 30 placas (83,33%) incontables y 6 placas (16,67%) contables de un total de 36 placas, FIG. 1. De las 30 placas incontables, 24 (80%) de ellas presentaron colonias invasivas y confluentes como las anteriormente descritas; y las restantes 6 placas (20%) no eran contables debido a que el número de U.F.C. era mayor de 400.

-*Poslavado*: De un total de 40 placas procesadas sólo fueron contables 18 (45%) de ellas; y el resto, 22 (55%), fueron consideradas incontables, FIG. 1. A su vez, en 19 (86,36%) de estas últimas el conteo no fue posible debido a la presencia de colonias confluentes, y en las otras 3 (13,64%) porque presentaron más de 400 colonias por placa.

-*Posibilidades para el cálculo de la reducción bacteriana*: De 36 relaciones establecidas entre los resultados del prelavado y el poslavado de la dilución, sólo en 6 (16,67%) de ellas se logró obtener resultados para calcular el % de reducción de la carga bacteriana del interior de las pezoneras lavadas y desinfectadas. Es decir que en sólo esas 6 relaciones se obtuvo resultados contables tanto en el prelavado como en el poslava-

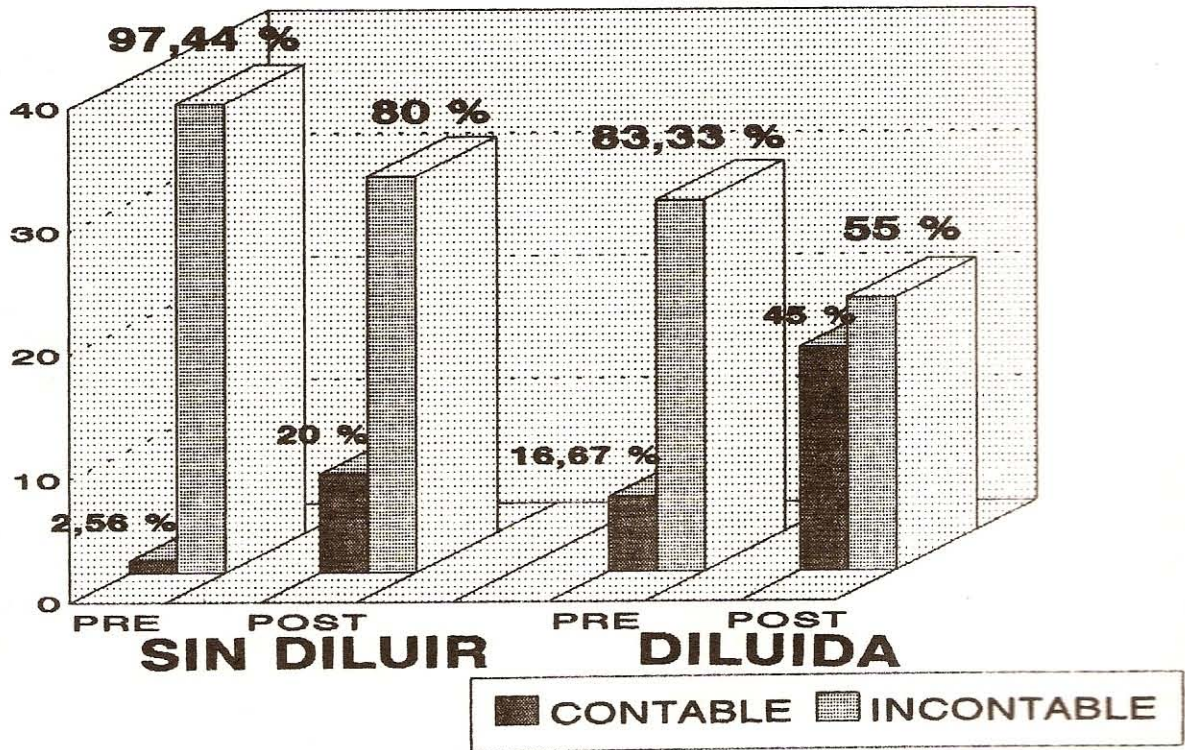


FIGURA 1. RESULTADOS DEL PRELAVADO Y EL POSLAVADO DE LAS MUESTRAS SIN DILUIR Y LAS DILUIDAS SEMBRADAS EN EL AGAR SANGRE.

do, lo que aportaría los datos numéricos necesarios para ejecutar la fórmula del porcentaje de reducción bacteriana antes descrita, FIG. 2.

Eficiencia del agar sangre:

El porcentaje de eficiencia para el agar sangre, calculado en base al total de posibilidades para determinar el porcentaje de reducción de la carga bacteriana, tanto en las muestras sin diluir como en las diluidas, fue de un 15%. Es decir que de un total de 40 muestras procesadas sólo en 6 de ellas fue posible realizar dicho cálculo, FIG. 3.

En agar manitol salado

Muestras sin diluir:

-*Prelavado:* Se procesaron 40 muestras de las cuales sólo en 18 placas (45%) se pudo determinar el total de U.F.C., siendo catalogadas como contables. Las restantes 22 placas (55%) fueron clasificadas como incontables, FIG. 4, debido a que todas ellas (100%) presentaron más de 400 colonias por placa, FIG. 6.

-*Poslavado:* Igualmente se procesaron 40 muestras, de las cuales 34 placas (85%) fueron consideradas como contables; y las 6 placas (15%) restantes eran incontables, FIG. 4, donde el 100% de estas poseía más de 400 colonias, FIG. 6.

-*Posibilidades para el cálculo de la reducción bacteriana:* De 40 relaciones establecidas entre los resultados del prelavado,

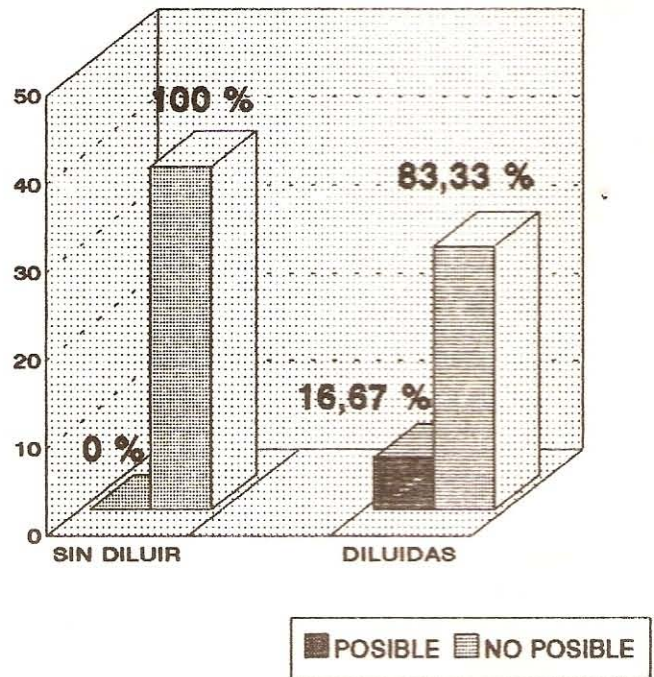


FIGURA 2. POSIBILIDADES PARA CALCULAR EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN EN LAS MUESTRAS SIN DILUIR Y LAS DILUIDAS DEL AGAR SANGRE.

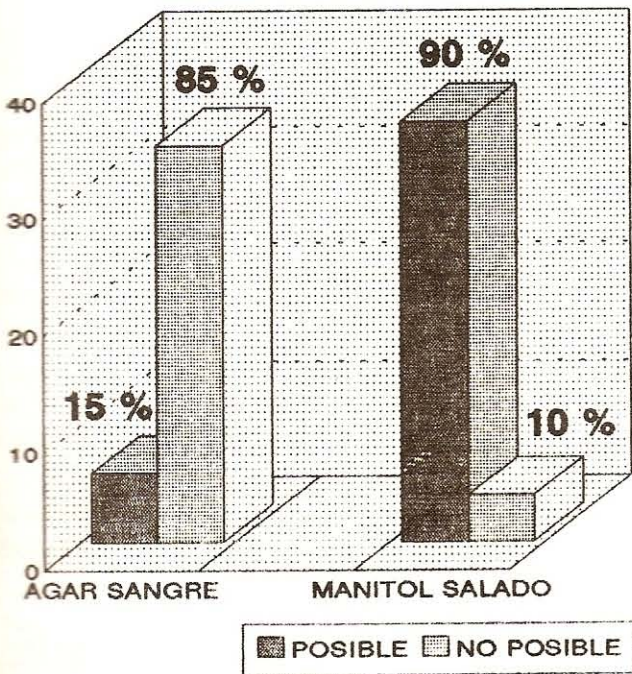


FIGURA 3. EFICIENCIA DEL AGAR SANGRE Y DEL MANITOL SALADO.

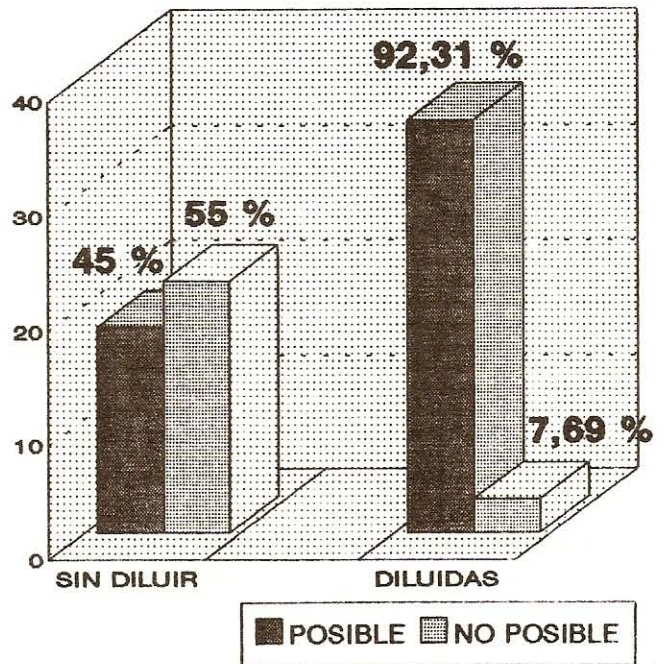


FIGURA 5. POSIBILIDADES PARA CALCULAR EL PORCENTAJE DE REDUCCIÓN EN LAS MUESTRAS SIN DILUIR Y LAS DILUIDAS DEL MANITOL SALADO.

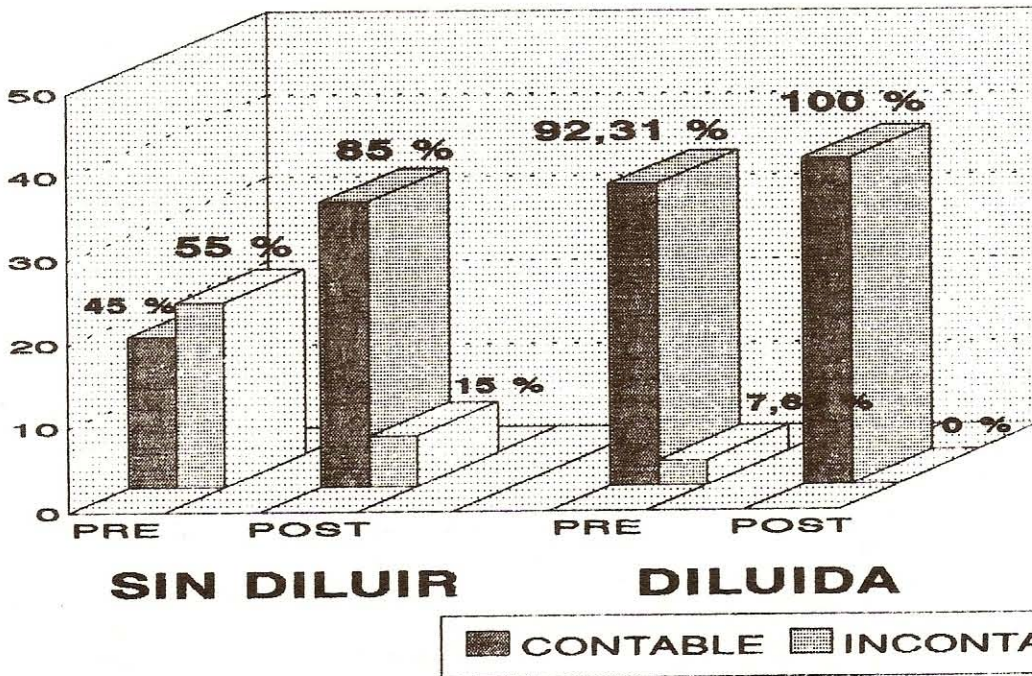


FIGURA 4. RESULTADOS DEL PRELAVADO Y EL POSLAVADO DE LAS MUESTRAS SIN DILUIR Y LAS DILUIDAS SEMBRADAS EN EL MANITOL SALADO.

do y el poslavado sin diluir, sólo en 18 (45%) se logró obtener resultados para calcular el % de reducción de la carga bacteriana del interior de las pezoneras lavadas y desinfectadas, FIG. 5.

Muestras diluidas:

-*Prelavado:* Se obtuvo un total de 39 muestras procesadas, de las cuales en 36 placas se logró un conteo efectivo, es decir un 92,31% de resultados contables. Y tan sólo 3 placas

(7,69%) fueron consideradas incontables, ya que tenían más de 400 colonias, FIGS. 4 y 6.

-Poslavado: De un total de 39 muestras procesadas, se pudo contar en el 100% de las placas, en forma clara y precisa, es decir que todas las placas fueron consideradas contables, FIGS. 4 y 6.

-Posibilidades para el cálculo de la reducción bacteriana: Se estableció un total de 39 relaciones, de las cuales 36 (92,31%) permitieron calcular el porcentaje de reducción de la carga bacteriana, que se obtuvo al usar el sistema de lavado y desinfección ya descrito, FIG. 5.

Eficiencia del manitol salado:

El porcentaje de eficiencia para el manitol salado, calculado en base al total de posibilidades para determinar el porcentaje de reducción de la carga bacteriana, tanto en las muestras sin diluir como en las diluidas, fue de un 90%. Es decir que de un total de 40 muestras procesadas en 36 de ellas fue posible realizar dicho cálculo, FIG. 3.

NOTA: Todas las muestras del preordeño dieron negativas, lo que garantizó la esterilidad de los materiales utilizados en la toma de la muestra.

Análisis Estadístico

Para comparar el porcentaje de eficiencia de cada medio de cultivo, se empleó la Prueba Z para proporciones; en la cual el valor de $Z_{cal} = -10,095364$ ($P < 0,001$).

DISCUSIÓN

Para poder evaluar un método de lavado y desinfección de pezoneras entre vacas, es necesario determinar si éste reduce la carga bacteriana del interior de las pezoneras, y cuantificar dicha reducción [8]. Por lo tanto, se hace necesario aplicar una técnica que permita cuantificar la reducción de la carga bacteriana; la cual ya ha sido descrita por McDonald y col. [8].

El buen funcionamiento de dicha técnica depende del medio de cultivo donde es sembrada la muestra que se obtuvo del interior de las pezoneras; ya que el medio debe permitir contar con facilidad y claridad las colonias que han crecido en él, tanto para las muestras del prelavado como las del poslavado de un mismo tratamiento; lo cual es necesario para calcular la reducción de la carga bacteriana, ya que se requiere de ambos resultados (pre y poslavado) expresados en forma numérica para ejecutar la fórmula respectiva y poder así saber si el método de lavado y desinfección usado está funcionando o no.

Por lo tanto, un medio de cultivo será más eficiente que otro cuando permita obtener resultados contables, tanto en el prelavado como en su poslavado correspondiente, en el mayor número de muestras recolectadas.



FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE LAS CAUSAS DE PLACAS INCONTABLES.

En este trabajo se determinó que existe diferencia altamente significativa entre los dos medios de cultivo comparados (agar sangre y manitol salado), en lo que respecta a su eficiencia; diferencia que estuvo a favor del segundo de ellos, tal y como lo reflejó el valor negativo de "Z" (-10,095364).

Se observó que el agar sangre no fue muy efectivo, ya que sólo fue posible calcular el porcentaje de reducción de la carga bacteriana en un 15% de las muestras sembradas en este medio. De 40 relaciones que se establecieron sólo 6 de ellas obtuvieron resultados contables tanto en el prelavado como en su poslavado correspondiente, ya sea en sus formas sin diluir o diluida.

Una de las posibles razones de esta baja eficiencia se debió a que el agar sangre es un medio enriquecido no selectivo que permitió el crecimiento de un gran número de colonias de características invasivas; las cuales crecían rápidamente (en 9 horas ya había abundante crecimiento) e incluso sobre otros tipos de colonias, lo cual dificultó su identificación y conteo. Asimismo, dichas colonias invasivas confluían entre sí, lo que también impidió su conteo efectivo. Es por esto que la cantidad de placas incontables en el agar sangre por causa de las colonias invasivas y confluentes fue bastante alta; un 78,95% en el prelavado y un 90,62% en el poslavado correspondiente a las muestras sin diluir; y en las diluciones respectivas fue de un 80% para el prelavado y 86,36% para el poslavado; todo lo cual hace un total de 83,92% de placas no contables por presentar este tipo de colonias, convirtiéndose éstas en la principal causa que impidió el conteo de las muestras sembradas en el agar sangre, FIG. 6.

En consecuencia, en un gran número de muestras sembradas en el agar sangre no fue posible conocer la carga bacteriana, ya sea en el prelavado o en el poslavado, o en ambos, debido a que resultaron incontables. Esto impidió obtener los datos numéricos necesarios para hacer posible la determinación de la reducción de la carga bacteriana del interior de las pezoneras, que se obtendría al usar un método de lavado y desinfección; impidiendo entonces conocer si éste es efectivo o no, dejando de cumplir así con el objetivo para el cual fueron sembradas las muestras.

Estos resultados difieren con los obtenidos en otros trabajos [6, 8, 14, 15, 16] donde sí se pudo cuantificar la reducción bacteriana usando como medio de cultivo agar sangre. Las posibles razones de estas diferencias pueden deberse a:

1) Dichos trabajos fueron realizados en zonas de climas templados, como por ejemplo: Washington (EEUU) [8], Gainesville (EEUU) [14], Pennsylvania (EEUU) [15], etc.

2) Los rebaños que se usaron eran semiestabulados [14, 15] o estabulados [6, 8].

3) El manejo sanitario en esos rebaño era bastante estricto, sobre todo a lo que se refiere a las medidas de higiene aplicadas al equipo de ordeño y al uso de éste.

Lo anterior hace suponer que la carga bacteriana de dichos animales era bastante baja, si lo comparamos con los animales que se utilizaron en este trabajo; el cual se realizó en un clima tropical, con alta temperatura y humedad, en donde los animales permanecían en potreros abiertos (no estabulados), y las medidas higiénicas durante el ordeño no fueron tan estrictas; lo cual facilitaría el crecimiento y desarrollo de una alta carga bacteriana en la piel de los pezones, la cual pasaría a las pezoneras durante el ordeño.

En cambio, los resultados obtenidos en el manitol salado contrastan abiertamente con los del agar sangre, debido a que en el manitol ninguna placa presentó dichas colonias invasivas; y la razón de esto radica en que los microorganismos que originaban ese tipo de colonias, bacilos ambientales Gram +, no crecían en las altas concentraciones de sal que poseía este medio (7,5%).

Todo esto determinó que el porcentaje de eficiencia para el manitol salado fuera bastante alto, un 90%; debido al hecho que se pudo establecer un mayor número de relaciones contables entre el prelavado y el poslavado, aportando los datos numéricos necesarios para cuantificar la reducción de la carga bacteriana.

Asimismo, es importante señalar que el mayor número de relaciones que permitieron calcular la reducción bacteriana correspondieron a las diluciones realizadas a cada muestra, tal como se puede observar en los siguientes resultados:

No se obtuvo ninguna relación Contable-Contable en las muestras sembradas sin diluir en el agar sangre; en cambio sí

se obtuvo un 16,67% en las diluidas sembradas en el mismo medio.

Y en lo que respecta al manitol salado, las muestras sembradas sin diluir sólo obtuvieron un 45% de eficiencia para establecer relaciones Contable-Contable; en cambio en las diluidas se obtuvo un 92,31% de eficiencia.

CONCLUSIONES

1.- El agar manitol salado rojo de fenol usado para la siembra, como parte de la técnica no destructiva de muestreo de superficies, fue mucho más eficiente que el agar sangre de bovino al 5%; debido a que facilitó la cuantificación de la carga bacteriana del interior de las pezoneras en U.F.C. en el mayor número de muestras, tanto en el prelavado como en el poslavado; lo que permitiría a su vez calcular el porcentaje de reducción de la carga bacteriana de las pezoneras, evaluando así el método manual de lavado y desinfección que se le aplicó a las mismas.

2.- El agar sangre no obtuvo buenos resultados debido a que es un medio de cultivo enriquecido y no selectivo que permitió el crecimiento excesivo de microorganismos en las placas sembradas, lo que impidió un conteo claro y preciso de éstas. Además, las pezoneras presentaron una alta carga de microorganismos ambientales contaminantes, debido a las condiciones climáticas y de manejo antes señaladas.

3.- Las diluciones de las muestras permitieron calcular el porcentaje de reducción bacteriana en un mayor número de éstas; debido a que al diluir la muestra se esta igualmente diluyendo la alta carga bacteriana que ésta poseía, lo que a su vez facilitaría el conteo en las placas.

RECOMENDACIONES

1.- Como una forma de determinar la eficiencia al usar un método manual de lavado y desinfección de pezoneras, se recomienda el uso del MSRF como medio de cultivo para la siembra de las muestras recolectadas del interior de las pezoneras; especialmente cuando el rebaño de ordeño se encuentre a potrero (no estabulado) y/o en climas tropicales (alta temperatura y humedad). Resaltando que la reducción bacteriana calculada con este medio es sólo en base a los microorganismos mesófilos halófilos moderados y no al total de la carga bacteriana.

2.- Usar el agar sangre como un medio secundario para aislar e identificar microorganismos causantes de mastitis del interior de las pezoneras, a través de sus características de crecimiento, morfología y patrón hemolítico.

3.- Cuando se sospeche que las muestras poseen una alta carga de microorganismos, debido a las características climatológicas y de manejo bajo las cuales esté el rebaño a

muestrear; se recomienda utilizar diluciones de dicha muestra, usando para ello Buffer Fosfato Salino (BFS).

AGRADECIMIENTO

Al personal de la Cátedra de Microbiología, FCU-LUZ. Al propietario y al personal de la Hacienda Cambalache. Al CONDES por aportar el financiamiento de este trabajo como parte de sus actividades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Cullor, J.S. The Control, treatment and prevention of the various types of Bovine Mastitis. *Veterinary Medicine*. 88(6): 571-579. 1993.
- [2] Fliss, I.; Simard, R.E. and Ettriki, A. Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. *Journal of Food Science*. 56(1): 249-250. 1991.
- [3] Fox, L.K.; Hutton, C.T.; Hancock, D.D. and Gershman, M. Typing *Staphylococcus aureus* to determine sources of intramammary infections (IMI). *Journal of Dairy Science*. 73: (Supplement) 1: 257. 1990.
- [4] Fox, L.K. and Gay, J.M. Contagious Mastitis. *The Veterinary Clinic of North America*. 9(3): 475-488. 1993.
- [5] Hobblet, K. Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Memorias del Curso "Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina". Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto: 18. 1993.
- [6] Hogan, J.S.; Harmon, R.J.; Langlois, B.E.; Hemken, R.W. and Crist, W.L. Efficacy of an iodine backflush for preventing new Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science*. 67(8): 1850-1857. 1984.
- [7] Kingwill, R.G.; Dodd, F.H. and Neave, F.K. Machine Milking and Mastitis. *Machine Milking*. Thiel, C.C. and Dodd, F.H. (eds.). The National Institute for researching Dairying, Reading, England; The Hannah Research Institute, Ayr, Scotland. Technical Bulletin Editors. 4ed. 354 pp. 1983.
- [8] McDonald, J.S.; Adams, D.S. and Darlington, R.L. Studying the effects of backflushing milking units. *Veterinary Medicine*. 88(4): 382-386. 1993.
- [9] Merck. Manual de medios de cultivos. Merck-IGODA, División de Diagnóstico. 122 pp. 1990.
- [10] Nickerson, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* Mastitis infections. *Veterinary Medicine*. 88(4): 368-374. 1993.
- [11] Osuna, D.J.; De Young, D.J. and Walker, R.L. Comparison of an antimicrobial adhesive drape and povidone-iodine preoperative skin preparation in dogs. *Veterinary Surgery*. 21(6): 458-462. 1992.
- [12] Pankey, J.W. Hygiene at milking time in the prevention of Bovine Mastitis. *British Veterinary Journal*. 145(5): 401-409. 1989.
- [13] Philpot, W.N. Control of Mastitis by hygiene and therapy. *Journal of Dairy Science*. 62(1): 168-176. 1979.
- [14] Shearer, J.K.; Smith, K.L.; Bray, D.R. and Than, T.Q. Field observations on the effectiveness of various teatcup cluster sanitation procedures in Florida dairies. *Journal Dairy Sciences*. 68 (Supplement), 1:199. 1985.
- [15] Smith, T.W.; Eberhart, R.J.; Spencer, S.B.; Kesler, E.M.; Hargrove, G.L.; Wilson, R.W. and Heald, C.W. Effect of automatic backflushing on number of new intramammary infections, bacteria on teatcup liners, and milk iodine. *Journal of Dairy Science*. 68(2): 424-432. 1985.
- [16] Smith, T.W. Teatcup liner disinfection in reducing the spread of mastitis pathogens. *Proceeding, Internacional Mastitis Symposium, Canada*: 135-142. 1987.