

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y SENSIBILIDAD  
ANTIMICROBIANA DE GERMENES PATOGENOS ENCONTRADOS  
EN MASTITIS CLINICA BOVINA, OBTENIDOS EN ESTABLOS  
RUSTICOS EN EL MUNICIPIO DE ENCARNACION  
DE DIAZ, JALISCO.

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

GUILLERMO DAVID PONS ARENAS

ASESOR: MVZ. MINERVA SOTO ROSALES

GUADALAJARA, JALISCO. FEBRERO DE 1988

A MIS PADRES:

PONS SIERRA DAVID Y  
ARENAS DE PONS MARTHA EUGENIA.

Por su cariño, su comprensión  
y sacrificios con que guiaron  
mis primeros pasos a través de  
mi vida estudiantil.

A MIS HERMANOS:

LORENA ELIZABETH ,  
DANIEL ALEJANDRO ,  
JAIME EDUARDO ,  
FEDERICO ALBERTO ,  
\*VICTOR FEDERICO , Y  
\*DANIEL ROBERTO .

Por su apoyo y comprensión sin límites.

A MIS AMIGOS:

Y A TODAS LAS PERSONAS, que han estado con  
migo en los momentos más difíciles de mi -  
vida.

A MI ASESOR:

M.V.Z. MINERVA SOTO ROSALES.  
Por sus consejos y enseñanzas que guiaron y  
cuidaron la realización de esta TESIS.

A LOS SEÑORES GANADEROS Y MEDICOS VETERINARIOS ZOOTECNISTAS:

Que con experiencias personales colaboraron  
en la realización completa y apegada a la -  
realidad el presente trabajo.

G R A C I A S .

A MI ESPOSA:

TORRES VELAZQUEZ SAHARA HELENA.

Por su AMOR, CARINO y COMPREN--  
SION incondicional.

Por su MOTIVACION CONSTANTE para  
conmigo y su APOYO para seguir -  
ADELANTE POR MAS DIFICIL QUE SEA.

Y por ser la compañera INSUSTITUIBLE  
de toda mi vida.

A MIS MAESTROS:

Por su PACIENCIA para enseñar lo que  
cada uno de ellos cree necesario.

Por la LEGACION de sus CONOCIMIENTOS.

Por alentarnos para seguir adelante  
haciendonos la vida menos DIFICIL.

G R A C I A S .

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y SENSIBILIDAD  
 ANTIMICROBIANA DE GERMENES PATOGENOS ENCONTRADOS EN  
 MASTITIS CLINICA BOVINA OBTENIDOS DE ESTABLOS RUSTICOS EN EL  
 MUNICIPIO DE ENCARNACION DE DIAZ, JALISCO.**

I N D I C E :

|                         |    |
|-------------------------|----|
| JUSTIFICACION .....     | 1  |
| INTRODUCCION .....      | 2  |
| ANTECEDENTES .....      | 14 |
| OBJETIVOS .....         | 18 |
| MATERIAL Y METODO ..... | 19 |
| RESULTADOS .....        | 25 |
| DISCUSION .....         | 34 |
| CONCLUSIONES .....      | 38 |
| SUMARIO .....           | 39 |
| BIBLIOGRAFIA .....      | 41 |

## J U S T I F I C A C I O N .

EL presente trabajo forma parte de un  
muestreo realizado en establos rústicos  
de 7 municipios de la Zona de los Altos  
del Estado de Jalisco.

## I N T R O D U C C I O N

El término mastitis se refiere a la inflamación de la glándula mamaria sea cual sea su causa. Este término deriva del griego "mastos", mama e "itis", inflamación. La enfermedad puede ocurrir en cualquier mamífero, pero es de mucho mayor frecuencia e importancia en la vaca lechera, ya que produce cambios importantes en la composición de la leche y disminuye la producción láctea. (20) (24).

La transmisión de esta enfermedad es de un animal a otro por medio de las manos del ordeñador, las pezoneras de la ordeñadora mecánica, moscas chupadoras o por la suciedad de los corrales. (24).

Entre los factores predisponentes que facilitan la entrada del microorganismo o disminuyen la resistencia del animal al crecimiento bacteriano desencadenando el proceso inflamatorio se encuentran los siguientes:

- Golpes, pisadas, heridas, cuarteaduras, mordiscos de la cría al mamar. (5) (10).
- Ordeño inadecuado por alteraciones excesivas en el vacío, por sobreordeño o por ordeño incompleto. (4)(24).
- Deficiente higiene de los implementos de ordeño, especialmente pezoneras no lavadas y desinfectadas. (4) --- (10) (24).
- Condiciones de clima y alojamiento inapropiadas como establos cortos o estrechos, ventilación deficiente, pisos resbaladizos, cama húmeda o sucia, acumulación de lodo y/o estiércol en épocas de lluvia, baja excesiva de la temperatura media, etc. (5) (16) (24).
- Alimentación mal balanceada y trastornos metabólicos. (24).
- Factores genéticos relacionados con el tamaño y la forma de los pezones y con la resistencia de los ligamentos superiores de la ubre. (5) (24).

Entre las anomalías más importantes de la leche cabe mencionar: cambios de color, presencia de coágulos, incremento de las proteínas de la sangre y leucocitos en el tejido mamario. La finalidad de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar el irritante, reparar los daños de los tejidos y hacer que la ubre regrese al funcionamiento normal. (14) (20) (24).

#### CAUSAS BACTERIANAS DE LAS MASTITIS.

Dentro de éstas, muchas son consecuencia directa del mal manejo e higiene de la ordeña. En realidad no son las bacterias sino más bien sus toxinas, las que producen la respuesta inflamatoria. La inflamación persistente ocasiona daños en los tejidos y el reemplazamiento de células secretoras de la ubre con tejido conectivo no productivo (o de cicatrización), ésta pérdida de tejido reduce la producción de leche. (4).

Entre las principales bacterias involucradas en las mastitis se encuentran:

|                      |   |                                 |
|----------------------|---|---------------------------------|
| <u>Streptococcus</u> | { | <u>uberis</u>                   |
|                      |   | <u>agalactiae</u>               |
|                      |   | <u>dysgalactiae</u>             |
|                      |   | <u>zoepidemicus</u>             |
|                      |   | <u>fecalis</u>                  |
|                      |   | <u>pneumoniae</u>               |
|                      |   | <u>pyogenes</u>                 |
|                      |   | (4) (5) (7) (9) (10) (12) (16). |



Staphylococcus

aureus  
epidermidis  
citreus  
albus  
intermedius  
saprofiticus  
pyogenes

(4) (5) (7) (9) (10) (16).

Enterobacterias

Escherichia coli  
Proteus mirabilis  
Salmonella paratyphi "a"  
Enterobacter aglomerans  
Klebsiella pneumoniae

(5) (7) (9) (10) (12) (15)(16).

Corynebacterium

pyogenes  
hemoliticum  
pseudotuberculosis

(5) (7) (9) (10) (12).

Mycoplasma

bovigenitalum  
agalactiae var. bovis

(5) (9) (12).

Mycobacterium

fortuitum  
tuberculosis

(9) (10)(12).

Pseudomona aeruginosa (5) (7) (9) (10) (12).

Sphaerophorus necrophorus (9) (10) (12).

Pasteurella multocida (9) (10) (12).

Brucella abortus (9) (10) (12).

Nocardia sp. (9) (12).

Levaduras

Cryptococcus neoformans

Candida albicans

Trichosporum sp

(7) (9) (10) (12).

No rara vez se presentan infecciones mixtas, en las que --  
varias bacterias se encuentran asociadas; el proceso inflama  
torio que éstas causan puede cursar de forma muy desfavora---  
ble y, dado su gravedad, requieren rápida intervención vete--  
rinaria. (10).

#### TIPOS DE MASTITIS .

SUBCLINICA.- Forma en la que no hay inflamación en la glán  
dula o una gran anormalidad de la leche, a simple vista. (14)

CLINICA.- Existen condiciones anormales en la leche y la -  
ubre, la leche puede tener copos, coágulos, o un aspecto acu  
so, espeso o sanguinolento; la ubre se presenta con inflama--  
ción, y son detectables síntomas generales en la vaca.(14) --  
(15).

AGUDA.- Inflamación repentina del cuarto afectado que puede sentirse caliente, duro y sensible al tacto. Puede hacerse sistémico con signos de fiebre, pulso rápido, depresión, debilidad y pérdida de apetito. (10).

CRONICA.- Infección persistente de la ubre que existe continuamente. A veces se desarrollan en la forma clínica. Después de esas apariciones bruscas, se produce un regreso a la forma subclínica. (7).

## D I A G N O S T I C O   D E   L A   M A S T I T I S .

### Pruebas físicas:

- 1.- PRUEBA DEL PAÑO NEGRO.- Consiste en extraer unos chorros de leche haciéndolos pasar a través del paño, si hay presencia de grumos, indica positividad a mastitis. (7) -- (23).
- 2.- PRUEBA DE CLORUROS.- La leche se pone en contacto en una titulación con nitrato de plata en solución 0.1 N., la transformación de la solución en cuanto a su color en un amarillo intenso, es indicativo de mastitis. (10).
- 3.- PRUEBA DE CATALASA.- Se practica en un tubo de fermentación llamado Smith, en el cual se depositan 15 cm<sup>3</sup> de leche problema y se agregan 5 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluida al 1%, y a las 24 horas se observan los resultados si no hay mastitis, la leche no sufre alteración, en caso contrario se forma una burbuja en la parte superior. (7).
- 4.- PRUEBA DE WHITESIDE MODIFICADA.- En este método se mezclan 2 gotas de solución normal de Na OH (si la leche es refrigerada, solo 1 gota) con 5 de leche, sobre una placa de cristal negra; mezclado cuidadosamente y agitando durante 20 a 30 segundos con una varilla de vidrio.

El resultado de la prueba se designa: -, +, +, ++, +++, -- +++++. El resultado será negativo si el aspecto de la leche no varía; positivo si se observan coagulaciones terrosas, - en filamentos o en témpanos; y grado máximo de positividad, si la mezcla se transforma en una masa viscosa, espesa, que desprende un líquido claro. (7) (10).

5.- PRUEBA DE CALIFORNIA.- Se realiza directamente en el establo o sala de ordeño. El material requerido consta de una paleta de plástico con 4 perforaciones que van en coordinación con los pezones del animal.

El reactivo a utilizar es alkyl aril sulfonato al 3%, indicador púrpura de bromocresol en una concentración de 1:10,000.

Después de eliminar los primeros chorros de cada cuarto se toman las muestras en la sección adecuada de la paleta. Enseguida se agregan el reactivo a cada sección en igual -- cantidad que la leche, y se agita suavemente para mezclar -- la leche con el reactivo con movimientos circulares. Esto -- produce la reacción entre el reactivo y las células somáticas. Se mide la cantidad de coagulación (viscosidad) para -- calcular el número de células blancas (leucocitos) y otras células somáticas presentes.

Cuando mayor sea la formación de gel, tanto más alto será el conteo de células existentes en la leche, indicándonos -- el grado de inflamación en cada cuarto de ubre. (4) (7) -- (14).

CALIFICACION E INTERPRETACION DE LA  
PRUEBA DE CALIFORNIA.

| CALIFICACION  | DESCRIPCION DE LA REACCION   | CONTEO APROXIMADO DE CELULAS EN LA LECHE. |
|---------------|--|---|
| Negativa -    | No hay gel visible   | 200,000 / ml                              |
| Positivo +    | Se observa una cantidad ligera de gel al inclinar la paleta.   | 500,000 / ml                              |
| Positivo ++   | Gel más pesado que no va hacia el centro al darle vueltas a la paleta.   | 1'500,000./ ml                            |
| Positivo +++  | Gel espeso que se des <del>pl</del> aza con rapidez hacia el centro al darle vueltas a la paleta, rapidamente. | 5'000,000 / ml                            |
| Positivo ++++ | Gel espeso que se adhiere al fondo de la paleta.   | 5'000,000 / ml                            |

(7)

Los valores sólo se utilizan como referencia aproximada - puesto que hay grandes variaciones individuales hasta el extremo de considerar normales recuentos células hasta de ----- 250,000 células / ml., e incluso superiores. Además hay diferencias fisiológicas entre distintos cuarteros, de tal forma que puede ser sólo relativo el incremento del número de células en la leche total de una mama. (10).

Los factores que influyen en el número de células son los siguientes:

- Fase de lactación en que se efectuó el recuento. El incremento en esta etapa es constante en la época calos--tral y al final de la lactación. (10).
- Edad del animal:  
Las vacas de mayor edad tienen más células en su leche que las jóvenes. (7) (10).
- Si la operación se efectuó al principio, mitad, o final del ordeño.  
Los líquidos inicial y final del ordeño tienen un con--tenido especialmente elevado de células. (7)(10).
- Los incrementos patológicos son bastante frecuentes en comparación con los fisiológicos, (10)

#### 6.- PRUEBAS BACTERIOLOGICAS PARA ESTIMAR LA CALIDAD DE LA LECHE.

- A) Conteo directo al microscopio de células contenidas en la leche a analizar. Las células somáticas están pre--sentes en la leche en forma normal a niveles bajos --- (50,000 - 200,000 / ml.), cuando se alcanzan niveles altos, entre 200,000 y 500,000 / ml., o más dependiendo de la severidad o extensión de la infección, los --mismos indican leche anormal. (4) (7) (14).
- B) Siembras en medios sólidos en caja de Petri con medios de cultivo específicos para el crecimiento de bacterias. (3).
- C) Pruebas bioquímicas. Medios T.S.I. (hierro - triple a--zúcar), citrato de Simonns; M.I.O. (motilidad-indol-or--nitina), L.I.A. (agar de hierro y lisina); R. M. - --- V. P. (rojo de metilo - vogues pros kauer); coagulasa, oxidasa, catalasa. (3)

7.- ANTIBIOGRAMA.- Es una prueba utilizada para observar el grado de sensibilidad de las bacterias hacia algún antibiótico. Esta prueba se fundamenta en que al colocar un disco impregnado con cierta cantidad de antimicrobiano, sobre un medio sólido inoculado previamente con bacterias el antimicrobiano se difunde formando un gradiente de concentración que permitirá o inhibirá el crecimiento de la bacteria. Generalmente se utilizan antimicrobianos de amplio espectro, lo que permite usarlos tanto para bacterias gram - positivas como para gram - negativas. (1).

## REPERCUSIONES ECONOMICAS DE

### LA MASTITIS.

Desde hace muchos años se ha reconocido que la mastitis es, entre todas las enfermedades, la que causa los mayores daños a la industria lechera del país. En lo que se refiere a su frecuencia e importancia económica ocupa el primer lugar, ya que reduce las ganancias al disminuir la producción láctea, pérdida de vacas valiosas, costo de tratamientos y producción de leche de mala calidad, la cual a su vez trae como consecuencia problemas de salud pública. (4) (5) (10) (17) (25)

La producción láctea en México tiene gran importancia económica participando con un 27.9%, en el producto interno bruto del sub-sector pecuario, ocupando un lugar primordial con respecto a los otros productos de origen animal. (11)

La incidencia de mastitis bovina en México no ha tenido uniformidad en todos aquellos investigadores que se han abocado al estudio de esta enfermedad. (11)

Se ha detectado que la ganadería lechera presenta del 65 al 75% de mastitis, habiendo casos dramáticos que llegan al 90%. Más de un millón de vacas productoras afectadas, dejan de producir alrededor de 700 millones de litros de leche al año. (14) (17) (25)

Así mismo, Rivera Sánchez (1974) reportó una incidencia de 81% y en otros trabajos realizados como en el de Vázquez Garza (1974), se reporta una incidencia de 60 - 80%. (11)

El Dr. Luis Felipe Pérez Fernández destaca que en la mayoría de los establos, un 5% de los animales presenta cuadros clínicos, mientras el restante 95% padece mastitis subclínica. Esta última, por lo tanto, es la que mayores pérdidas económicas reporta al productor, pues no tiene manifes-



taciones visibles, siendo detectable únicamente por pruebas de diagnóstico, como la de California. Por medio de la prueba de California, el Dr. Jasper de la Universidad de Davis, ha encontrado que las pérdidas de cuartos afectados llegan a ser del 42%, en comparación con los cuartos sanos. (25)

La literatura señala que la incidencia de mastitis bovina en el mundo en general ha sido estimada en un 50% de las vacas lecheras (11)

La mayor parte de los estudios ponen de manifiesto que, en promedio, un cuarto glandular afectado, experimenta un 30% disminución de su productividad, estimándose que una vaca con mastitis subclínica pierde el 25% de su producción total y una vez que se llega al estado clínico, se puede perder del 20 al 50% de la producción potencial por cuarto de ubre. (14)

El Estado de Jalisco es considerado como la primera cuenca lechera del país en la zona de los Altos, se localiza además, la cuenca de Chapala y la Sierra del Tigre en el sur del estado. Es el principal productor de leche con 900 millones de litros anuales que corresponden al 12% de la producción nacional. (13)

Los municipios que destacan como productores son: Lagos de Moreno, San Miguel el Alto, Arandas, San Juan de los Lagos, Encarnación de Díaz, Ocotlán, Tototlán, Zapotlanejo. - los cuales producen el 56.8% del total de la producción estatal (1985). (2)

Durante 1986, el inventario ganadero en Jalisco reportó los siguientes datos aproximados:

BOVINOS                    3'015,165                    cabezas.

|            | Cabezas de ganado |          |
|------------|-------------------|----------|
| CARNE      | 2'190,775         | (71.88%) |
| LECHE      | 753,777           | (25%)    |
| DE TRABAJO | 70,553            | ( 3.12%) |

Producción promedio de leche por año 962 millones de litros.

Producción promedio de leche diaria 2'635,616 Lts.

Valor de la producción diaria \$ 408'520,480.00 (2)

Por lo que respecta al municipio de Encarnación de Díaz, el cual forma parte de la Cuenca lechera de los Altos, los datos obtenidos durante el primer trimestre de 1987, fueron los siguientes:

OVINOS LECHE 36,910 cabezas

Producción promedio de leche anual 42'828,735 lts.

Producción promedio de leche por día 117,339 lts

Valor aproximado de la producción diaria \$ 22'294,410.00 (18)

De acuerdo a lo señalado por la literatura (14) y comprobado por las opiniones de varios ganaderos de la región, - existe una pérdida hasta de un 30% en la producción lechera debido a mastitis en su forma clínica.

Así, puede deducirse que, por este concepto, en el Estado de Jalisco se tiene una pérdida promedio por día de 790,684 lts que representan \$ 122'526,144.00.

Por otro lado, el municipio en cuestión, sufre una pérdida aproximada de 35,201 lts por día con un costo de \$ 6'688,323.00, sin contar, en ambos casos, los gastos por concepto de medicamentos, mano de obra y asistencia médica.

## ANTECEDENTES

### ASPECTOS FISIOGRAFICOS.- °

El municipio de Encarnación de Díaz se encuentra ubicado en la parte noreste de la Región Altos del Estado, limita al norte con el estado de Aguascalientes, al sur con el municipio de San Juan de los Lagos, al este con el de Lagos de Moreno y al oeste con el de Teocaltiche. (21)

Tiene como extensión territorial 129,697 hectáreas - clasificadas agrológicamente en la forma siguiente: 1,291 - has. de riego, 29,214 has. de temporal y humedad, 2,400 has de bosques, 88,155 has. de pastizales y 8,637 has. de tierras improductivas. (21)

Su topografía presenta relieves más o menos planos, que caracterizan a las áreas comprendidas en la Altiplanicie Central del país, tiene altitudes que varían entre 1,500 y 2,100 m. s. n. m., variando únicamente en 2 pequeñas partes ubicadas en las partes norte y este con altitudes entre 2,100 y 2,700 m.s.n.m. (21)

HIDROLOGIA. La constituye la subcuenca hidrológica "Rio Verde Grande de Belén" mediante los ríos y arroyos comprendidos en ella misma que a su vez forma parte de la Región hidrológica "Lerma Chapala-Santiago". (21)

CLIMA. El clima de Encarnación es seco, con otoño, invierno y primavera secos y semicálido con invierno benigno. Su temperatura media anual alcanza un promedio de 19.4° C., como máxima 41° C y -7° C mínima. (21)

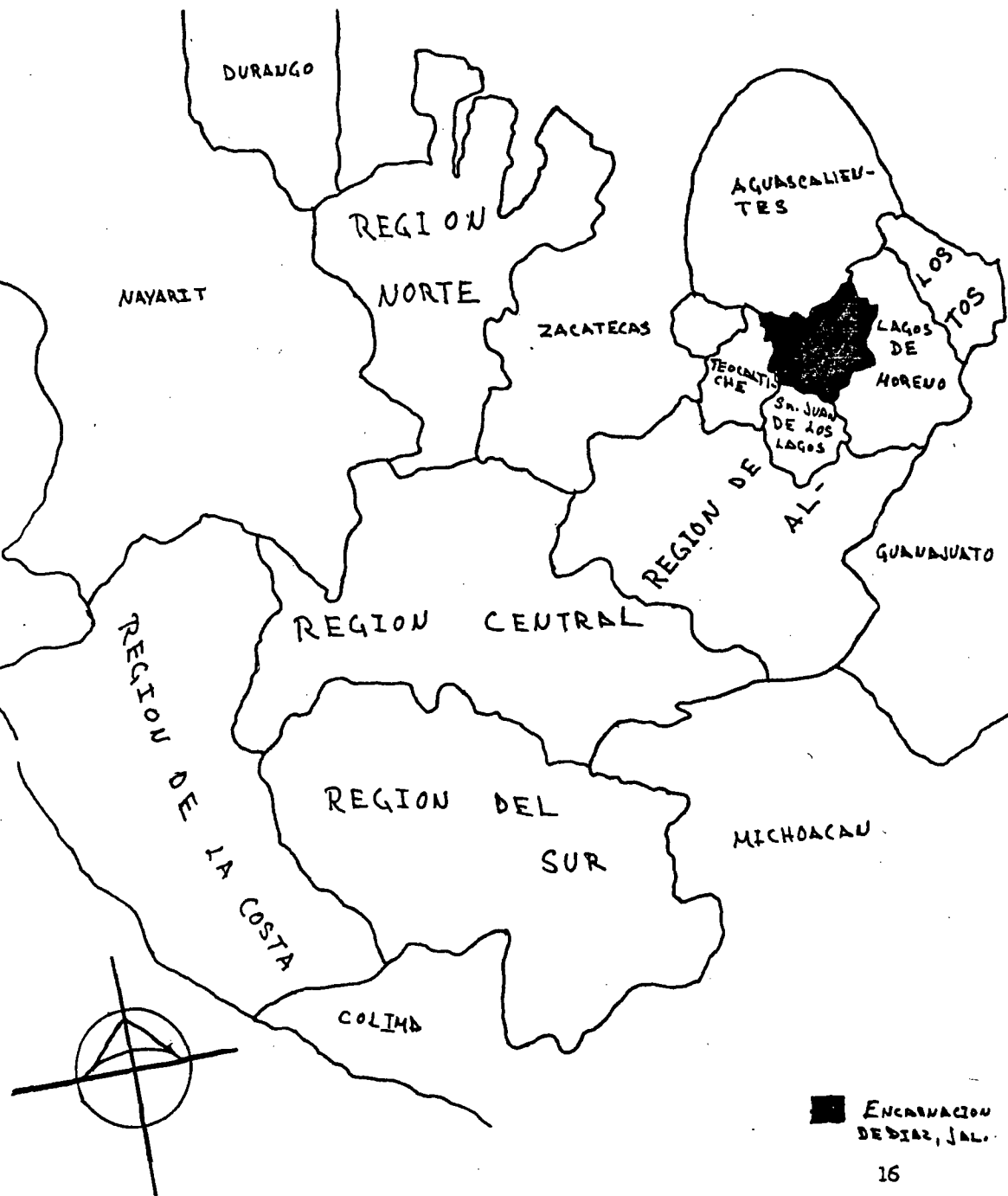
En todo el municipio se tiene un régimen pluviométrico inferior a los 800 milímetros anuales y recibe en promedio una precipitación pluvial anual de 563.8 mm. (21)

### SECTOR GANADERO.

Se encuentra representado por 5 especies: bovina con 73,870 cabezas, las cuales están dedicadas en un 22.9% a la explotación lechera y el 77.1% a la carne; porcina con 22,580 cabezas; la ovina con 1,250, caprina 2,940 cabezas; y 29,060 correspondiente a las aves. (18) (21)

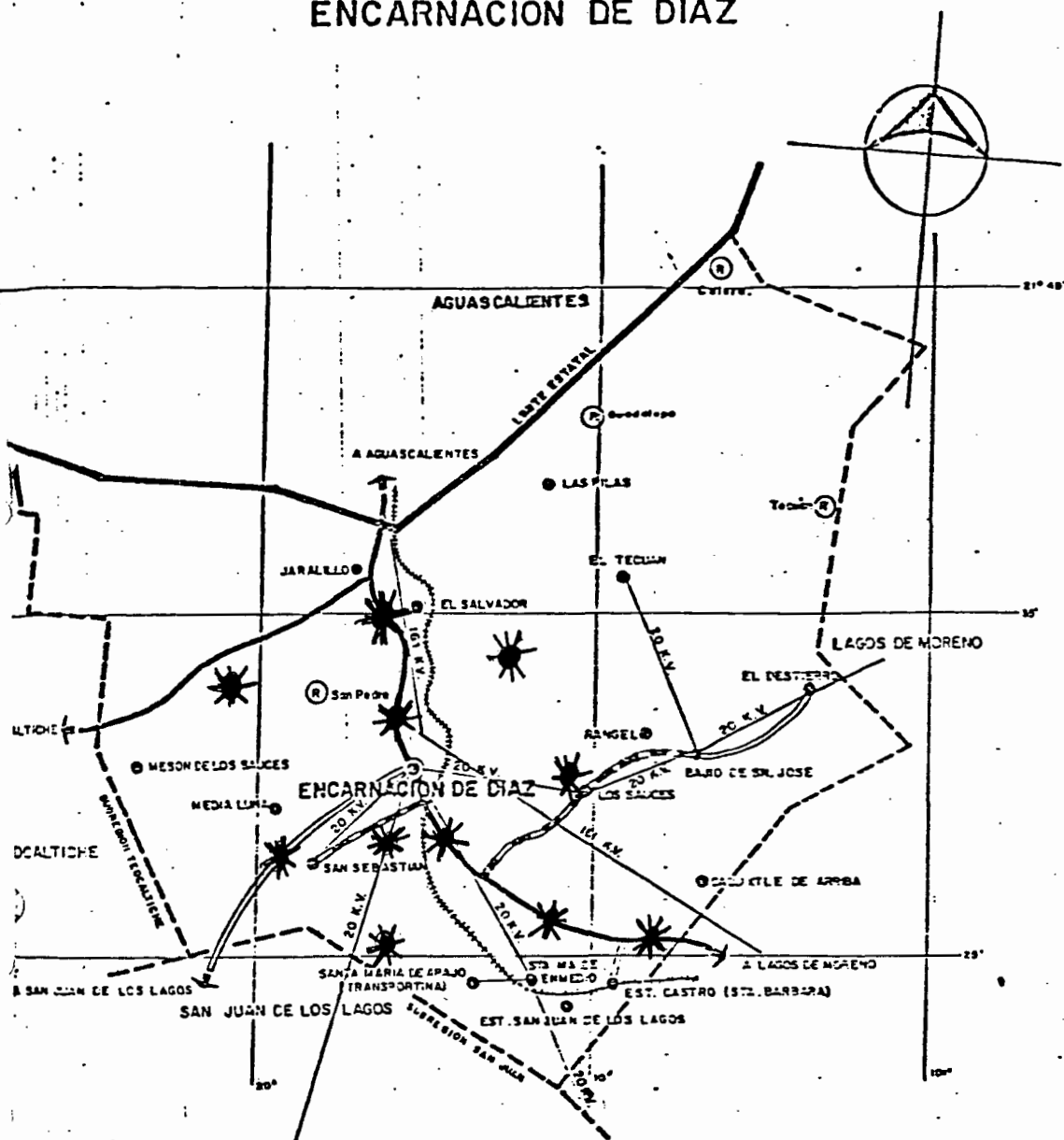
### SECTOR COMERCIO.

En cuanto a la producción de leche, más del 88% se destina a la ciudad de Guadalajara, Guanajuato y el D. Federal, no obstante de la cercanía con la ciudad de Aguascalientes. (21)



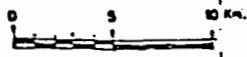
ENCARNACION DE DIAS, JAL.

# ENCARNACION DE DIAZ



## SIMBOLOGIA

- ⊙ CABECERA MUNICIPAL
- PRINCIPALES LOCALIDADES
- CARRETERA
- TERRACERA
- ⊗ Localización de los establos visitados
- ▭ BRECHA
- LINEA DE TRANSMISION
- ⊙ COPAS DE RIO
- ⊠ PLANTA GENERADORA
- △ SUB-ESTACION
- MURALLA F.C.



### O B J E T I V O S :

- 1.- Aislar e identificar los microorganismos patógenos causantes de las mastitis clínicas encontradas en el municipio de ; - Encarnación de Díaz, Jal.
- 2.- Conocer la sensibilidad antimicrobiana - de los gérmenes encontrados.

## MATERIAL Y METODO

Se tomó un grupo de 11 establos al azar, comprendidos dentro del municipio de Encarnación. Previa aplicación de la prueba de California para mastitis, se obtuvieron muestras de leche, tanto de vacas con signos clínicos de mastitis, como de aquellas aparentemente sanas pero con antecedentes de haber padecido la enfermedad, más una muestra de leche sana por establo para ser usada como testigo.

La leche se recolectó al momento de la ordeña, de la siguiente forma:

Se desinfectó la ubre y los pezones con una solución de iodo al 1%, secando luego cuidadosamente con una franela limpia. Tirando los 3 primeros chorros de cada cuarto, se procedió a realizar la prueba de California de la forma ya mencionada. Después de haber agregado el reactivo y mezclado con la leche, se observó el grado de coagulación; de acuerdo a esta reacción se calificó según el cuadro de interpretación para esta prueba.

Del o los cuartos afectados, fué tomada la leche, depositándola en frascos estériles y en cantidad apropiada de 90 ml. Durante el traslado de las muestras, éstas se mantuvieron en refrigeración.

En el laboratorio, para evitar contaminaciones del medio a las muestras, éstas se homogenizaron ligeramente dando movimientos circulares a los frascos con la mano para después, a la flama de un mechero, vaciar cada una en tubo de ensaye estéril con tapón de algodón, centrifugándose luego a 6,000 r. p. m. durante 5 min., tiempo en el cual es posible tomar el Ph de la muestra directamente del frasco en que fué recolectada.



Para llevar a cabo la lectura de Ph, el potenciómetro se puso a funcionar media hora antes de usarlo. Se calibró después con una solución buffer de 8.7 milimoles de fosfato de sodio dibásico, ajustando a un Ph 7:38 a una temperatura de 37° C. Después de cada lectura, el electrodo del potenciómetro se lavó con agua bidestilada quedando listo para la siguiente lectura. Cada 10 muestras aproximadamente, es necesario volver a calibrar el aparato con la solución buffer.

Terminada de centrifugar la muestra, se eliminó la grasa y el sobrenadante, conservando el sedimento, el que fué utilizado para:

a) Tinción de Giemsa para conteo leucocitario.

Se hizo un frotis de cada muestra en un portaobjetos y se trató con tinción de Giemsa de la siguiente forma: el portaobjetos se limpió con un algodón húmedo en alcohol para eliminar la grasa que pudiera tener, se dejó secar cercano a la flama del mechero. Con el asa bacteriológica, se tomó un poco del sedimento de la muestra centrifugada colocándolo sobre el portaobjetos agregando una gota de agua bidestilada.

Con la misma asa de platino se hizo el frotis lo más uniformemente posible, cuando secó, se fijó pasando la preparación varias veces por la llama del mechero. Enseguida se trató con solución de lugol durante 5 minutos, se lavó con agua y luego con thioalfito sódico al 0.5%; se tiñó con colorantes de Giemsa durante 40 minutos, se lavó y dejó secar al aire libre.

Esta tinción es importante puesto que de su observación directa al microscopio, se comprueba el nú-

-mero de células por ml. contenidas en la leche problema comparándolos con los resultados obtenidos al hacer la prueba de California en el establo.

La fórmula para realizar el recuento leucocitario es:

$$\frac{\text{No. de células por ml. de leche normal.}}{\text{No. de campos observados.}} \times \frac{\text{No. total de células observadas en los campos.}}{\text{No. de células por ml. de la leche problema.}} = \text{(8)}$$

b) Siembra en caldo nutritivo.

En medio estéril a la flama directa del mechero y, usando el asa bacteriológica, se tomó sedimento de la muestra centrifugada depositándolo en tubos de ensaye estériles conteniendo como medio de crecimiento caldo nutritivo, enseguida se incubó durante 24 hs. a 37° C.

Cuando el resultado era negativo, se resembraba e incubaba nuevamente a 37° C durante 24 hs.. De resultar negativa por segunda ocasión, la muestra se clasificaba como normal o no mamitosa.

El crecimiento bacteriano o positividad, se observó por turbidez del medio. A partir de este primer cultivo, se aislan las bacterias presentes sembrando en placas de Petri conteniendo medios selectivos para el crecimiento bacteriano. La siembra se efectuó en medio estéril (a flama directa) con asa de platino introduciendo ésta en el caldo nutritivo y realizando luego estrias sobre la superficie del medio sólido, después se incubó a 37° C por 24 hs.

Los medios selectivos sólidos empleados fueron 3, a saber: gelosa sangre; verde brillante; y mc. conkey.

Cuando, después de incubar, se observó crecimiento solo en el medio de la gelosa sangre, el tipo de colonia se sembró en tubo estéril conteniendo caldo infusión cerebro - corazón (I.C.C.), nuevamente esto se hizo a la flama directa del mechero para evitar contaminaciones. Se incubó a 37°C por 24 horas. En caso de negatividad, se resucubaba y reincubaba 24 horas más.

El cultivo en I.C.C., se realiza con el fin de mantener vivo y nuevo el cultivo de la colonia bacteriana aislada de la muestra problema.

Simultáneamente se hizo una tinción de gram como sigue: un portaobjeto desgrasado se calienta ligeramente sobre la flama del mechero, una vez caliente, con un lápiz grueso se traza un círculo en la parte central del portaobjeto, se pone una gota de agua destilada dentro del círculo, se toma con el asa una muestra del cultivo y se mezcla con el agua hasta hacerla homogénea, una vez hecho esto, se saca con movimientos rotatorios sobre el mechero; enseguida se aplica cristal violeta durante 1 minuto, se lava; lugol 1 minuto, se lava; alcohol acetona, según se observe decoloración, se lava y, por último, se aplica safranina por 15 segundos, se lava y seca al aire libre.

Posteriormente se observó al microscopio con objetivo de inmersión y se clasificó el germen encontrado como Gram negativo ó Gram positivo, según las bacterias se tiñeron de un color rojo ó azul respectivamente. En seguida se realizan pruebas de azúcares específicas para Staphylococcus (hemólisis, manitol. coagulasa, catalasa, maltosa, glucosa, -- oxidación - fermentación) y Streptococcus (hemólisi, mani--

-tol, trehalosa, sorbitol, salicina, lactosa, rafinosa, inulina) en base al resultado de éstas se clasificó el tipo de bacteria en su género y especie.

Cuando se observó crecimiento en los 3 medios (posibles enterobacterias); de las colonias en gelosa sangre, se resembraron en I. C. C. e incubaron 24 horas a 37° C, se hizo tinción de gram y observó al microscopio, anotando tipo y forma de la bacteria encontrada.

De los medios restantes (verde brillante y mc. conkey), se realizaron pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias como T. S. I. (dextrosa, sucrosa, lactosa - hierro); C. S. (citrate de Simmons); L. I. A. (agar de hierro y lisina); M. I. O. (motilidad-indol-ornitina); R. M. - V. P. (rojo de metilo - voges proskauer).

En caso de *Corynebacterium*, las pruebas realizadas fueron hemólisis, catalasa, ureasa, gelatina, glucosa, lactosa, - maltosa, sucrosa, trehalosa).

En ambos casos. los resultados se confrontaron con los obtenidos por medio de la tinción de gram y clasificados según su reacción sobre las pruebas bioquímicas mencionadas de acuerdo a tablas preestablecidas. (9)

Finalmente, identificados los gérmenes involucrados en los procesos mamarios localizados, se procedió a realizar la prueba de sensibilidad hacia los diferentes antibióticos que, para combatir la mastitis, se encuentran disponibles en el comercio.

Esta prueba se fundamenta en que al colocar un disco impregnado con determinada cantidad de antimicrobiano, sobre un medio sólido inoculado con bacterias, el antimicrobiano difundirá, formándose un gradiente de concentración el cual

-inhibirá o permitirá el crecimiento de la bacteria. (1)

Para efectuar ésta prueba, se preparó medio de agar Mueller - Hinton; se vació a cajas de Petri dejando enfriar y pasando luego a refrigeración, posteriormente se colocaron en estufa bacteriológica a  $37^{\circ}$  C durante 30 minutos con el fin de eliminar la humedad excesiva.

Las muestras a sembrar en el medio de Mueller, se encontraban en tubos de ensaye en caldo infusión cerebro - corazón. Utilizando un hisopo de madera y algodón, se inoculó - el medio de Mueller mediante estrias sobre la totalidad de la superficie de agar, después se tomaron los discos impregnados con antibiótico con pinza estéril y se colocaron en el medio presionándolos ligeramente para asegurar un contacto completo con la superficie; se procedió a incubar a  $37^{\circ}$  C durante 24 horas, al cabo de las cuales se realizó la lectura.

Las cepas se clasificaron en: resistentes (R) ó sensibles (S), dependiendo esto del halo de inhibición de crecimiento que presentaron.

## RESULTADOS

Los resultados que se obtuvieron de la prueba de California realizada a nivel establo, mostraron una mayor incidencia de mastitis en animales que se encontraban entre el 2o. y 4o. parto; el grado de infección fué variable pero en este grupo la mastitis estuvo presente con ++, + + +, y hasta + + + + (máxima positividad) según la clasificación de la prueba de California (C. M. T.)

Los animales de lo., 5o., y 6o. parto se encontraron positivos a mastitis en un 36% aproximadamente; en ellos el grado de infección también fué variable encontrándose mayor en + +, y + + +, según la interpretación de la prueba.

Sólo se tuvo una vaca de 10o. parto la cual presentó mastitis con positividad + +, según clasificación de la C.M.T. (fig. 1).

Al realizar el conteo leucocitario, la menor lectura fué de 500,000 células por ml. y, la mayor de 8'750,000; encontrando el mayor número de casos entre 500,000 y 1'325,000 cel/ml. consideradas estas cantidades en la clasificación C.M.T. como positivo + . El mayor recuento correspondió a 3 muestras, todas pertenecientes a un mismo establo; su lectura fué de 7'000,000 a 8'750,000 cel/ml. (fig. 2)

La frecuencia con que fueron observadas las diferentes células leucocitarias, se presentan en el diagrama de barras (fig. 3). El mayor porcentaje correspondió a monocitos siguiendo en orden decreciente eosinófilos, neutrófilos y basófilos.

En las muestras "testigo", el PH fluctuó entre 6.35 y 6.79. El 54% de ellas se mantuvo entre 6.39 y 6.74; el 28%

fué mayor de 6.74 y sólo el 18% fué menor de 6.39. (fig. 4).

Las muestras problema presentaron más variaciones, y su  $\mu$  estuvo comprendido entre 6.34 y 7.27 (fig. 5).

La tabla no. 1, muestra la incidencia de bacterias aisladas de las leches anormales, siendo los Staphylococcus, Enterobacterias y Corynebacterium los que se encontraron con mayor frecuencia; Streptococcus sólo fué aislado en el 1.96% de los casos.

La lectura de los antibiogramas Gram negativos (-), reportó una marcada resistencia de las Enterobacterias a la ampicilina y colimicina; altamente sensibles a gentamicina y, en menor grado, a los demás antibióticos. (fig. 6).

En los antibiogramas para Gram positivos (+) también se observó una resistencia considerable a ampicilina, además de cloxacilina, lincomicina, penicilina y sulfametoxazol con -- trimetoprim.

El mayor grado de sensibilidad de los gérmenes gram positivos aislados, fué hacia kenamicina, gentamicina, cefotaxina, estreptomina y tetraciclina, siendo menor en cefalosporina; con excepción de eritromicina en la que resultó un número igual de cepas sensibles y resistentes. (fig. 7).

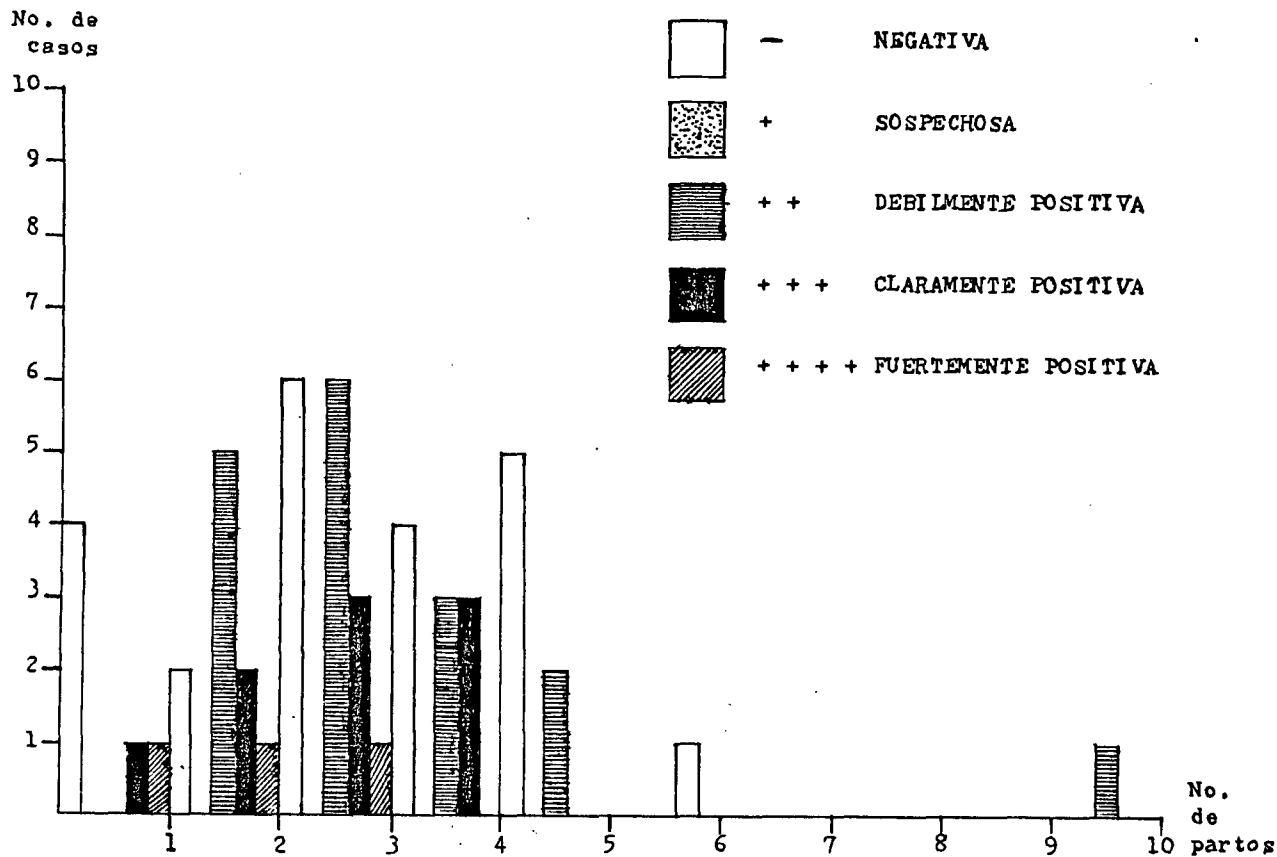


FIG. I.- RESULTADO DE LA PRUEBA DE CALIFORNIA EFECTUADA A NIVEL ESTABLO



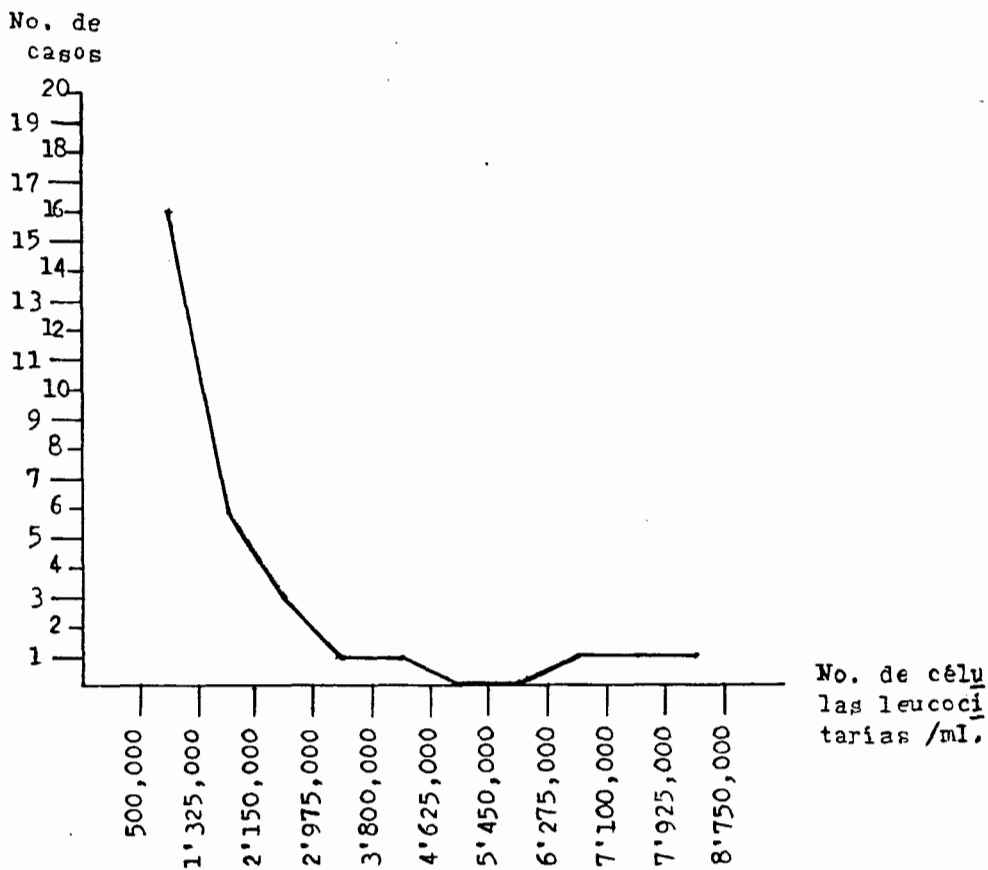


FIG. 2.- NUMERO DE CELULAS LEUCOCITARIAS POR ML. ENCONTRADO EN LAS MUESTRAS DE LECHE OBSERVADAS.

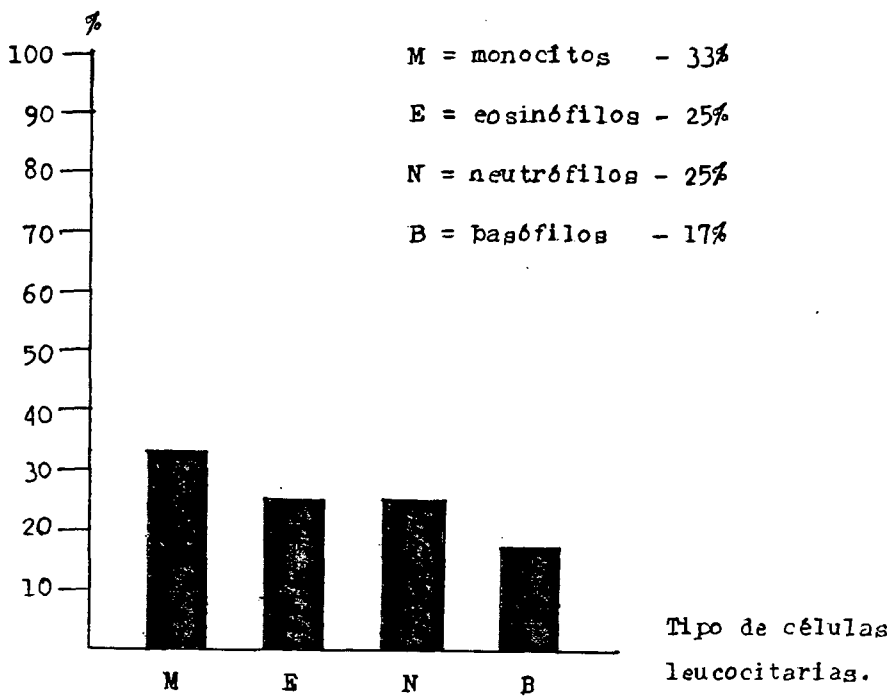
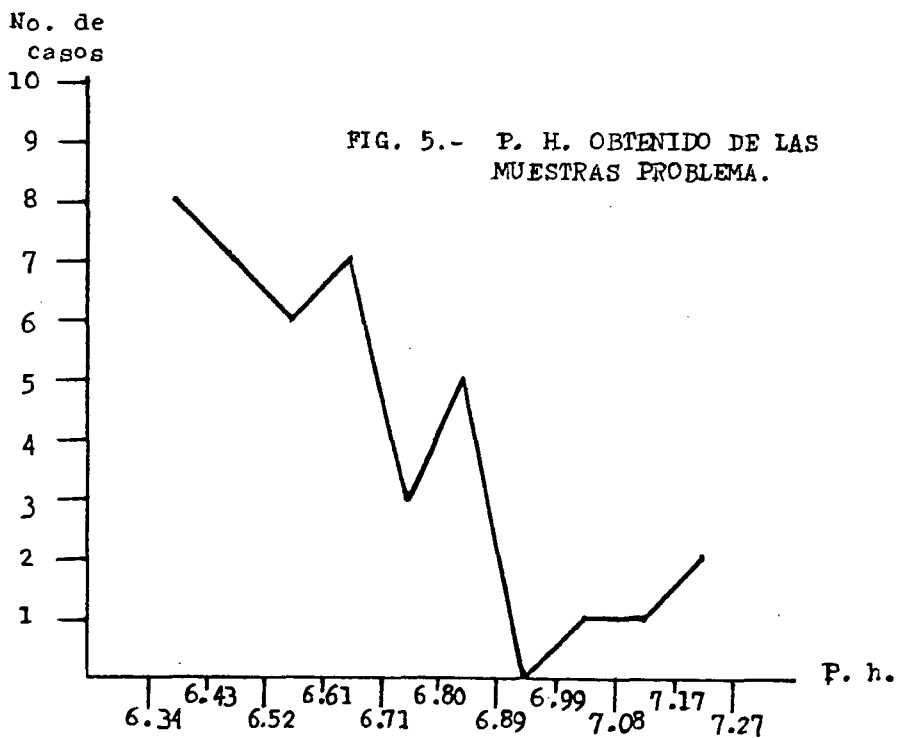
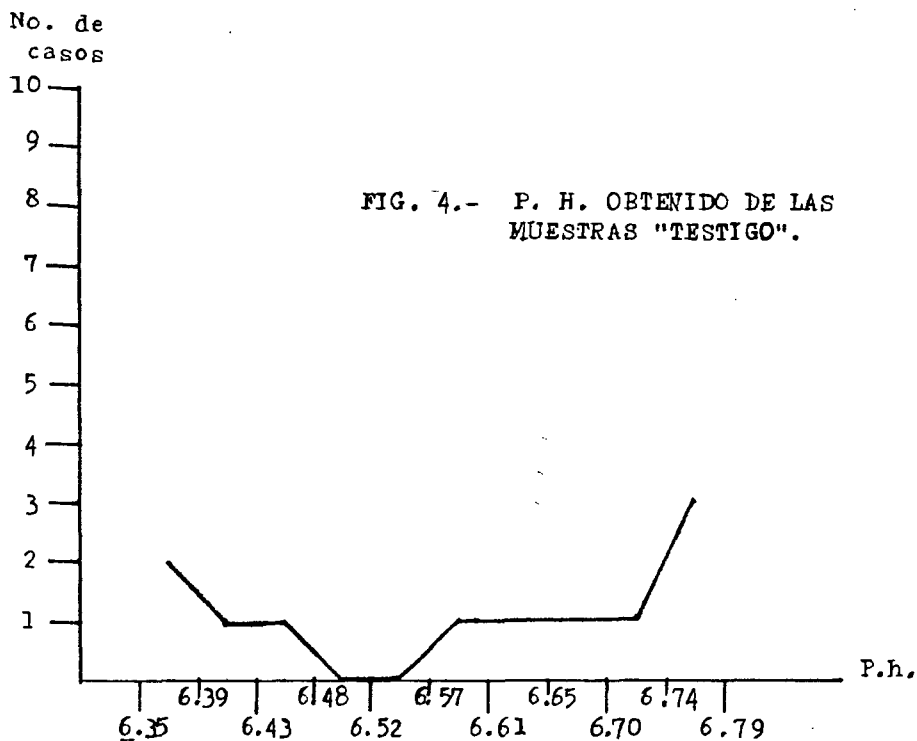


FIG. 3.- TIPO DE CELULAS LEUCOCITARIAS Y PORCENTAJE EN QUE FUERON EN CONTRADAS.



| TIPO DE BACTERIA.                          |       |
|--|-------|
| <u>Staphylococcus epidermidis.</u>         | 13.72 |
| <u>Corynebacterium pyógenes.</u>           | 9.80  |
| <u>Escherichia coli.</u>                   | 7.84  |
| <u>Corynebacterium hemoliticum.</u>        | 5.88  |
| <u>Enterobacter aglomerans.</u>            | 5,88  |
| <u>Staphylococcus intermedius.</u>         | 3.92  |
| <u>Salmonella paratyphi "a".</u>           | 3.92  |
| <u>Streptococcus uberis.</u>               | 1.96  |
| <u>Staphylococcus saprofiticus.</u>        | 1.96  |
| <u>Corynebacterium pseudotuberculosis.</u> | 1.96  |
| <u>Proteus mirábilis.</u>                  | 1.96  |
| Mustras negativas.                         | 41.2  |
| T O T A L :                                | 100.  |

Tabla No. 1.- Porcentaje de bacterias encontradas en las muestras procesadas.

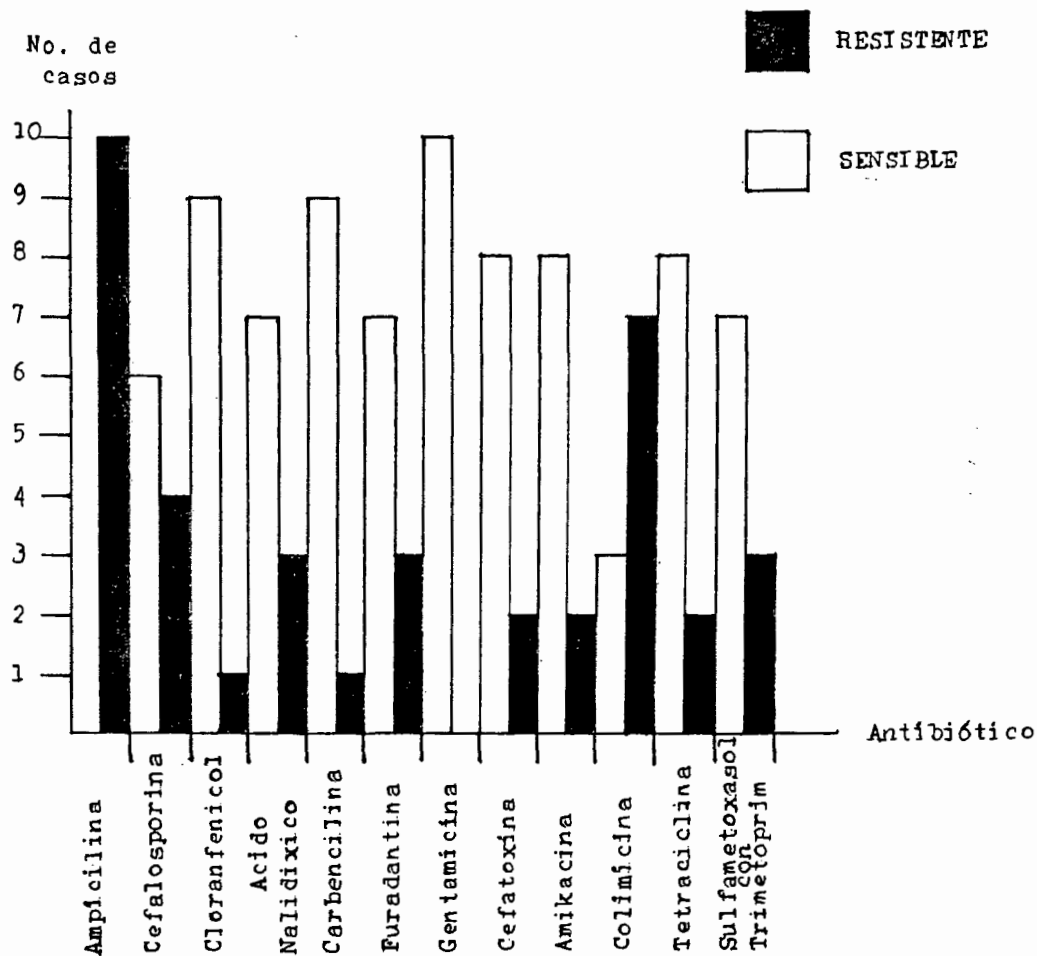


FIG. 6.- RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD HACIA DIFERENTES ANTIMICROBIANOS DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS AISLADAS.

No. de  
casos

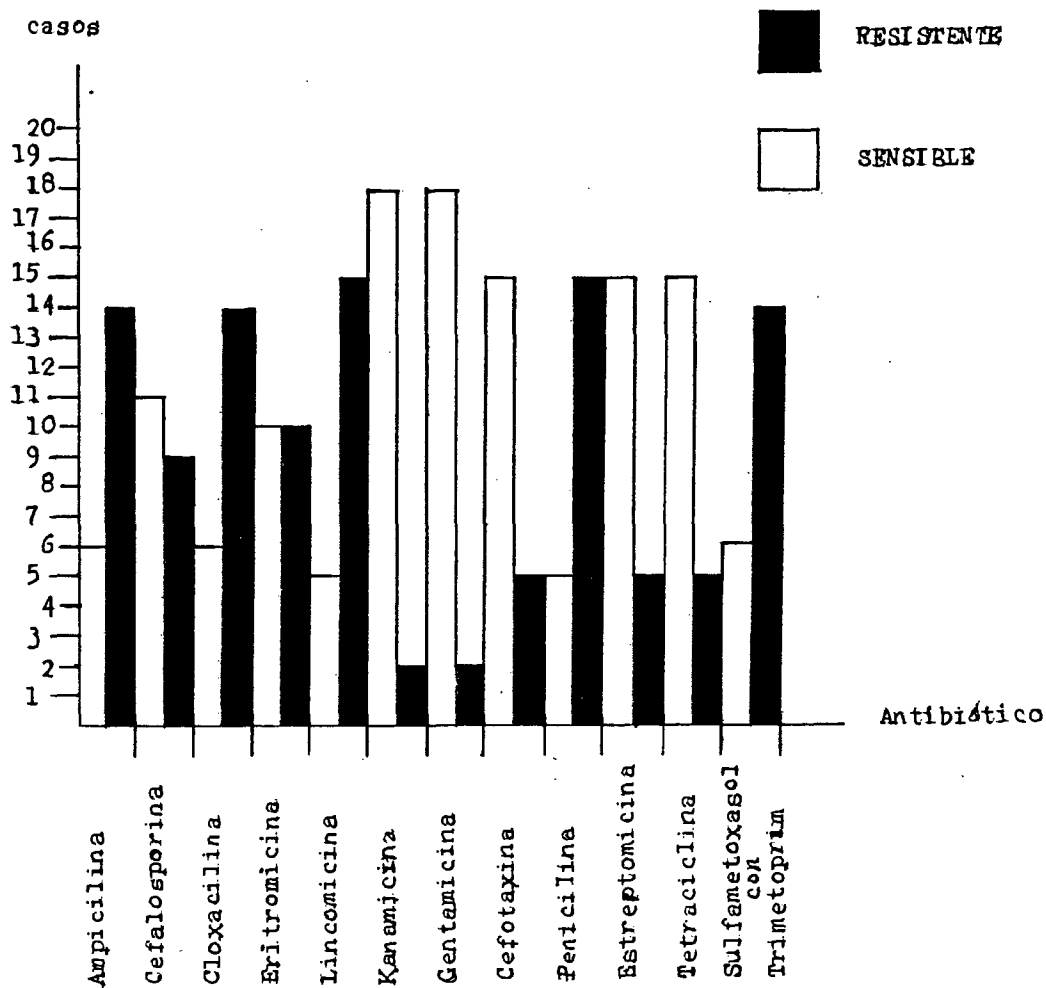


FIG. 7.- RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD  
HACIA DIFERENTES ANTIMICROBIANOS DE LAS  
BACTERIAS GRAM - POSITIVAS AISLADAS.

## DISCUSION

Analizando los resultados del presente estudio, se observó que, en el medio, el mayor índice de mastitis revelado por el uso de la prueba de California se encontró en animales - de 20. a 40. parto, en adelante se aprecia una disminución. El incremento de problemas mamarios a partir del 20. parto puede explicarse por el hecho de que la mayoría de las nuevas infecciones las contrae el animal durante el período seco y en el primer mes después del parto.

Durante el período seco no se le presta al animal la debida atención puesto que no está produciendo y la mastitis no es detectada; después del parto, dadas las características propias del calostro, la infección puede pasar desapercibida.

Debido a que la totalidad de los animales -- con excepción de 1 de 100. parto-- estaban comprendidos antes del 70 parto, no fué posible comprobar si en la edad avanzada de la vaca es más frecuente la presencia de mastitis como lo - señala la literatura.

El recuento leucocitario directo al microscopio, guarda estrecha relación con los valores aproximados establecidos en relación con las pruebas de campo al momento del ordeño utilizando el reactivo para la prueba de California.

La leche utilizada para la prueba, provenia de los primeros chorros antes que la vaca fuera ordeñada, ya que si se toman muestras al final del ordeño, el número de células se encuentra aumentado, lo que daría falsos positivos, restándole confiabilidad a la investigación.

Se encontraron 3 muestras con lecturas de 7'000,000, - 7'375,000 y 8'750,000 cel/ml., pertenecientes al mismo esta

-blo, los animales eran de 3o., 2o., y 1er. parto respectivamente. Posteriormente, al trabajar los antibiogramas, se descubrió que la cepa de mayor conteo era resistente a 7 de los 12 antibióticos contenidos en el sensidisco (aprox. al 58%); el intermedio presentó una resistencia a 11 antibióticos (91%) y el 3o., sólo presentó resistencia a 3 (25%)

Estas muestras tienen en común el ser resistentes a ampicilina, cloxacilina y penicilina, antibióticos de uso bastante frecuente si no los únicos usados por el momento para combatir la enfermedad en ese lugar.

Al realizar el recuento leucocitario, se tuvo que, el mayor porcentaje de células correspondió a los monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, en orden decreciente.

Ya que tanto los neutrófilos como los monocitos constituyen la primera línea de defensa del organismo contra alteraciones en el mismo, sobre todo procesos inflamatorios, es obvio que éstas células se encuentran en mayor número en el lugar de la lesión.

Los eosinófilos al igual que los basófilos abandonan el torrente circulatorio y, en diversos aspectos intervienen en situaciones de alarma y problemas de alergia. La literatura no menciona la frecuencia con que estas células son encontradas pero puede deducirse que, su número varía de acuerdo al grado de afección de los tejidos y al tiempo transcurrido desde su infección primaria hasta el momento de su estudio.

En lo que respecta al pH, según la bibliografía consultada, una leche sana, madura y recién ordeñada debe ser débilmente ácida, con un pH aproximado a 6.55. (10)

En las muestras testigo trabajadas, se presentaron variaciones diversas, las que fueron más notables en las anormales.



En el primer caso, tratándose de leches normales, las diferencias de lectura pudieron deberse al tipo que las muestras se mantuvieron en refrigeración antes de ser llevadas al laboratorio para ser analizadas. En el segundo caso, aparte de lo ya señalado, las muestras contenían células --- muertas, bacterias y demás desechos producidos en el sitio de la inflamación, lo que influyó de manera determinante en el ph.

Bacterias encontradas.- Varios autores señalan que las bacterias más frecuentemente encontradas en los procesos -- inflamatorios de las ubres en el ganado lechero son: Streptococcus y Staphylococcus, y que las demás bacterias desempeñan un papel secundario, no por ello de menos importancia. También pueden presentarse infecciones mixtas Staphylococcus y Streptococcus, con C. pyógenes, E. coli, Enterobacter, Klebsiella, Levaduras, Mycoplasmas, etc.

En los resultados obtenidos, el mayor porcentaje correspondió a Staphylococcus y Enterobacterias, seguidos por Corynebacterium y en menor porcentaje, Streptococcus. Se comprende que, debido a condiciones ambientales propias de la región, de manejo y procedencia de los animales, así como de las posibles interacciones que tengan lugar entre los microorganismos presentes, se creará una población bacteriana característica de la zona.

Asimismo, su reacción ante los antibióticos será diferente y tenemos que, las bacterias gram positivas estudiadas - en el presente trabajo, han desarrollado una marcada resistencia a ellos, lo mismo ha pasado con las gram negativas y ante estas cepas, antibióticos de amplio espectro como la - ampicilina y penicilina han dejado de ser confiables en el tratamiento de la mastitis.

Esto se debe principalmente a la poca información que el ganadero recibe en relación a esta enfermedad y al uso indiscriminado que hace de los antibióticos; la mayor parte de las veces sin administrar las dosis mínimas adecuadas, contribuyendo con esto a recrudecer más la enfermedad en su hato desechando más tarde los animales que, por haber perdido 2 ó más cuartos no es posible seguir manteniendo dentro del efectivo.

Los antibióticos contenidos en los sensidiscos, vienen en preparaciones médicas especiales para usarse en antibiogramas a nivel humano. Por carecer de las concentraciones adecuadas para uso veterinario, se utilizan solamente como marco de referencia y los resultados que arrojen no deben considerarse de manera alguna definitivos.

## CONCLUSIONES.

La mayor positividad a la prueba de California se encontró entre los animales de 2o y 3er. parto.

Se tuvo un mínimo de 1'325,000 células leucocitarias por  $\text{cm}^3$  de leche problema en un número elevado de muestras (53%) y un máximo de 8'750,000; el tipo de leucocitos que prevaleció fueron monocitos en un 33%.

El PH de las muestras testigo se mantuvo débilmente ácido entre 6.35 y 6.79; no así el de las muestras mamitosas el que presentó grandes variaciones clasificándose algunas de ellas dentro de la alcalinidad (7.27).

Entre las bacterias aisladas, el Staphylococcus epidermidis presentó el mayor porcentaje, encontrándose también Corynebacterium pyogenes, hemolyticum, Escherichia coli, y -- bacterias de las cuales se habla en la literatura pero no -- habían sido detectadas en la zona como Salmonella paratyphi "a" y Proteus mirabilis. Los Streptococcus representaron el mínimo porcentaje en este caso.

Los antibióticos a los que las bacterias aisladas presentaron mayor resistencia fueron: ampicilina (80%), penicilina y lincomicina (75%), colimicina y cloxacilina (70%).

Una mayor sensibilidad se observó hacia gentamicina (93%) kanamicina, cloranfenicol y carbencilina (90%), tetraciclina y amikacina (80%), cefatoxina (76%).

## SUMARIO

El presente trabajo se realizó en el municipio de Encarnación de Díaz, Jal. Se escogieron al azar 11 establos, en cada uno de ellos se practicó la prueba de California de la mastitis para detectar a los animales afectados por esta enfermedad de los cuales fué tomada una muestra y debidamente registrada guardada a baja temperatura. De cada establo se tomó una muestra testigo de leche sana.

Fueron muestreados un total de 51 animales de los cuales resultaron 30 positivos. (58.82% aprox.)

En el laboratorio se hizo la lectura del pH de cada muestra. Unos ml. fueron vaciados a tubos de ensaye y centrifugados a 6,000 r.p.m./5 min. Con el sedimento resultante se efectuaron frotis en portaobjetos y se tiñeron con colorante de Giemsa para el conteo directo al microscopio y cálculo del número de células por ml. de cada muestra.

Con el sobrenadante del sedimento se sembró en caldo nutritivo en tubo de ensaye incubando durante 24 hs. a 37°C, de aquí se pasó a sembrar en medio sólido en placa de Petri (gelosa sangre, verde brillante y mc. conkey) se incubaron luego a 37°C por 24 hs.

De las colonias que se observó crecimiento en gelosa sangre se hicieron tinciones de Gram para con ayuda del microscopio establecer por su morfología y tinción presentada, la bacteria presente en las colonias. De la misma colonia se resembró en caldo infusión cerebro-corazón con el fin de tener a mano un cultivo joven y vivo de las colonias, el caldo infusión cerebro-corazón fué incubado a 37°C durante 24 hs.

De las colonias con crecimiento en verde brillante y mc. conkey se tomaron para realizar pruebas bioquímicas e iden-

-tificar enterobacterias; los medios una vez inoculados se incubaron a 37° C por 24 horas, después de este tiempo se interpretaron los resultados y se clasificó el tipo de bacteria encontrado.

Posteriormente las bacterias encontradas fueron sometidas a la prueba de sensibilidad a los diferentes antibióticos. Para ello, con ayuda de un hisopo estéril se sembró en forma de estría sobre la superficie del medio agar Mueller-Hinton cubriendo su totalidad, sobre esta siembra se colocó después con pinzas estériles, el disco impregnado con los antibióticos presionando un poco para asegurar un perfecto contacto.

Se incubó 24 horas a 37° C al final de este tiempo se les dió lectura, interpretando los resultados como resistentes (R), o sensibles (S), según se encontró crecimiento o un halo de inhibición alrededor del antibiótico, respectivamente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) BIGAUX Diagnostica, s.a.  
Folleto instructivo para antibiogramas 1986.
- (2) D. A. G. I. (Departamento de agricultura, ganaderia e irrigación del Estado de Jalisco)  
Censo ganadero julio 1984 a febrero 1985.
- (3) DAVIS, Richard F.  
La vaca lechera 1964  
Editorial limusa  
Págs. 29, 30, 226.
- (4) ENSMINGER  
Producción bovina para leche 1971  
Editorial El Ateneo  
Págs. 287, 325, 357
- (5) BERGEN, William M; REAVES, Paul  
Ganado lechero, alimentación y administración. 1985  
Editorial Limusa  
Pág. 302
- (6) FERNANDEZ DE CORDOVA DE LA BARRERA, Luis; FLORES PATIÑO Enrique.  
Memorias VIII Congreso Nacional de Buiatria, Veracruz, Ver. Octubre 1982  
Tema: Ventajas económicas, rentabilidad y eficacia del programa de control de mastitis bovina por medio de la prueba de California (C. M. T.) en la cuenca lechera de Tizayuca, Hgo.  
Pág. 119

- (7) FOLEY, A. C.; BATH, D. L.  
El ganado lechero, principios, prácticas, problemas y beneficios. 1982  
Editorial Interamericana  
Págs. 358 - 360
- (8) GIL MUNGUIA, Herlinda (tesis)  
Prueba comparativa de efectividad de la California mastitis Test (C. M. T.) para diagnóstico de mastitis subclínica.  
Guadalajara, Jal. 1975  
Págs. 10, 13, 14.
- (9) G. R. Carter; CHARLES, C. Thomas  
Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinaria.  
Editorial Acribia, Zaragoza  
Págs. 24, 32, 34, 38 - 40, 42, 44, 80 - 84, 96, 100, 128, 143, 152, 159, 168, 222.
- (10) HEIDRICH, J. H.; RENK, W.  
Enfermedades de las glándulas mamarias en los animales domésticos. 1969  
Editorial Labor, S. A.  
Págs. 167, 169, 172, 209, 216, 224 - 226, 230, 231.
- (11) MARTINEZ ROMO, Emilio. (tesis)  
Pérdidas económicas por incidencia de mastitis subclínica en la zona lechera del Estado de Guanajuato.  
Guadalajara, Jal. 1980  
Págs. 4, 5.
- (12) MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A.  
Bacteriología y virología veterinarias 1975  
Editorial Acribia  
Págs. 222, 225, 228, 230, 248, 254, 263, 285, 286,  
291, 294.

290, 294, 304, 328, 348, 385, 437, 440, 443, 454, 472  
552, 557, 573, 574.

- (13) MEXICO GANADERO  
Organo oficial de la C. N. G.  
Octubre 1986  
No. 304.
- (14) MEXICO HOLSTEIN  
Vol. 16 No. 12 diciembre 1985  
Págs. 18-20
- (15) MEXICO HOLSTEIN  
Vol. 17 No. 7 julio 1986  
Págs. 12, 13, 40, 41, 50.
- (16) MEXICO HOLSTEIN  
Vol. 17 No. 8 agosto 1986  
Págs. 42, 45, 46, 48, 49.
- (17) ORGANIZACION EDITORIAL MEXICANA  
Publicación quincenal El sol del campo.  
No. 95 octubre 1982
- (18) S. A. R. E. (Secretaría de agricultura y recursos hid-  
ráulicos)  
Distrito No. 11 Lagos de Moreno, Jal.  
Censo ganadero. Encarnación de Díaz, Jal.  
1er. trimestre 1987
- (19) SCHMIDT, G. H.; VAN VLECK, L. D.  
Bases científicas de la producción lechera. 1974  
Editorial Acribia  
Pág. 164.
- (20) SMITH, Hilton A. ; JONES, Thomas Carlyle



Patología veterinaria 1962

Editorial Uteha

Págs. 923, 924

- (21) S. P. P. / I. N. E. G. I. (Secretaría de programación y presupuesto - instituto nacional de estadística, - geografía e informática)  
Dirección regional occidente  
Aspectos fisiográficos del municipio de Encarnación de Díaz, Jal. 1984.
- (22) TORRES MENDEZ, Alvaro. (tesis)  
Estudio teórico económico de las pérdidas por manejo defectuoso en hatos lecheros.  
Guadalajara, Jal. 1983
- (23) UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.  
Facultad de medicina veterinaria y zootecnia  
Departamento de microbiología  
Manual de prácticas de bacteriología  
Prácticas 5, 7, 15, 18.
- (24) WYETH VALES de México, S. A.  
Boletín informativo. Síntesis de investigación clínica.  
Mastitis y heridas del pezón. 1982
- (25) WYETH VALES de México, S. A.  
Boletín informativo. Síntesis de investigación clínica.  
Importancia económica de la mastitis. 1982