

ETIOLOGIA MICROBIANA DE LAS MASTITIS BOVINA EN TAMBOS DE LA CUENCA LECHERA SANTAFESINA

Dr. Lorenzo A. Romano*
Dr. Pedro E. Weidman*
Dra. María A. Tessi**

I. INTRODUCCION

La mastitis bovina constituye mundialmente uno de los problemas de mayor relevancia económica que afecta los sectores estrechamente relacionados con la producción, industrialización y consumo de la leche. (3, 6, 13, 14, 17, 30).

En la cuenca lechera santafesina, según lo reportado por Borano y otros (27), las pérdidas de producción por mastitis se elevaron a 29, 86% para tambos con ordeño mecánico y 10,70% para tambos con ordeño manual. Esto fue el resultado de combinar el recuento celular indirecto mediante el Test de California (CMT) con el examen clínico post-ordeño para detectar lesiones fibrósicas del parénquima mamario (36).

Considerando como positivos los grados 2 y 3 del test de referencia, el 49,53% de todos los cuartos mamarios analizados tuvieron esa reacción. (35,19% para el ordeño manual y 52,84% para el ordeño mecánico).

Atendiendo la alta incidencia de mastitis se planteó la necesidad de desarrollar las pautas de un eficiente plan de control.

El conocimiento de la flora bacteriana actuante y su comportamiento ante los productos antimicrobianos utilizados, era imprescindible.

Con respecto a los microorganismos aislados de mastitis bovina, es generalmente reconocido que un elevado porcentaje de las mismas, son producidas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae* (22, 25, 31). Actualmente *S. aureus* es uno de los gérmenes más frecuentemente identificados (10, 12, 24, 26, 31), posiblemente debido al incremento de cepas resistentes a los antibióticos.

Referente a *Pseudomona aeruginosa*, ha aumentado en estos últimos años el número de cepas aisladas, como consecuencia del uso de sales cuaternarias de amonio, a las cuales son resistentes, a la falta de higiene en los equipos de ordeño.

* Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNL Esperanza.Santa Fe.Argentina
** Instituto de Tecnología de Alimentos. UNL. Santa Fe.Argentina

deño (22, 38) y además por el uso de aguas contaminadas con las citadas bacterias (7, 26, 35).

II. MATERIAL Y METODOS

II-1 Toma de muestras: Desde octubre de 1977 a setiembre de 1978, tomados al azar, se sometieron a la prueba de CMT, 1672 vacas Holando Argentino en producción de 40 tambo del área central de la cuenca lechera santafesina, así discriminados: 12 con ordeño manual y 28 con ordeño mecánico. Habiéndose respetado en el muestreo la proporción de los mismos elegida para el trabajo de relevamiento inicial (27). No se discriminaron los tipos de máquinas ordeñadoras empleadas y se examinaron solamente las vacas entre el 15° y 240° día de lactancia (cuadro Nº 1).

CUADRO Nº 1

Características de los tambo muestreados

Tambo		Nº de vacas		Muestras de leche
Tipo		En ordeño (*)	Muestreadas	Nº
Manual	12	353	46	96
Mecánico	28	1319	132	224
Total	40	1672	178	320

(*) Números de vacas en ordeño en condiciones de muestreo.

En cada tambo, a no menos del 10% de cuartos mamarios CMT grados 2 y 3 se les tomó una muestra de leche una vez concluido el ordeño, según la siguiente secuencia:

- 1) Lavado de la ubre con agua limpia.
- 2) Desinfección con hipoclorito de sodio al 0,5 %.
- 3) Secado con paño estéril.
- 4) Desinfección de los pezones con alcohol 96°.
- 5) Secado de los pezones con paño estéril (extremo especialmente).
- 6) Recolección de un solo chorro por cuarto y por tubo (10cc aproximadamente).

Se recogieron las muestras en tubos estériles con tapa de rosca de 30cc de capacidad, sin azida de sodio y con azida de sodio adicionadas de púrpura de acuerdo a Florret (25).

Se transportaron todas las muestras refrigeradas con hielo y se procesaron dentro de las 8 horas de su recolección.

II-2: Determinaciones microbiológicas: Cada muestra de leche se sembró directamente y luego de incubada a 37°C, 24 hs., en media placa agarizada de los siguientes medios de cultivo: triptefina base adicionada de esculina, hierro y sangre bovina desfibrinada estéril, al 5%; Fosina-Azul de Etileno (ME) Cetrimida y Sabouraud. Se incubaron los cultivos a 37°C, 24-48 hs., y en casos negativos se prolongó la incubación 72 hs., debido a que el género *Corynebacterium* suele tener desarrollo lento en algunas especies patógenas.

Las colonias aisladas de las placas de agar sangre-esculina-hierro, previa observación de las características microscópicas, tipo de hemólisis, hidrólisis de la esculina, etc., se repicaron en caldo de infusión de cerebro-corazón, y se incubaron a 37°C, 24 hs.

Para la identificación de los gérmenes aislados se procedió como se indica a continuación:

a) *Streptococcus agalactiae, dysgalactiae* y *uberis*. Se efectuó el test de CAMP (25). Se prepararon placas de agar triptefina base, adicionadas de esculina, hierro y sangre ovina estéril, y también placas agarizadas con el medio Edwards conteniendo sangre ovina. Se sembraron las mismas diametralmente con

una cepa hemolítica de *S. aureus*, enviada gentilmente por el Dr. Plommet (INRA) Mouzilly, Francia). Después se sembraron las cepas de estreptococos a estudiar en forma perpendicular al estafilococo, desde la periferia al centro de la placa, sin tocar la estría central del mismo. Las placas se incubaron a 37°C, durante 24-48 horas en atmósfera de anhídrido carbónico.

Se clasificaron los estreptococos en base a la prueba de CAMP, es decir a la hemólisis típica cuneiforme, a la hidrólisis de la esculina, tipo de hemólisis de la cepa en estudio y formación de pigmentos. Luego se completó la identificación con la hidrólisis del hipurato y pruebas de fermentación de carbohidratos (5).

b) Staphylococcus aureus. Se realizó el test de la coagulasa libre, con plasma de conejo al EDTA de Difco (34). Con las cepas coagulasa positivas, se estudió la fermentación anaerobia de la glucosa (2); ~~ác. oxalacético~~ pirruvato (34); ~~ác. succínico~~ succinato con los medios TDA (19) y STN (20) y hemólisis en sangre ovina estéril (25).

c) Corynebacterium ~~pyogenes~~, hemolyticus y bovis. Se estudiaron las corinebacterias reconocidas como agentes etiológicos de mastitis bovina de acuerdo a Bergey (5).

d) Bacilos Gram positivos esporulados aerobios. Se identificaron mediante pruebas morfológicas bioquímicas y fisiológicas (5).

e) Bacilos Gram negativos. Las colonias aisladas de las placas de agar-esculina-hierro, IMB y Cetrinida, fueron identificadas previamente por la reacción de la oxidasa de Kovacs (16) y de acuerdo a la misma, se orientó la identificación hacia las enterobacterias o Pseudomonas.

Ps. aeruginosa. A las cepas oxidasa positivas se las sembró en los medios de King A y B, Hugh-Leifson (C-F) y se hizo el test de la temperatura a 41°C (16). Se identificaron también las citadas bacterias, por la producción de pirocininas, empleando una serie de cepas indicadoras de *Ps. aeruginosa*, enviadas gentilmente por el Dr. Govan, J.E.W. (University of Edinburgh, Scotland).

Enterobacterias. Se estudiaron según Edwards y Ewing (11).

f) Levaduras y hongos. Las colonias aisladas de las placas de agar sangre y de Sabouraud se identificaron según Lodder (21) y Ainsworth y Sussman (1).

II-3: Pruebas de sensibilidad a los antibióticos y sulfaridas: Se empleó el método de difusión en agar, utilizando discos aislados o multidiscosgeras Britania. Se procedió de acuerdo a Joseph (12). Se ensayaron los siguientes compuestos antimicrobianos: penicilina (10 u. ox.); estreptomicina (10_{mg}); cloranfenicol (30_{mg}); tetraciclina (30_{mg}); eritromicina (15_{mg}); kanamomicina (15_{mg}); reticilina (15_{mg}); dicloxacilina (30_{mg}); lincolicina (10_{mg}); TMS (25_{mg}); ~~ác. oxalacético~~ oxonílico (25_{mg}); gentamicina (10_{mg}); fosfomicina (50_{mg}); colistinina (10_{mg}); neomicina (30_{mg}); parameomicina (30_{mg}); sisomicina (10_{mg}); furoxona (300_{mg}); carbenicilina (50_{mg}) y rifampicina (30_{mg}).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro N° 2, se indican los microorganismos identificados en 320 muestras de leche de cuartos mamarios, alcanzando *S. aureus* el valor más elevado (54,10%), corroborando los resultados obtenidos por numerosos autores (10, 12, 24, 28, 31).

En segundo término se identificó *Str.agalactiae* (23,43%). Los restantes microorganismos se identificaron en menor número aunque se destaca *Pseudomonas aeruginosa* (13,12%).

No se detectó ninguna mastitis aséptica, debido a que de todas las muestras se aislaron microorganismos involucrados en la enfermedad.

Debe aclararse que en el período abarcado por el presente trabajo las condiciones climáticas fueron realmente excepcionales sobre todo referido a la abundancia de lluvias, (precipitación media anual. 925 mm - Precipitación durante el período de ensayo: 1674 mm).

Un elevado porcentaje del total de las muestras (84%), estaban contaminadas con bacilos esporulados aerobios, generalmente hemolíticos. Esto probablemente se

origina en la falta de higiene durante el proceso de ordeño. Vaes (37), Davies y Wilkinson (8), comprobaron que la parte externa de la ubre de la vaca, era una importante fuente de contaminación con esas bacterias. En el cuadro N° 3 se detallan las especies aisladas, siendo las más frecuentes *B. coagulans*, *B. polymyxa* y *E. sphaericus*. Aunque su rol como agente etiológico de mastitis es aún discutido (24) los mismos representan un peligro para la industria láctea, particularmente por el elevado porcentaje de *Bacillus coagulans* identificado (59, 18%). De acuerdo a Davies (9), el 100% de esas bacterias aisladas de leche, sobreviven a un calentamiento de 100°C durante 30 minutos.

Con respecto a las variaciones estacionales de las bacterias patógenas más comúnmente identificadas, *S. aureus* y *Ps. aeruginosa*, experimentaron un marcado aumento en su número durante el período otoño-invierno, siendo muy frecuentes las asociaciones de estas bacterias. En cambio, *Str. agalactiae* no acusó mayores variaciones. (cuadro N°4).

En el cuadro N° 5 se detalla la sensibilidad a los antibióticos y sulfamidas en cepas de *S. aureus* y *Str. agalactiae*, manifestándose alta para la gran mayoría de los antimicrobianos empleados, notándose muy poca variación estacional.

Por el contrario y de acuerdo a lo mostrado en el cuadro N° 6, *Ps. aeruginosa* reveló baja sensibilidad a la gran mayoría de los antimicrobianos empleados y con variación estacional en alguno de ellos.

A los efectos de estudiar el comportamiento de *Ps. aeruginosa* en distintos tipos de establecimientos, se separaron estos en dos categorías, de acuerdo al cuadro N° 7.

Como era lógico suponer en los tambos donde se utilizaron antimicrobianos en forma masiva e indiscriminada, la resistencia de esta bacteria se vió incrementada, con la única excepción de Sisomicina.

Algunas propiedades bioquímicas relacionadas con la patogenicidad de los esta filococos (coagulasa, hemólisis y B hemólisis), se muestran en el cuadro N° 8. Estos resultados coinciden con las determinaciones realizadas por Tessi y col. (33), trabajando con cepas aisladas de leche cruda del "pool" de los mismos tambos del presente trabajo. Es interesante destacar que en esas muestras de leche, contrariamente a lo esperado, se registró un bajo número de estafilococos coagulasa positivos, no obstante haberse identificado un porcentaje tan considerable de estas bacterias en las muestras de cuartos mararios.

IV. CONCLUSIONES.

- 1) Las especies bacterianas actuantes no difieren de las descritas en la bibliografía mundial, y varían estacionalmente. No se detectó ningún caso de mastitis aséptica.
- 2) La carga bacteriana manifiesta una alta incidencia relativa de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- 3) *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* muestran una alta sensibilidad a los antimicrobianos de uso corriente.
- 4) La baja sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a los distintos antimicrobianos plantea un serio problema profiláctico, agravándose la situación en los tambos con uso indiscriminado de aquellos.
- 5) La alta contaminación con *Bacillus* sp. representa un grave inconveniente desde el punto de vista del procesamiento industrial.

RESUMEN

Durante los años 1977-1978, se revisaron 1672 vacas Holando Argentino pertenecientes a 40 tambos del área central de la cuenca lechera santafesina.

Se estudiaron 320 muestras de cuartos mararios, grados 2 y 3 al Test de California.

Los agentes etiológicos más frecuentemente identificados fueron: *Staphylococcus aureus* (54,10%); *Streptococcus* (23,43%) y *Pseudomonas aeruginosa* (13,12%).

Con respecto a las variaciones estacionales en la proporción de las citadas -

bacterias, se registró un incremento en el período otoño-invierno, en relación a primavera-verano de *S. aureus* (42,1% a 60%) y de *Ps. Aeruginosa* (3,75% a 22,50%); en cambio *Str. agalactiae* no experimentó variaciones apreciables (26,88% a 20%).

La sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* fue alta, y de *Pseudomonas aeruginosa* fue baja, frente a los antibióticos y sulfamidas utilizados.

Además se comprobó una gran contaminación de las muestras con bacilos esporulados aerobios, siendo los más frecuentes: *Bacillus coagulans* (59,18%); *E. polymyxa* (20,19%) y *F. Sphaericus* (9,53%).

* * *

CUADRO Nº 2

Agentes etiológicos de mastitis bovina subclínica aislados de 320 muestras de cuartos mamarios (*)

Microorganismos	Muestras		
	Nº	%	
<u>Staphylococcus aureus</u>	141	44,10	54,10% <u>S. aureus</u>
<u>S. aureus + Ps. aeruginosa</u>	32	10,00	
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	10	3,12	13,12% <u>Ps. aerug.</u>
<u>Streptococcus agalactiae</u>	75	23,43	
<u>uberis</u>	0	2,81	32,17% <u>Strepto-</u> <u>coccus</u>
" <u>dysgalactiae</u>	6	1,87	
<u>Streptococcus sp.</u>	13	4,06	
<u>Bacillus cereus</u>	3	2,50	
<u>Corynebacterium pyogenes</u>	6	1,87	
" <u>bovis</u>	3	2,50	
<u>Escherichia coli</u>	9	2,81	
<u>Aspergillus sp.</u>	3	0,93	
Total de muestras examinadas	320	100,00	

(*) Muestras contaminadas con Bacillus sp.: 64%

CUADRO Nº 4

Variaciones estacionales de los agentes etiológicos más frecuentes de mastitis
bovina subclínica.

Microorganismos	Primavera-Verano (1)		Otoño-Invierno (2)	
	Nº	%	Nº	%
<u>Staphylococcus aureus</u>	77	48,13	64	40,00
<u>S. aureus + Ps. aeruginosa</u>			32	20,00
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	6	3,75	4	2,50
<u>Streptococcus acalactiae</u>	43	26,88	32	20,00
" <u>ukeris</u>	4	2,50	5	3,13
" <u>dysgalactiae</u>	3	1,87	3	1,87
<u>Streptococcus sp.</u>	7	4,37	6	3,75
Total de muestras examinadas	160		160	
Total de muestras positivas	160	100,00	160	100,00
Muestras contaminadas con <u>Bacillus sp.</u>	80,00		88,00	

(1) Primavera-Verano: 1 de Octubre - 31 de Marzo

(2) Otoño-Invierno: 1 de Abril - 30 de Setiembre.

CUADRO N° 5

Sensibilidad a los antimicrobianos de varias cepas de *S. aureus* y de
Str. agalactiae

Estación	Primavera-Verano		Otoño-invierno	
	<i>S.aureus</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.agalactiae</i>
Bacterias				
N° de cepas	52	30	52	30
Antimicrobiano	Sensibilidad (%)			
Penicilina	80,70	86,77	78,85	87,00
Estreptomina	84,60	90,00	82,69	75,00
Cloranfenicol	92,31	93,34	94,23	96,10
Tetraciclina	92,31	93,34	94,23	95,50
Eritromicina	92,31	93,34	94,23	96,00
TSF	92,31	90,00	94,18	90,00
Kaneamicina	94,26	96,67	96,15	91,00
Cleandomicina	92,31	93,34	90,38	94,10
Meticilina	69,24	73,34	42,08	69,00
Dicloxacilina	79,63	73,34	65,38	68,00
Lincamicina	80,77	80,00	76,15	90,00

CUADRO N° 6

Comparación de la sensibilidad a los antimicrobianos en cepas de
Ps. aeruginosa

Cepas estudiadas N°	Primavera - Verano	Otoño - Invierno
	88	110
Antimicrobiano	%	%
Rifampicina	23,86	54,54
Cloranfenicol	28,82	0,00
Ac. oxonílico	34,09	45,45
Kaneamicina	29,40	36,36
Centamicina	88,63	77,27
Fosfomicina	47,72	59,09
Colistina	59,09	81,81
Neomicina	70,45	50,00
Pararomicina	23,85	0,00
Fisomicina	97,72	90,90
Furazona	29,54	13,63

CUADRO N° 7

Sensibilidad a los antibióticos y sulfamidas de 88 cepas de Ps. aeruginosa
aisladas en leche, durante la Primavera = Verano, 1977-1978

Cepas estudiadas	Tambos tipo I (*)		Tambos tipo II (**)		Total
	Nº	%	Nº	%	
	26		62		88
Antimicrobiano	Sensibilidad				
	Nº	%	Nº	%	%
Pifampicina	21	80,76	0	0,00	23,86
Cloranfenicol	22	84,61	0	0,00	28,82
Ac. oxonílico	23	88,46	7	11,29	34,09
Kaneandomicina	25	96,15	0	0,00	28,40
Centamicina	26	100,00	52	83,87	88,63
Fosfomicina	23	88,46	19	30,64	47,72
Colistina	23	88,46	29	46,77	59,09
Neomicina	23	88,46	39	62,90	70,45
Paranomicina	21	80,76	0	0,00	23,86
Sisomicina	24	92,30	62	100,00	97,72
Furaxona	20	76,92	6	9,67	29,54
Carbencilina	20	76,92	7	11,29	30,68

(*) Con poco o nulo empleo de antimicrobianos

(**) Con empleo prolongado de varios antimicrobianos.

* * *