



OCURRENCIA DE PATÓGENOS INTRAMAMARIOS AISLADOS SOBRE MUESTRAS DE LECHE, DE CASOS BOVINOS REMITIDAS AL LABORATORIO, Y PERFIL DE SENSIBILIDAD SOBRE LAS CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y STREPTOCOCCUS UBERIS.

Hirigoyen, D. ;Laport. A¹.; Abelenda, C¹ y Constantín, M.¹

¹ Funcionarios de COLAVECO, www.colaveco.com. / Nueva Helvecia, Dpto de Colonia, Uruguay

SUMMARY

This paper is a longitudinal retrospective epidemiological study of an universe of bacteria isolates from cow's milk samples with clinical and subclinical mastitis, those had been sent to the laboratory COLAVECO, over a period of 6 years, from 2008 to 2013. The prevalence of infectious agents on environmental agrees with previous surveys done in the Uruguay. Staphylococcus aureus and Streptococcus uberis, were screened for their susceptibility to some antimicrobial agents by the disk diffusion method in agar (ADDM) under the criteria of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). S.aureus and Str. uberis, showed a profile of resistance to penicillin from 36% and 35%, respectively.

RESUMEN

Se presenta un estudio epidemiológico retrospectivo longitudinal de bacterias aisladas de muestras de leche de vaca con mastitis clínica y subclínica, que fueron enviados al laboratorio COLAVECO, en un periodo de 6 años, de 2008 a 2013. El predominio de los agentes contagiosos sobre los ambientales coincide con trabajos anteriores efectuados en el Uruguay. Fueron analizados en su susceptibilidad ante algunos agentes antimicrobianos mediante el método de disco difusión en agar (MDDA) bajo criterios del National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Se encuentra en el grupo de Staphylococcus aureus y Streptococcus uberis, un perfil de resistencia contra Penicilina de un 36% y 35%, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

En el Uruguay existen varios estudios de la prevalencia de bacterias causantes de mastitis que vienen desde la década de los 70', hasta nuestros días. (1, 2, 3, 4,5) El aumento del número de las resistencias a los antimicrobianos es creciente y generalizada, por

lo que exige una monitorización con vigilancia constante, que puede llevarse a cabo coleccionando los aislamientos de microorganismos de casos con mastitis clínica o subclínica y realizando estudios de sensibilidad en los laboratorios (6). Por esta razón, se considera importante dar a conocer a los veterinarios de campo, estos resultados obtenidos en COLAVECO, para un adecuado y responsable manejo de los antimicrobianos contra mastitis en la práctica de campo.

OBJETIVOS

El presente trabajo intenta comunicar un estudio epidemiológico retrospectivo longitudinal, sobre un universo de aislamientos bacterianos efectuados de muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica, remitidas al laboratorio en un periodo de 6 años, desde 2008 a 2013. Se presenta la evaluación de la actividad in vitro de un grupo seleccionado de antimicrobianos contra cepas de S. aureus y Str. Uberis aisladas de muestras provenientes de casos de campo.

MATERIALES

El universo estuvo constituido por 3353 muestras de leche obtenida de vacas con mastitis clínica y subclínica, provenientes de múltiples rebaños lecheros provenientes de 9 Dpto. de la región Sur del Uruguay. Las muestras fueron extraídas por el veterinario responsable del estado sanitario de cada establecimiento, o el propietario de los animales, y enviadas refrigeradas con fines de diagnóstico; así como también para verificar la eficacia del tratamiento y en la menor parte de los casos antes de instaurarlo. Se recibieron en promedio 95 envíos por año integrados por recolecciones (aproximadamente 6 muestras) tomadas asépticamente de cuartos mamarios individuales en tubos estériles con tapa rosca de 15 ml de capacidad, proporcionados por el laboratorio COLAVECO, siguiendo las recomendaciones del National Mastitis Council, USA (NMC) (7). Las variables analizadas fueron:

tipo de microorganismos aislados y resistencia a antimicrobianos de dos agentes (*S. aureus* y *Str. uberis*).

Aislamiento e identificación:

Para el aislamiento e identificación de los patógenos mamarios se siguieron recomendaciones y criterios de NMC (7), empleando agar sangre ovino con 0.1% Esculina. La identificación de *Staphylococcus* spp. se basó en sus propiedades morfológicas, hemolíticas y pruebas de la coagulasa (7). La identificación de los estreptococos mamarios (*Str. agalactia*, *Str. dysgalactia* y *Str. uberis*) se basó en las propiedades morfológicas, hemolíticas y bioquímicas, incluyendo el test de CAMP (8). Para la identificación de las bacterias coliformes y el resto de los agentes se siguieron criterios del NMC (7).

Evaluación de la sensibilidad bacteriana:

Para la determinación de la sensibilidad se utilizó el método de disco de difusión en agar (MDDA) y criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (8); donde cada cepa bacteriana de *S. aureus* y *Str. uberis* se sembró en caldo nutritivo e incubó a 37 °C por 24 horas. Los medios usados fueron Agar Muller Hinton (Difco laboratorios), donde se aplicaron los discos de antibióticos. Estas placas se incubaron invertidas a 37°C por 24 horas, luego de lo cual se procedió a la medición de las zonas de inhibición de crecimiento. Para el caso de *Str. uberis* se utilizó el mismo medio agar Muller Hinton, más 5% de sangre ovina. Los siguientes discos de antibióticos (Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, Maryland, EUA) fueron ensayados: Ampicilina(10 µg), Penicilina(10 µg), Tetraciclina (30µg), Trimetoprima + sulfa (25 µg), Rifampin (5 µg), Oxacilin (1 µg), Cefalotin (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Eritromicina (15 µg) y Amoxicilina +Clavulanico (20/10ug). Para la asignación de categorías; sensible o resistente, se consideró los puntos de corte recomendados en las normas del NCCLS (8), donde las cepas con sensibilidad intermedia fueron incluidas en la categoría de resistentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **tabla 1** muestra la distribución anual de muestras que arriban al laboratorio que oscila en un promedio de 559 muestras/año para el periodo en estudio.

Tabla 1: Distribución de muestras de leche de cuartos mamarios recibidas por año en COLAVECO (total 3353)

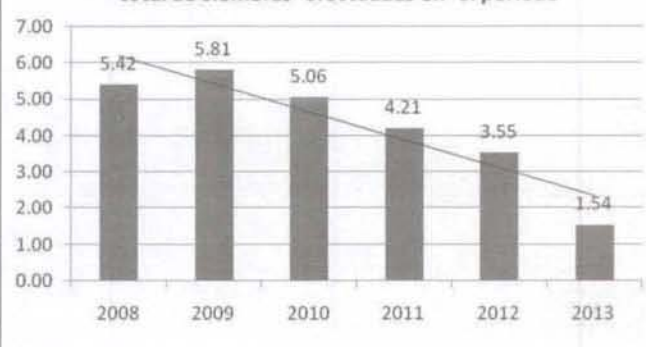
	2008	2009	2010	2011	2012	2013
AÑOS	8	9	0	1	2	3
SUB-TOTAL MUESTRAS	498	430	652	475	700	598

En la **tabla 2**, se presentan los niveles de crecimientos de patógenos intramamarios por placa. De la misma se advierte que en los últimos años hubo un aumento de las muestras con 1 solo agente. Esta mayor frecuencia podría reflejar una mejora en los procedimientos de recolección de las muestras, por parte de los remitentes, dado que también se percibe en la gráfica 1, una disminución en el nivel de muestras contaminadas.

Tabla 2: Porcentaje de agentes por placa del total de siembras efectuadas por cada año

	2008	2009	2010	2011	2012	2013
% Muestras con 1 patógeno	61,2	52,8	52,5	54,9	89,7	91,0
% Muestras con 2 patógenos	6,8	12,1	14,0	9,7	10,0	8,9
% Muestras con 3 patógenos	0,4	0,0	0,2	0,6	0,1	0,2

Gráfica 1: % de muestras contaminadas sobre el total de siembras efectuadas en el periodo



En **tabla 3**, se muestra la frecuencia de aislamientos efectuados durante el periodo en estudio pudiéndose observar cuales son los agentes que más se recuperan de los cultivos.

De igual manera, se advierte un nivel significativo de no crecimiento de agentes en los cultivos sembrados que en promedio es 19%, cifra esta, que coincide con datos de la bibliografía internacional que plantea entre un 20 y 30%. (7).

En el universo de muestras trabajadas y de acuerdo con sus características de distribución e interacción con el pezón y su canal, se aprecia un predominio de los agentes clasificados como contagiosos, tal como lo han reportado otros autores en nuestro país. (1, 2, 3, 4,5)



Tabla 3: Frecuencia de agentes aislados sobre muestras de leche de cuartos mamarios recibidas por año en COLAVECO (total 3353)

Agentes	Porcentaje de aislamientos por año					Estadíst. Básica			
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Desv	Prom	Varianza
<i>Staphylococcus aureus</i>	29,52	30,23	32,21	24,00	20,39	26,42	4,40	27,13	19,37
<i>Corynebacterium bovis</i>	21,08	22,00	18,71	11,37	4,47	8,34	7,29	14,33	53,10
<i>Streptococcus uberis</i>	14,46	14,42	10,58	16,21	15,65	12,05	2,16	13,89	4,68
<i>Streptococcus dysgalactia</i>	7,83	5,81	13,19	12,42	5,78	6,18	3,40	8,54	11,56
<i>Escherichia coli</i>	1,41	1,63	1,84	4,00	6,97	2,31	2,14	3,03	4,00
Coliformes	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,17	0,17
Levadura	0,60	1,40	0,92	0,63	0,78	0,00	0,46	0,72	0,21
Klebsiella	0,20	0,00	0,46	0,00	0,52	0,15	0,22	0,22	0,05
<i>Staphylococcus coag. Neg.</i>	0,00	1,83	2,30	2,53	2,36	1,39	0,95	1,70	0,89
<i>Bacillus gram positivo</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,05	0,02	0,00
<i>Streptococcus agalactia</i>	0,00	0,00	0,00	4,21	9,73	23,80	9,40	6,29	88,29
<i>Pseudomonas</i>	0,00	0,00	0,00	0,84	0,13	0,61	0,37	0,26	0,14
<i>Micrococcus</i>	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,13	0,05	0,02
<i>Proteus spp.</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,05	0,02	0,00
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,15	0,31	0,16	0,10
<i>Prototheca spp.</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,05	0,02	0,00
Serratia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,06	0,03	0,00
Sin crecimiento	18,47	17,21	14,42	19,58	28,42	16,84	4,86	19,16	23,02
Muestra Contaminada	5,42	5,81	5,06	4,21	3,55	1,54	1,57	4,27	2,46

La tabla 4 muestra el perfil de los dos tipos de patógenos analizados en cada año, frente a la batería de antimicrobianos ensayados.

Tabla 4: %Sensibilidad de St. Aureus y Str. Uberis a diferentes antimicrobianos											
Estafilococo aureus	p	cf	ox	sxt	amc	ra	e	t	eno	am	
2008	63	100	100	100	100	100	98	99	n/r	100	
2009	54	100	100	100	99	100	n/r	100	97	n/r	
2010	63	100	100	100	100	100	99	n/r	100	100	
2011	64	100	100	100	100	100	99	n/r	n/r	n/r	
2012	70	100	99	100	99	98	95	100	n/r	n/r	
2013	71	100	100	100	99	100	98	95	n/r	n/r	
Streptococo uberis											
2008	63	100	100	100	100	100	98	99	n/r	100	
2009	54	100	100	100	99	100	n/r	100	97	n/r	
2010	63	100	100	100	100	100	99	n/r	100	100	
2011	64	100	100	100	100	100	99	n/r	n/r	n/r	
2012	70	100	99	100	99	98	95	100	n/r	n/r	
2013	75	100	n/r	100	100	99	99	98	n/r	n/r	

p= Penicilina; cf=Cefalotín; ox= Oxacilín; sxt= Trimetoprim+sulfá; am=Amoxicilina+clavulanico; ra=Rifampin; e= Entromicina; t=Tetraciclina; eno=Enrofloxacin; am= Ampicilina

CONCLUSIONES

Los Staphylococcus son las bacterias más frecuentemente aisladas en todo el período. Estos datos son coincidentes con trabajos iniciales efectuados en Uruguay desde la década del 70' (3, 5,6) en las cuencas tradicionales, hasta otros más recientes (1), o de la zona litoral oeste del Uruguay (4)

En este análisis la prevalencia de Str. agalactia aumenta en los últimos años, lo cual podría estar asociado a remisiones provenientes de predios lecheros que recién se crean y que poseen un número elevado de animales por establecimiento superior a la media nacional.

Del análisis se encuentra que la prevalencia de Str. Uberis está cobrando importancia como sucede en otros países de industria lechera desarrollada, seguramente en relación a los cambios de los sistemas productivos y a condiciones climáticas imperantes.

Del ensayo cualitativo efectuado MDDA sobre las cepas de S. aureus aisladas se presentó en promedio una resistencia a la Penicilina del 36%, tal como se evidencio en trabajos anteriores efectuados por otros autores (3) en nuestro país. En el caso del Str.uberis se encontró para el periodo en estudio un promedio del 35% de resistencia. Este último valor, debería ser tenido en cuenta por veterinarios prácticos y seguido con preocupación para futuros programas de control, dado que exhibe una disminución en la sensibilidad ya encontrada por Gianecchini en 2002, en estudios llevados a cabo en cepas recogidas en la cuenca lechera tradicional.

Se debe insistir que las remisiones de muestras al laboratorio, vengán indefectiblemente con una anamnesis que oriente al laboratorista, y que ayude a clasificar el tipo de mastitis del que se obtiene la muestra, a efectos de ajustar el procedimiento de siembra y poder efectuar posteriores análisis y estudios de asignación de los patógenos a los cuadros clínicos.

Los autores son conscientes que esta forma de comunicar resultados mediante estudios de casos acumulados, en contraposición con la forma programada de vigilancia activa, tiene la ventaja de ser menos costosa, pero en contraposición tiene la desventaja de no poder controlar el método de extracción. Al mismo tiempo, el procedimiento programado permite poder contar fácilmente con mayor cantidad de datos, que facilitan estudios epidemiológicos posteriores y mantienen informados a los veterinarios prácticos de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bouman, M.; Hirigoyen, D. y Berton, A. 1999. Análisis de resultados de 427 muestras remitidas para aislamiento de bacterias de mastitis y antibiograma. Jornadas de Salud de ubre. pp: 56-68. Nva. Helvecia, Uruguay.
- Del Baglivi, L. y col. 1976. Investigaciones sobre mastitis subclínica en rodeos lecheros del Uruguay. Veterinaria 12 (Vol.61): pp.69-77.
- Gianecchini E. Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. Acta vet. scand., Vol.43, pp.221-230.
- Herrera B. et al. 1982. Etiología de las mastitis subclínicas y estudio de la cuenca lechera de Tacuarembó. III Congreso Nacional de Veterinaria. Mdeo. Uruguay. pp. 495-505



- Laborde M. y col. 1981. Mastitis subclínica: etiología y distribución de la infección en cuartos mamarios de vacas ordeñadas manual y mecanizadamente, Veterinaria Vol.76:,pp.75-80,
- Muñoz, I. H. Vanaclocha y González, F. 2007. La importancia de las redes microbiológicas en el control de las resistencias bacterianas. RedMIVA. Rev Esp Quimioterap, Vol. 20 (Nº 2): pp.193-202.
- National Mastitis Council: Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. 1999.
- National Comitee for Clinical Laboratory Standards M31-A2. Vol. 22. Nº6. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Suceptibility Tests for Bacteria isolates from Animals; Second Edition.

VALORES DE INDICADORES METABÓLICOS SANGUÍNEOS EN VACAS LECHERAS DURANTE EL PERIODO DE TRANSICIÓN PRE Y POSPARTO Y PRIMER TERCIO DE LACTACIÓN

*Luana Edith Oliveira da Silva**, *Clarissa Strieder-Barboza*, *Catalina Wagemann*,
Fernando Wittwer³, *Mirela Noro*

FAMV, Universidade de Passo Fundo, Brasil. BR 285, São José, Passo Fundo/RS.* E-mail: luana0706@hotmail.com_ Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia. / Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pampa, Brasil.

RESUMEN

Objetivo. El objetivo del estudio fue establecer variaciones en los valores de indicadores del metabolismo energético-proteico y de lesión hepática en vacas lecheras durante el período de transición pre y posparto y primer tercio de lactación. Materiales y Métodos. Se analizaron los datos generados en los perfiles metabólicos de 2.663 vacas, realizados durante los años 2008 a 2011. Resultados y Conclusiones. Los indicadores presentaron variaciones durante el período de transición preparto hasta el 1er tercio de lactación, con valores más críticos posteriores al parto, a excepción de la globulinemia. Estos períodos son considerados decisivos para las vacas lecheras, motivo por el cual es fundamental monitorear su condición metabólica para el diagnóstico precoz de alteraciones.

SUMMARY

Objective. The aim of this study was to compare the values of blood markers of energy and protein metabolism and liver injury in dairy cows during the transition period and first third of lactation. Materials and methods. Metabolic profiles of 2.663 cows were obtained during the period 2008 - 2011 and analyzed. Results and conclusions. All the blood markers showed variations from the prepartum period until the 1st third of lactation, being more critical after

parturition, with the exception of globulinemia. These periods are considered critical to dairy cows, hence monitoring the metabolic status is essential for early diagnosis of metabolic imbalances.

INTRODUCCIÓN

La intensificación de la producción ha favorecido la presentación de desbalances metabólico-nutricionales en los rebaños lecheros (Westwood y col, 2003), los que en las vacas lecheras son más frecuentes desde el período de transición preparto hasta la 8ª semana posparto. Esta mayor susceptibilidad está asociada a la disminución en el consumo de materia seca y al incremento en la demanda energética para la producción láctea (Cucunubo et al, 2013). El diagnóstico del estado metabólico-nutricional puede ser realizado mediante la determinación de indicadores sanguíneos del metabolismo energético-proteico y la evaluación de lesión hepática (González et al, 2000). El objetivo del estudio fue comparar los valores de indicadores del metabolismo energético-proteico y de lesión hepática en vacas lecheras durante el período de transición pre y posparto y primer tercio de la lactación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos. Fueron utilizados los datos de perfiles metabólicos (PM) de vacas provenientes de la región de La Araucanía, Los Ríos y Los Lagos, Chile, que