

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINAY SU RESISTENCIA ANTE ALGUNOS ANTIBACTERIANOS

IDENTIFICATION OF BOVINE MASTITIS CAUSING BACTERIA AND ITS RESISTANCE TO SOME ANTIBACTERIALS

Anastasia Cruz Carillo¹

Carlos E. Estepa²

Jeimy J. Hernández Lizarazo³

Juan Pablo Sanabria Villate³

RESUMEN

La mastitis es una enfermedad común en los hatos lecheros, relacionada con pérdidas económicas importantes para el sector. Paralelamente, el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos ha sido una constante preocupación en la medicina humana y veterinaria. Este estudio, se hizo con el fin de identificar los agentes causales de mastitis clínica y subclínica y su estado de resistencia frente a algunos antimicrobianos, en hatos lecheros del municipio de Duitama, Boyacá. Se evaluaron 541 animales en producción, distribuidos en 25 fincas, 12 con ordeño mecánico y 13 con ordeño manual. Se tomaron muestras de leche de los cuartos positivos a mastitis clínica o subclínica para realizarles cultivo bacteriológico y antibiograma. Se encontró que las bacterias Gram positivas son la principal causa de mastitis

en la zona, siendo el agente causal de mastitis clínica y subclínica más frecuente, *Staphylococcus aureus* con porcentajes de 32 y 42%, respectivamente, seguido de otras especies de *Staphylococcus*. Con menor frecuencia *Streptococcus* sp. fue el agente causal para ambos tipos de mastitis. En cuanto al estado de resistencia, se observó sensibilidad relativa a la oxacilina, tetraciclina y estreptomycin por parte de agentes Gram positivos. Los resultados obtenidos en este estudio ratifican la importancia de conocer las características de la mastitis en cada zona, con el fin de establecer correctamente los tratamientos respectivos.

Palabras clave: Resistencia, mastitis clínica y subclínica, antibacterianos, bacterias

SUMMARY

Mastitis is a common condition in dairy herds, related to important economical losses for the sector. Additionally, the development of resistance to antimicrobians has been a constant preoccupation in human and veterinary medicine. This study was carried out to identify the causal agents of clinical and subclinical mastitis, and its state of resistance in the presence of some antimicrobial in dairy herds in Duitama (Boyacá). 541 animals were

¹ M.V. Esp. U.N. Docente de Planta, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, UPTC. Programa de Medicina Veterinaria-Zootecnia. Grupo GICIVET. anicata22@hotmail.com

² M.V. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Docente ocasional, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Programa de Medicina Veterinaria-Zootecnia.

³ M.V.Z. UPTC.

evaluated in production, distributed in 25 farms, 12 with mechanical milking, and 13 with manual milking. Milk samples were taken from the positive quarters of clinical or subclinical mastitis for bacteriological culture and an antibiogram. It was found that the gram positive bacteria are the main cause of mastitis in the area, being the *Staphylococcus aureus* the causal agent of the most frequent clinical and subclinical mastitis, with percentages between the 32 to 42% respectively. With less frequency, the *Streptococcus* sp. was the causal agent for both types of mastitis. As for the resistance state, we observed a relative sensibility to oxacinlin, vancomycin, tetracilin and streptomycin by the gram positive agents. The results obtained in this study ratify the importance of knowing the mastitis characteristics in each area in order to establish the right treatments.

Keys Words: Resistance, clinic mastitis, subclinic mastitis, antibiotics

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria, caracterizada por alteraciones físicas y químicas de la leche, representadas por el número de células somáticas de ésta, por la presencia de microorganismos y por alteraciones patológicas de la ubre. Ocurre como respuesta de los tejidos secretores a lesiones traumáticas, a sustancias irritantes o bien, a la presencia de toxinas producidas por microorganismos que han llegado a la ubre (Miller & Bartlett, 2004).

La mastitis subclínica, se caracteriza por la ausencia de signos de inflamación en la ubre y por la apariencia normal de la leche; sin embargo, los microorganismos y las células blancas de la leche (células somáticas), se encuentran elevados en gran número (Pérez, 2005). En la mastitis clínica, el cuarto infectado se inflama, hay dolor, edema, la leche tiene coágulos y grumos y se torna amarilla o rojiza por la presencia de sangre. En casos severos hay fiebre, decaimiento, pulso acelerado, pérdida de apetito y baja la producción (Guterbock *et al.* 1993).

A nivel mundial, se estima que el 10% de los casos de mastitis, corresponden a la forma clínica y cerca del 90% son del tipo subclínico. En algunos reportes nacionales, se indica que el microorganismo más común

causante de mastitis es el *Streptococcus agalactiae* (40%), seguido por *Staphylococcus aureus* (30 - 40%), *Streptococcus* ambiental con (5 - 10%) y coliformes (1%) (Cotrino, 2003; Ruiz *et al.* 2001).

En el municipio San Pedro de los Milagros (Antioquia) en 1999, se encontró una prevalencia de mastitis por cuarto de 12,3% y en el cultivo, las bacterias más frecuentes fueron *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus coagulasa* positiva y *S. aureus* con valores de 47%, 14,6% y 13%, respectivamente (Ramírez & Gaviria, 2001; Ruiz *et al.* 2001).

En el 2004, la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, en el municipio de Belén, aisló a partir de vacas diagnosticadas con mastitis 21,4% de *Streptococcus* como agente causal, siendo el *S. viridans* el microorganismo más común en vacas pertenecientes a explotaciones con ordeño mecánico. *Staphylococcus* sp. fue aislado en 14,2% de los casos y estando más frecuente en animales ordeñados de forma manual. Se aisló *S. aureus* solo en 7,1% de los casos, más frecuentemente en ordeño mecánico (Cely & Meneses, 2004).

Según el Dr. Germán Rodríguez, la Universidad de La Salle realizó un trabajo en el Alto Chicamocha (Boyacá), utilizando la prueba de California Mastitis Test (CMT), en época de lluvia y de sequía. En el verano muestrearon 3344 cuartos, de los que 50,5% fueron negativos, 16,82% fueron grado uno, 14,47% grado dos, 11,84% grado tres y, en grado 4, se encontraron 5,17%. El porcentaje de mastitis clínica fue 0,32% y los cuartos perdidos 0,92%.

Casos de resistencia de *S. cohnii* y *S. aureus* a antibióticos han sido detectados a nivel mundial. Razas de *S. aureus* con susceptibilidad reducida a glicopéptidos se reportan de Japón, Estados Unidos, Europa y Lejano Oriente (Tenover *et al.* 2001), mientras que Martínez & Mattar (2006), registran un caso de posible resistencia de *S. cohnii* a vancomicina.

Por otra parte, la resistencia es una mutación genética desarrollada por los agentes infecciosos con fines adaptativos, para resistir los efectos producidos por los fármacos ante los cuales son susceptibles. Los genes de resistencia pueden estar ubicados en el ADN de la bacteria o como ADN extranuclear (plásmido) y se transmiten de una bacteria a otra (Klement *et al.* 2005; San Martín *et al.* 2002).

El objetivo principal de este estudio fue el de conocer los agentes más frecuentes causantes de mastitis clínica y subclínica y su estado de resistencia a los antimicrobianos en los hatos lecheros de la zona de Duitama (Boyacá), para proporcionar a los Médicos Veterinarios de la zona, una herramienta para la elección del tratamiento de la mastitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio, se realizó en el municipio de Duitama, Boyacá, perteneciente a la región geográfica Andina, ubicado en el altiplano Cundiboyacense. Predomina el clima frío húmedo con terrenos ubicados entre los 2500 y 3000msnm; temperatura promedio 15°C, promedio de precipitación 1128mm; la humedad relativa 81,4% y la evaporación oscila entre 80,63mm y 99,53mm. Se encuentran explotaciones de ganadería de leche de tipo semi-intensivo e intensivo, manejan praderas de kikuyo y en algunos lugares lo combina con avena, alfalfa, ray grass y trébol.

Animales de Experimentación. Los animales que se tomaron para el muestreo fueron hembras bovinas en producción, de las razas Holstein, Normando y, en menor proporción, Jersey, Pardo Suizo y sus cruces. Se realizó el muestreo sin considerar edad, tiempo de producción o etapa de lactancia, la única condición fue estar en producción. En la mayoría de predios vermifugan una vez al año con albendazol, febendazol y triclobendazol; suplementan con sal mineralizada, calcio o productos vitamínicos y en casi todos vacunan contra aftosa y brucella.

La zona rural del municipio está conformada por 19 veredas, de las cuales diez fueron consideradas en este estudio, por corresponder a la parte sur del municipio, que es la zona con mayor actividad lechera. De acuerdo con la información suministrada por la Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA), el municipio cuenta con 5974 hembras bovinas, de las cuales 3952 son hembras mayores de tres años. Estos ejemplares, se encuentran ubicados en 38 predios, de los cuales se seleccionaron 25 al azar; el número de muestras, se obtuvo con la aplicación de la siguiente fórmula (Zapata, 2000):

$$n = \frac{N Z^2 S^2}{Z^2 S^2 + NE^2}$$

n = tamaño de la muestra; N = tamaño de la población; E = error máximo (0,05); S²=varianza de la población (0,25); Z = coeficiente de varianza (1,96).

De las 19 veredas tenidas en cuenta, diez se seleccionaron para este estudio, incluyendo solo los predios que tuvieran mínimo 19 hembras en producción. De las 25 explotaciones incluidas, 13 hatos cuentan con ordeño manual y 12 con ordeño mecánico (Tabla 1).

Toma y envío de muestras. El examen clínico de la ubre, la inspección de la leche y la toma de muestras, se realizó durante el ordeño de la mañana, respetando las rutinas de la finca. La prueba de CMT, se hizo como la describe la literatura (Sargeant *et al.* 2001). De cada cuarto afectado, se tomó una muestra en tubo de ensayo estéril, habiendo desechado previamente los primeros chorros. Cada muestra fue identificada, colocada en una cava de icopor con hielo e inmediatamente remitida al Centro de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Sogamoso, donde se realizaron las pruebas.

Pruebas microbiológicas. Para la identificación de microorganismos, las muestras de leche se cultivaron inicialmente en agar sangre en el que crecen gran cantidad de bacterias y en agar MacConkey, que se utiliza para identificación de microorganismos Gram negativos, especialmente esterobacterias (Granados & Villaverde, 2002). Cumplidas 24 horas de incubación, se procedió a hacer la lectura y solo cuando no hubo crecimiento bacteriano, las muestras se reincubaron y leyeron a las 48 horas. Posteriormente, se realizó la tinción de Gram para diferenciar bacterias Gram positivas y negativas.

Buscando diferenciar los *Streptococcus* de los *Staphylococcus*, se hizo la prueba de catalasa. Aquellos microorganismo que fueron catalasa positivos, se identificaron como *Staphylococcus* y los catalasa negativos como *Streptococcus*. Debido a la importancia que, de acuerdo con otros reportes, muestra el *S. aureus* como agente causante de mastitis (Revelli & Rodríguez, 2001; Valencia & Jurado, 2003), se hizo la prueba de coagulasa, para identificar esta bacteria, que resulta positiva a la

Tabla 1. Cantidad de vacas muestreadas y tipo de ordeño en los predios y veredas del municipio de Duitama, consideradas en el estudio.

VEREDA	PREDIO	IDENTIFICACIÓN FINCA	No. DE VACAS MUESTREADAS	TIPO DE ORDEÑO
San Lorenzo de Abajo	Fátima	A	19	Manual
	El Alcaparral	B	21	Manual
	La Chata	C	23	Manual
	Las Vegas	E	18	Manual
	El Porvenir	F	17	Manual
	Londres	H	20	Manual
	La Cabaña	J	24	Manual
Higueras	Las Manitas	D	35	Manual
	Santa María	L	28	Mecánico
	Santa Ana	M	17	Mecánico
	San Lorenzo	O	22	Mecánico
Agua tendida	Buyara	G	24	Mecánico
	La Esperanza	I	18	Mecánico
	Villa Constanza	Z	18	Mecánico
San Luís	San Fernando	K	26	Manual
	Santa Teresa	P	18	Manual
San Antonio norte	La Estación	N	19	Mecánico
Tocogua	La Ilusión	Ñ	17	Manual
Surba y Bonza	Versalles	R	22	Mecánico
	Casa Linda	S	24	Mecánico
Sirata	San Carlos	T	19	Manual
San Lorenzo de arriba	Silva Plazas	U	18	Manual
	Villa Rocío	Y	22	Mecánico
Quebrada de Becerras	El Rincón	V	20	Mecánico
	El Recuerdo	X	32	Mecánico

prueba. Aquellas muestras catalasa positivas y coagulasa negativas, se identificaron como *Staphylococcus* spp. (Granados & Villaverde, 2002; Perreten *et al.* 2005; Ruiz *et al.* 2001).

Las bacterias que crecieron en el agar MacConkey fueron sometidas a pruebas bioquímicas que permitieron identificarlas. Las bacterias lactofermentadoras son *Echerichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* y las no lactofermentadoras, *Salmonella* y *Shigella*. Se utilizó el agar triple azúcar hierro, para detectar la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa. La producción de H₂ por liberación de azufre determina la presencia de *Citrobacter*. Por otra parte, el agar de hierro lisina se utilizó para identificar la producción de las enzimas lisina descarboxilasa, lisina deaminasa y, eventualmente, la producción de H₂ s y gas. Esta prueba determina, por un cambio de pH, un viraje en el color, que se relaciona con la presencia de *E. coli*, *Klebsiella* sp. y *Citrobacter freundii*. Para confirmar la presencia de bacilos Gram negativos, se realizó la prueba en agar citrato.

La presencia o ausencia de flagelos en microorganismos, como *Corynebacterium*, no fermentadores Enterobacterias, *Pseudomonas*, *Brucella* y *Bordetella*, se comprobó en agar de motilidad. Para complementar la identificación de microorganismos, se utilizaron caldos de malonato, rojo de metileno y Voges Poskaue (enterobacterias) (Granados & Villaverde, 2002).

Una vez los diferentes microorganismos fueron identificados, se seleccionaron cuatro colonias para ser transferidas a caldo nutritivo, Mueller Hinton o de triplicasa de soya, utilizados para hacer, posteriormente, el antibiograma. La incubación, se hizo a 37°C por dos a seis horas, con el fin de conseguir la turbidez del tubo 0,5 de la escala de MacFarland. El inóculo tomado de dichos cultivos, fue sembrado en rejilla para pasados cinco minutos, ponerlo en contacto con los sensidiscos de amoxicilina (25mcg), cefalexina (30mcg), gentamicina (10mcg), oxitetraciclina (30mcg), trimetropim sulfa (25mcg), cefaperazona (30mcg), cloxacilina (5mcg), oxacilina (10mcg), eritromicina (15mcg), penicilina G potásica (10mcg), estreptomycin (10mcg), ampicilina (10mcg) y tetraciclina (30mcg). La distancia entre cada uno fue de 24mm. Pasadas 24 horas, se procedió a hacer la lectura, midiendo el diámetro de la zona de completa inhibición del crecimiento. Cuando en diámetro de inhibición superaba 14mm, se interpretaba como sensibilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 25 fincas evaluadas se encontró que en 12 de ellas se usaban ordeño mecánico y en 13 ordeño manual. El total de animales muestreados fue 541 (2164 cuartos), de los cuales 147 fueron positivos a mastitis subclínica en uno o más de sus cuartos (Tabla 2), con un total de 1965 cuartos positivos. De manera similar a como se

Tabla 2. Número de cuartos positivos o negativos a mastitis clínica y subclínica y número de cuartos perdidos.

CLASIFICACIÓN DE LA LESIÓN	NÚMERO DE CUARTOS	PORCENTAJE (%)
Negativo	1965	90,81
Mastitis subclínica grado 1	65	3,0
Mastitis subclínica grado 2	61	2,8
Mastitis subclínica grado 3	45	2,07
Mastitis subclínica grado 4	15	0,69
Mastitis clínica	6	0,27
Cuarto perdido	7	0,32
TOTAL	2164	100

observa en los estudios adelantados en Paipa, Belén, Sotaquirá, Duitama y Santa Rosa, la presentación de mastitis clínica y de cuartos perdidos en este estudio, fue baja, llegando solo a 0,27% (6 cuartos) y 0,32% (7 cuartos), respectivamente, valor que corresponde a 6 animales de los 541 muestreados (Cely & Meneses, 2004; Rodríguez & Moreno, 2005). A pesar de la importancia que representa esta situación en una producción lechera, cinco predios es un valor mínimo, teniendo en cuenta que las explotaciones incluidas en este estudio no son altamente tecnificadas.

El total de cuartos positivos a CMT, en alguno de sus grados, fue de 192 cuartos representando 8.87% de los muestreados, lo que no coincide con los estudios realizados por Rodríguez & Moreno (2005) y Cely & Meneses (2004), en los que superaron el 45%. Se podría pensar que en Duitama no existe una elevada presencia de mastitis en comparación con los demás municipios del cordón lechero de Boyacá, hecho que se puede atribuir a la situación sociocultural del municipio, pues su desarrollo facilita la adquisición de insumos para control y tratamiento de la enfermedad y la capacitación del personal a cargo de la rutina de ordeño. A pesar de que se encontraron solo 2,77% de los cuartos con mastitis subclínica grado tres o cuatro, se resalta la necesidad de controlar esos casos para evitar su evolución a mastitis clínica (Guterbock *et al.* 1993).

En lo referente al aislamiento bacteriano, de las 192 muestras cultivadas solo en 76 (39,5%) se observó crecimiento bacteriano, por lo que 116 muestras (60,4%) resultaron negativas a la identificación bacteriana. Estos hallazgos fueron similares a lo reportado en el municipio Belén donde hubo crecimiento bacteriano en 44,1% de las muestras positivas a CMT. Basados en los diferentes estudios realizados a nivel mundial, se puede considerar que la mastitis es causada principalmente por bacterias Gram positivas, seguida de microorganismos Gram negativos (Revelli & Rodríguez, 2001). Los estudios indican que entre 87% y 95% de las mastitis son causadas por bacterias Gram positivas y el porcentaje restante por Gram negativas, así mismo, que la mastitis subclínica es más frecuente (60-90%) que la mastitis clínica (Ávila *et al.* 2002; Revelli & Rodríguez, 2001; Ruiz *et al.* 2001; Valencia & Jurado, 2003). En varios estudios realizados en diferentes países, las dos bacterias más importantes para mastitis han sido *Streptococcus* y *Staphylococcus*

y con menor incidencia *E. coli*, aunque se reportan bacterias emergentes como el *Corynebacterium* sp. (Faría *et al.* 2005; Tenhagen *et al.* 2006).

En este trabajo, con una tendencia similar a la encontrada por Valencia & Jurado, (2003) y por Rivelli & Rodríguez (2001), el microorganismo más frecuente fue *S. aureus*, que es uno de los agentes etiológicos de la mastitis contagiosa más comunes. En el altiplano cundiboyacense, 60% de los casos positivos a mastitis, corresponden a *S. aureus*, seguidos por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. y coliformes; sin embargo, en otros estudios, hubo mayor frecuencia de *Streptococcus* sp., seguido de *Staphylococcus* sp. (Cely & Meneses, 2004; Rodríguez & Moreno, 2005; Cotrino, 2001). En varios países, se muestra que la mastitis causada por microorganismos contagiosos disminuye año a año, pero aumenta la causada por otros agentes (Pitkälä *et al.* 2004).

En los cuartos muestreados en este trabajo, se aisló *S. aureus* para mastitis clínica en 32% de los casos y para subclínica en 41% de ellos (Tabla 3). Igualmente, esta bacteria se aisló en mayor proporción en animales manejados con ordeño mecánico, coincidiendo con los datos registrados por Cely & Meneses (2004). Este resultado es esperable debido a que esta bacteria tiene como reservorio principal la glándula mamaria, permitiendo que las pezoneras sean el medio de transmisión, cuando no son correctamente desinfectadas. Aunque en este estudio no se incluyó el análisis de la rutina de ordeño en los predios, se sabe que la mayor incidencia de bacterias contagiosas se encuentra cuando no se usan selladores de pezón después de cada ordeño (Galton, 2004).

Staphylococcus sp. fue encontrado con mayor frecuencia en los casos de mastitis subclínica (29%) que en los de la forma clínica de la enfermedad (17%). Sin embargo, mostró la misma prevalencia que el *Streptococcus* sp. causando mastitis clínica. Esta tendencia de presentación fue similar a lo reportado en los estudios en San Pedro de los Milagros, Antioquia (Ramírez & Gaviria, 2001). En el presente trabajo, el microorganismo se aisló con mayor frecuencia en explotaciones con ordeño manual, lo que puede atribuirse a las manos del ordeñador y a las inadecuadas condiciones de higiene en instalaciones y rutina de ordeño (Tabla 3).

Tabla 3. Prevalencia de microorganismos de acuerdo con el tipo de ordeño.

AGENTE ETIOLÓGICO	ORDEÑO MECÁNICO		ORDEÑO MANUAL	
	No muestras	Porcentaje %	No muestras	Porcentaje %
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	56	19	35,8
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	0	15	28
<i>Streptococcus sp.</i>	8	35	16	30
<i>Escherichia coli</i>	1	4	0	-
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	4	2	4
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	1	1,8
TOTAL	23	100	53	100

Streptococcus sp., en frecuencia, fue la segunda bacteria causante de mastitis. Se aisló en 26% y 17% de los casos de mastitis subclínica y clínica, respectivamente (Tabla 3). Fue mayor en ordeño mecánico que en el manual y puede ser atribuida a lesiones en los pezones o a la capacidad que tiene de infectar la ubre de las terneras, permaneciendo indefinidamente en su glándula mamaria (Pitkälä *et al.* 2004).

Las bacterias Gram negativas presentaron menor porcentaje en los aislamientos, destacándose *K. ozaenae* en 17% de las mastitis clínicas y en 3% de las subclínicas, teniendo igual porcentaje en los dos tipos de ordeño. En varios trabajos, se encuentra que esta bacteria no es frecuentemente aislada, aunque en algunos países es la más importante (Cely & Meneses, 2004; San Martín *et al.* 2002). A pesar de que en varios países del mundo se ha reportado *E. coli* y *Klebsiella* como unas de las bacterias que con más frecuencia produce mastitis clínica, en los reportes realizados en Colombia, incluyendo el presente trabajo, la incidencia es baja a pesar de ser una bacteria que habita comúnmente el medio ambiente (Guterbock *et al.* 1993). En este estudio, se aisló *Citrobacter freundii* (una muestra de mastitis subclínica en ordeño manual), el cual no se reporta en ninguno de los estudios nacionales referenciados.

En cuanto al estado de resistencia encontrado en este estudio, las bacterias Gram positivas presentaron diferentes grados de resistencia ante los antimicrobianos evaluados, que ordenada de forma decreciente fue, estreptomomicina (74%), oxacilina (50%), penicilina G potásica (42%), tetraciclina (33.8%), eritromicina (30.6%), cloxacilina (26.4%) y ampicilina (24%); mientras que para los microorganismos gram negativos fueron trimetropim sulfa (60%), cefalexina (46%), amoxicilina (40%), y con 28,5% cefaperazona, oxitetraciclina y gentamicina (Tabla 4).

Del total de muestras se aislaron 30 para *S. aureus*, presentando mayor resistencia a la estreptomomicina y oxacilina con 83,3% (25/30) y 60%(18/30), respectivamente. *Streptococcus sp.* mostró 73,6% (14/19) de resistencia a estreptomomicina, a tetraciclina 63.1% (12/19), a penicilina G potásica 63.1% (12/19) y *Staphylococcus sp.*, 41% (9/22) a oxacilina (Tabla 4). La penicilina G sódica y la oxacilina tienen alta eficacia contra gérmenes gram positivos, en tanto que solo las bacterias Gram negativas y *Staphylococcus* son sensibles a la estreptomomicina. Por tal razón, *Streptococcus sp.* en forma natural es resistente a este antibiótico (Cottrino, 2003; Cué & Morejón, 1998).

Por otra parte, *Staphylococcus sp.* mostró 41% de resistencia frente a la oxacilina, de manera diferente a

Tabla 4. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de las bacterias gram positivas aisladas.

AGENTE ETIOLÓGICO	Ob	Ox	E	S	Te	P	Am
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,6	60	33,3	83,3	30	36,6	16,6
<i>Streptococcus</i> sp.	21	36	31,5	73,6	63,1	63,1	21
<i>Staphylococcus</i> sp.	27,2	41	13,6	31,8	0	18,1	13,6

Ob = cloxacilina; Ox= oxacilina; E= eritromicina; Te= tetraciclina; P= penicilina G potásica; Am= ampicilina

lo reportado en San Pedro de los Milagros, donde se encontró una sensibilidad de 100% (Ramírez & Gaviria, 2001). Esto demuestra una vez más, que los estados de resistencia varían de una zona a otra y dependen de la presión de selección ejercida por frecuente uso de antibacterianos.

En razón a que muchos de los antimastóticos comercializados en Colombia contienen aminoglicósidos, en este estudio se quiso demostrar el poco efecto de este antibiótico sobre *Streptococcus*, así como la alta resistencia que adquieren los *Staphylococcus*. Es de resaltar que los aminoglicósidos son altamente eficaces contra Gram negativos y poco efectivos contra gérmenes Gram positivos. Tal como se esperaba, se obtuvo un grado de resistencia de estas bacterias equivalente a 74%.

Corroborando lo anterior, se encontró alta resistencia del *S. aureus* a estreptomina, siendo ésta un tipo de resistencia natural más que adquirida. Hubo resistencia a oxacilina, 60% de manera similar a otros estudios (Tenhagen *et al.* 2006; Rabello *et al.* 2005).

Únicamente, la *Klebsiella ozaenae* presentó un 66,6% de resistencia a trimetropim sulfa, gentamicina y ampicilina; el *C. freundii* y *E. coli* presentaron sensibilidad a oxitetraciclina, cefalexina, cefaperazona, amoxicilina, gentamicina y en especial a trimetropim sulfa; a pesar de que la cefalexina no es indicada para este tipo de bacterias, en este estudio las pocas muestras aisladas no presentaron resistencia (Tabla 5). Estos resultados fueron a similares los reportados por San Martín *et al.* (2002).

Tabla 5. Porcentaje de resistencia antimicrobiana de las bacterias gram negativas aisladas.

AGENTE ETIOLÓGICO	ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS PARA ANTIBIOGRAMA					
	Aml	Sxt	Cl	Cfp	Ot	Gm
<i>Klebsiella ozaenae</i>	66,6	66,6	10	33,3	33,3	66,6
<i>Citrobacter freundii</i>	33,3	0	0	33,3	0	33,3
<i>Escherichia coli</i>	33,3	0	33,3	33,3	0	0

Aml= amoxicilina; Sxt= trimetoprim-sulfa; Cl= cefalexina; Cfp= cefoperazona; Ot= oxitetraciclina; Gm gentamicina

La cloxacilina y amoxicilina aparecieron para el tratamiento de mastitis en el 2002 según la ONU para la Agricultura y Alimentación presentando una sensibilidad del 100%; no obstante en la investigación la cloxacilina y amoxicilina presentaron cierto grado de resistencia. Para amoxicilina es un resultado esperado pues es un antibiótico sensible a la beta lactamasa, pero en el caso de cloxacilina genera alarma porque este antibacteriano se considera resistente a la enzima, lo que lleva a pensar que se han generado nuevos mecanismo de resistencia y corrobora la presencia de diferentes tipos de enzimas (Pitkälä *et al.* 2004).

CONCLUSIONES

Se puede indicar que la mastitis clínica presenta baja prevalencia en la zona estudiada y que fue superada notoriamente por los casos encontrados de mastitis subclínica. Por otra parte y en razón a que en el presente estudio no se tuvo en cuenta la etapa de lactancia, el tiempo de producción ni la edad de la hembras muestreadas, se encontraron falsos positivos con el CMT, lo cual no alteró los resultados, debido a que la presencia de bacterias en dichas muestras se corroboró con los cultivos bacteriológicos. Es así como sin ser el CMT una prueba 100% confiable, constituye una herramienta importante por costos y facilidad de aplicación, para el control de esta enfermedad en las explotaciones, con una sensibilidad de aproximadamente el 50% (Sargeant *et al.* 2001).

Con una tendencia muy similar a otros estudios desarrollados en Colombia y Sur América, se observó que las mastitis en la zona estudiada, son en su mayoría causadas por microorganismos gram positivos (93%) y muy poco por gram negativos. Se puede indicar que en el municipio de Duitama, *Staphylococcus sp.* y especialmente *S aureus* es la bacteria causante de mastitis, seguida por *Streptococcus sp.* y con baja prevalencia por las bacterias Gram negativas.

Considerando que las bacterias Gram positivas, especialmente *S. aureus* y *Streptococcus sp.*, mostraron alta resistencia (73,6%-83,3%) a la estreptomina y que fueron éstas las principales bacterias causantes de mastitis en el municipio de Duitama, este antibacteriano no debería ser considerado en la terapéutica de esta patología en la zona. Muchos de los medicamentos antimastíticos que se comercializan en Colombia incluyen la asociación penicilinas – aminoglicósidos, lo cual, basados en los

resultados de este estudio, es una elección inadecuada. Es importante recordar que el uso de antibacterianos ineficaces para ciertos microorganismos propicia el desarrollo de resistencia.

Es de resaltar que hubo un grado relativamente alto de resistencia a la oxacilina por parte de los microorganismos Gram positivos, principalmente de *S. aureus*. Este hallazgo es importante en razón a que el antibacteriano es específico contra agentes Gram positivos y es resistente a ciertos tipos de beta-lactamasa. Sin embargo, las bacterias generan diferentes tipos de resistencia y logran sintetizar varios tipos de enzimas capaces de inactivar los fármacos. Este tipo es un ejemplo claro de resistencia adquirida que ha llevado a que un fármaco, que de forma natural era eficaz, con el tiempo pierda su capacidad antibacteriana.

Las penicilinas naturales, la eritromicina y la cefalexina, aunque son antibacterianos de alta eficacia contra bacterias Gram positivas, el desarrollo de resistencia ha llevado a que su eficacia se vaya perdiendo. Es así como esto se considera importante, en razón a que estos tres antibacterianos son de primera elección en el manejo de mastitis en nuestro medio.

RECOMENDACIONES

Se enfatiza en la necesidad de conocer los conceptos epidemiológicos básicos de las enfermedades infecciosas en cada zona del país, así como el estado de resistencia de los agentes causales ante los fármacos utilizados, buscando aplicar la terapia farmacológica de primera elección y minimizar el riesgo de desarrollo de resistencia. La resistencia aumenta año tras año, por lo cual es necesario repetir este tipo de estudios periódicamente, para determinar la evolución de ésta y los cambios que puedan ocurrir en cuanto a los agentes etiológicos de la mastitis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo dan sinceros agradecimientos al Dr. Darío Vaca, entonces director del Centro de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) Duitama y a Rocío Socha, Bacterióloga del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁVILA, T.S.; GUTIÉRREZ, C.A.S.; SÁNCHEZ, G.J. 2002. Comparación del estado de salud de la ubre y calidad sanitaria de la leche en vacas ordeñadas manual y mecánicamente. *Veterinaria México*. 33 (4):134-138. Disponible desde Internet en <http://scielo-mx.bus.br/scielo.php> (con acceso 08/12/06).
- CELY, M.; MENESES, R. 2004. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en casos de mastitis subclínica en hatos lecheros en el municipio de Belén. Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tunja, Boyacá. 85p.
- COTRINO, V. 2001. Diagnóstico y tratamiento de la mastitis. Memorias de la Ponencia en el Congreso Panamericano de la Calidad de la Leche y la Mastitis. Bogotá. p.64-67.
- COTRINO, V. 2003. Diagnóstico de mastitis. Disponible desde Internet en: www.imvltda.com/programas/ar16.html (con acceso 20/02/06).
- CUÉ, M.B.; MOREJÓN G.M. 1998. Antibacterinos de acción sistémica. Parte II. Otros grupos de antibióticos". *Rev Cubana Med Gen Integr*. 14(4):362-373.
- FARÍA, J.F.R.; VALERO-LEAL, K.; D`POOL, G.; GARCÍA, U.A.; CAGNASSO, M.A. 2005. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos de algunos patógenos mastitogénicos aislados de leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito. *Rev. Cient. (Venezuela)*.15(3):1103-1106.
- GALTON, D.M. 2004. Effects of an automatic postmilk-ing teat dipping system on new intramammary infections and iodine in milk. *J. Dairy Sci*. 87:225-231.
- GRANADOS, P.R.; VILLAVERDE, P.M.C.. 2002. *Microbiología* 2 ed. Vol. II: "Bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. *Micología general*. Parasitología general. Cap. 1, 4, 8. Paraninfo, Thomson Learning. México. p.24-45; 65-67; 90-93.
- GÜTERBOCK, W.; EENENNAAM, R.; ANDERSON, J. 1993. Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical mastitis caused by environmental pathogens. *J. Dairy Sci*. 76(11):3437-3439.
- KLEMENT, E.; CHAFFER, M.; LEITNER, G.; SHWIMMER, A.; FRIEDMAN, S.; SARAN, A. Y. SHPIGEL, N. 2005. Assessment of accuracy of disk diffusion tests for the determination of antimicrobial susceptibility of common bovine mastitis pathogens: a novel approach. *Microbial Drug Res*. 11(4):342-350.
- MARTÍNEZ, P.; MATTAR, S. 2006. Posible aislamiento clínico de *Staphylococcus cohnii* resistente a vancomicina. *Infecto*. 10(3)175-177.
- MILLER, G.; BARTLETT, P. 2004. Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *J. Am.Vet. Med. Assoc*. 198(2):227-231.
- PÉREZ, R. 2005. La Mastitis un enemigo de la rentabilidad. Memorias de la Ponencia en el Seminario Nacional de Actualización en Sanidad y Producción Bovina, organizado por la Gobernación de Cundinamarca, Bogotá-Colombia. p.23-27.
- PERRETEEN, V.; VORLET, F.; SLICKEERS, P.; EHRLICH, R.; KUHNERT, P.; FREY, J. 2005. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram positive bacteria. *J. Clin. Microb*. 43 (5):2291-2302
- PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci*. 87:2433-2441.
- RABELLO; R.F.; SOUZA, C.R.; DUARTE, R.S.; LOPES, R.M.; TEIXEIRA L.M.; CASTRO, A.C. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro Brazil. *J. Dairy Sci*. 88 (9):3211-3219.

- RAMÍREZ, N.; GAVIRIA, G. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio San Pedro de los Milagros. Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 4(1):76-79.
- REVELLI, G.; RODRÍGUEZ, C. 2001. Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina en la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. Respuesta a la sensibilidad antimicrobiana. Rev. Electrónica de Veterinaria. 4(23):56-58.
- RODRÍGUEZ, G.; MORENO, F. 2005. Evaluación y caracterización de la calidad sanitaria e higiénica de la leche producida en la región del Alto Chicamocha, departamento de Boyacá. Proyecto de investigación en trámite de publicación. Información suministrada por los autores.
- RUIZ, J.D.; RAMÍREZ, N.F.; ARROYAVE, O. 2001. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros. Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 14 (2):143 –154.
- SAN MARTIN, B.; KRUIZE, J.; MORALES, M.A.; AGÜERO, H.; LEÓN, B.; ESPINOZA, S.; IRAGÜEN, M.V.; PUGA J. BORIE, C. 2002. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y Xª Región, Chile. Arch. Med. Vet. (Chile). 34(2):102-105
- SARGEANT, J.M.; LESLIE, K.E.; SHIRLEY J.E. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. J. Dairy Sci. 84:2018-2024.
- TENHAGEN, B.A.; KOSTER, G.; WALLMAN, J.; HEUWIESER, W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89(7):2542-2551.
- TTENOVER, F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER, M.V. 2001. Increase resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 7:327-332.
- VALENCIA, H.; JURADO, F. 2003. Aislamiento e identificación de microorganismos causantes de mastitis subclínica y su sensibilidad a antibacterianos, en hatos lecheros del sur occidente de Pasto. Rev. Col. Cienc. Pec. 16. Suplemento No. 16: 16-22.
- ZAPATA, E. 2000. Investigación de Mercado. Tunja: IDEAD Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 98p.

Recibido: Octubre 2 de 2006

Aceptado: Marzo 5 de 2007