

Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay

Bovine mastitis, distribution of pathogens and antimicrobial resistance in the Southern Dairy Basin of Uruguay

Giannechini, R^{1,4*}, Concha C², Delucci I³, Gil J⁵, Salvarrey L⁶, Rivero R¹

Recibido: 27/09/2013
Aprobado: 14/1/2014

RESUMEN

Cincuenta y tres establecimientos lecheros del sur de Uruguay fueron seleccionados para determinar la prevalencia de mastitis subclínicas, la incidencia de mastitis clínica, distribución de los patógenos y su susceptibilidad antimicrobiana. La prevalencia de mastitis subclínica fue determinada en base al recuento de células somáticas en 9.016 muestras de leche obtenidas de 2.254 vacas de acuerdo a un umbral >300.000 células/mL. La prevalencia media fue de 54,2% animales afectados, siendo *Staphylococcus aureus* (21,4%) el principal patógeno aislado de muestras positivas. Durante un año fueron registrados

SUMMARY

A total of 53 farms were selected in Southern dairy region of Uruguay, in order to estimate the prevalence of subclinical mastitis, the incidence of clinical mastitis, distribution and antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens. The prevalence of sub-clinical mastitis was determined in base on somatic cell counts in quarter's milk samples and a threshold value of > 300,000 cells/mL.; 9,016 milk quarters samples were collected from 2,254 dairy cows and the mean prevalence at herd level was 54.2% of affected cows. The main pathogen isolated from positive samples was *Staphylococcus aureus* (21.4%). During one

¹ Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino", MGAP CC 57037, CP 60000, Paysandú, Uruguay. ² Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), EE La Estanzuela, Colonia, Uruguay. ⁴ Departamento de Ciencias Microbiológicas, Área de Bacteriología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Regional Norte, Salto, Uruguay. ⁵ Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay. ⁶ Departamento de Bioestadística, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Regional Norte, Salto, Uruguay. *Autor de correspondencia: <mailto:egiannechini@mgap.gub.uy>

667 casos clínicos, determinándose la incidencia media de mastitis clínica en 11,8 casos cada 100 vacas/año en riesgo. Un total de 341 muestras de leche fueron obtenidas de los casos registrados y el patógeno más frecuentemente aislado fue *Staphylococcus aureus* (27,8%). Un total de 864 aislamientos de los géneros estafilococo, estreptococo y enterococo obtenidos de casos de mastitis clínica y subclínica fueron analizados en su susceptibilidad a agentes antimicrobianos por el método de Disco Difusión Agar. Un 39,1% de aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de casos subclínicos y un 36% de casos clínicos fueron resistentes a la penicilina, y en *Staphylococcus coagulasa* negativos el 29,4% y 33,3%, respectivamente. Los aislamientos del género estreptococo resultaron susceptibles a penicilina, mientras que el 12,5% del género enterococo fueron resistentes. En conclusión, Uruguay mantiene un alto nivel de prevalencia de casos de mastitis subclínica en el rodeo lechero. *Staphylococcus aureus* es confirmado como el principal agente etiológico con un alto porcentaje de resistencia a penicilina.

Palabras claves:

vacas lecheras, mastitis, prevalencia, incidencia

year 667 cases of clinical mastitis were recorded with a mean incidence rate of clinical mastitis of 11.8 cases per 100 cow/year at risk. Milk samples were obtained from 341 clinical cases for bacteriological isolation, the most prevalent pathogen isolated was *Staphylococcus aureus* (27.8%). A total of 864 strains belonging to staphylococci, streptococci and enterococci isolated from clinical and subclinical mastitis cases were analyzed for their susceptibility to antimicrobial agents. The susceptibility patterns were studied by Agar disk diffusion method. The 39.1% of *Staphylococcus aureus* strains from subclinical cases and 36% from clinical cases were resistant to penicillin, and 29.4% and 33.3% of coagulase negative staphylococci strains, respectively. All the streptococcal isolates were susceptible to penicillin, while 12.5% of enterococci strains were resistant. In conclusion, Uruguay maintain a high level of sub clinical infection in the dairy herds, and *Staphylococcus aureus* is confirmed as the principal pathogen with a high percentage of penicillin resistance.

Keywords:

dairy cow, mastitis, prevalence, incidence

INTRODUCCIÓN

Mastitis bovina es una enfermedad inflamatoria de la glándula mamaria caracterizada por un incremento en el recuento de células somáticas (RCS) en la leche y por cambios patológicos en el tejido mamario (International Dairy Federation, 1987), con importantes repercusiones sanitarias y económicas. Puede presentarse con alteraciones en ubre y en leche fácilmente detectables lo que se denomina mastitis clínica (MC), o en forma subclínica o mastitis subclínica (MSC) la que se caracteriza por no presentar cambios aparentes en la leche a pesar de un incremento significativo del RCS (Bramley y col., 1996). Ambas presentaciones pueden disminuir significativamente la producción de leche y alterar su calidad (Seegers y col., 2003). Según Bartlett y col. (1992) la ocurrencia de casos de mastitis y su etiología varía entre las diferentes regiones o países productores de leche. Esto puede estar asociado con factores tales como raza o biotipo lechero, nivel de producción, sistema de producción (estabulado o pastoril), manejo y factores medioambientales como por ejemplo: temperatura y humedad (Olde Riekerink y col., 2007). Por lo tanto, conocer la prevalencia de MSC, la incidencia de casos de MC y su etiología es de importancia para la se-

lección de estrategias eficientes para el control de la enfermedad.

Uruguay es el principal exportador de productos lácteos de la región, con una producción anual de 2.057 millones de litros de leche obtenidos en 4.400 establecimientos lecheros donde se ordeñan unas 470.000 vacas (DIEA, 2012). Desde 1996, se implementó en Uruguay el pago de la leche por su calidad, parámetros como el de recuento de células somáticas en leche de tanque (RCST) de los establecimientos lecheros remitentes a plantas lecheras fueron registrados en una base de datos por la Junta Nacional de la Leche hasta el año 2004, discontinuándose hasta la actualidad. La media anual del RCST de los establecimientos remitentes disminuyó de 545.800 células/mL en 1996 a 341.200 células/mL en 2004 (OPYPA, 2004). Aunque existe una buena correlación entre RCST y la prevalencia de MSC o proporción de vacas con un alto RCS en el rodeo (Emanuelson y Funke, 1991), una débil asociación se ha encontrado con la incidencia de casos de MC (Valde y col., 2005), por lo cual no es adecuado tener en cuenta exclusivamente el RCST como parámetro de salud de la ubre. En un estudio realizado anteriormente en la región Litoral Oeste de Uruguay por Giannechini y col. (2002a), se determinó una prevalencia de MSC del 54,2% en vacas

y 26,7% de cuartos afectados, y 1,2 casos cada 100 vacas en riesgo al mes (14,4 casos estimando para el año) fue el índice de incidencia de casos de MC (IIMC) obtenido. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) fue el patógeno más prevalente en casos clínicos como subclínicos. Este trabajo llevado a cabo en la segunda área lechera del país fue la primera evaluación de la enfermedad en base a un diseño aleatorio de toma de muestras. En él no fue considerada la influencia estacional sobre la incidencia de casos de MC, ya que la evaluación de los casos de MC fue realizada durante un mes. Tampoco fueron consideradas las diferencias en el status en salud de la ubre a nivel del rodeo.

Los agentes antimicrobianos han sido ampliamente usados para el tratamiento de mastitis bovina. Existen importantes razones para evaluar la resistencia a los antibióticos, una de ellas es obtener información que ayudará en la elección de la droga antimicrobiana más adecuada para el tratamiento. Y la más importante desde el punto de vista de Salud Pública, que se enfoca en la detección temprana de cepas bacterianas con resistencia múltiple a distintos antibióticos para evitar la presencia de estas en la cadena de alimentos de origen animal. En los últimos años han sido detectadas cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) aisladas de casos de mastitis bovina (Hwa Lee, 2003; Vanderhaeghen y col., 2010).

El objetivo de este estudio fue determinar la incidencia anual de los casos de MC, la prevalencia de MSC, los patógenos prevalentes en ambas entidades de la enfermedad, y otras variables del status de salud de la ubre a nivel de rodeo en la Cuenca lechera del Sur de Uruguay, el área más importante en producción de leche. Otro de los propósitos del mismo fue determinar la resistencia a los antibióticos de los patógenos aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la muestra

Para determinar la muestra se utilizó la información de 1.838 tambos de la Cuenca lechera del Sur, ubicados en cuatro departamentos: Canelones, Colonia, Florida y San José. Estos establecimientos integran la Cooperativa Nacional de Productores de Leche (CONAPROLE) y representan más del 50% del total de tambos que remiten leche a plantas lecheras en el país. Un esquema de muestreo en dos etapas (Farver, 1987) fue implementado para determinar en una primera etapa la muestra de establecimientos y en forma secundaria el número de animales necesarios para estimar la prevalencia de mastitis subclínica. Sobre esta base se determinó una muestra aleatoria estratificada de 53 establecimientos lecheros de acuerdo al tamaño del rodeo en ordeño, distribuidos de la siguiente manera según los diferentes estratos: 22 con un número

Cuadro 1.- Distribución geográfica de la muestra de vacas lecheras y de los establecimientos lecheros seleccionados de los diferentes estratos de acuerdo al tamaño del rodeo en ordeño

Estratos	Canelones				Colonia			Florida			San José					
	Vacas	Tambos	Vacas	Tambos	Vacas	Tambos	Vacas	Tambos	Vacas	Tambos	Vacas	Tambos	Vacas	Tambos		
< 50	7827	310	175	6	2314	76	15	1	6581	217	159	7	12022	474	176	8
51-100	6658	89	132	3	4688	63	50	1	11403	158	98	3	10400	141	141	6
101-200	4006	28	112	2	3684	28	130	2	12543	83	300	5	11168	78	68	1
>200	2310	9	72	1	1381	6	72	1	14498	53	156	2	7477	25	246	4
Total	20801	436	491	12	12067	173	267	5	45025	511	713	17	41067	718	631	19

ro de <50 vacas en ordeño, 13 entre 51 a 100 vacas en ordeño, 10 entre 101 a 200 vacas en ordeño, y 8 tambos con más de 200 vacas en ordeño. Los tambos que fueron seleccionados en cada estrato reflejaron la proporción de vacas en ordeño que hay en cada estrato y la proporción de las mismas en cada departamento (Cuadro 1).

El número total de animales a muestrear fue determinado en base a un intervalo de confianza del 95% con un error del 3% y una prevalencia esperada del 50% de vacas afectadas de mastitis subclínica de acuerdo a los resultados obtenidos por Giannechini y col. (2002a). Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, se determinó un total de 2254 vacas en ordeño a muestrear. La selección de las mismas se formuló de la siguiente forma: el 80% de los animales en rodeos con ≥ 50 vacas en ordeño, 50% en rodeos con 51 a 100 vacas, 35% en rodeos con 101 a 200 vacas y 29% en rodeos con más de 200 vacas. La aleatorización en la selección de las vacas a muestrear en cada establecimiento se realizó teniendo en cuenta un esquema de toma de muestra sistemático. Por ejemplo, para obtener una muestra de 66%, cada tercera vaca fue omitida en la toma de la muestra. Mientras que se equilibraron las muestras tomadas de animales que entran del lado derecho con las del lado izquierdo de la sala de ordeño junto

con las que se colocan al frente y las que lo hacen en la parte trasera, desde la entrada de la primera vaca hasta la última. El propósito de este diseño de toma de muestra fue asegurar la capacidad de detección de vacas afectadas de forma sub-clínica en rodeos de diferentes dimensiones. La misma muestra de 53 establecimientos lecheros fue considerada para investigar el índice de incidencia de los casos de MC.

Prevalencia de mastitis sub-clínica

Se realizó una única visita a cada uno de los establecimientos lecheros seleccionados entre el período del 1 de Setiembre del 2002 y el 31 de agosto del 2003, para determinar la prevalencia de mastitis sub-clínica en cada rodeo lechero. Durante las mismas, se colectaron muestras de leche individuales de cuartos de las vacas elegidas antes de ser ordeñadas en forma aséptica para aislamiento bacteriológico, de acuerdo a las directivas del National Mastitis Council (Hogan y col., 1999). Las muestras obtenidas fueron transportadas en cajas isotérmicas con hielo (4 a 8°C) al Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino” de la ciudad de Paysandú. Junto a las anteriores también fueron colectadas muestras de leche para el RCS en tubos con tabletas

de bronopol (Broad Spectrum Microtabs II, D & F Control Systems Inc, Chaska, MN, USA) como conservantes, estas se remitieron al Laboratorio de Calidad de Leche del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) en la Estación Experimental “La Estanzuela”. Un cuarto mamario fue considerado afectado en forma sub-clínica, cuando no presentaron síntomas clínicos pero el RCS fue mayor al valor umbral de 300 000 células/ml, con o sin aislamiento positivo de patógenos (Pitkälä y col., 2004). La prevalencia de los casos de MSC en la región fue determinada como la proporción de animales con al menos un cuarto afectado sub-clínicamente. Además, se determinó la media de la prevalencia de los rodeos en cada estrato.

Incidencia de mastitis clínica

El IIMC se determinó en base al número de muestras de casos clínicos recibidos de los 53 establecimientos seleccionados durante el período entre el 1ro de Setiembre del 2002 y el 31 de Agosto del 2003. Antes de comenzar el trabajo, los encargados del ordeño en cada establecimiento fueron entrenados para reconocer vacas con MC y para tomar una muestra de leche en forma aséptica. Ellos fueron instruidos para inspeccionar las va-

cas durante el ordeño (dos veces al día) y tomar la muestra del cuarto afectado antes de tratar con antibióticos. Los casos de MC fueron diagnosticados a través de signos clínicos en la leche (grumos, coágulos, apariencia acuosa, cambio de coloración) y en la ubre (rubor, inflamación, endurecimiento, dolor). Las muestras obtenidas fueron congeladas y almacenadas a -20°C en el establecimiento. Formularios conteniendo información con la identificación de los animales, número de lactancias, fecha de parición, fecha de aparición del caso clínico, refugos y número de vacas en riesgo (día a día) fueron completados por cada uno de los productores. En cajas isotérmicas con hielo, fueron remitidas cada 4 semanas al Laboratorio Regional Noroeste “Miguel C. Rubino” de Paysandú para cultivo bacteriano las muestras congeladas de leche junto a los formularios con la información por los productores. No fueron determinados los RCS de las mismas, tomando en consideración el efecto de la congelación sobre las células somáticas.

Un caso de mastitis clínica fue considerado como una vaca diagnosticada como afectada dentro de un período de 14 días (Bartlett y col., 2001). Si al menos transcurrieran 14 días después de un reporte de un caso de mastitis clínica, cualquier determinación posterior fue considerada como el

comienzo de un nuevo caso. El IIMC fue expresado como el número de casos clínicos cada 100 vacas/año en riesgo, el mismo fue calculado como el número total de casos en un año dividido por el total de vacas-días en riesgo acumulados en ese período multiplicado por 365 y por 100 (Kelton y col., 1998). Vacas días en riesgo fue la suma de las que estaban en ordeño y las que estaban secas día a día. Las vaquillonas comenzaron a acumular días en riesgo cuando ellas tuvieron su primer parto, mientras que las vacas que se descartaron acumulan días en riesgo hasta la fecha de su eliminación del ordeño como así en caso de muertes. Las vacas no fueron consideradas en riesgo de contraer un nuevo caso clínico durante los 14 días después del último reporte o diagnóstico de mastitis clínica (Bartlett y col., 2001).

Microbiología

Las muestras provenientes de casos clínicos fueron recibidas congeladas a -20°C y descongeladas a temperatura ambiente o de mesada, mientras que las muestras tomadas para la evaluación de mastitis sub-clínica fueron recibidas frescas (4°C) por el laboratorio. De ambos tipos de muestras, $10\ \mu\text{l}$ de leche fueron sembrados en placas de agar sangre (Difco laboratories, Detroit, USA)

suplementadas con 5% de sangre bovina. La incubación fue realizada bajo condiciones de aerobiosis a 37°C, y analizadas entre las 24 y 48 horas. Los microorganismos aislados fueron identificados en un comienzo por la morfología de sus colonias, el tipo de hemólisis, coloración de Gram, test de catalasa y test de Hidróxido de Potasio (KOH 3%) (Hogan y col., 1999).

Estafilococos.- La identificación de los aislamientos de *S. aureus* fue realizada de acuerdo a Giannechini y col (2002). Los *Staphylococcus* coagulasa-negativos (SCN) fueron determinados como especies.

Estreptococos y Enterococos.- Los Estreptococos fueron identificados de acuerdo a los procedimientos descritos por Giannechini y col. (2002) y los Enterococos fueron confirmados por el crecimiento en caldo Triptosa Soja con 6.5% de NaCl (Difco-laboratories, Detroit, USA) (Hogan y col., 1999).

Escherichia coli y Pseudomonas spp.- La identificación definitiva de estas bacterias bacilares Gram negativas y con el test de KOH positivo fue de acuerdo a Giannechini y col. (2002)

Mannheimia haemolytica- Esta bacteria fue identificada por medio de: morfología de la colonia, tinción de Gram, test de KOH, test de catalasa,

test de oxidasa (Bactidrop™ Remel, Lenexa, KS, USA), crecimiento sobre Agar Mac Conkey (Difco-laboratories, Detroit, USA) y fermentación de la lactosa (Hogan y col., 1999).

Trueperella pyogenes.- Esta especie fue identificada por morfología de la colonia, test de catalasa, tinción de Gram, licuefacción de la gelatina e incubación sobre agar sangre en una atmósfera con CO₂ al 10% a una temperatura de 37°C durante 24 a 48 horas, obteniendo un hemólisis marcada en el medio (Hogan y col., 1999).

Levaduras.- Estas fueron identificadas después de incubar en agar sangre a 37°C, por la morfología de la colonia y por tinción de Gram (Quinn y col., 1994).

A cada una de las placas de agar sangre con los aislamientos de las diferentes especies bacterianas se le realizó el recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC). Tomando en cuenta el criterio utilizado por Barkema y col. (1998) los patógenos contagiosos como *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*) fueron considerados como causa de infecciones mamarias si se obtuviera el aislamiento de una colonia (100 UFC/ml). Mientras que, para patógenos medioambientales de mastitis (Coliformes, Estreptococos medioambientales, *Enterococcus*

spp., *Trueperella pyogenes*, *Mannheimia haemolytica* y *Pseudomonas* spp.) se consideraron aquellos aislamientos con ≥ 200 UFC/ml, y ≥ 1000 UFC/ml para los aislamientos de SCN, Levaduras y *Bacillus* spp. A excepción de aquellos aislamientos de muestras en los cuales *S. aureus* o *Str. agalactiae* estuvieron presentes, muestras con tres o más especies bacterianas fueron consideradas como contaminadas.

Recuento de Células Somáticas de Leche de Cuartos

El RCSLC se determinó dentro de las 48 horas de extraída la muestra a través de un contador de células en leche Somacount 300 (Bentley, Instrument Inc., Chaska, MN, USA).

Recuento de Células Somáticas en Tanque de Leche

El valor obtenido por el cálculo de la media geométrica de las últimas tres determinaciones del RCS en la leche del tanque recibido por el establecimiento de la Planta Lechera antes de nuestra visita, es el que se utilizó como el nivel del RCST para el rodeo.

Evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos

La susceptibilidad *in vitro* de los patógenos aislados a agentes antimicrobianos fue determinada a través del método de Disco Difusión Agar (DDA) siguiendo las directivas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para bacterias aisladas de animales (CLSI, 2008). Previo a la evaluación de susceptibilidad todos los patógenos aislados fueron sembrados nuevamente sobre Agar Sangre e incubados por 24 horas a 37°C, para partir de cultivos frescos. Los siguientes discos de antibióticos (Difco Laboratories, Detroit, USA) fueron utilizados en la evaluación: penicilina, 10 μg ; ampicilina, 10 μg ; oxacilina, 1 μg ; amoxicilina + ácido clavulánico, 20 μg + 10 μg ; cefalotina, 30 μg ; eritromicina, 15 μg ; enrofloxacin, 5 μg ; gentamicina, 10 μg ; neomicina, 30 μg ; estreptomycin, 10 μg ; tetraciclina, 30 μg ; sulfametoxazol + trimetoprima, 1,25 μg + 23,75 μg . La sensibilidad de los estafilococos fue evaluada frente a todos los antibióticos anteriormente enumerados, mientras los estreptococos y enterococos frente a 7 de estos agentes antimicrobianos (penicilina, ampicilina, cefalotina, enrofloxacin, eritromicina, tetraciclina y sulfametoxazol-trimetoprima). El medio de cultivo usado fue agar Müller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit,

USA) para estafilococos, agar Müeller-Hinton suplementado con 5% de sangre ovina para estreptococos y enterococos. Las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y *S. aureus* ATCC 29213 fueron incluidas como controles de calidad de la metodología. Las placas montadas con el método de DDA fueron leídas después de las 18 horas de incubación a 37°C en condiciones de aerobiosis. Los aislamientos fueron categorizados como susceptibles, susceptibilidad intermedia y resistentes de acuerdo a la medidas del diámetro de los halos de inhibición producidos por los diferentes discos de antibióticos (CLSI, 2008). No hay recomendaciones actualmente disponibles del CSLI de los valores límites que determinan las tres categorizaciones para neomicina y estreptomycin; por lo cual los valores límites para kanamicina fueron los utilizados para estos 2 antibióticos (CLSI, 2008). Para confirmar la resistencia de oxacilina entre las cepas aisladas de estafilococos que dieron positivas en el método de DDA, un sistema de micro dilución disponible en el mercado (VetMIC™ +/- panels, SVA, Uppsala, Sweden) fue usados de acuerdo a las recomendaciones elaboradas por el CLSI (2008). Los procedimientos de este test de screening fueron llevados a cabo de acuerdo a Giannechini y col. (2002). Las cepas de *S. aureus* ATCC 29886 y *S. aureus* ATCC 29887 fueron incluidas como controles negativo

y positivo, respectivamente. Finalmente, todos los aislamientos de estafilococos fueron además analizados por su producción de β -lactamasas el método del trébol (“cloverleaf” test) como lo describió Giannechini y col. (2002) de acuerdo a Franklin y Wierup (1982).

Estadística

La media aritmética, mediana, desvío estándar e intervalo de confianza 95% (IC 95%) fueron determinados a través de las funciones estadísticas de EXCEL (Microsoft Office, 2003). La comparación entre los diferentes estratos fue realizada usando el PROC GLM de SAS/STAT (SAS, 2008). El modelo usado fue: $Y = \mu + \text{estrato} + \text{error}$, donde Y era la prevalencia de vacas afectadas de MSC, o prevalencia de cuartos afectados con MSC, o el RCST o el RCSLC. La comparación de las medias de los diferentes estratos fue realizada a través de la opción LSMean. Las diferencias en los porcentajes de resistencia entre los patógenos aislados de casos de MC con respecto a los patógenos aislados de casos de MSC fueron analizadas a través del test “two samples proportion” (Milton, 1992). Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$.

RESULTADOS

IIMC y etiología

Durante el año que duró el estudio fueron registrados 667 casos de MC de 43 establecimientos lecheros y la media del IIMC en los rodeos de estos predios fue 11,8 casos cada 100 vacas-año en riesgo (rango 0 a 38,4) (Cuadro 2), respectivamente.

Los valores descriptivos del IIMC de acuerdo a los diferentes estratos según el tamaño de los rodeos se resume en Cuadro 4, no fueron encontra-

das diferencias entre los diferentes estratos. Los casos clínicos se registraron a partir de vacas en su primer lactancia hasta en vacas en su decimo primera. El mayor número de casos se dio en vacas en su 5ta lactancia (Figura 1).

La distribución de los casos clínicos con respecto a los días en lactancia se muestra en la Figura 2.

La mayoría de los casos clínicos reportados se detectaron dentro de los primeros 100 días de lactancia (51,5%). Mientras que, un alto porcentaje

Cuadro 2. Valores descriptivos relacionados a la presentación de mastitis en 53 establecimientos lecheros de la cuenca lechera del Sur de Uruguay.

	Rodeos (no.)	Media/Mediana	DE	IC 95%	Rangos
Incidencia de mastitis clínica (casos cada 100 vacas-año en riesgo)	43*	11,8/10,1	9,0	10,6 - 13	0 – 38,4
Prevalencia de mastitis subclínica (vacas)	53	54,2/52,8	17,2	51,9 – 56,5	10 – 93,3
Prevalencia de mastitis subclínica (cuartos)	53	28,8/27,4	12,5	27,2 – 30,5	5,8 – 60
RCST ¹ (x1000 células/mL)	53	445,9/390	227,4	415,3 – 476,6	103 - 1146
RCSLC ² (x1000 células/mL)	53	374,6/317,1	205,1	347 – 402,2	93,8 – 1010

*10 rodeos fueron no tenidos en cuenta por proveer información incompleta.

¹RCSTL= Recuento de Células Somáticas en Leche de Tanque.

²RCSLC= Recuento de Células Somáticas en Leche de Cuartos

DE=Desvío Estándar

IC=Intervalo de confianza

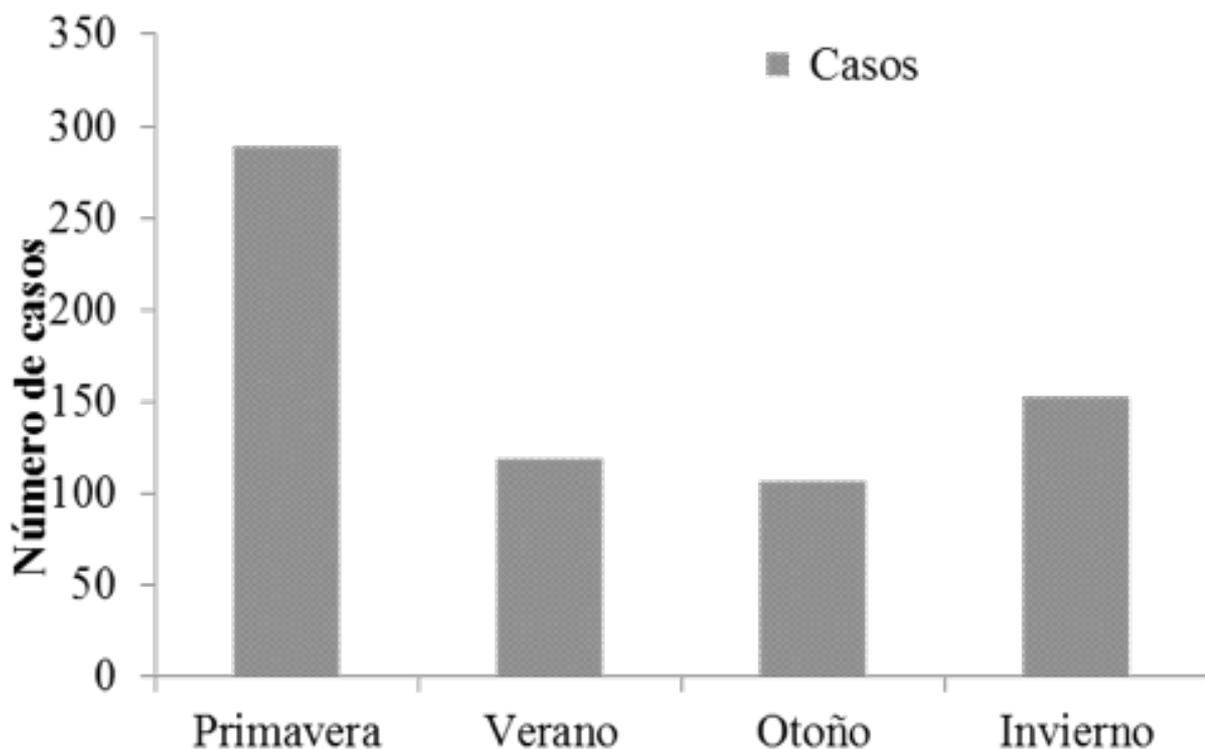


Figura 1: Distribución de los casos de mastitis clínica obtenidos de 43 rodeos lecheros de la Cuenca lechera del sur de Uruguay distribuidos de acuerdo al número de lactancias de las vacas afectadas (n=667).

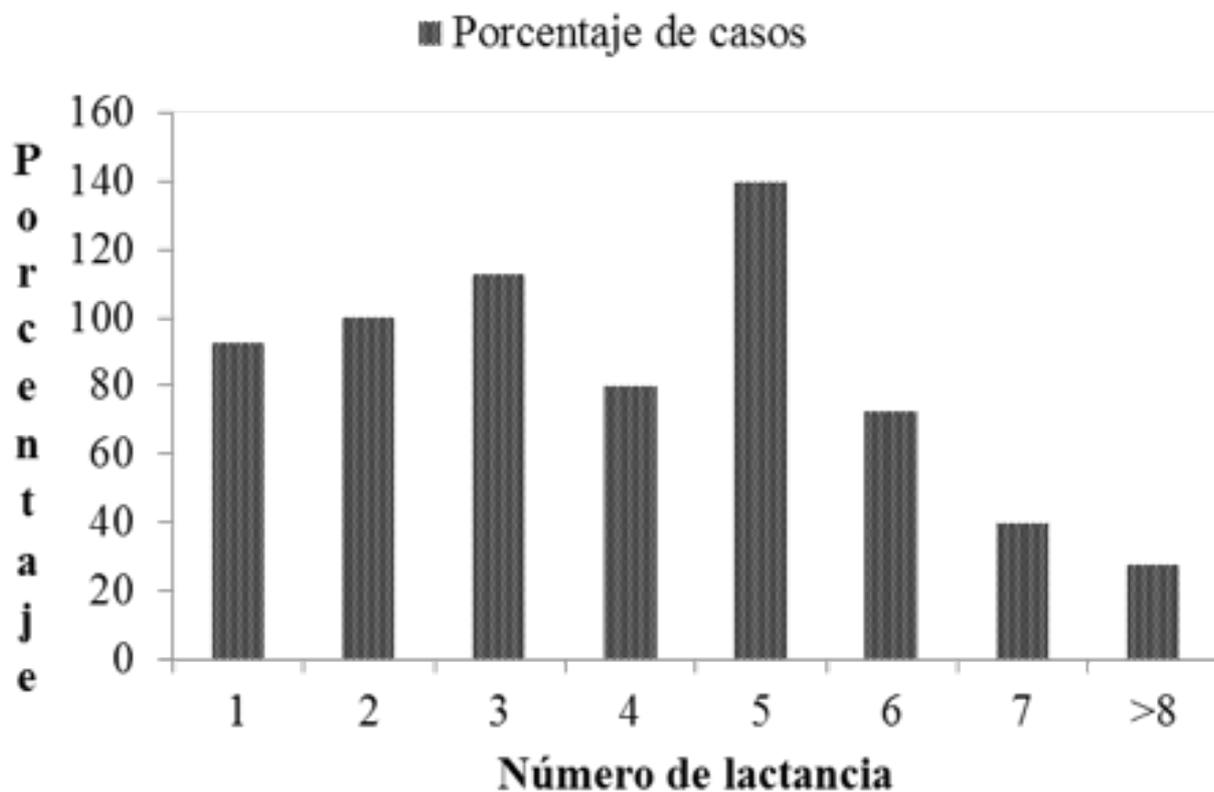


Figura 2: Distribución de los casos de mastitis clínica obtenidos de 43 rodeos lecheros de la Cuenca lechera del sur de Uruguay en relación a los días en lactancia de las vacas afectadas (n=667).

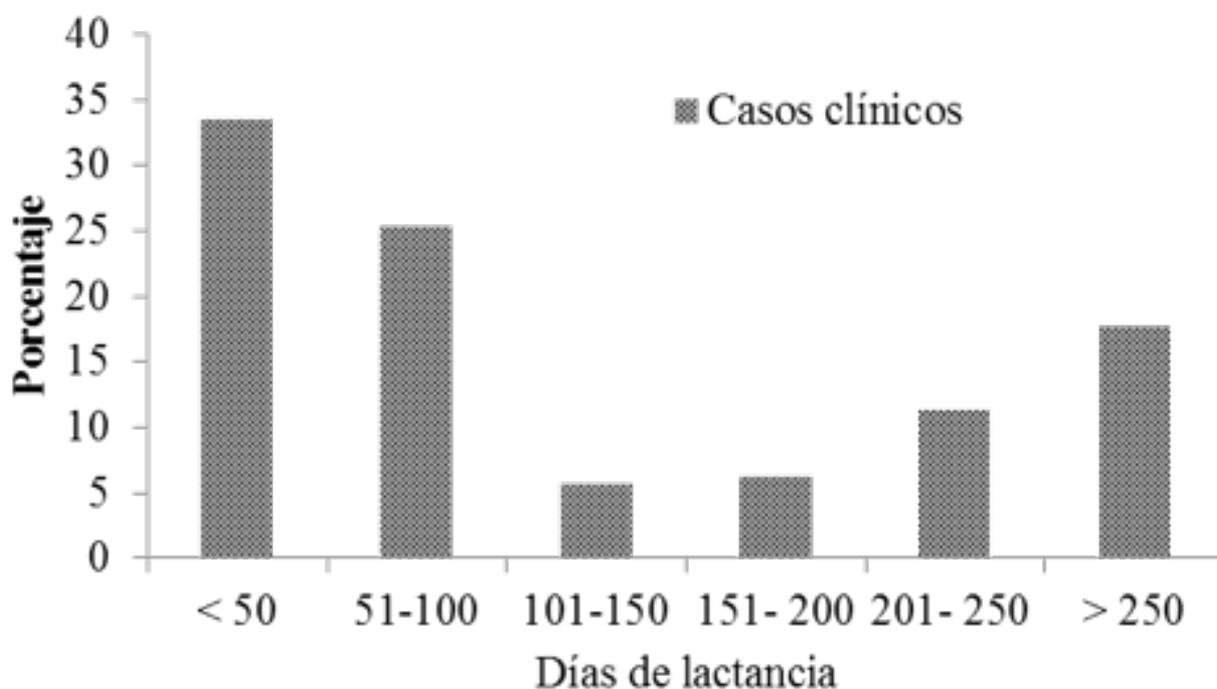


Figura 3: Distribución estacional de los casos clínicos (n=667) obtenidos de 43 establecimientos de la cuenca lechera del sur de Uruguay

Cuadro 3. Patógenos aislados de muestras de leche obtenidas de casos clínicos en 43 establecimientos lecheros de la Cuenca Lechera del sur de Uruguay.

Microorganismos	Numero de aislamientos	Porcentaje
<i>Staphylococcus aureus</i>	79	23,1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	51	14,9
SCN*	17	5
<i>Streptococcus uberis</i>	14	4
<i>Mahinemia haemolitica.</i>	7	2,1
<i>Escherichia coli</i>	5	1,5
<i>Enterococcus sp.</i>	4	1,2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0,6
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	0,6
Levaduras	2	0,6
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	0,3
<i>S. aureus</i> + <i>Str. dysgalactiae</i>	11	3,2
<i>S. aureus</i> + <i>Str. uberis</i>	4	1,2
<i>S. aureus</i> + <i>Str. agalactiae</i>	1	0,3
Contaminadas	22	6,4
Negativas	119	35
TOTAL	341	100

*SCN = *Staphylococcus coagulasa-negativos*

de casos de mastitis clínica (40%) fueron registrados durante la primavera (Figura 3).

Muestras de leche en forma aséptica fueron obtenidas de 341 casos clínicos, determinándose que el *S. aureus* (27,8%) fue el patógeno de mayor prevalencia, mientras el 35% de las muestras fueron negativas. Los hallazgos microbiológicos en las muestras de casos de mastitis clínica son descritos en Cuadro 3.

Prevalencia y Etiología de Mastitis Sub-clínica

La prevalencia de casos de mastitis sub-clínica en la región fue determinada sobre 9016 muestras de leche tomadas de los cuartos de 2254 vacas en ordeño. Un total de 1204 (53,4%) vacas sobre un total de 2254, y 2484 (27,5%) cuartos de un total de 9016 fueron diagnosticados con masti-

tis sub-clínica. La media de la prevalencia de los rodeos estudiados fue determinada en 54,2% de animales afectados (IC 95%, 51,9 a 56,5) (Cuadro 4).

En el Cuadro 5 son presentados los valores descriptivos de la prevalencia de acuerdo a los diferentes estratos.

En el 39,7% (986) de los cuartos con mastitis sub-clínica se obtuvieron aislamientos bacterianos, mientras que en el 60,3% (1498) de estos cuartos no fue observado desarrollo bacteriano en los cultivos. Solamente 370 (4,1%) cuartos con RCS por debajo del valor límite o umbral (300.000 células/mL) fueron positivas a aislamientos bacterianos, los cuales no fueron considerados como afectados en forma sub-clínica en el presente estudio. El patógeno más frecuentemente aislado de cuartos con mastitis sub-clínica

Cuadro 4. Valores descriptivos de la incidencia de mastitis clínica (casos cada 100 vacas/riesgo) distribuidos diferentes estratos de acuerdo al número de vacas en ordeño del rodeo

	Rodeos	Media/Mediana	DE	IC 95%	Rangos
<50 vacas	18	11,5/4,8	12,23	8,7 – 14,23	0 – 38,4
51 a 100 vacas	11	11,2/10,8	6,14	9 – 12,6	3,1 – 17,7
101 a 200 vacas	6	12,2/10,3	6,27	7,8 – 12,8	5,4 – 22,8
>200 vacas	8	12/10,7	6,54	8,5 – 12,9	4,4 – 24,3

DE=Desvío Estándar IC=Intervalo de confianza

Cuadro 5. Valores descriptivos de la prevalencia de mastitis subclínica distribuidos en los diferentes estratos de acuerdo al número de vacas en ordeño del rodeo

	Rodeos	Media/Mediana	DE	IC 95%	Rangos
Rodeos con <50 vacas					
Prevalencia de mastitis subclínica (vacas)	22	61,5/63 ^a	18,76	57,6 – 65,4	10 – 93,3
Prevalencia de mastitis subclínica (cuartos)	22	32,9/31,7 ^a	13,38	30,1 – 35,7	5,8 – 60
Rodeos con 51 a 100 vacas					
Prevalencia de mastitis subclínica (vacas)	13	63,2/62 ^a	16,07	57,4 – 65,3	23 – 73,7
Prevalencia de mastitis subclínica (cuartos)	13	36,4/30,6 ^a	13,93	32,6 – 40,2	13 – 55,3
Rodeos con 101 a 200 vacas					
Prevalencia de mastitis subclínica (vacas)	10	50,3/51,8 ^{ab}	11,99	46,6 – 54	25 – 70
Prevalencia de mastitis subclínica (cuartos)	10	26,8/25,9 ^{ab}	8,91	24 – 29,6	11,6 – 42,8
Rodeos con >200 vacas					
Prevalencia de mastitis subclínica (vacas)	8	44,4/47 ^b	10,45	38,3 – 45,5	24,4 – 52,8
Prevalencia de mastitis subclínica (cuartos)	8	19,8/19,3 ^b	5,30	18,6 – 21,1	11,4 – 27,8

DE=Desvío Estándar

IC=Intervalo de confianza

Diferentes letras representan diferencias significativas ($P<0.05$)

Cuadro 6. Hallazgos bacteriológicos en muestras de leche de cuartos con mastitis subclínica de 53 rodeos lecheros de la Cuenca Lechera del sur de Uruguay distribuidos en los estratos de acuerdo al número de vacas en ordeño.

MICROORGANISMOS	Total de Rodeos		< 50 vacas en ordeño		51 a 100 vacas en ordeño		101 a 200 vacas en ordeño		> 200 vacas en ordeño	
	Aislamientos	%	Aislamientos	%	Aislamientos	%	Aislamientos	%	Aislamientos	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	491	19,8	147	24,2	142	19,2	126	19,4	76	16,1
SCN	149	6,0	43	6,8	44	5,9	26	4,0	36	7,7
<i>Streptococcus uberis</i>	120	4,8	29	4,8	32	4,3	18	2,8	41	8,8
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	102	4,1	46	7,5	23	3,1	15	2,3	18	3,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	69	2,8	31	5,2	21	2,8	12	1,8	5	1,1
<i>Enterococcus spp.</i>	4	0,2	0	0	0	0	4	0,6	0	0
<i>S. aureus + Str. dysgalactiae</i>	13	0,5	6	1,0	2	0,3	2	0,3	3	0,6
<i>S. aureus + Str. uberis</i>	16	0,6	2	0,7	8	1,1	2	0,3	4	0,8
<i>S. aureus + Str. agalactiae</i>	18	0,7	11	1,8	3	0,4	4	0,6	0	0
<i>Str. uberis + Str. dysgalactiae</i>	4	0	2		1	0,1	1	0,1	0	0
Muestras negativas	1498	60,5	308	48,0	463	62,8	440	67,8	287	61,1
TOTAL	2484	100	625	100	739	100	650	100	470	100

en la región fue *S. aureus*, seguido por SCN, *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*), *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*), *Streptococcus agalactiae* (*Str. agalactiae*) y *Enterococcus sp.* (Cuadro 6).

RCS de leche de Tanque y

RCS de leche de Cuartos

La media del RCST en los rodeos seleccionados fue de 445 900 células/ml (rango 103 000 a 146 000) y la mediana 390 000 células/ml., mientras que la media del RCSLC fue 374 600 células/ml (rango 93 800 a 1 010 000) y la mediana 317 100 células/ml (Cuadro 2). Los datos descriptivos para RCST y RCSLC en relación a los estratos en los cuales están distribuidos los predios de acuerdo al tamaño del rodeo están resumidos en Cuadro 7.

Susceptibilidad a los antibióticos

Los valores obtenidos con las cepas control estuvieron dentro de los rangos esperados para todos los agentes antimicrobianos evaluados. Los porcentajes de resistencia obtenidos por medio del test de DDA son presentados para *S. aureus* en Cuadro 8, SCN en Cuadro 9, *Str. aga-*

lactiae en Cuadro 10, *Str. dysgalactiae* en Cuadro 11, *Str. uberis* en Cuadro 12 y *Enterococcus sp.* en Cuadro 13, respectivamente.

No se encontraron diferencias en los perfiles de sensibilidad entre los aislamientos provenientes de casos de MC y casos de MSC para *S. aureus*,

SCN, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*. La excepción fue para la estreptomicina, ya que los aislamientos de *S. aureus* y SCN aislados de los casos de MC fueron significativamente menos sensibles. El 100% de los aislamientos de *S. aureus* y SCN resistentes a penicilina fueron productores de

Cuadro 7. Valores descriptivos de RCSLT y RCSLC distribuidos en los diferentes estratos de acuerdo al número de vacas en ordeño del rodeo.

	Rodeos	Media/Mediana	DE	IC 95%	Rangos
Rodeos con <50 vacas					
RCSLT (x 1000 células/ml.)	22	540/486 ^a	274,27	482,7 – 597,3	210 – 1146
RCSLC (x 1000 células/ml)	22	419,8/335,5 ^a	240,15	369,3 – 470,1	93,8 – 1010
Rodeos con 51 a 100 vacas					
RCSLT (x 1000 células/ml.)	13	469,4/450 ^a	195,74	416 – 519,6	103 – 872
RCSLC (x 1000 células/ml)	13	449,4/427,3 ^a	228,99	356,6 – 481,1	131,1 – 882,3
Rodeos con 101 a 200 vacas					
RCSLT (x 1000 células/ml.)	10	336,9/352,5 ^{bc}	100,36	305,8 – 368	148 – 490
RCSLC (x 1000 células/ml)	10	308,3/296,9 ^{ba}	108,05	274,8 – 341,8	172,3 – 476,9
Rodeos con >200 vacas					
RCSLT (x 1000 células/ml.)	8	285,1/273 ^c	67,62	261,7 – 305,5	189 – 393
RCSLC (x 1000 células/ml)	8	261,9/247,9 ^{cb}	61,19	240,7 – 283,1	194,1 – 344,1

RCSLT= Recuento de Células Somáticas en Leche de Tanque.

RCSLC= Recuento de Células Somáticas en Leche de Cuarto

DE=Desvío Estándar

IC=Intervalo de confianza

Diferentes letras representan diferencias significativas ($P<0.05$)

β -lactamasas. Los aislamientos resistentes a oxacilina de *S. aureus* y SCN determinados por el test de ADD, fueron susceptible en el test de screening para evaluar la resistencia a dicho agente antimicrobiano. Todos los aislamientos de *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, y *Str. uberis* fueron susceptibles a penicilina y cefalosporinas de primera generación (cefalotina), mientras el 12,5% y 100% de los aislamientos de *Enterococcus spp.* fueron resistentes a penicilina y cefalosporina, respectivamente. Los enterococos también presentan un alto nivel de resistencia a eritromicina (50%), enrofloxacina (87,5%), y sulfametoxazol-trimetoprima (87,5%).

Cuadro 8.- Susceptibilidad *in vitro* de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos de casos de mastitis clínica y subclínica en la Cuenca lechera del sur de Uruguay, determinada por el método de disco difusión agar.

Agentes antimicrobianos	Casos Clínicos (92 aislamientos)			Casos Subclínicos (378 aislamientos)		
	Susceptible	Intermedia	Resistente	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	60,9%	x	39,1%	64,0%	x	36,0%
Ampicilina Amoxicilina/ Ac. clavulánico	60,9%	x	39,1%	64,0%	x	36,0%
Oxacilina	91,4%	x	8,6%	90,0%	x	10,0%
Cefalotina	91,3%	6,5% ^a	2,2% ^a	96,8%	2,4% ^a	0,8% ^a
Eritromicina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Tetraciclina	86,9%	9,8%	3,3%	89,5%	7,9%	2,6%
Enrofloxacina	93,5%	0,0%	6,5%	96,3%	0,5%	3,2%
Gentamicina	98,9%	1,1%	0,0%	98,4%	1,6%	0,0%
Neomicina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Estreptomicina	93,5%	6,5%	0,0%	94,2%	5,8%	0,0%
Trimethoprima / Sulfametoxazol	3,3%	28,2%	68,5%	52,7%	10,3%	37,0%
	100%	0,0%	0,0%	99,7%	0,3%	0,0%

^a Todos los aislamientos fueron determinados como sensibles a la oxacilina por el test de screening.

Cuadro 9.- Susceptibilidad *In vitro* de los aislamientos de *Staphylococcus* coagulasa-negativos obtenidos de casos de mastitis clínica y subclínica en la Cuenca lechera del sur de Uruguay, determinada por el método de disco difusión agar.

Agentes antimicrobianos	Casos Clínicos (17 aislamientos)			Casos Subclínicos (138 aislamientos)		
	Susceptible	Intermedia	Resistente	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	70,6%	x	29,4%	66,7%	x	33,3%
Ampicilina	70,6%	x	29,4%	66,7%	x	33,3%
Amoxicilina/Ac. clavulánico	100,0%	x	0,0%	96,1%	x	3,9%
Oxacilina	100,0%	0,0%	0,0%	99,3%	0,0%	0,7% ^a
Cefalotina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Eritromicina	82,4%	5,9%	11,7%	94,8%	1,3%	3,9%
Tetraciclina	76,5%	5,9%	17,6%	94,2%	0,0%	5,8%
Enrofloxacina	100,0%	0,0%	0,0%	99,3%	0,7%	0,0%
Gentamicina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Neomicina	100,0%	0,0%	0,0%	99,3%	0,7%	0,0%
Estreptomicina	17,7%	58,8%	23,5%	48,7%	12,9%	38,4%
Trimethoprima/ Sulfametoxazol	100,0%	0,0%	0,0%	99,7%	0,3%	0,0%

^a Todos los aislamientos fueron determinados como sensibles a la oxacilina por el test de screening.

Cuadro 10.- Susceptibilidad *In vitro* de aislamientos de *Streptococcus agalactiae* obtenidos de casos de mastitis clínica y subclínica en la Cuenca lechera del sur de Uruguay, determinada por disco difusión agar.

Agentes antimicrobianos	Casos Clínicos y Subclínicos (49 aislamientos)		
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	100,0%	0,0%	0,0%
Ampicilina	100,0%	0,0%	0,0%
Cefalotina	100,0%	0,0%	0,0%
Eritromicina	98,0%	2,0%	0,0%
Tetraciclina	63,3%	0,0%	36,7%
Enrofloxacina	61,3%	36,7%	2,0%
Trimethoprima/Sulfametoxazol	98,0%	0,0%	2,0%

Cuadro 11.- Susceptibilidad *In vitro* de aislamientos de *Streptococcus dysgalactiae* obtenidos de casos de mastitis clínica y subclínica en la Cuenca lechera del sur de Uruguay, determinada por el método de disco difusión agar.

Agentes antimicrobianos	Casos clínicos (61 aislamientos)			Casos subclínicos (89 aislamientos)		
	Susceptible	Intermedia	Resistente	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	x	0,0%
Ampicilina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	x	0,0%
Cefalotina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Eritromicina	91,8%	8,2%	0,0%	97,8%	1,1%	1,1%
Tetraciclina	0,0%	4,9%	95,1%	5,6%	6,7%	87,6%
Enrofloxacina	67,2%	32,8%	0,0%	60,7%	39,3%	0,0%
Trimethoprima/ Sulfametoxazol	98,9%	1,1%	0,0%	91,1%	6,7%	2,2%

Cuadro 12.- Susceptibilidad *In vitro* de aislamientos de *Streptococcus uberis* obtenidos de casos de mastitis clínica y subclínica en la Cuenca lechera del sur de Uruguay, determinada por ADD.

Agentes antimicrobianos	Casos Clínicos (18 aislamientos)			Casos Subclínicos (113 aislamientos)		
	Susceptible	Intermedia	Resistente	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Ampicilina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Cefalotina	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%
Eritromicina	88,9%	11,1%	0,0%	90,2%	8,0%	1,8%
Tetraciclina	83,4%	11,1%	5,5%	90,3%	6,2%	3,5%
Enrofloxacin	55,6%	44,4%	0,0%	56,6%	41,6%	1,8%
Trimethoprima/ Sulfametoxazol	72,3%	22,2%	5,5%	75,3%	8,8%	15,9%

Cuadro 13.- Susceptibilidad *In vitro* de aislamientos de *Enterococcus sp.* obtenidos de casos de mastitis clínica y subclínica en la Cuenca lechera del sur de Uruguay, determinada por ADD.

Agentes antimicrobianos	<u>Casos Clínicos y Subclínicos</u> (8 aislamientos)		
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	87,5%	0,0%	12,5%
Ampicilina	87,5%	0,0%	12,5%
Cefalotina	0,0%	0,0%	100,0%
Eritromicina	50,0%	0,0%	50,0%
Tetraciclina	87,5%	0,0%	12,5%
Enrofloxacin	12,5%	87,5%	0,0%
Trimethoprima/ Sulfametoxazol	12,5%	0,0%	87,5%

DISCUSIÓN

La media del IIMC de 11,8 casos cada 100 vacas/año en riesgo obtenido en el presente estudio es considerada más fiable que la incidencia de 14,4 casos cada 100 vacas-año en riesgo reportada por Giannechini y col. (2002a) en base a muestras obtenidas en un mes en la Cuenca Lechera de la Región Litoral Oeste de Uruguay. Este valor fue menor a los reportados por otros autores en diferentes países desarrollados (Barkema y col., 1998; Bartlett y col., 2001; Milne y col., 2002; Olde Riekerink y col., 2008; Sviland y Wagge, 2002; Wolff y col., 2012). Los IIMC obtenidos en estos últimos estudios se encontraron entre 17 a 49 casos cada 100 vacas/año en riesgo. Las diferencias en los valores de incidencia están asociadas a los diferentes métodos de recolección de muestras (criterio de selección, estacionalidad del muestreo, método en la obtención de datos, definición de mastitis clínica), la ubicación geográfica (países diferentes, regiones diferentes, clima, condiciones medioambientales), y los sistemas de producción (estabulados o pastoriles, manejo, razas empleadas, nivel de producción). Por estas razones, los IIMC obtenidos en diferentes trabajos de investigación tienen que ser comparados con cuidado. Los resultados de los trabajos anteriormente señalados fueron obtenidos en siste-

mas de producción basados en estabulación de los animales, mientras que Uruguay produce en base a sistemas pastoriles; de acuerdo con Washburn y col. (2003) vacas en pastoreo presentan menos casos de MC. Estos autores obtuvieron 1,8 veces más casos clínicos en vacas en confinamiento que en vacas a pastoreo. Los sistemas pastoriles están asociados a un bajo nivel de producción de leche y se ha reportado que niveles de producción elevados están genéticamente asociados con baja resistencia a las mastitis (Emanuelson y col., 1988). Myllys y Rautala (1995) describieron que las infecciones de mastitis en vaquillonas eran más frecuentes en rodeos lecheros con producciones altas que en aquellos con producciones bajas de leche. La incidencia de casos clínicos obtenida en nuestro estudio fue similar a los 14,6 casos cada 100 vacas/año en riesgo citados por Lacy-Hulbert y col. (2006) en Nueva Zelanda, donde la producción lechera es basada en sistemas pastoriles.

La información acerca de los casos de mastitis clínica proveniente de 10 predios fue excluida del estudio, por la falta de fiabilidad en la recolección de los datos. Es inevitable en estudios llevados a cabo con una selección aleatoria de productores lecheros para determinar el IIMC, la pérdida de motivación que experimentarían

algunos productores durante el trabajo derivando en sub evaluación o no reconocimiento de casos de MC.

El riesgo de contraer infecciones intramamarias está incrementado en el peri parto, con la presentación de un importante número de casos durante la lactancia temprana (Persson Waller, 2000). El 59% de los casos de MC durante nuestro estudio fueron reportados en vacas dentro de los primeros 100 días de lactancia (33,6 % < 50 días de lactación). Como es sabido a fines del invierno y principios de la primavera se concentran las pariciones en establecimientos lecheros; mientras que durante el otoño e invierno, las condiciones de humedad, la presencia de barro y las bajas temperaturas incrementan el riesgo de daño de la piel de las tetas afectando el esfínter del pezón lo cual podría contribuir en el aumento del número de casos clínicos. Lo que explicaría la concentración de casos clínicos observada en este trabajo principalmente durante primavera (Setiembre-Diciembre) y en segundo lugar en el invierno (Junio-Setiembre).

También el riesgo en la incidencia de casos de MC aumenta con el número de lactancias. Valde y col. (2004) determinaron mayor riesgo acumulativo en el registro de tratamientos de mastitis en vacas con tres o más lactancias en los Países

Nórdicos. En el presente estudio, cerca del 70% de los casos clínicos fueron registrados en vacas de 3ra. lactancia o más, observándose el pico de casos clínicos en vacas de 5ta. lactancia (Figura 2). Los principales patógenos aislados de casos de MC fueron *S. aureus* (27,8%) y *Str. dysgalactiae* (18,1%). Hay una fuerte correlación en la incidencia de mastitis clínica causada por estos patógenos en asociación con altos RCST (Barkema et al, 1999). Esto concuerda con el alto nivel de la media del RCST (445 900 células/ml) determinada en los establecimientos seleccionados en nuestro estudio. Mientras, se obtuvo un bajo porcentaje en aislamientos de patógenos medioambientales como *Escherichia coli* (*E. coli*) (1.5 %) y *Str. uberis* (4 %). Goldberg y col. (1992) reportaron una baja incidencia en la colonización de la punta del pezón por parte de patógenos medioambientales de mastitis en vacas a pastoreo que en estabuladas, sugiriendo que la contaminación bacteriana de las tetas está minimizada en sistemas pastoriles extensivos, lo cual es el caso de los sistemas de producción lechera de Uruguay. En este estudio el 35% de los cultivos bacterianos fueron negativos para los casos de MC, un porcentaje similar (32,5%) fue reportado por Giannechini y col. (2002a). Zorah y col. (1993) en revisión realizada acerca de las fallas en el aislamiento de patógenos en muestras de leche, sugieren las si-

güentes razones: cura bacteriológica espontánea, la presencia de una muy baja cantidad de bacterias viables en la muestra, inhibición de las bacterias por presencia de antibióticos, y continuación de la muerte bacteriana durante el transporte de la muestra. La elección en la técnica de cultivo bacteriológico influencia de gran manera en el número de falsos negativos en los aislamientos (Schukken y col., 1989; Sol y col., 2002; Zecconi y col., 1997). El incremento en el tiempo de almacenamiento de muestras congeladas resulta en la disminución del número de muestras conteniendo *E. coli* (Schukken y col., 1989).

La prevalencia de casos de MSC determinada en el presente estudio (53,4% vacas afectadas, 27,5% cuartos afectados) fue similar a los resultados obtenidos por Giannechini y col. (2002a) en el área lechera del Litoral Oeste, donde, la prevalencia fue del 52,4% de vacas afectadas y 26,7% de cuartos afectados. Esta prevalencia es alta con respecto al 31% obtenido por Pitkälä y col. (2004) en Finlandia y 29% informado por Plozza y col. (2011) en Australia. Esto se debe a que los países anteriormente mencionados cuentan con programas nacionales de control de mastitis. En Uruguay los programas de control de mastitis son implementados por los veterinarios de la profesión liberal y algunos servicios de extensión de las

plantas lecheras a nivel de los establecimientos. Los cuales incluyen medidas tradicionales como chequeo periódico de máquina de ordeño, sellado de los pezones, detección temprana de mastitis clínica y tratamiento, secado con antibióticos, eliminación de los animales con mastitis crónica. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo se puede establecer que estas medidas no son implementadas adecuadamente en un alto porcentaje de establecimientos.

Staphylococcus aureus es el principal patógeno aislado en el presente estudio como en la evaluación realizada por Giannechini y col. (2002a), como fue mencionado anteriormente la alta prevalencia de patógenos contagiosos se correlaciona con un alto RCST (Barkema y col., 1999). Los estratos en los cuales los establecimientos seleccionados se categorizaron de acuerdo al tamaño del rodeo reflejaron la capacidad de inversión y del nivel productivo de los mismos. En lo que respecta a parámetros de salud de la ubre (prevalencia de MSC, media del RCST, media del RCSLC) los rodeos con más de 200 vacas en ordeño eran los de mejores índices. En estos se encontraron que los porcentajes de aislamiento de *S. aureus* y *Str. agalactiae* con respecto a los establecimientos de los otros estratos fueron los más bajos (Cuadro 7). Cuando la prevalencia de

MSC declina, esta muchas veces va acompañada por un cambio en importancia relativa y absoluta de los principales patógenos de mastitis. Pitkälä y col. (2004) reportaron bajo RCST (132 000 células/ml) en Finlandia, donde a través de un programa de control se ha obtenido un continuo descenso en la prevalencia de los casos de MSC, acompañado en una disminución de la incidencia de los patógenos contagiosos (*S. aureus* y *Str. agalactiae*), mientras que los aislamientos de SCN se han convertido en los más prevalentes.

La producción de β -lactamasas es el mecanismo más común de resistencia a la penicilina en los estafilococos, y se encontró que el 100% de los aislamientos de *S. aureus* y SCN resistentes a este agente antimicrobiano eran productores de la enzima. Los porcentajes de resistencia a la penicilina hallados en los aislamientos de *S. aureus* de los casos de MC (39,1%) y MSC (36%), fueron menores aunque no de significación en relación a lo obtenido (47,6%) en el estudio realizado en la región litoral oeste de Uruguay (Gianneechini y col., 2002). La resistencia a penicilina de los aislamientos de SCN (MC 29,4%; MSC 33,3%) fue similar (27%) a la descrita por Gianneechini y col. (2002). En este trabajo se determinó por primera vez la resistencia a la asociación de Amoxicilina + Ácido clavulánico en *S. aureus* y SCN

aislados de casos de mastitis en Uruguay y no fueron hallados aislamientos de *S. aureus* o SCN resistentes a la meticilina. Esto podría sugerir que la resistencia a esta asociación antimicrobiana se debería a una sobre producción de β -lactamasas de acuerdo a lo citado por Brakstad y Maeland (1997). Se encontró un sensible aumento en la resistencia de *S. aureus* (MC 13,1%; MSC 10,5%) y SCN (MC 17,6% y MSC 5,2%) a eritromicina cuando comparamos el nivel de resistencia determinado en aislamientos de *S. aureus* (3%) y SCN (0%) obtenidos en la región litoral oeste de Uruguay (Gianneechini et al., 2002). La asociación de amoxicilina + Acido clavulánico y antibióticos de la familia de los macrólidos son utilizados en Uruguay como alternativa a la penicilina, en el tratamiento de los casos de mastitis debida a infecciones por *S. aureus* y SCN resistentes a esta última. La venta de estos agentes antimicrobianos es libre y no siempre los tratamientos son llevados a cabo con la supervisión de un veterinario. Lo cual se ve reflejado en el aumento de la resistencia de los aislamientos del género *Enterococcus* a la penicilina y eritromicina (12,5% y 50%) con respecto a lo obtenido por Gianneechini y col. (2002) para estos antimicrobianos (7% y 4,6%). La importancia de este género radica en que los enterococos integran el grupo de bacterias indicadoras que es sugerida su inclusión en los

programas de monitoreo de resistencia antimicrobiana (Caprioli y col., 2000). Los aislamientos del género *Streptococcus* siguen manteniendo una altísima sensibilidad al grupo de antibióticos β -lactámicos (100%) en nuestro estudio, al igual que la sensibilidad reportada en estreptococos aislados de casos de mastitis en la región Litoral Oeste por Giannechini y col (2002).

En conclusión, en Uruguay se mantiene un alto nivel de prevalencia de casos de mastitis subclínica en el rodeo lechero. *Staphylococcus aureus* es confirmado como el principal agente etiológico en casos clínicos y subclínicos, presentando un alto porcentaje de aislamientos resistentes a penicilina con disminución en la sensibilidad a antibiótico usados como alternativos. Esto hace necesario una profundización en la caracterización de este patógeno en futuros estudios para determinar las estrategias más adecuadas para su control.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Raquel Bianco y al equipo de extensión de CONAPROLE por haber hecho posible la coordinación para la visita y toma de muestras en los tambos seleccionados. El trabajo fue realizado dentro del proyecto FPTA 94 con fondos otorgados por el Instituto Nacional

de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarestrup FM, Jensen NE. (1998). Development of penicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. *Microb Drug Resistance*, 4:247-256.
2. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Benedictus G, Brand A. (1999). Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 82:1643-1654.
3. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJGM, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 81:411-419.
4. Bartlett PC, Agger JF, Houe H, Lawson LG. (2001). Incidence of clinical mastitis in Danish dairy cattle and screening for non-reporting in a passively collected national surveillance system. *Prev Vet Med*, 48:73-83.
5. Bartlett PC, Miller GY, Lance SE, Heider LE. (1992). Clinical mastitis and intramammary infections on Ohio dairy farms. *Prev Vet Med*, 12:59-71.
6. Brakstad OG, Maeland JA. (1997). Mechanisms

- of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*, 105:264-276.
7. Bramley AJ, Cullor JS, Erskine RJ, Fox LK, Harmon RJ, Hogan JS, Nickerson SC, Oliver SP, Smith KL, Sordillo LM. (1996). Current concepts of bovine mastitis. 4th ed. Madison, The National Mastitis Council. 64 pp.
 8. Caprioli A, Busani L, Martel J L, Helmuth R. (2000). Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *Int J Antimicrob Agents* 14:295–230.
 9. CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition; CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 99 pp.
 10. DIEA 2012. Anuario Estadístico. Dirección de Estadísticas Agropecuarias. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo-Uruguay.
 11. Emanuelson U, Funke H. (1991). Effect of milk yield on relationship between bulk milk somatic cell count and prevalence of mastitis. *J Dairy Sci* 74:2479-2483.
 12. Emanuelson U, Danell B, Philipsson J. (1988). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J Dairy Sci* 71:467-476.
 13. Farver TB. (1987). Disease prevalence estimation in animal populations using two-stage sampling designs. *Prev Vet Med* 5:1-20.
 14. Franklin A, Wierup M. (1982). Evaluation of the sensitive method adapted for antimicrobial drug susceptibility testing in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 7:447-454.
 15. Giannechini RE, Concha C, Franklin A. (2002). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. *Acta Vet Scand* 43:31-41.
 16. Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J. (2002a). Occurrence of clinical and sub clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Vet Scand* 43:221-230.
 17. Goldberg JJ, Wildman EE, Pankey JW, Kunkel JR, Howard DB, Murphy BM. (1992). The influence of intensively managed rotational grazing, traditional continuous grazing, and confinement housing on bulk tank milk quality and udder health. *J Dairy Sci* 75:96-104.
 18. Hogan JS, Gonzalez RN, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW, Smith KL. (1999). Laboratory handbook on bovine mastitis. Natl. Mastitis Council, Inc., Madison, WI, USA.

19. Lee J (2003). Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol* 69:6489-6494
20. International Dairy Federation. (1987). Bovine mastitis. Definitions and guidelines for diagnosis. *Bull Int Dairy Federation*, 211: -8.
21. Kelton DF, Lissemore KD, Rochelle EM. (1998). Recommendation for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *J Dairy Sci* 81:2502-2509.
22. Lacy-Hulbert J, Lopez-Benavides M, Williamson J, Summers E, Pryor S, Cursons R. (2006). Ecology of *Streptococcus uberis* within a pastured-based dairying system. In: 45th Annual Meeting Proceedings, National Mastitis Council, Tampa, FL, January 22 – 25, pp. 134 - 144.
23. Milne MH, Barrett DC, Fitzpatrick JL, Biggs AM. (2002). Prevalence and etiology of clinical mastitis on dairy farms in Devon. *Vet Rec* 151:241-243.
24. Milton S. (1992). *Statistical methods in the biological and health sciences*. 2nd Ed. New York, McGraw-Hill.
25. Myllys V, Rautala H. (1995). Characterization of clinical mastitis in primiparus heifers. *J Dairy Sci* 78: 38-545.
26. Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci* 91:1366-1377.
27. Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Stryhn H. (2007). The effect of season on Somatic Cell Count and the incidence of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 90:1704-1715.
28. OPYPA (2004). *Anuario. Oficina de Planeamiento y Producción Agropecuaria*. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Montevideo-Uruguay.
29. Persson Waller K. (2000). Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Biology of the mammary gland*. in *Advances in experimental medicine and biology*: Vol. 480. Eds. J. A. Mol and R. A. Glegg., Kluwer Academic Plenum Publishers. New York. Pages 231-245.
30. Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001-Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci* 87:2433-2441.
31. Plozza K, Lievaart JJ, Potts G, Barkema, HW. (2011). Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. *Aust Vet J* 89:41-46.
32. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR.

- (1994). Clinical Veterinary Microbiology. London, Mosby-Year Book Europe Limited. 648 p.
33. SAS Institute (1999). OnlineDoc[®], Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC.
34. Schukken YH, Grommers FJ, Smit JA, van de Geer D, Brand A. (1989). Effect of freezing on bacteriological culturing of mastitis milk samples. *J Dairy Sci* 72:1900-1906.
35. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 34:475-491.
36. Sol J, Sampimon OC, Hartman E, Barkema HW. (2002). Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from sub clinical mastitis samples. *Vet Microbiol* 85:241-249.
37. Sviland S, Waage S. (2002). Clinical bovine mastitis in Norway. *Prev Vet Med* 54:65-78.
38. Valde JP, Østerås O, Simensen E. (2005). Description of herd level criteria for good and poor udder health in Norwegian dairy cows. *J Dairy Sci* 88:86-92.
39. Valde JP, Lawson LG, Lindberg A, Agger JF, Saloniemi H, Østerås O. (2004). Cumulative risk of bovine mastitis treatments in Denmark, Finland, Norway and Sweden. *Acta Vet Scand* 45:201-210.
40. Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol* 144:166-171.
41. Washburn SP, White SL, Green JT, Benson GA. (2002). Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *J Dairy Sci* 85:105-111.
42. Wolff C, Espetvedt M, Ann-Kristina L, Rintakoski S, Egenvall A, Lindberg A, Emanuelson U. (2012). Completeness of the disease recording systems for dairy cows in Denmark, Finland, Norway and Sweden with special reference to clinical mastitis. *Vet Res* 8:1131-142.
43. Zecconi A, Piccinini R, Zeponi A, Ruffo G. (1997). Recovery of *Staphylococcus aureus* from centrifuged quarter milk samples. *J Dairy Sci* 80:3858-3063.
44. Zorah KT, Daniel RCW, Frost AJ. (1993). Detection of bacterial antigens in milk samples from clinical cases of bovine mastitis in which culture is negative. *Vet Rec* 132:208-210.