

APORTACION AL ESTUDIO DE LAS MAMITIS BOVINAS DE TIPO SUBCLINICO

Por J. Rojo Vázquez,
M. Fernández Díez y
J. M. Aller Gancedo

INTRODUCCION

Las mamitis bovinas constituyen uno de los problemas patológicos de mayor importancia en la explotación del ganado lechero a nivel mundial, debido fundamentalmente a sus repercusiones económicas e higiénico-sanitarias. Por ello, esta enfermedad viene teniendo gran interés y motivando abundante bibliografía acerca del estudio de sus múltiples aspectos.

Entre los diversos tipos y formas de manifestación de las mamitis destacan los procesos subclínicos, cuya importancia radica en que, en ausencia de signos generales y locales evidentes, existe infección en la leche, con el riesgo de que esta infección se haga clínicamente manifiesta en una próxima lactación; además, existe un incremento celular consecuencia de la infección y una ligera merma de la secreción glandular.

Por otra parte, su propio carácter subclínico determina el que cursen insidiosamente, dificultando en gran manera su control y motivando su extraordinaria frecuencia.

La mama alberga diversos microorganismos, sobre todo estafilococos y estreptococos, que, en relación con diversos factores (falta de higiene, ordeño defectuoso, etc.), pueden producir la enfermedad clínica o subclínica. En cualquiera de los casos, pueden aislarse con distinta frecuencia, lo que, unido a otros determinantes, como aparición de resistencias, condiciona la terapéutica a aplicar.

An. Fac. Vet. León, 1977, 23, 43-56.

De aquí la necesidad de realizar exámenes periódicos sobre la leche, a fin de determinar la flora bacteriana que interviene en las mamitis subclínicas y su comportamiento «in vitro» frente a diversos antimicrobianos. De esta manera, el clínico podrá ser orientado sobre la conveniencia de aplicar un determinado producto, bien en la terapéutica del proceso o bien en el momento del secado de la ubre.

Este trabajo tiene por objeto conocer la prevalencia de las distintas especies de gérmenes presentes en la leche bovina con mamitis subclínica, así como su comportamiento «in vitro» frente a diversos antimicrobianos, como una aportación más para el control de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de leche. Se tomaron 464 muestras de leche, de 15-20 ml cada una, recogidas directamente de cada cuarterón durante el ordeño de la noche, en frascos estériles de tapón roscado, de un total de 116 vacas en plena lactación y pertenecientes a diversas explotaciones de la provincia de León y alrededores de la capital.

Los animales muestreados eran de distintas razas y edades, la mayor parte de los cuales no habían padecido mamitis con anterioridad; cuando se dió esta circunstancia, la recogida tuvo por finalidad conocer si se había producido su curación bacteriológica. En el momento de la recogida se anotaron los datos relativos al número y época de las lactaciones, edad y raza de los animales, padecimiento anterior de mamitis clínica y caracteres macroscópicos de la leche.

Todos los animales muestreados eran ordeñados a máquina.

Para el traslado de las muestras al laboratorio se utilizó una nevera portátil.

Siembras y tipificación bacterianas. Las siembras se realizaron a partir de leche sin incubación ni centrifugación previas. Para el aislamiento inicial se emplearon los siguientes medios selectivos: agar de McConkey para enterococos y enterobacterias; agar S-110 para estafilococos; y agar con triptosa más sangre ovina al 6 % y azida sódica para estreptococos y corynebacterias (para algunas muestras se usó el medio de Edwards con sangre ovina al 6 %). La incubación se realizó a 37° C.

La resiembra posterior se efectuaron en los medios habituales de laboratorio.

La identificación de las cepas bacterianas se realizó de acuerdo con los métodos y técnicas consignados en los manuales de bacteriología, haciéndose cita especial de los de Baird-Parker y Lancefield.

Recuento celular. Se realizó por el método de Breed, tiñéndose las preparaciones según el método de WILLIAMS⁴⁴. Se consideraron como procedentes de mamitis subclínicas todas aquellas leches que tuvieron un número celular igual

o superior a 500.000 / ml, valor aceptado por los diversos investigadores como mínimo de positividad.

Antibiogramas. Se realizaron por el método disco-placa, según la técnica de BAUER y col.⁴, previa incubación de las cepas en caldo con triptosa, ajustándose la turbidez de la suspensión al patrón número 1 de McFarland y realizándose la siembra final mediante hisopo en agar de MUELLER y HINTON. La lectura se hizo entre las 24 y 48 horas de incubación de las placas a 37° C, en relación con el grado de desarrollo del cultivo.

Los antimicrobianos empleados y su concentración fueron: ampicilina, 10 µg; cefaloridina, 30 µg; cloranfenicol, 30 µg; cloxacilina, 1 µg; eritromicina, 15 µg; estreptomycin, 10 µg; furadantín, 300 µg; gentamicina, 10 µg; kanamicina, 30 µg; neomicina, 30 µg; novobiocina, 30 µg; penicilina, 10 U; tetraciclina, 30 µg; y trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), 25 µg.

Las cepas se caracterizaron como sensibles, ligeramente sensibles y resistentes, según el criterio de BAUER y col.⁴ y de los Laboratorios Merieux (s. a.).

Todos los reactivos y medios empleados, salvo SXT y medio de Edwards (Oxoid), fueron suministrados por la casa Difco.

RESULTADOS

De los 116 animales muestreados, 60 (51,72 %) resultaron con mamitis subclínica; su distribución, de acuerdo con el número de la lactación, fue la siguiente: primera lactación, 7 vacas (20 %); segunda, 11 (50 %); tercera, 15 (71,4 %); cuarta, 10 (58,8 %); quinta, 7 (87,5 %); sexta, 3 (75 %); séptima, 1 (50 %); ocatava, 1 (50 %); novena, 3 (100 %); no se conocía, 2. De acuerdo con la época de lactación, se distribuyeron como sigue: primer mes, 4 vacas (33,3 %); segundo, 5 (41,6 %); tercero, 5 (33,3 %); cuarto, 7 (43,7 %); quinto, 6 (66,6 %); sexto, 5 (83,3 %); séptimo, 5 (83,3 %); octavo, 6 (66,6 %); noveno, 1 (33,3 %); onceavo, 4 (80,0 %); doceavo, 6 (100 %); treceavo, 1 (100 %); no se sabía, 5.

Se obtuvieron 112 cuarterones positivos (46,60 %), lo que representó el 24,13 % del total de los cuarterones muestreados; 3 vacas (5 %) presentaron mamitis subclínica en los cuatro cuarterones; 12 (20 %), en tres; 19 (31,66 %), en dos; y 26 (43,33 %), en un solo cuarterón.

La distribución de los cuarterones positivos, de acuerdo con los valores del recuento celular, fue como sigue: de 500.000 a 1 millón de células por ml, 42 cuarterones; de 1 a 2 millones, 25; de 2 a 3 millones, 14; de 3 a 4 millones, 11; de 4 a 5 millones, 5; de 5 a 6 millones, 5; de 6 a 7 millones, 2; de 7 a 8 millones, 1; de 8 a 9 millones, 1; de 13 a 14 millones, 1; de 14 a 15 millones, 1; de 22 a 23 millones, 1; de 23 a 24 millones, 1; de 28 a 29 millones, 1; y de 81 a 82 millones, 1.

53 vacas (88,33 % de las vacas con mamitis subclínica y 45,68 % del total de las muestreadas) albergaban gérmenes en la leche, esto es, presentaban

infección; 96 cuarterones (85,71 % de los 112 celularmente positivos) manifestaron la infección y 16 (14,29 %) dieron lugar a siembras estériles.

El porcentaje de cuarterones con una sola especie bacteriana (51,61 %) fue superior a los que tuvieron dos (29,03 %) y tres (18,27 %), que fue el número máximo de especies aisladas por cuarterón.

49 vacas (92,45 % de las vacas con infección) albergaban estafilococos en la leche; de ellas, 23 (43,4 %) presentaron infección pura y 26 (49 %) infección mixta.

De 78 cuarterones (81,25 % de los cuarterones infectados) se aislaron estafilococos; en 44 (45,8 %), solos y en 34 (35,4 %), con otros gérmenes.

Se aislaron 174 cepas, cuya distribución fue la siguiente: *S. aureus**, 31 (17,81 %); *S. epidermidis*, 69 (39,65 %); *Str. agalactiae*, 7 (4,02 %); *Str. pyogenes*, 2 (1,44 %); grupo D, 5 (2,78 %); *Str. uberis*, 1 (0,57 %); estreptococos no clasificados, 10 (5,74 %); *Corynebacterium****, 10 (5,74 %); *Micrococcus*, 3 (1,72 %); *E. coli* y otros gram-negativos, 27 (15,51 %); cocos gram-positivos que no llegaron a tipificarse por perderse en las resiembras, 9 (5,17 %).

El resultado de los antibiogramas practicados sobre los distintos géneros y/o especies se muestra en los cuadros 1, 2, 3, 4 y 5.

Todas las cepas de *S. aureus* resultaron sensibles a eritromicina y furadantín; el 96,3 % a cefaloridina y SXT; y el 92 % a dicloxacilina, novobiocina y gentamicina. Los mayores porcentajes de cepas resistentes correspondieron a ampicilina (48 %), estreptomycin (51,85 %) y penicilina (55,55 %). Frente al resto de los antibióticos, los porcentajes de cepas sensibles estuvieron comprendidos entre el 77,77 % para el cloranfenicol y el 88,89 % para neomicina.

Prácticamente todas las cepas del género *Staphylococcus* fueron sensibles a eritromicina, cefaloridina, furadantín, gentamicina, neomicina y SXT (95-97 %). Los porcentajes más altos de cepas resistentes se obtuvieron frente a penicilina (40,57 %) y estreptomycin (44,92 %). Frente al resto de los antibióticos, los porcentajes de cepas sensibles estuvieron comprendidos entre el 76 % para ampicilina y 86 % para cloranfenicol.

Casi todas las cepas del género *Streptococcus* fueron resistentes a estreptomycin (91,30 %) y un 70 % de las mismas lo fueron a kanamicina; por el contrario, todas las cepas fueron sensibles a eritromicina y en 92,3 % lo fueron a ampicilina y cefaloridina. El porcentaje de cepas sensibles a penicilina y furadantín fue del 82,6 % y 84,6 %, respectivamente, siendo ligeramente inferior para cloranfenicol (78,2 %). Para el resto de los antimicrobianos, el porcentaje de cepas sensibles se mantuvo aproximadamente entre el 50 % para neomicina y el 74 % para gentamicina.

Todas las cepas del género *Corynebacterium* fueron sensibles a penicilina,

* Sólo se consideraron *S. aureus* las cepas coagulasa positivas.

** La mayor parte *C. bovis*.

cefaloridina, gentamicina y ampicilina y el 90 % de ellas lo fueron a cloranfenicol y neomicina; casi todas las cepas (90 %) fueron resistentes a dicloxacilina, el 60 % lo fueron a novobiocina, cloxacilina y furadantín y el 50 % frente a tetraciclina. Para el resto de los antibióticos, los porcentajes de cepas sensibles estuvieron comprendidos entre el 60 % para estreptomycin y 70 % para kanamicina.

A fin de poder comparar nuestros datos con los de aquellos investigadores que los comunican englobados, se ha considerado conjuntamente el comportamiento de todos los gérmenes gram-positivos. La mayoría de las cepas han sido sensibles a cefaloridina (96,94 %), eritromicina (92,83 %), gentamicina (90,32 %) y algunas menos a ampicilina (89,49 %). Solamente un 62,64 % de las cepas fue sensible a cloxacilina, obteniéndose en cambio porcentajes de sensibilidad satisfactorios frente a penicilina (80,67 %), cloranfenicol (85,06 %), SXT (81,31 %) y neomicina (79,36 %). Los mayores porcentajes de cepas resistentes correspondieron a dicloxacilina (50,43 %) y estreptomycin (58,74 %).

DISCUSION

Como se ha señalado anteriormente, el 51,72 % de las vacas muestreadas resultaron con mamitis subclínica. La menor frecuencia correspondió a las vacas de primera lactación (20 %), siendo igual o superior al 50 % en las vacas de las restantes lactaciones. Por otra parte, la menor frecuencia de vacas con mamitis subclínica correspondió a las que se encontraban en los cuatro primeros meses de lactación, siendo generalmente mucho más alta en las restantes.

El mayor número de muestras (37,5 %) correspondió a un contenido celular comprendido entre 500.000 y 1 millón de células / ml; a partir de esta última cifra, el número de cuarterones positivos fue disminuyendo a medida que aumentaba el contenido celular. Los máximos porcentajes de muestras positivas se correspondieron con valores de hasta 6 millones de células / ml; por encima de esta cifra sólo tuvimos 8 muestras (7,1 %), entre las cuales hubo tres que estuvieron comprendidas entre los 22 y 30 millones y 1, excepcionalmente, estuvo comprendida entre 81 y 82 millones. Por tanto, la mamitis subclínica parece estar vinculada a valores celulares relativamente altos, aunque en algunos casos pueden llegar a ser muy importantes.

Hemos observado que predominaron las vacas con un sólo cuarterón celularmente positivo y que el número de animales disminuyó a medida que aumentó el número de cuarterones afectados.

El 45,68 % de las vacas muestreadas y el 88,33 % de las vacas con mamitis subclínica albergaban gérmenes en la ubre. Por tanto, casi siempre existió una respuesta celular ante la presencia de microorganismos en la mama, pero pudiendo faltar en relación con diversos factores o microorganismos, tal como señala FORBES¹⁵.

Se ha comprobado que en los cuarterones con mamitis subclínica y con infección suele predominar una sola especie bacteriana, siendo menor el número y porcentaje de muestras a medida que aumenta el número de especies bacterianas aisladas.

Gran parte de los autores consultados señalan aproximadamente un 50 % de incidencia de mamitis subclínica en los bovinos^{2,3,5,9,14,30,38} que es un valor muy próximo al obtenido por nosotros (51,72 %); sin embargo, también se han señalado porcentajes superiores³⁷ e inferiores^{17,24,41}.

El porcentaje de cuarterones mamíticos señalado por algunos autores es generalmente más bajo que el obtenido por nosotros (24,13 %). HEEVER y TURNER²⁰ señalaron un 12,4 %; en Holanda, un 11,7 % (Stichying Gezondheidszorg voor Dieren, 1976); HAVELKA¹⁸, un 22,32 %. Sin embargo, KOH SENG HUAT y JOSEPH³⁰ comunicaron un 28,71 %, ligeramente superior al nuestro.

El 85,71 % de los cuarterones celularmente positivos tenía infección, representando el 20,19 % del total de los muestreados; el primer valor se sitúa muy por encima del dado por HOWELL y col.²³, y el segundo fue ligeramente superior al 19 % señalado por HUNTER y JEFFREY²⁴ y MADSEN y col.²⁹, y al 19,8 % dado por LOOSMORE y col.²⁸.

El 45,65 % de las vacas muestreadas por nosotros estaban infectadas, siendo un porcentaje notablemente superior al 28,71 % señalado por GLAWISCHNIG y col.¹⁶.

La mayoría de los aislamientos señalados por los diferentes autores corresponde a estafilococos y estreptococos, a los que pueden asociarse, principalmente, *Corynebacterium bovis* y algunos gérmenes gram-negativos. WILSON⁴⁵ afirmó que los procesos subclínicos están enteramente asociados a la presencia de estafilococos y estreptococos, en tanto que BURGISSER⁷ señaló que lo estaban en un 97 % y GLAWISCHNIG y col.¹⁶ en un 98,79 %. Sin embargo, corrientemente se dan porcentajes comprendidos entre un 80-90 %, habiendo quedado en nuestro caso por debajo de estos valores, con 71,83 %, aunque llegando al 79,9 % cuando se incluyeron la totalidad de los gram-positivos.

Respecto a la frecuencia del aislamiento de los diversos géneros y especies, predominan los autores que señalan una mayor prevalencia de estafilococos^{9, 17, 23, 24, 28, 30, 31, 35, 37, 40} en relación con la de los estreptococos^{7, 18, 25}. Al igual que todos ellos, nosotros también obtuvimos un porcentaje más elevado de cepas de estafilococos (57,4 %).

Entre los estreptococos aislados, *Str. agalactiae* fue el más frecuente (28 %). Asimismo, casi todos los autores consultados^{30,42} coinciden en señalar su mayor frecuencia.

El hecho de aislarse durante los últimos años un mayor porcentaje de estafilococos que de estreptococos en las muestras de leche procedentes de mamitis clínica y subclínica, pudiera deberse al amplio uso de la penicilina y

su mayor eficacia frente a los segundos, o bien estar en relación con su mayor difusión en la naturaleza.

La implicación de *S. aureus* y *Str. agalactiae* en los procesos mamíticos clínicos y subclínicos no ha sido puesta en duda por ningún autor; sin embargo, la de *Str. pyogenes* no parece ser demasiado constante. Los estreptococos del grupo D son considerados generalmente como contaminantes, pero capaces de determinar ocasionalmente un proceso patológico³⁶; por otra parte, CULLEN⁸ y BURGISSER⁷ han corroborado la ubicuidad de *Str. uberis*.

S. epidermidis y *C. bovis* también han sido implicados en procesos clínicos, aunque parece que en mayor dependencia con otros gérmenes y circunstancias ambientales; nosotros los hemos aislado exclusivamente en algunas muestras, estando de acuerdo con FORBES¹⁵, EVANS¹¹ y HOLMBERG²¹ en considerarlos ocasionalmente como responsables de la enfermedad. No obstante, BRAMLEY y col.⁶ afirmaron que, a pesar de su frecuente aislamiento, *C. bovis* no es causa de enfermedad clínica de la mama, aunque sí determinante de una gran reacción celular que, por otra parte, no hemos podido comprobar en nuestro estudio.

E. coli también ha sido señalado como germen contaminante, junto con otras enterobacterias, así como causante de procesos clínicos; el hecho de que pueda determinar mamitis clínica, permite considerar su presencia posible en las subclínicas, aunque su aislamiento en nuestro estudio fue más bien escaso.

A pesar de todo lo expuesto anteriormente, pensamos con PARKER³³ que es difícil o imposible interpretar el significado de las bacterias en la leche, sin evidencia clínica de la enfermedad.

De las 21 vacas muestreadas que habían padecido con anterioridad mamitis clínica en uno o más cuarterones, 7 de ellas no manifestaron infección y 6 de éstas fueron también negativas celularmente; de las 14 restantes, 10 evidenciaron contaje celular e infección usuales, mientras que 3 mostraron una respuesta celular y bacteriológica muy acusada y 1 no presentó positividad celular. Como afirmó BRANDER⁵, el fallo en la curación bacteriológica es debido a que el caso clínico no es tratado teniendo en cuenta su agente etiológico.

En relación con la segunda parte del tema, hemos revisado algunos trabajos de publicación más reciente, que hacen referencia al comportamiento «in vitro» de cepas gram-positivas frente a diversos antimicrobianos, sobre todo estafilococos (particularmente *S. aureus*) y estreptococos, aisladas de procesos clínicos y subclínicos.

Los porcentajes de cepas de estreptococos sensibles a los distintos antimicrobianos fueron, globalmente, inferiores a los de las cepas de estafilococos y *S. aureus*. Salvo frente a penicilina y ampicilina, con porcentajes de sensibilidad elevados, y a eritromicina, cefaloridina y cloranfenicol, con porcentajes similares, frente al resto de los antimicrobianos, los valores fueron mucho más altos para las cepas de estafilococos, llegando a ser la diferencia mucho más

patente en el caso de estreptomina, a la que resultaron sensibles el 53,06 % de las cepas de estafilococos y el 8,68 % de las de estreptococos, así como el de kanamicina, a la que fueron sensibles el 82,59 % y el 30,47 %, respectivamente.

Es interesante destacar, por ser un antibiótico muy empleado en el secado de la mama, que el porcentaje de sensibilidad de las cepas de estreptococos a cloxacilina (65,36 %) no fue tan alto como cabría esperar, siendo bastante más alto para las cepas de estafilococos (82,6 %) y de las de *S. aureus* (88,45 %) en particular.

Algo similar sucedió frente a dicloxacilina, a la que el 84,84 % de las cepas de estafilococos y el 92 % de las de *S. aureus* se mostraron sensibles, mientras que sólo lo fueron el 53,8 % de las de estreptococos.

Es difícil discutir nuestros resultados con los de otros autores^{7,12,13,19,22,26,30,32,34,35,42,43} debido a la gran disparidad de los mismos; si bien concuerdan con los de la mayoría, también existen discrepancias en mayor o menor grado.

En el caso de *S. aureus*, la diferencia más acusada en los porcentajes de sensibilidad respecto a los datos suministrados por otros autores correspondió a ampicilina, frente a la que nosotros obtuvimos aproximadamente la mitad de sus valores, y a penicilina, estreptomina y cloranfenicol, aunque con menos diferencia. Por el contrario, frente a tetraciclina obtuvimos un porcentaje de sensibilidad netamente superior a los referidos por algunos autores. A gentamicina y cefaloridina, la mayoría de las cepas fueron sensibles, pero no poseemos datos de comparación.

Respecto a las cepas de estreptococos, las mayores diferencias correspondieron a novobiocina, a la que obtuvimos un porcentaje de sensibilidad netamente inferior a otros autores, y a neomicina, a la que se han señalado porcentajes escasos, en tanto que nosotros obtuvimos un 52,18 % de sensibilidad. Frente a gentamicina hemos observado la diferencia más acusada, ya que nosotros obtuvimos un 73,90 % de cepas sensibles y McDONALD y McDONALD³² señalaron que todas sus cepas fueron resistentes.

Varios autores^{1,26,34} expresaron sus resultados referidos al total de los gérmenes gram-positivos. Al comparar sus datos con los nuestros, observamos que los porcentajes de sensibilidad fueron muy próximos frente a nitrofurantoina, pero frente a penicilina, estreptomina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina y gentamicina resultaron muy superiores en nuestro estudio, especialmente para eritromicina, neomicina y penicilina. Es reseñable la buena acción de la cefaloridina, ampicilina y SXT, así como el que la cloxacilina y dicloxacilina hayan quedado por debajo de lo esperado.

El comportamiento de nuestras cepas frente a gentamicina y estreptomina fue semejante al señalado por HOUESHELL (cit. por ANGULO TOLEDO¹); sin embargo, frente a penicilina resultaron netamente más sensibles, a pesar del escaso porcentaje de sensibilidad obtenido.

RESUMEN

A fin de conocer la flora bacteriana presente en la leche de vacas con mastitis subclínica, así como su comportamiento «in vitro» frente a diversos antimicrobianos, se han estudiado 464 muestras de 116 vacas en plena lactación pertenecientes a diversas explotaciones de los alrededores de León.

De las 116 vacas muestreadas, 60 (51,72 %) resultaron con mastitis subclínica, siendo positivos 112 cuarterones (40,60 %) y predominando las vacas con un solo cuarterón positivo. Se observó una menor frecuencia de mastitis subclínica en las vacas que estaban en su primera lactación y en las que se encontraban en los cuatro primeros meses de lactación.

De las vacas con mastitis subclínica, 53 (88,33 %) albergaban gérmenes en la leche; de los cuarterones positivos, 96 (85,71 %) presentaban infección, siendo tres el máximo número de especies bacterianas aisladas por cuarterón y predominando los aislamientos de una sola especie bacteriana.

Se aislaron 174 cepas: *S. aureus*, 31 (17,81 %); *S. epidermidis*, 69 (39,65 %); *Str. agalactiae*, 7 (4,02 %); *Str. pyogenes*, 2 (1,44 %); grupo D, 5 (2,78 %); *Str. uberis*, 1 (0,57 %); estreptococos no clasificados, 10 (5,74 %); *Corynebacterium*, 10 (5,74 %); *Micrococcus*, 3 (1,72 %); *E. coli* y gram-negativos, 27 (15,51 %); cocos gram-positivos sin tipificar perdidos en las resiembras, 9 (5,17 %).

Aunque con apreciables diferencias de sensibilidad entre los estafilococos y estreptococos, así como de los otros gérmenes, las cepas gram-positivas aisladas manifestaron globalmente el siguiente comportamiento «in vitro» frente a los diversos antimicrobianos ensayados: cefaloridina, 96,94 % de cepas sensibles; eritromicina, 92,83 %; gentamicina, 90,32 %; ampicilina, 89,49 %; cloranfenicol, 85,06 %; trimetoprim-sulfametoxazol, 81,31 %; penicilina, 80,67 %; neomicina, 79,26 %; furadantín, 73,89 %; tetraciclina, 70,76 %; novobiocina, 65,01 %; cloxacilina, 62,64 %; kanamicina, 61 %; dicloxacilina, 49,55 %; y estreptomina, 41,24 %.

SUMMARY

In order to know the bacterial flora present in cows milk with subclinic mastitis and its «in vitro» behaviour against several antimicrobial agents, we have studied 464 samples from 116 cows in full lactation from farms near Leon.

Sixty cows out of the 116 sampled (51.72 %) had subclinic mastitis, being positive 112 quarters (46.6 %) and cows with only one quarter positive being the most frequent. We noticed a lower frequency of subclinic mastitis in cows in their first lactation and in those that were in their first 4 months of lactation.

Fifty three of the cows with subclinic mastitis (88.33 %) had microorganisms in their milk and 96 of the positive quarters (85.71 %) had infection,

isolating only one species in most of the cases, with a maximum of three species per quarter.

174 strains have been isolated: *S. aureus*, 31 (17,81 %); *S. epidermidis*, 69 (39,65 %); *Str. agalactiae*, 7 (4,02 %); *Str. pyogenes*, 2 (1,44 %); D group, 5 (2,78 %); *Str. uberis*, 1 (0,57 %); non-classified *Streptococcus*, 10 (5,74 %); *Corynebacterium*, 10 (5,74 %); *Micrococcus*, 3 (1,72 %); *E. coli* and other gram-negative, 27 (15,51 %); non-typified gram-positive cocci lost during the culture, 9 (5,17 %).

We found differences in the sensitivity of *Staphylococcus* and *Streptococcus* and the rest of the microorganisms against the different antimicrobial agents studied, but we can summarize their general behaviour as follows: cephaloridine, 96,94 % of sensible strains; erythromycin, 92,83 %; gentamicin, 90,32 %; ampicillin, 89,49 %; chloromycetin, 85,06 %; trimethoprim-sulfametoxazole, 81,31 %; penicillin, 80,67 %; neomycin, 79,26 %; furadantin, 73,89 %; tetracycline, 70,76 %; novobiocin, 65,01 %; cloxacillin, 62,64 %; kanamycin, 61,0 %; dicloxacillin, 49,55 %; and streptomycin, 41,24 %.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANGULO TOLEDO, P. (1976).-Gentamicina. Gentileza Essex España. Goisa, Torrejón de Ardoz. Madrid.
- 2) ANÓNIMO (1972).-Orbenin. Gentileza Lab. Cooper-Zeltia, Porriño.
- 3) ANÓNIMO (1974).-Control de la mastitis bovina. Publ. del Ministerio de Agricultura, Secretaría general técnica, Servicio de publicaciones.
- 4) BAUER, A. W. y col. (1966).-Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. clin. Path.*, **45** (4): 493-496.
- 5) BRANDER, G. C. (1972).-Clinical problems in preventive medicine. The control of mastitis. *Br. vet. J.*, **128**: 58-63.
- 6) BRANLEY, A. J. y col. (1976).-Prevalence of *Corynebacterium bovis* in bovine milk samples. *Vet. Rec.*, **99**: 275.
- 7) BURCISSER, H. (1972).-Los problemas prácticos concernientes a la lucha contra los gérmenes patógenos de la leche, *REVE*, fasc. 257.
- 8) CULLEN, G. A. y LITTLE, T. W. A. (1969).-Isolation of *Str. uberis* from the rumen of cows and from soil. *Vet. Rec.*, **85** (5): 115-118.
- 9) CHANDLER, G. y BAXI, K. K. (1975).-Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in cows. *Indian Vet. J.*, **52** (4): 275-281.
- 10) ELLIOT, R. E. y col. (1976).-New Zealand National mastitis survey: 1965-66. The microflora of bovine composite milk samples. *New Zealand vet. J.*, **24** (5): 80-84.
- 11) EVANS, J. M. y col. (1972).-Dry cow therapy. *Vet. Rec.*, **90**: 542.
- 12) BAGADI, H. O. y RAZIG, S. E. (1976).-Response of mastitis organisms to cloxacillin. *Vet. Rec.*, **98**: 245.
- 13) BIBERSTEIN, E. L. y col. (1974).-Antimicrobial sensitivity patterns in *S. aureus* from animals. *J.A.V.M.A.*, **164** (12): 1.183-1.186.
- 14) FORBES, D. y HEBERT, C. (1968).-Studies in the pathogenesis of staphylococcal mastitis. *Vet. Rec.*, **82** (3): 69-73.
- 15) FORBES, D. (1970).-The pathogenic significance of various intramammary infections. *Br. vet. J.*, **126**: 260-266.
- 16) GLAWISCHNIG, E. y col. (1972).-Medidas más importantes para una lucha eficaz contra las infecciones de la mama en los grandes efectivos de vacas lecheras. *REVE*, fasc. 248.
- 17) HARROP, M. H. W. y col. (1975).-Incidence of bovine mastitis in the dairying region of Southern Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, serie veterinaria, **10** (8): 65-67.
- 18) HAVELKA, B. (1975).-Aetiology of bovine mastitis in Slovakia in the years 1972-1974. *Vet. Med.* **20** (8): 477-481.

- 19) HAVELKA, B. (1975).-Antibiotic sensitivity of *Str. agalactiae* and *S. aureus* in Slovakia in 1974. *Vet. Med.*, **20** (8): 455-461.
- 20) HEEVER, van der, L. W. y TURNER, G.R.S. (1976).-The comparative incidence of subclinical bovine mastitis in 17 herds when using two sets of diagnostic criteria. *Jl. S. Afr. vet. med. Ass.*, **47** (4): 263-264.
- 21) HOLMBERG, O. (1973).-*S. epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta vet. Sca.*, supl. 45: 1-144.
- 22) HOUSE, J. A. y MEANLY, M. (1974).-Antibiotics sensitivity patterns of *S. aureus* from bovine milk. *Cornell Vet.*, **64** (4): 584-587.
- 23) HOWELL, D. y col. (1964).-A survey of the incidence of mastitis in dairy cows in the reading area. *Vet. Rec.*, **76** (40): 1.107-1.112.
- 24) HUNTER, A. C. y JEFFREY, D. C. (1975). Subclinical mastitis in suckler cows. *Vet. Rec.*, **96**: 442-447.
- 25) KEINTZEL, H. (1974).-Treatment of subclinical mastitis in dairy cows during the dry period with long-acting penicillin. Inaugural dissertation. Tierarzt. Hochschule, Hannover.
- 26) KORMEDY, B. (1973).-Therapeutic value of gentamicin in the treatment of mastitis. *Magy. Alla torv. Lap.* **32** (2): 131-133.
- 27) LABORATORIOS MERIEUX, (s. a.).-Bacteriologie, virologie, cultures cellulaires, pp. 76.
- 28) LOOSMORE y col. (1968).-Draying-off therapy for bovine mastitis: A comparative field trial. *Vet. Rec.*, **83** (14): 358-360.
- 29) MADSEN y col. (1974).-Herd incidence of bovine mastitis in four Danish dairy districts. I. The prevalence and mastitogenic effect of microorganisms in the mammary glands of cows. *Nordisk vet. Med.*, **26** (9): 473-482.
- 30) KOH SENG HUAT y JOSEPH, P. G. (1974).-Studies on bovine mastitis. *Kajian Veterinar.*, **6** (2): 68-75.
- 31) MAFFEY, J. y UVAROV, O. (1961).-Novobiocin in the treatment of staphylococcal mastitis in cows. *Vet. Rec.*, **73** (40): 965-967.
- 32) McDONALD, J. S. and McDONALD, Z. Z. (1976).-Antibiograms of streptococci isolated from bovine intramammary infections. *Amer. J. vet. Res.*, **37** (10): 185-188.
- 33) PARKER, W. H. (1967).-Staphylococci in cows milk. *Vet. Rec.*, **80** (23): 688.
- 34) PATRA, P. E. y col. (1974).-Treatment of clinical bovine mastitis by different intramammary preparations following «in vitro» sensitivity test. *Indian vet. J.*, **51** (5): 375-378.
- 35) PHILPOT, W. N. (1969).-Role of therapy in mastitis control. *J. dairy Sci.*, **52** (78): 713.
- 36) PLOMET, M. (1966).-Diagnóstico bacteriológico de las infecciones de la mama de la vaca. En *Patología de la producción láctea*. Ed. Academia, León.
- 37) ROBERTS, S. J. y col. (1969).-Concepts and recent developments in mastitis control. *J.A.V.M.A.*, **155** (2): 157-166.
- 38) SMITH y col. (1966).-Methods of reducing the incidence of udder infection in dry cows. *Vet. Rec.*, **79** (8): 233.
- 39) STICHTING GEZONDHEIDS ZOR VOOR DIESEN (1976).-Survey of the occurrence of bovine mastitis in the Netherlands. *Tijdschr. Diergenesk.* **101** (6): 317-318.
- 40) STUNZI, H. (1974).-Patología de las mastitis. *REVE*, fasc. 274.
- 41) TRONEV, P. y col. (1975).-*Veterinar Nauki*, **12** (6): 73-83.
- 42) VALENTI, G. y CALDORA, C. (1974).-Sensitivity to various drugs of streptococcal strains isolated from cattle with disorders of the mammary secretion. Choice of drugs for use in mixed staphylococcal and streptococcal infection. *Ann. Fac. Med. Vet., Torino*, **21**: 200-213.
- 43) WILKENS, W. (1969), cit. por ALLER GANCEDO, B. y ESCUDERO DIEZ, A. (1972).-El problema de la antibiorresistencia en la clínica veterinaria: un caso práctico. *Supl. Cient. Bol. Inf. Cons. Gral. Col. Vet. España*, n.º 192: 19-28.
- 44) WILLIAMS, L. F. (1971).-Mastitis bovina: métodos de diagnóstico usados para el control de la enfermedad. Mesa redonda. *Trib. vet.* (agosto).
- 45) WILSON (1973).-Dry cow therapy. *Vet. Rec.*, **93** (23).

CUADRO 1

Porcentajes de sensibilidad y resistencia de las cepas de Staphylococcus aureus

	Resistentes	L. sensibles	Sensibles
Eritromicina	0	3,70	96,29
Furadantin	0	7,40	92,59
Trimetoprim-sulfametoxazol	3,70	0	96,29
Cefaloridina	3,70	7,40	88,90
Gentamicina	7,40	3,70	88,88
Dicloxacilina	8	4	88,00
Novobiocina	7,40	7,40	85,18
Neomicina	11,11	0	88,89
Tetraciclina	11,11	0	88,89
Cloxacilina	11,53	3,84	84,61
Kanamicina	14,81	0	85,18
Cloranfenicol	22,22	7,40	70,37
Ampicilina	48,0	16,0	36,00
Estreptomina	51,85	14,81	33,33
Penicilina	55,55	18,51	25,92

CUADRO 2

Porcentajes de sensibilidad y resistencia de las cepas de estafilococos

	Resistentes	L. sensibles	Sensibles
Trimetoprim-sulfametoxazol	1,42	0	98,57
Cefaloridina	1,44	2,89	95,67
Eritromicina	1,44	8,69	89,8
Furadantín	2,89	8,69	88,40
Gentamicina	2,89	1,44	95,65
Neomicina	4,34	7,24	88,4
Cloranfenicol	13,04	11,59	75,36
Novobiocina	14,49	13,04	72,45
Dicloxacilina	15,15	16,86	68,18
Tetraciclina	15,94	0	84,05
Cloxacilina	17,39	5,79	76,81
Kanamicina	17,39	1,44	81,15
Ampicilina	23,80	15,87	60,31
Penicilina	40,57	23,18	36,23
Estreptomina	44,92	13,04	42,02

CUADRO 3

Porcentajes de sensibilidad y resistencia de las cepas de estreptococos

	Resistentes	L. sensibles	Sensibles
Eritromicina	0	0	100
Cefaloridina	7,69	3,84	88,46
Ampicilina	7,69	3,84	88,46
Furadantin	15,38	3,84	80,76
Penicilina	17,39	26,08	56,52
Tetraciclina	21,73	13,04	65,21
Cloranfenicol	21,73	13,04	65,21
Gentamicina	26,08	21,73	52,17
Novobiocina	30,43	26,08	43,47
Trimetoprim-sulfametoxazol	34,61	3,84	61,53
Cloxacilina	34,61	30,75	34,61
Dicloxacilina	46,15	23,07	30,76
Neomicina	47,82	21,73	30,43
Kanamicina	69,56	4,34	26,08
Estreptomina	91,30	4,34	4,34

CUADRO 4

Porcentajes de sensibilidad y resistencia de las cepas de corynebacterias

	Resistentes	L. sensibles	Sensibles
Penicilina	0	0	100
Cefaloridina	0	0	100
Gentamicina	0	0	100
Ampicilina	0	0	100
Neomicina	10	30	60
Cloranfenicol	10	10	80
Eritromicina	20	10	70
Trimetoprim-sulfametoxazol	20	0	80
Kanamicina	30	10	60
Estreptomina	40	10	50
Tetraciclina	50	0	50
Novobiocina	60	0	40
Cloxacilina	60	20	20
Furadantin	60	10	30
Dicloxacilina	90	0	10

CUADRO 5
Porcentajes de sensibilidad y resistencia de las cepas Gram-positivas

	Resistentes	L. sensibles	Sensibles
Cefaloridina	3,04	2,24	94,70
Eritromicina	7,14	6,23	86,6
Gentamicina	9,65	7,72	82,60
Ampicilina	10,49	6,57	82,92
Cloranfenicol	14,92	11,54	73,52
Trimetoprim-sulfametoxazol	18,67	1,28	80,03
Penicilina	19,32	23,08	57,59
Neomicina	20,72	19,65	59,61
Furadantin	26,09	7,51	66,38
Tetraciclina	29,22	4,34	66,42
Novobiocina	34,97	13,04	51,97
Cloxacilina	37,33	18,84	43,80
Kanamicina	38,98	5,26	55,74
Dicloxacilina	50,43	13,24	36,31
Estreptomina	58,74	9,12	32,12