

ACCION "IN VITRO" DE ALGUNAS COMBINACIONES DE ANTIBIOTICOS SOBRE BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA *

OSCAR VALDÉS ORNELAS
Médico Veterinario

INTRODUCCIÓN

LA MASTITIS bovina, por su frecuente presentación en las vacas lecheras, constituye un problema polifacético que afecta al ganadero ocasionándole fuertes pérdidas económicas, al público consumidor por el peligro que corre de consumir ocasionalmente leche procedente de animales enfermos y porque, a causa de la mastitis en el mercado se dispone de menor cantidad de leche y a mayor precio, y al médico veterinario que tiene que enfrentarse a una enfermedad de difícil control por su difusibilidad, lo variable de su etiología y las características de la misma enfermedad.

Para el médico sanitario, la mastitis bovina constituye un verdadero problema de salud pública tanto por el peligro que representan para el hombre algunos de los gérmenes causantes de esta enfermedad, cuanto por el uso indiscriminado de antibióticos para su tratamiento, lo que presupone cierto riesgo para el consumidor de la leche que los contenga. Esta relación de la mastitis bovina con la salud pública humana, es la que ha determinado al autor de este trabajo a presentarlo a la consideración de esta H. Academia.

Los estudios efectuados acerca de la incidencia de la mastitis bovina en toda la República son escasos y por ello no es posible dar cifras estadísticas sobre su presentación. La opinión de médicos veterinarios y estableros incrimina a esta enfermedad de ser la causante de una disminución de un 15 a un 20% de la producción. Morales ¹ en 1952, en un estudio hecho sobre 1,379 animales de establo, encontró el 21% de enfermos y estimó las pérdidas anuales causadas por

* Leído en la sesión del 30 de agosto de 1961.

Nota: El autor agradece al Dr. M. A. Hidalgo su colaboración.

la mastitis bovina en la cuenca lechera del Distrito Federal, en 34 millones de pesos.

Antes del uso de las sulfas en terapéutica veterinaria, el tratamiento de las mastitis y en particular el de las causadas por *Str. agalactiae*, tenía pocas probabilidades de ser efectivo. La generalización del uso de las sulfas y su demostrada efectividad cuando eran instiladas en forma de suspensiones oleosas al interior de la cisterna a través del canal de la teta, ofreció una perspectiva halagüeña para el control de la mastitis.

Poco tiempo después de que el precio de la penicilina permitió su liberal utilización en medicina humana, se empezó a emplear este antibiótico con extraordinario éxito en el tratamiento de la mastitis bovina bajo la forma de instilaciones de soluciones de penicilina sódica o potásica cristalinas. Al estar en disponibilidad para uso terapéutico otros nuevos antibióticos, algunos han sido ensayados con relativo éxito, ya sea que se emplearan solos o formando combinaciones que dieran un mayor espectro de acción antibacteriana.

Actualmente son numerosas las combinaciones de antibióticos que para el tratamiento de la mastitis bovina se presentan bajo la forma de ungüentos para ser instilados a través del canal de la teta. Su libre venta a los establos, da lugar frecuentemente a un uso impropio que redundará en perjuicio de los animales y a que al no estar bajo la vigilancia del médico veterinario el tratamiento, la leche de los animales tratados sea puesta a la venta antes del tiempo requerido para que los antibióticos se hayan eliminado totalmente.

Dado que en ciertos casos algunos de estos productos muestran poca o nula acción curativa, el médico veterinario en ocasiones se pregunta a sí mismo que método debe emplear para seleccionar el producto que resulte más efectivo. El procedimiento ordinario de aislar e identificar a los gérmenes causantes de la enfermedad, para luego determinar la sensibilidad de éstos a distintos antibióticos, requiere de un tiempo que es muy importante para la iniciación del tratamiento. Por otra parte, las determinaciones de la sensibilidad de las bacterias se hace habitualmente frente a antibióticos aislados y no en combinaciones que es como se ofrecen comúnmente en los productos comerciales.

Tratando de buscar una solución al problema planteado, diseñamos un método sencillo y práctico que nos permitiera determinar en forma aproximada la acción *in vitro* sobre los gérmenes causantes de mastitis, de algunas combinaciones comerciales de antibióticos, utilizando los cultivos resultantes de la prueba diagnóstica de Hotis.¹ El ensayo de este método en 200 muestras de leches procedentes de vacas con mastitis, es el objeto del presente trabajo.

En el año de 1960 se inició en los laboratorios de la Escuela de Medicina,

MATERIAL Y MÉTODOS

Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., un programa de trabajo conjunto en-

tre ésta y la Fundación Rockefeller para ayudar a la industria lechera y, como parte del mismo se ha estado efectuando un estudio de la incidencia de la mastitis bovina utilizándose entre otros métodos de diagnóstico la prueba de Hotis. El encargado del proyecto, médico veterinario Marco Antonio Hidalgo, accediendo a nuestra solicitud para colaborar en este trabajo nos proporcionó casi en su totalidad las muestras de leche que empleamos en nuestro estudio.

Las muestras de leche procedieron de varios establos situados en las inmediaciones del Distrito Federal, fueron tomadas con las precauciones de asepsia necesarias en tubos estériles que contenían el indicador bromocresol púrpura (con excepción de 10 de ellas). Después de incubadas a 37°C durante 48 a 24 horas en la Escuela de Veterinaria, las que dieron positivas en la prueba de Hotis, nos las remitieron para nuestro estudio.

De los ungüentos para el tratamiento de la mastitis bovina que son más conocidos, seleccionamos seis diferentes. Cinco de ellos estaban presentados en tubos de estaño depresibles, conteniendo como dosis para ser instilada en cada cuarto de la ubre, de 6.5 a 13.3 g. de ungüento. Otro producto más estaba presentado en un tubo conteniendo 25 g. como dosis. Fueron obtenidos de farmacias veterinarias y mostraban fechas que nos indicaron su reciente elaboración. Cada uno de los 5 primeros ungüentos fue suspendido en leche estéril en proporción de 1 g. para cada 20 ml. de leche y del ungüento que tenía 25 g. como dosis, la suspensión se hizo en proporción de 2 g. de ungüento para 20 ml. de leche.

Utilizando una jeringa estéril y una aguja del número 24 que en el caso de cada una de las suspensiones se comprobó que daba 100 gotas por ml. se depositó sobre discos de papel filtro Wathman Núm. 1 que tenían 6 mm. de diámetro y que habían sido previamente esterilizados, en series separadas, una gota de la suspensión del ungüento. Identificando los discos por medio de marcas a lápiz, se desecaron dejándolos en la estufa a 37°C. durante una hora.

Los de cada serie se transfirieron separadamente de las cajas de Petri a tubos estériles con tapón de rosca y se conservaron en el refrigerador hasta ser usados.

Los discos de papel preparados en esta forma y de acuerdo con la fórmula expresada en cada producto, contendrían cada uno en sus respectivas series lo siguiente:

Ungüento Núm. 1. 8.3 U. de penicilina G potásica y 8.3 mcg. de dihidroestreptomina.

Ungüento Núm. 2. 3.3 mcg. de tioestrepton y 10 mcg. de neomicina.

Ungüento Núm. 3. 4.0 U. de penicilina procaína; 4.0 mcg. de dihidroestreptomina; 4.0 mcg. de neomicina; 20 mcg. de sulfatiazol; 20 mcg. de sulfamerazina; 2.0 mcg. de papaína; 0.2 mcg. de sulfato de cobalto y 0.8 mcg. de acetato de hidrocortisona.

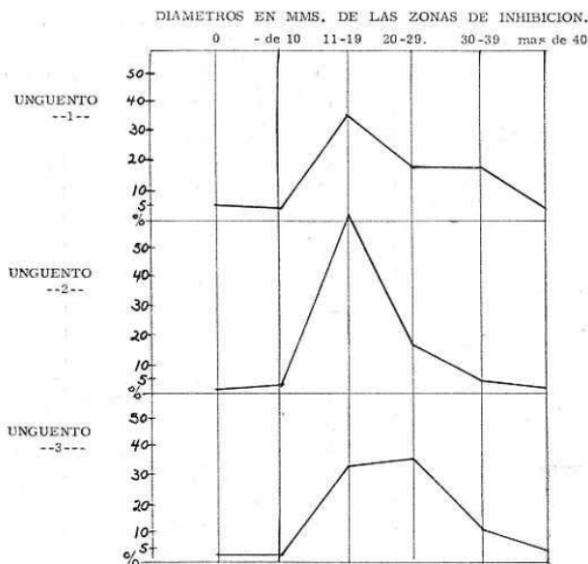
Ungüento Núm. 4. 16 mcg. de clorhidrato de oxitetraciclina.

Ungüento Núm. 5. 14 mcg. de clorhidrato de clortetraciclina; 7.0 mcg. de neomicina y 7.0 mcg. de dihidroestreptomocina.

Ungüento Núm. 6. 10 mcg. de clortetraciclina; 5.0 mcg. de neomicina y 5.0 mcg. de dihidroestreptomocina.

Las pruebas se efectuaron en la forma siguiente: en una caja de Petri estéril se depositaba aproximadamente 0.5 ml. de la muestra de leche y sobre ella se vertía agitando con un movimiento de rotación para homogenizar, aproxima-

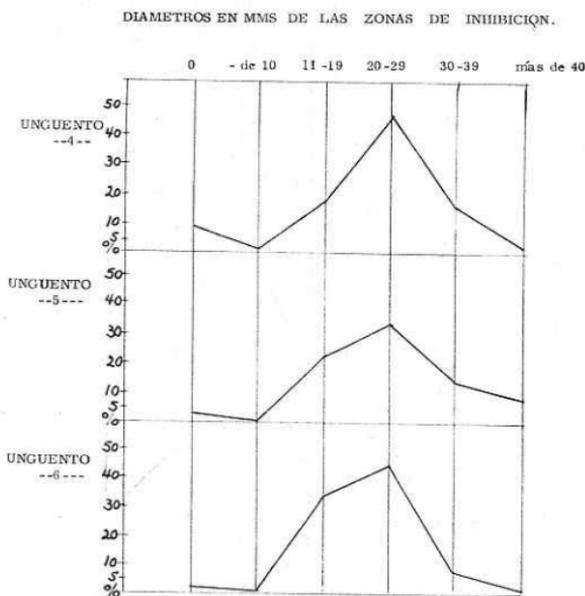
PORCENTAJE DE MUESTRAS DE LECHE QUE PRESENTARON
DISTINTAS ZONAS DE INHIBICION.



mente 15 ml. del siguiente medio de cultivo previamente esterilizado a 121°C. durante 20 minutos y luego enfriado a 45°C.: triptosa Difco 2 g., cloruro de sodio 0.5 g., extracto de carne Difco 0.3 g., agar granulado 2 g. y agua destilada 100 ml., 7.2-7.4. Una vez solidificado el medio de cultivo mezclado con la leche, se depositaban sobre la superficie del mismo distribuyéndolos equidistantemente los seis discos de papel representativos de los seis ungüentos distintos. Cada una de las cajas de Petri fue marcada para su identificación y se llevaron a la estufa donde se incubaron a 37°C. durante 18 a 24 horas al cabo de las cuales se hizo la lectura de las zonas de inhibición, anotando el diámetro en mm. de cada una de ellas.

En el caso del ungüento Núm. 2 que contenía tioestrepton, considerando que por su escasa solubilidad este antibiótico no pasaría a la leche en que se suspendía, se preparó una serie duplicada de discos con la variante de hacer primero una extracción de antibióticos del ungüento suspendiendo 1 g. de éste en 10 ml. de dimetil sulfoxido y luego adicionando los otros 10 ml. de leche. La actividad inhibidora de estos discos, mostrada en las primeras 100 pruebas, al

PORCENTAJE DE MUESTRAS DE LECHE QUE PRESENTARON
DISTINTAS ZONAS DE INHIBICION

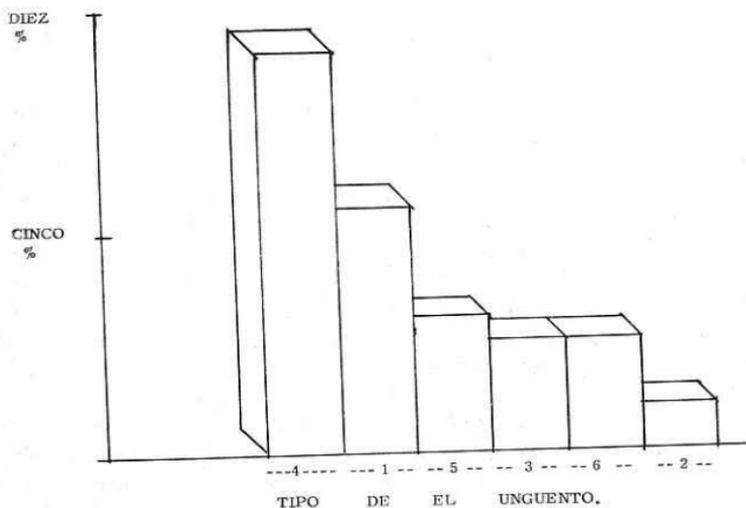


ser muy similar a la que dieron los discos preparados con el mismo producto suspendido sólo en leche, hizo que en las últimas 100 pruebas ya no utilizáramos esta serie duplicada. Asimismo, en los resultados omitimos los datos correspondientes a dicha serie por la razón expuesta.

A 100 de las muestras se les practicó bacterioscopía previa coloración de Gram y en 120 de ellas se intentó el aislamiento de bacterias coliformes mediante siembras en cajas de Petri con medio de gelosa-eosina-azul de metileno. De cada uno de los cultivos (procedentes de una muestra de leche) que presentaban características de coliformes, se obtuvieron a partir de colonias aisladas

de 3 a 4 subcultivos en gelosa simple. Estos cultivos fueron enviados al Q. B. y P. Jorge Olarte, Jefe del Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil, quien nos ofreció amablemente realizar un estudio exploratorio de la posible relación que tuvieran estos coliformes con los que se han encontrado como causantes de diarreas en los niños y saber si era o no conveniente ampliar o continuar este estudio. La clasificación antigénica de las cepas enviadas

HISTOGRAMA PORCENTUAL DE MUESTRAS QUE PRESEN TARON RESISTENCIA TOTAL CON ESTOS DIFERENTES UNGUENTOS.



fue intentada sólo frente a los sueros tipo de los gérmenes más comúnmente encontrados en México.

RESULTADOS

Al efectuar la lectura de las zonas de inhibición que se presentaban alrededor de cada uno de los discos de papel, se hicieron mediciones exactas de las mismas, formando una tabla cuya inclusión en este trabajo consideramos no sea pertinente por su extensión y por ello la resumimos formando 6 grupos de zonas de inhibición: 0 equivalente a no-inhibición, 10 mm. de diámetro o menos, de 11 a 19 mm., de 20 a 29 mm., de 30 a 39 mm. y de 40 ó más, según se observa en la tabla siguiente:

NÚMERO DE MUESTRAS DE LECHE EN CUYOS CULTIVOS SE PRESENTARON ZONAS DE INHIBICIÓN PRODUCIDAS POR LOS ANTIBIÓTICOS ENSAYADOS

Diámetros en mm. de las zonas de inhibición observadas

<i>Ungüentos</i>	0	10	11-19	20-29	30-39	40 o más
1. Penicilina y estreptomina	11	10	81	44	40	9
2. Tioestrepton y neomicina	2	6	135	41	8	2
3. Penicilina, neomicina, sulfas, etc.	5	5	72	78	25	10
4. Clorhidrato de oxitetraciclina	18	2	38	103	31	3
5. HCl, clortetraciclina, neomicina y estreptomina	6	0	52	75	30	17
6. Clortetraciclina, neomicina y estreptomina	5	2	77	96	13	2

De las 200 muestras de leche sembradas e incubadas en las condiciones descritas, 5 no presentaron crecimiento después del período de incubación a 37°C. Estas 5 muestras correspondieron a un grupo de 10 que no se sujetaron a la prueba de Hotis, pero que presentaban alteraciones muy marcadas de sus caracteres organo-lépticos suficientes para considerarlas como leches mamitosas. En el suero de 3 de estas 5 leches que no dieron crecimiento, se humedecieron discos de papel filtro que luego fueron depositados sobre cultivos de distintos gérmenes, mostrando después de 18 horas de incubación, amplias zonas de inhibición. En la bacterioscopia efectuada a estas muestras de leche, no se encontraron gérmenes, y sí muy abundantes leucocitos, glóbulos rojos y células.

En la bacterioscopia practicada a 100 de las muestras, en 70 de ellas se observaron estreptococos, en su mayor parte formando cadenas de más de seis elementos y por su morfología posiblemente *Str. agalactiae*. En orden de frecuencia después de los estreptococos, se encontraron cocos Gram positivos, ya sea aislados o formando pequeños racimos y bacilos cortos Gram negativos. En menor proporción se observaron diplococos y bacilos Gram positivos de tipo difteroide.

De las 120 muestras de leche de las cuales se intentó aislar bacterias coliformes, en 47 se obtuvieron en el medio de gelosa-eosina azul de metileno colonias típicas. En un primer grupo de cultivos enviados para su clasificación, correspondiente a 22 animales, se encontraron varias colonias cuya estructura antigénica fue 0 128 - B 12 y 0 112 - B 13. En el segundo grupo de cultivos enviados al Quím. Olarte, en el estudio de 60 cultivos de tipo coliforme correspondientes a 18 muestras de leche, sólo se encontró en un caso *E. coli* 0 86 - B 7. En el tercer grupo de cultivos correspondientes a 7 muestras de leche, el reporte del Laboratorio nos indicó que los gérmenes enviados no correspondían en su clasificación antigénica a los coliformes que han sido señalados como los agentes causantes de diarreas infantiles.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se ensayó un método sencillo para determinar la actividad *in vitro* sobre bacterias causantes de mastitis, de algunas combinaciones de antibióticos que bajo la forma de ungüentos se usan para el tratamiento de dicha enfermedad.

Al analizar las ventajas y desventajas de este método, observamos que el efecto antibacteriano que se estudia, no sólo queda limitado a las bacterias patógenas encontradas en las muestras que dieron la prueba de Hotis positiva, sino también a bacterias saprofitas que puedan contaminar la muestra de leche a pesar de las precauciones de asepsia adoptadas al tomarla.

Las condiciones en que se efectuó este ensayo, no nos permiten emitir, ni lo intentamos, un juicio sobre las ventajas o desventajas de una u otra combinación de antibióticos para el tratamiento de la mastitis bovina, ya que la acción antibacteriana *in vitro* sólo es un índice de su posible actividad en los tejidos del animal. Por otra parte, se ha reconocido que no en todos los casos la amplitud de las zonas de inhibición encontradas en los medios de cultivo, corresponde a una mayor actividad *in vivo*. Así pues, la medición de las zonas de inhibición sólo nos da un valor muy relativo excepto en los casos en que no hay inhibición.

Al estudiar los gérmenes que mostraron resistencia a la acción de algunos de los antibióticos ensayados, encontramos que la mayoría correspondían a *Staphylococcus*, y dado el problema que las cepas de estos gérmenes resistentes representan para el hombre, propusimos se efectuara, y ya se ha iniciado, un trabajo en el que se estudie específicamente la resistencia que presenten los estafilococos manitol-coagulasa positivos aislados de leches procedentes de vacas con mastitis. Este estudio nos revelará con mayor precisión, el grave riesgo que entraña, para la formación de cepas bacterianas resistentes, el uso indiscriminado de antibióticos.

Considerando las fallas de inhibición presentadas por distintos antibióticos, anotamos que en el caso del ungüento número 4 que lleva un solo antibiótico, el número de fallas fue mayor, lo que nos indica cierta ventaja en el uso de combinaciones. Por otra parte, si tenemos en cuenta el peligro que entraña la presencia de la penicilina en la leche, para la sensibilización del hombre o para el desencadenamiento del choque, de acuerdo con lo señalado por el Dr. Salazar Mallén y otros señores Académicos en distintas ocasiones, al ver que el uso de la combinación penicilina-estreptomycin reporta menos ventajas que el de otras preparaciones, creemos debería limitarse su aplicación a casos muy especiales y aplicarse una estricta reglamentación que impidiera la venta de leche que contuviera estos u otros antibióticos.

Las 5 muestras de leche en que no se obtuvo desarrollo de gérmenes, es una

comprobación de lo ya señalado por Salinas Aguilera⁶ en relación a la producción de graves alteraciones de la glándula mamaria por el uso de antibióticos en forma desordenada.

No consideramos necesario en este trabajo la identificación completa de los gérmenes causantes de la mastitis, ya que estudios de esta índole han sido realizados anteriormente en México por Pérez Moreno,⁵ Lozoya,² Macías Naranjo³ y Salinas Aguilera.⁶

La presencia de bacterias coliformes patógenas en la leche, tiene particular importancia en lo referente a su consumo si tenemos en cuenta que algunas cepas son resistentes a la temperatura de pasteurización, según lo hemos demostrado en otro trabajo⁷ efectuado sobre coliformes aislados de productos lácteos. Afortunadamente, la incidencia no es elevada y en muchos casos la correspondencia de algunos antígenos somáticos o capsulares entre cepas de origen animal y cepas de origen humano, no es suficiente para que las consideremos idénticas.

Creemos que si bien el método propuesto, no nos permite determinar qué antibióticos son los más efectivos para el tratamiento de algunos casos particulares de mastitis, sí puede ser de utilidad para seleccionar el producto a usar en casos de mastitis causadas por gérmenes resistentes a determinados antibióticos y sensibles a otros.

RESUMEN

Se describe un método sencillo para determinar la actividad *in vitro* de algunas combinaciones de antibióticos sobre bacterias causantes de mastitis bovina. Se reportan los resultados obtenidos del ensayo de este método en 200 muestras de leche procedente de vacas con mastitis y se hacen algunas consideraciones que el autor estima de importancia para la salud pública humana.

BIBLIOGRAFIA

- Hotis, R. P., y W. T. Miller: *A simple method for detecting Mastitis Streptococci in milk*. U.S.D.A. Circ. 400, 1936.
- Lozoya Pérez, G.: *Estudio sobre la mastitis bovina*. Tesis: Esc. Nac. Med. Vet. y Z., U.N.A.M., 1946.
- Macías Naranjo, R.: *Contribución al estudio de la etiología de las mastitis de las vacas lecheras en el Distrito Federal*. Tesis: Esc. Nac. Med. Vet. y Z. U.N.A.M., 1959.
- Morales Alcocer, J.: *Breve estudio económico de la "Mamitis Vacuna" en el Distrito Federal*. Tesis: Esc. Nac. de Med. Vet. y Z. U.N.A.M., 1952.
- Pérez Moreno, C.: *Contribución al conocimiento de la mastitis estreptocócica bovina y clasificación de los gérmenes aislados*. Tesis: Esc. Nac. de Ciencias Biol. I. P. N., 1943.
- Salinas Aguilera, E.: *Comparación del valor relativo del "California Mastitis Test" con respecto a la prueba de Hotis standard, para la detección de la mastitis bovina*. Tesis: Esc. Nac. Med. Vet. y Z., U.N.A.M., 1961.
- Valdés Ornelas, O. y Martínez, F.: *Aislamiento de bacterias coliformes a partir de cremas y mantequillas pasteurizadas*. Ciencia, VIII, Núms. 10-12: 284-285, 1948.

COMENTARIO AL TRABAJO DEL DR. OSCAR VALDES
ORNELAS, "ACCION *IN VITRO* DE ALGUNAS
COMBINACIONES DE ANTIBIOTICOS
CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA"

JORGE OLARTE, Q.B.P.

EL TRABAJO del Dr. Valdés Ornelas presenta aspectos de interés tanto en el campo de la medicina veterinaria como en el de la salubridad pública.

Consideramos que el método seguido para determinar la acción de los antibióticos y sulfonamidas sobre los agentes de la mastitis, adolece de ciertos inconvenientes, ya que sólo cuando se precisa el diagnóstico por medio del aislamiento en cultivo puro e identificación adecuada del germen causal, es posible observar una correlación importante entre las pruebas de sensibilidad y la respuesta *in vivo*. Los resultados obtenidos *in vitro* con mezclas de bacterias o gérmenes que no están en cultivo puro suelen conducir a errores, siendo frecuentemente la causa del fracaso de dichas pruebas.

El autor señala el hallazgo en algunas de estas mastitis de tres tipos serológicos de *Escherichia coli* relacionados con las diarreas de los niños. Resultados semejantes han sido publicados por otros autores (Varela et al., Rev. Inst. Salub. Enf. Trop., 17: 57 y 81, 1957), sin que se haya demostrado una identidad completa entre la serología de los colis encontrados en animales y aquellos responsables de diarreas en los niños. Por el momento podemos afirmar que, en general, los animales tienen poca participación en la propagación de estas infecciones.

La presencia en la mastitis bovina de *Staphylococcus aureus*, coagulasa positiva, resistente a los antibióticos, podría tener una repercusión apreciable en la epidemiología de las estafilococcias humanas. Se menciona que se tienen en marcha estudios más extensos encaminados a dilucidar esta posibilidad.

Llama la atención el uso aparentemente extenso de antibióticos en el tratamiento de la mastitis bovina. Se ha podido demostrar que, a pesar de la pasteu-

* Leído en la sesión del 30 de agosto de 1961.

rización, porciones considerables de los antibióticos permanecen activas en la leche. La contaminación de la misma con estas sustancias se prolonga por lo menos por tres o cuatro días después de su aplicación en la vaca. Aquí surgen dos problemas de salubridad pública. Uno, el peligro que representa la ingestión de pequeñas cantidades de antibióticos en los procesos de sensibilización del hombre para los mismos antibióticos. Sin embargo, parece que en la práctica este hecho tiene importancia sólo en relación con la penicilina y se solucionaría fácilmente al prohibir el uso de este antibiótico en la mastitis.

El segundo inconveniente serio que encontramos a la práctica que se discute, es la posibilidad del desarrollo de cepas de bacterias resistentes, principalmente patógenas intestinales, también como consecuencia de la ingestión prolongada de pequeñas cantidades de sulfonamidas y antibióticos en la población general, y quizás, en particular en el niño. En el curso de los últimos ocho años hemos venido observando en el Hospital Infantil, la aparición constante y progresiva de cepas de *Shigella* resistentes a las tetraciclina y estreptomina (Olarie, J., y De la Torre J., Am. J. Trop. Med. Hyg., 8, 324, 1960). En un estudio reciente, en colaboración con Ramos Alvarez, hemos encontrado que igualmente los colis patógenos han venido mostrando esta tendencia de resistencia progresiva para la neomicina, antibiótico considerado como el tratamiento de elección en estas infecciones. Una situación parecida ha sido descrita en Francia (Butiaux, R. et al., Arch. Malad. l'Appar. Diges., 45, 225, 1956). Por el contrario, resulta curioso el hecho de que la resistencia desarrollada por estos dos grupos de bacterias para el cloranfenicol, antibiótico que al parecer no se emplea en la mastitis, es mínima. Siendo el intestino del hombre la fuente principal de *shigelas* y *colis* patógenos, es probable que el mecanismo señalado participe activamente en el desarrollo de estos fenómenos de resistencia.

Como se indica en el trabajo, salta a la vista la necesidad de medidas que impidan que, por lo menos aquellos antibióticos importantes en medicina, contaminen la leche destinada al consumo humano.