

Incidencia de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, determinada por examen bacteriológico directo y Método de Hotis en leches sometidas al Test de California¹

Carlos Pedraza G.², Gastón Alegría R.³, Luis Barrales V.⁴ y Fernando Silva F.⁵

INTRODUCCION

La Mastitis Subclínica del bovino ha sido asociada, en numerosos estudios, con importantes deterioros en la calidad y cantidad de la leche, Gray y Schalm (1962); Forster, Ashworth, Lueddecke (1967), Philpot (1967), Pedraza *et al.* (1977).

Extraordinaria importancia se otorga al hecho que el producto lácteo sea libre de microorganismos patógenos nocivos para la salud humana y animal, FAO/OMS (1960). De acuerdo a los antecedentes existentes en el país, altos índices de prevalencia han sido observados para la mastitis subclínica (Zurita, Palavicino, Cripe, Timm, Styles, 1972) (Agüero, 1971).

El presente estudio determina el nivel de contaminación por bacterias patógenas existentes en glándulas mamarias normales y afectadas con mastitis subclínica. Se consideró necesario comprobar la eficiencia de un método de diagnóstico utilizado en el país para la identificación de bacterias patógenas de la ubre (Método de Hotis), Zurita, Gómez, Rosende y Carrión (1971). Con este objeto, se

compararon sus resultados con los del examen bacteriológico directo en placa, aceptado oficialmente por su precisión.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en seis lecherías de la provincia de Santiago, durante los meses de junio a agosto de 1976. Se efectuó el diagnóstico bacteriológico de 418 muestras de leche, seleccionadas del muestreo de 1.088 cuartos correspondientes a 272 vacas. Los detalles del muestreo han sido presentados por Pedraza *et al.* (1977). En el diagnóstico de la mastitis subclínica se utilizó el Test de California (CMT), siguiendo las recomendaciones de sus autores Schalm y Noorlander (1957). El resultado del test clasificó las muestras en: CMT normal, CMT trazas, CMT₁, CMT₂ y CMT₃, que corresponden a leche normal, leche con mastitis grado trazas, leche con mastitis grado 1, leche con mastitis grado 2 y leche con mastitis grado 3, respectivamente. Se utilizan dos métodos de diagnóstico bacteriano en el análisis de cada muestra: a) examen bacteriológico directo, y b) el método de Hotis. El primero de ellos, es un método caracterizado por la seguridad y precisión de los diagnósticos que emite. El método de Hotis, originalmente creado para efectuar el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* (Hotis y Miller, 1936), ha sido utilizado como una técnica preliminar para detectar varias especies bacterianas patógenas de la glándula mamaria, presentes en la leche. Además, se caracte-

¹Recepción originales: 2 de agosto de 1977.

²Méd. Vet., Programa Producción de Leche, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³Méd. Vet., Depto. de Salud e Higiene Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile, Santiago.

⁴Ing. Agr., M. S., Oficina de Estadística, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

⁵Egresado del Depto. Autónomo de Probabilidades y Estadística de Universidad Católica de Chile, Santiago.

riza por la facilidad con que se ejecuta, convirtiéndolo en un método práctico.

El método de Hotis se efectuó e interpretó de acuerdo a las instrucciones de Schalm, 1962.

El examen bacteriológico, incluyó: 1) examen microscópico directo, utilizándose la coloración de Gram; 2) siembra y aislamiento en los siguientes medios de cultivo: a) Agar Triptosa con 5% de sangre de ovino en caja Petri para bacterias aeróbicas; b) Agar Triptosa-soya (BBL) en tubo para el desarrollo de bacterias anaeróbicas; c) Agar glucosado de Sabourand en caja de Petri para hongos; d) Caldo y Agar base para Mycoplasma (BBL) con o sin cristal violeta, en tubo y caja de Petri, enriquecido con extracto de levadura al 1% y suero equino estéril e inactivado al 20%. En la identificación, las cepas puras se sembraron en medios de cultivos diferenciales para estudiar las propiedades bioquímicas.

La identificación final se hizo en base a los caracteres microscópicos, biológicos y bioquímicos según la clave de Bergey (Buchanan y Gibbons, 1974).

El análisis estadístico estuvo basado en el desarrollo de pruebas de hipótesis para proporciones binomiales con una aproximación a la normal ($\alpha = 0,05$) (Ostle, 1963) (Snedecor y Cochran, 1973). Al utilizar estas pruebas en forma iterativa se determinó la proporción máxima de aciertos bajo la cual se acepta la hipótesis nula $P \geq P_0$, la cual se denotará como proporción máxima estimada de aciertos del método Hotis con respecto al examen bacteriológico directo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al utilizar el Test de California para el diagnóstico de la mastitis, se encontró que el 61,76% de los cuartos examinados presentó algún grado de mastitis, afectando a un 84,2% de las vacas. De acuerdo a los resultados de este Test, el 34,52% correspondió a CMT trazas; 22,47% a CMT₁; 20,38% a CMT₂; 20,68% a CMT₃ y sólo el 1,93% a mastitis clínica.

Los resultados obtenidos por grado de mastitis subclínica y diagnóstico bacteriano por los métodos Hotis y examen directo, son presentados en el Cuadro 1. Para CMT_n se observa que el número total de aciertos del método Hotis con respecto al examen directo fue 52 casos de 81. El número parcial de aciertos por diagnóstico se presenta en la diagonal de

dicho cuadro y los no aciertos, fuera de la diagonal. La estimación de la proporción máxima de aciertos del método de Hotis fue de un 0,72 para aquellas muestras diagnósticas como negativas por el examen bacteriológico directo. De igual manera al calcular este estadígrafo para aquellas muestras clasificadas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) por el método directo se observa que este valor fue de 0,59.

Para *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) no se calculó el estadígrafo señalado, puesto que los aciertos del método Hotis correspondieron con los valores del examen bacteriológico directo, indicando esto, que la estimación de la proporción máxima de aciertos alcanza valores cercanos al 100%. Como se observa, las estimaciones encontradas para las proporciones máximas de aciertos de las muestras negativas y positivas a *S. aureus*, difieren importantemente del 100%. Para *S. aureus* este valor 0,59 estaría señalando una baja capacidad del método Hotis para la detección de este microorganismo, lo cual puede significar un serio problema, si se considera las marcadas características patógenas que éste presenta para los tejidos de la glándula mamaria. Al estudiar el comportamiento de las proporciones de los no aciertos, se observa que para CMT_n éste es uniforme, tanto para negativos como para *S. aureus*.

Se destaca la existencia de glándulas que siendo totalmente sanas y negativas al Test de California, presenten sus cuartos contaminados con bacterias patógenas. Schalm, Carroll y Jain, 1971, describen el fenómeno denominándolo "infección latente", este hecho en la práctica constituye un obstáculo para cualquier plan de control sanitario de la glándula mamaria.

Al comparar los diferentes grados de mastitis se puede observar, para casos negativos, una uniformidad en las estimaciones de las proporciones máximas de aciertos. En los casos de muestras positivas a *S. aureus*, se produjo un incremento en el valor de este estadígrafo a través de los 2 primeros grados de mastitis y leche negativa al CMT, luego una disminución en su valor en los grados más intensos, observándose casos extremos de valores como 0,37 para CMT₃.

El incremento de glándulas positivas a microorganismos patógenos (predominando en este estudio el *S. aureus*) registrado en los grados más intensos de la inflamación mamaria, estaría probablemente intensificando aún

Cuadro 1 — Grado de mastitis, incidencia de microorganismos patógenos y proporciones de aciertos y no aciertos entre métodos de Hotis y examen bacteriológico directo.

Grado de Mastitis	Diagnóstico Bacteriano	METODO BACTERIANO DE HOTIS			Examen bacteriológico directo	Proporción máxima estimada de aciertos $\alpha = 0,05$	Proporción de los no aciertos
		Neg.	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>			
CMT normal	Negativo	45	8	16	69	0,72	Sí
	<i>S. aureus</i>	3	3	2	8	0,59	Sí
	<i>S. agalactiae</i>	0	0	4	4	—	—
	Total Aciertos		52		81	0,71	
CMT trazas	Negativo	54	9	14	77	0,77	Sí
	<i>S. aureus</i>	3	8	5	16	0,66	Sí
	<i>S. agalactiae</i>	0	0	5	5	—	—
	Total Aciertos		67		98	0,75	
CMT (1)	Negativo	39	9	15	63	0,70	Sí
	<i>S. aureus</i>	5	7	1	13	0,70	Sí
	<i>S. agalactiae</i>	0	0	4	4	—	—
	Total Aciertos		50		80	0,70	
CMT (2)	Negativo	28	2	13	43	0,74	No
	<i>S. aureus</i>	5	10	13	28	0,49	Sí
	<i>S. agalactiae</i>	0	0	8	8	—	—
	Total Aciertos		46		79	0,66	
CMT (3)	Negativo	29	3	15	47	0,71	No
	<i>S. aureus</i>	6	6	13	25	0,37	Sí
	<i>S. agalactiae</i>	1	0	7	8	—	—
	Total Aciertos		42		80	0,60	
TOTAL	Negativo	195	31	73	299	0,69	No
	<i>S. aureus</i>	22	34	34	90	0,45	Sí
	<i>S. agalactiae</i>	1	0	28	29	—	—
	Total Aciertos		157		418	0,65	

más el cuadro patológico (Anderson, 1976). Al existir un compromiso bacteriano se genera la necesidad de un control mediante antibióticos. Como se sabe, el *S. aureus* es un microorganismo que adquiere fácilmente resistencia hacia los antibióticos de uso más común, condición que dificulta y encarece su control.

En el país ha sido posible detectar altos porcentajes de animales enfermos de mastitis subclínica, destacándose la elevada proporción de cuartos que reaccionan como CMT₂ y CMT₃, Zurita *et al.*, 1972; Caballero, Rabi y Ebert, 1970.

La disminución observada en la proporción máxima de aciertos de acuerdo al incremento de la mastitis, está señalando que, precisamente, donde más importante es la información del método de Hotis, es justamente donde menor precisión demuestra. Al analizar las proporciones de no aciertos, se observó que la uniformidad es mantenida a través de los diferentes grados de mastitis para el caso de *S. aureus*. Sin embargo, para los negativos, esta uniformidad no es mantenida en los grados más intensos de mastitis, observándose una proporción estadísticamente mayor en *S. agalactiae*. Esto indica que con el aumento de mastitis el método Hotis señala, con elevada frecuencia como *S. agalactiae* a muestras que son negativas.

Esta situación puede significar que si en el análisis de un gran número de muestras se considera la información aislada del método Hotis, se podría concluir que es *S. agalactiae* la especie bacteriana patógena más frecuente y, por lo tanto, la de mayor importancia. Zurita *et al.*, 1972, al aplicar este método, encuentran un 73,57% de cuartos positivos a *S. agalactiae* del total de cuartos positivos a bacterias patógenas. De acuerdo al mismo criterio, en el presente estudio se encuentra un 67,17% de positividad al *S. agalactiae*.

El análisis estadístico de los totales, permite observar que para aquellas muestras clasificadas como negativas, la proporción máxima de aciertos del método Hotis respecto al examen bacteriológico directo fue 0,69 para los

negativos y 0,45 para *S. aureus*, siendo la proporción de desaciertos desuniformes y uniformes, respectivamente. La proporción de aciertos para *S. agalactiae* fue cercana al 100% a través de todos los grados de mastitis y de las leches negativas al CMT.

De acuerdo a estas proporciones generales encontradas, no se podría asignar al método de Hotis, la precisión señalada por otros autores. Zurita *et al.*, 1972, encuentran un 75,8% de coincidencia de la prueba de Hotis con los métodos bacteriológicos, existiendo una asociación altamente significativa $P \leq 0,001$. Como se puede observar en este trabajo, las proporciones de aciertos determinadas entre los métodos, especialmente en los casos negativos a bacterias patógenas y positivas a *S. aureus*, son bajas. Por el contrario, la identificación de *S. agalactiae* la hace en forma eficiente, situación consecuente al origen del método, creado específicamente para la identificación de *S. agalactiae*.

Si se observa la proporción máxima estimada de aciertos por grado de mastitis, se apreciará que su valor es, en general, decreciente con el grado de CMT. Se explica esto por la existencia de una mayor proporción de cuartos infectados a medida que aumenta el grado de mastitis, situación que genera las diferencias señaladas anteriormente.

La proporción máxima estimada de aciertos general entre los métodos alcanza a 0,65 valor que se considera bajo, tratándose de métodos de diagnóstico. Si se calculan los porcentajes correspondientes a las frecuencias absolutas observadas por cada método utilizado, grado de CMT y diagnóstico bacteriano, se obtienen los Cuadros 2 y 3. Al expresarse los porcentajes de *S. agalactiae* y *S. aureus* como porcentajes del total de muestras positivas a bacterias patógenas de cada método, se verá que el Hotis detecta 67,17% de *S. agalactiae* y 32,83% de *S. aureus*, contrastando con 75,65% de *S. aureus* y 24,35% de *S. agalactiae*, encontrado por el examen bacteriológico directo.

Cuadro 2 — Presencia de microorganismos patógenos diagnosticados por el Método de Hotis en leches sometidas al Test de California.

	CMT _n %	CMT ₁ %	CMT ₂ %	CMT ₃ %	CMT ₄ %	Promedio
Negativa	59,26	58,16	55,00	41,77	43,75	51,91
<i>S. aureus</i>	13,58	17,35	20,00	15,19	12,50	15,79
<i>S. agalactiae</i>	27,16	24,49	25,00	43,04	43,77	32,30

Cuadro 3 — Presencia de microorganismos patógenos diagnosticados por examen bacteriológico directo en leches sometidas al Test de California.

	CMT _n %	CMT ₁ %	CMT ₂ %	CMT ₃ %	CMT ₄ %	Promedio
Negativa	85,18	78,57	78,75	54,43	58,75	71,53
<i>S. aureus</i>	9,87	16,32	16,25	35,44	31,25	21,53
<i>S. agalactiae</i>	4,93	5,10	5,00	10,12	10,00	6,93

R E S U M E N

Se realizó un estudio sobre la incidencia de mastitis en seis lecherías de la zona de Santiago, Chile, aplicándose el Test de California (CMT) a 1.088 muestras de leche con el fin de identificar la mastitis subclínica. Se encontró 84,2% de vacas reaccionantes y 61,76% de los cuartos enfermos. Del total de cuartos enfermos el 34,52% lo fue a CMT trazas; 22,47% CMT₁; 20,38% a CMT₂; 20,68% a CMT₃ y sólo el 1,93% presentó mastitis clínica. Se seleccionó 418 muestras de leche de acuerdo a su reacción con el CMT. Cada muestra fue sometida a diagnóstico mediante el examen bacteriológico directo y el método de Hotis, estableciéndose comparaciones que permitieron medir la efectividad del método Hotis. Al utilizar pruebas de hipótesis para proporciones binomiales, con aproximación a la normal, se determinó que la proporción de aciertos entre los métodos fue sólo de 65% ($\alpha = 0,05$), destacándose la baja precisión del método Hotis para la identificación de *Staphylococcus aureus*, la alta precisión para *Streptococcus agalactiae*; y la detección de *S. agalactiae* en un alto porcentaje de muestras que resultaron negativas al examen bacteriológico directo.

Los resultados finales señalaron que del total de muestras positivas a microorganismos patógenos, el método Hotis encuentra 67,17% con *Streptococcus agalactiae* y 32,83% con *Staphylococcus aureus*, contrastando con los resultados del examen bacteriológico directo que encontró 24,35% con *S. agalactiae* y 75,65% con *S. aureus*.

S U M M A R Y

INCIDENCE OF *Staphylococcus aureus* AND *Streptococcus agalactiae* IN MILKS SUBMITTED TO CALIFORNIA MASTITIS TEST (CMT) BY THE HOTIS AND DIRECT BACTERIOLOGICAL METHODS

A study was carried out in order to detect the incidence of mastitis in six dairy farms of Santiago Province, Chile. The California Mastitis Test (CMT) was applied to a total of 1.088 quarters and it was found that 84.2% of cows and 61.76% of quarters were affected by subclinical mastitis.

Of the affected quarters 34.52% were classified as CMT traces, 22.47% as CMT₁; 20.38% as CMT₂; 20.68% as CMT₃ and only 1.93% corresponded to clinical mastitis. The direct bacteriological method and the Hotis test were confronted by considering 418 samples of milks.

Hypothesis test for binomial proportions was considered in an iterative way. This test indicated that only 65% of the time both methods yielded the same results ($\alpha = 0.05$).

The Hotis test was highly efficient to identify *Streptococcus agalactiae* but not for the identification of *Staphylococcus aureus*. In a high percentage of samples classified as negative by the direct bacteriological method, the Hotis test detected the presence of *S. agalactiae*.

Of the total samples classified by each method as containing pathogenic microorganisms, the Hotis test classified them as 67.17% *S. agalactiae* and 32.83% as *S. aureus*, whereas the direct bacteriological method determined 24.35% and 75.65%, respectively.

LITERATURA CITADA

- AGÜERO, H. 1971. Informe final del período de práctica profesional. Universidad de Chile, Facultad de CC. PP. y Medicina Veterinaria. 102 p.
- ANDERSON, J. C. 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *British Veterinary Journal*. 132 (3): 229-245.
- BUCHANAN, R. E. and GIBBONS, N. E. 1974. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*. 8ª edición. The Williams and Wilkins Co. 1268 p.
- CABALLERO, E., RABI, J. y EBERT, J. 1970. Diagnóstico de mastitis mediante California Mastitis Test (CMT) y estudio bacteriológico en las muestras de leche positivas al CMT en lecherías de la comuna de Máfil (provincia de Valdivia). *Arch. Méd. Vet.* 2: 41-46.
- FAO/OMS. 1960. Comité mixto FAO/OMS de exportes en higiene de la leche. Segundo informe. FAO, Estudios Agropecuarios N° 52. 76 p.
- FORSTER, T. L., ASHWORTH, U. S. and LUEDECKE, L. O. 1967. Relationship between California Mastitis Test reaction and production and composition of milk from opposite quarters. *J. Dairy Sci.* 50: 675.
- GRAY, D. M. and SCHALM, O. W. 1962. The mastitis variable in milk yield as estimated by California Mastitis Test. *Am. J. Vet. Med. Res.* 23: 541.
- HOTIS y MILLER. 1936. Citado por Zurita, 1971. *Arch. Méd. Vet.* Vol. III N° 2, s/p.
- OSTLE, B. 1963. *Statistics in research*. p. 118. The Iowa State University Press. 585 p.
- PEDRAZA, C., GARCÍA, J., CIUDAD, C., PALMA, R., ALEGRÍA, G., ZURITA, L. 1977. Efecto de la mastitis subclínica sobre la calidad láctea. *Agricultura Técnica (Chile)*. 37 (4): 168-174.
- PHILPOT, W. N. 1967. Influence of subclinical mastitis on milk production and milk composition. *J. Dairy Sc.* Vol. 50. 1.
- SCHALM, O. W. 1962. A syllabus on the bovine mammary gland in health and disease. *Dep. Clin. Path. University of California, Davis*. s/p.
- , CARROLL, E. J. and JAIN, N. C. 1971. *Bovine mastitis*. Lea & Febiger. Philadelphia. 360 p.
- and NOORLANDER, D. O. 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. A. V. M. A.* 130: 199-207.
- SNEDECOR, G. W. and COCHRAN, W. G. 1973. *Statistical Methods*. pp. 211. The Iowa State University Press. Sixth Edition. 593 p.
- ZURITA, L., PALAVICINO, I., CRIPE, W., TIMM, P. y STYLES, J. 1972. Contribución al estudio de la mastitis del bovino. Formas de presentación y etiología más frecuente. *Arch. Méd. Vet.* Vol. IV (2): 51-57.
- , GÓMEZ, M., ROSENDE, S., CARRIÓN, C. 1971. Estudio comparativo del tubo Hotis y métodos bacteriológicos en el diagnóstico de la mastitis del bovino. *ARCH. Méd. Vet.* Vol. III (1): 32-35.

E R R A T A

Agricultura Técnica 37 (4)

En la página 155, TITULO, DONDE DICE:

EFEECTO DEL PESO DE VAQUILLAS A TEMPRANA EDAD SOBRE SU COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y REPRODUCTIVO

DEBE DECIR:

EFEECTO DEL PESO DE VAQUILLAS CUBIERTAS A TEMPRANA EDAD SOBRE SU COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y REPRODUCTIVO.

En la página 160, RESUMEN, DONDE DICE:

Los pesos ante-partum fueron de 463 Kg y 410 Kg, y los post-partum fueron de 527 Kg y 465 Kg, en cada grupo, respectivamente.

DEBE DECIR:

Los pesos ante-partum fueron de 527 Kg y 465 Kg, y los post-partum fueron de 463 y 410 Kg, para los grupos pesado y liviano, respectivamente.

On page 160, SUMMARY, WHERE IT SAYS:

The bodyweights before parturition were 463 and 410 Kg, and after parturition were 527 and 465 Kg for the heavy and light groups, respectively.

IT SHOULD READ:

The bodyweights before parturition were 527 and 465 Kg, and after parturition were 463 and 410 Kg for the heavy and the light groups, respectively.