

Patrones de resistencia a los antibióticos en bacterias aisladas de mastitis subclínicas

Antibiotic resistance patterns in bacteria isolated from subclinical mastitis

Katherine Chávez Rosero¹, Luis Condolo Ortiz^{1*}, Pamela Vinueza Veloz¹,
Nicole Tiama Paucar¹

RESUMEN

El objetivo del estudio fue valorar la resistencia de bacterias aisladas de mastitis subclínica de vacas Holstein mestizas de la Comunidad Tunshi San Nicolás, Chimborazo, Ecuador. Se analizó la leche de los cuatro cuartos mamarios de 90 vacas en lactación mediante la prueba diagnóstica de California Mastitis Test (CMT). Cuarenta vacas resultaron con al menos un cuarto positivo. El cultivo bacteriano se realizó en Agar Sangre y Agar MacConkey y la identificación mediante tinción Gram y pruebas bioquímicas. La prueba de sensibilidad y resistencia bacteriana a los antibióticos se efectuó empleando el protocolo Kirby-Bauer. Se aislaron patógenos gram positivos: *Staphylococcus* spp. (84.1%) y *Streptococcus* spp. (15.9%), y gram negativos: *Escherichia* spp. (73.8%) y *Klebsiella* spp. (26.2%). Para todos los aislados, la sensibilidad a la gentamicina fue de 100% y a la tetraciclina de 80.2%, mientras que la resistencia fue evidente a la penicilina con 65.4%.

Palabras clave: resistencia antibacteriana, mastitis bovina, Ecuador, antibiograma

¹ Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

* Autor de correspondencia: Luis Condolo Ortiz; luis.condolo@epoch.edu.ec

Recibido: 26 de febrero de 2024

Aceptado para publicación: 18 de enero de 2025

Publicado: 28 de febrero de 2025

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the resistance of bacteria isolated from subclinical mastitis in crossbred Holstein cows from the Tunshi San Nicolás Community, Chimborazo, Ecuador. Milk from the four mammary quarters of 90 lactating cows was analysed using the California Mastitis Test (CMT). Forty cows had at least one positive quarter. Bacterial culture was performed on Blood Agar and MacConkey Agar and identification was done using Gram staining and biochemical tests. The test for bacterial sensitivity and resistance to antibiotics was performed using the Kirby-Bauer protocol. Gram-positive pathogens were isolated: *Staphylococcus* spp. (84.1%) and *Streptococcus* spp. (15.9%), and Gram-negative pathogens: *Escherichia* spp. (73.8%) and *Klebsiella* spp. (26.2%). Sensitivity to gentamicin was 100% for all isolates, and to tetracycline 80.2%, while resistance was evident to penicillin with 65.4%.

Keywords: antibacterial resistance, bovine mastitis, Ecuador, antibiogram

INTRODUCCIÓN

La mastitis constituye una reacción inflamatoria de los tejidos de la ubre que se origina por numerosos mecanismos, incluyendo infecciones microbianas, afecciones mecánicas, químicas, termales o traumáticas (Seegers *et al.*, 2003). En particular, la mastitis infecciosa, un padecimiento común en vacas lecheras, resulta en cuantiosas pérdidas económicas. El impacto económico directo se debe principalmente a la disminución en la producción lechera, cambios en la composición química de la leche, o al sacrificio temprano de los animales, mientras que las indirectas pueden ser más difíciles de evaluar, pero se asocian con costos de tratamiento o atención veterinaria (Giannechini *et al.*, 2002; Guimarães *et al.*, 2017). Aun cuando las pérdidas económicas pueden ser un factor limitante para las explotaciones lecheras, la mastitis, especialmente la clínica, constituye además un serio problema para el bienestar animal, ya que se relaciona con intenso dolor y afectación de la calidad de vida (Leslie y Petersson, 2012).

Bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (*Strep. agalactiae*), *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae* y

Escherichia coli se encuentran entre los más frecuentes en casos de mastitis (Reyher *et al.*, 2012). Sin embargo, otros agentes etiológicos relacionados con esta patología pueden ser, en ocasiones subestimados, tales como *Bacillus* spp o *Staphylococcus* coagulasa negativa, microorganismos considerados como agentes productores de mastitis medioambiental, término acuñado para referirse a mastitis no contagiosas (Pyörälä, 2002). Este hecho sugiere que el tratamiento enfocado en el agente etiológico más probable (*S. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae* o *E. coli*) puede ser en realidad una de las razones por la que los tratamientos fracasan y favorecen la aparición de bacterias resistentes (Reyher *et al.*, 2012).

Por otro lado, las medidas de manejo para evitar o mitigar la mastitis en explotaciones lecheras forman parte de un complejo de medidas de control que requiere un profundo conocimiento de patrones epidemiológicos de mastitis (Sears y McCarthy, 2003; Hogeveen *et al.*, 2021), en oposición a la terapia antimicrobiana.

Antibióticos de amplio uso en las ganaderías como los betalactámicos (penicilina y cefalosporina), tetraciclinas y aminoglucósidos

(gentamicina), surgieron como una alternativa rápida, efectiva y segura para el tratamiento de la mastitis (Ying *et al.*, 2009; Tomanic *et al.*, 2023). Sin embargo, su uso frecuente e indiscriminado ha causado el surgimiento de bacterias multirresistentes (Escobar *et al.*, 2022), que no solo comprometen la estabilidad económica de las explotaciones lecheras, sino que son un serio riesgo para la salud pública, animal y medioambiental (Demirci, 2023).

Las explotaciones lechereas de Ecuador comprenden en su mayoría predios familiares o de pequeña escala (Instituto Nacional de Estadística y Censos del Ecuador, 2010), y se desconoce mayormente la situación de la mastitis en comunidades campesinas, en donde las limitaciones económicas limitan la tecnificación de la producción o un manejo basado en evidencias (Hogeveen *et al.*, 2021). Al considerar que la ganadería es una de las principales actividades de las familias campesinas, el objetivo de este estudio fue determinar la etiología de mastitis bovina, así como determinar su susceptibilidad a los agentes antibióticos más usados (penicilina, tetraciclina, gentamicina y cefalexina) en la Comunidad Tunshi - San Nicolás de la Provincia de Chimborazo – Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prevalencia de Mastitis

El estudio se llevó a cabo en la Comunidad Tunshi - San Nicolás de la parroquia Licto, provincia de Chimborazo, Ecuador, siendo el primer estudio realizado en el sector sobre producción bovina lechera, con una población indígena de bajos recursos, y con un manejo ganadero empírico, sin mayor orientación profesional. Se desconoce en esta población los tiempos de retiro de los medicamentos aplicados, especialmente de la penicilina. Del total de bovinos (n= 180 vacas) se seleccionaron las 90 vacas que se encontraban en lactación. Estas eran vacas multíparas con edades entre 4 y 7 años, cruce de criollo

y Holstein Friesian. Las hembras presentaban producciones de 5 a 10 L/día, dividido en un ordeño en la mañana y otro en la tarde.

Se utilizó la prueba diagnóstica de California Mastitis Test (C.M.T[®] Laboratorios Life, Ecuador). Para esto, tras descartar el primer chorro de leche, se mezcló el reactivo CMT (2 ml) con un volumen igual de leche por 10 s en la paleta de prueba y se registraron los resultados dentro de los 20 s posteriores según las pautas del Consejo Nacional de Mastitis: 0 (negativo), trazas (sospechoso), 1+ (positivo débil), 2+ (positivo medio) y 3+ (positivo fuerte) (NMC, 2017). Cada cuarto fue evaluado por separado. Para calcular la prevalencia de mastitis, cada animal fue considerado como positivo si al menos un cuarto de la glándula mamaria resultó afectado.

Cultivo y Aislamiento Bacteriológico

Se tomaron muestras de leche de cada cuarto positivo a la prueba de CMT. Para ello, las ubres fueron lavadas con agua limpia y secadas con papel absorbente de un solo uso. Se descartó los cinco primeros chorros, se limpió la abertura del pezón con alcohol al 70% y se dejó secar. Finalmente, se colectó 10 ml de leche en tubos estériles con tapa y transportados a 4 °C en cajas isotérmicas hasta el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal «LABIMA» de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) para los análisis respectivos.

Los microorganismos relacionados con la mastitis fueron detectados utilizando pruebas estándar de laboratorio. Las muestras fueron sembradas en agar sangre (Agar Columbia – Difco, EE. UU.) enriquecido con 5% de sangre estéril de cordero y MacConkey (Difco, EE. UU.) e incubadas en un medio aeróbico a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente se realizaron subcultivos para la caracterización morfológica y bioquímicas, basadas en Tinción Gram y pruebas bioquímicas, incluyendo oxidasa, catalasa, citrato y ureasa.

Prueba *in vitro* de Sensibilidad a los Antibióticos

El análisis de sensibilidad y resistencia bacteriana a los antibióticos se efectuó usando el protocolo Kirby-Bauer. En breve, los cultivos fueron esparcidos en agar Mueller-Hinton y la susceptibilidad a los siguientes antibióticos fue determinada: Penicilina G (PG, 10 unidades/disco), Tetraciclina (TC, 30 µg/disco), Gentamicina (GM, 30 µg/disco) y Cefalexin (30 µg/disco). Las zonas de inhibición se midieron tras 18 horas de incubación a 37 °C y los resultados fueron leídos de acuerdo con la escala de McFarland. Los resultados fueron expresados en términos de susceptible o resistente.

RESULTADOS

Prevalencia de mastitis

De las 90 vacas evaluadas, 40 (44.4%) resultaron positivas para la prueba CMT (Cuadro 1). La mayor parte de los animales (n = 20) estuvieron afectados en un solo cuarto, en tanto que 10 de ellas resultaron positivas en dos cuartos, 8 en tres cuartos y 2 en los cuatro cuartos.

En el Cuadro 2 se presenta la frecuencia de mastitis subclínica por cuartos mamarios. La mayor parte de animales sufrió el proceso de mastitis en el cuarto posterior izquierdo

Cuadro 1. Prevalencia de mastitis diagnosticadas mediante CMT según el total de vacas Holstein mestizas y total de cuartos mamarios en la Comunidad Tunshi San Nicolás, Chimborazo (n=90 vacas)

	Animales		Cuartos	
	n	%	n	%
Positivo	40	44.4	74	20.6
Negativo	50	55.6	286	79.4
Total	90	100.0	360	100.0

Cuadro 2. Prevalencia de mastitis según el cuarto mamario en vacas Holstein mestizas de la Comunidad Tunshi San Nicolás, Chimborazo

Cuartos infectados	Positivo		Negativo	
	n	%	n	%
CAD	13	14.4	77	85.6
CAI	15	16.7	75	83.3
CPD	21	23.3	69	76.7
CPI	25	27.8	65	72.2
Total	74	20.6	286	79.4

CAD: cuarto anterior derecho; CAI: cuarto anterior izquierdo; CPD: cuarto posterior derecho; CPI: cuarto posterior izquierdo

(27.8%), seguido del cuarto posterior derecho (23.3%), no habiendo diferencias significativas entre cuartos posteriores.

Cultivo y asilamiento bacteriológico

Los principales agentes etiológicos de mastitis resultantes del análisis microbiológico fueron *Staphylococcus* spp (84.1%), *Escherichia* spp. (73.8%), *Klebsiella* spp. (26.2%) y *Streptococcus* spp. (15.9%) (Cuadro 3).

Prueba *in vitro* de sensibilidad a los antibióticos

Los antibióticos con altos índices de sensibilidad fueron la gentamicina (100%) y la tetraciclina (80.2%) (Cuadro 4). Estos resultados indicaron que el mayor porcentaje de resistencia fue para la penicilina con 65.4% y para cefalexina y tetraciclina, aunque en porcentajes inferiores al 50%. La gentamicina y la cefalexina fueron sensibles en los aislados de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp.), mientras que solo la gentamicina tuvo efecto en los aislados de bacterias Gram negativas (*Klebsiella* spp. y *Escherichia* spp.) (Cuadro 4).

Cuadro 3. Géneros bacterianos aislados de las muestras de leche de bovinos de la Comunidad Tunshi San Nicolás, Chimborazo (n= 40 vacas Holstein mestizas positivas / 74 cuartos mamarios positivos)

	CAD	CAI	CPD	CPI	Promedio
<i>Staphylococcus</i> (%)	81.2	90.0	75.0	90.0	84.1
<i>Streptococcus</i> (%)	18.8	10.0	25.0	10.0	15.9
<i>Klebsiella</i> (%)	12.5	30.0	37.5	25.0	26.2
<i>Escherichia</i> (%)	87.5	70.0	62.5	75.0	73.8

CAD: cuarto anterior derecho; CAI: cuarto anterior izquierdo; CPD: cuarto posterior derecho; CPI: cuarto posterior izquierdo

Cuadro 4. Sensibilidad a los antibióticos de los aislados bacterianos obtenidos de vacas Holstein mestizas de la Comunidad Tunshi San Nicolás, Chimborazo (n= 40 vacas Holstein mestizas positivas / 74 cuartos mamarios positivos)

Género bacteriano	Antibiótico			
	Penicilina (%)	Tetraciclina (%)	Gentamicina (%)	Cefalexina (%)
<i>Staphylococcus</i>	28.0	83.5	100.0	100.0
<i>Streptococcus</i>	57.3	59.4	100.0	100.0
<i>Klebsiella</i>	16.7	95.8	100.0	20.8
<i>Escherichia</i>	36.5	81.9	100.0	48.4
Promedio	34.6	80.2	100.0	67.3

DISCUSIÓN

La mastitis bovina es una de las enfermedades más comunes del ganado lechero del Ecuador. Su prevalencia varía según la zona geográfica. De acuerdo con este estudio, la prevalencia de mastitis subclínica en Chimborazo fue de 44.4%, mientras que en otras provincias como Pichincha (Mazón *et al.*, 2023), Los Ríos (Sánchez *et al.*, 2020) o el Oro (Amer *et al.*, 2018) se han reportado prevalencias de 36.8, 52.2 y 72.0%, respectivamente. De igual forma, en países latinoamericanos se han reportado valores variables como en Colombia de 31.4% (Salamanca *et al.*, 2023) y en Perú de 51% (Alvarado *et al.*, 2019), dependiendo del tipo y manejo animal y de los factores medioambientales existentes en cada región.

Los cuartos mamarios más afectados fueron los cuartos posteriores en comparación a los cuartos anteriores, resultados concordantes con los estudios de Gómez *et al.* (2015) y Bonifaz y Conlago (2016). Las razones detrás de este evento incluyen el mayor contacto con heces, los golpes con los corvejones ocasionados al caminar y el almacenamiento de mayor cantidad de leche (Yera y Ramírez, 2016).

Los agentes causales de las mastitis detectadas fueron bacterias de los géneros *Staphylococcus* spp, *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. y *Streptococcus* spp., especialmente por los dos primeros con 84.1% y 73.8%. En el estudio de Balemi *et al.* (2021) también se identificó mayor prevalencia de *Staphylococcus* spp. (79.8%) y *Escherichia* spp. (9.4%); sin embargo, otros autores han

indicado índices altos de *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. (Saidi *et al.*, 2013; Tegegne *et al.*, 2020; Girma y Tamir, 2022).

Para el tratamiento de la mastitis se utilizan generalmente diferentes grupos de antibióticos como son los betalactámicos, las tetraciclinas y los aminoglucósidos. En este estudio se probaron cuatro fármacos (penicilina, cefalexina, tetraciclina y gentamicina), con resultados de 100% de sensibilidad para todos los gérmenes para la gentamicina y de 80.2% para la tetraciclina. En cambio, cerca del 65.4% de los aislados fueron resistentes a la penicilina. Estos resultados puede ser producto del uso prolongado e indiscriminado que se da a estos medicamentos antimicrobianos (Balemi *et al.*, 2021).

Para *Staphylococcus* spp., el principal agente etiológico de la mastitis subclínica, los antibióticos más eficientes fueron la gentamicina (100%) y la cefalexina (100%) y el menos eficiente la penicilina (28.0%). Es importante indicar que la resistencia a los betalactámicos puede estar mediada a través de dos mecanismos la producción de betalactamasas (Naranjo y Slowey, 2023) o la formación de biopelículas (Oliveira *et al.*, 2007).

En una investigación realizada también en el sector Tunshi, Chimborazo, Maldonado *et al.* (2022) encontraron que los antibióticos con mejores niveles de sensibilidad para *Staphylococcus* fueron la tetraciclina (86.1%) y la penicilina (36.1%), posiblemente debido al adecuado y controlado suministro de estos dentro de la explotación ganadera. En contraste a ello, Lämmler *et al.* (2011) manifiestan que a causa de que la penicilina ha sido considerada por mucho tiempo como la primera alternativa para el tratamiento de mastitis en bovinos, el desarrollo de la resistencia bacteriana ha resultado inevitable, de tal forma que este problema es común en las explotaciones lecheras, tal y como ha sido reportado por diversos autores (Mesquita *et al.*, 2019; Balemi *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

- Los géneros bacterianos más frecuentes causantes de mastitis en bovinos de la Comunidad Tunshi San Nicolás, Chimborazo, en orden descendente fueron *Staphylococcus* spp, *Escherichia* spp, *Klebsiella* spp y *Streptococcus* spp.
- El antibiótico con mayor índice de sensibilidad fue la gentamicina y el de mayor resistencia fue la penicilina.

LITERATURA CITADA

1. **Alvarado W, González J, Quilcate C, Saucedo J, Bardales J. 2019.** Factores de prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras del distrito de Florida, Región Amazonas, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 30: 923-931. doi: 10.15381/rivep.v30i2.16088
2. **Amer S, Gálvez FLA, Fukuda Y, Tada C, Jimenez IL, Valle WFM, Nakai Y. 2018.** Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *J Vet Med Sci* 80: 861-868. doi: 10.1292/jvms.17-0504
3. **Balemi A, Gumi B, Amenu K, Girma S, Gebru M, Tekle M, Ríus A, et al. 2021.** Prevalence of mastitis and antibiotic resistance of bacterial isolates from CMT positive milk samples obtained from dairy cows, camels, and goats in two pastoral districts in Southern Ethiopia. *Animals* 11: 1530. doi: 10.3390/ani11061530
4. **Bonifaz N, Conlago F. 2016.** Prevalencia e incidencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test con identificación del agente etiológico, en Paquiestancia, Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 24: 43-52.
5. **[NMC] Consejo Nacional de Mastitis. 2017.** Laboratory handbook on bovine mastitis. 3rd ed. Minnesota: USA. 90 p.

6. **Demirci M, Yigin A, Altun S, Ekici S. 2023.** A molecular investigation of extended spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp in raw cow milk. *Turk J Vet Anim Res* 7: 1-5. doi: 10.47748/tjvr.1092631
7. **Escobar M, Gonzáles A, Buela L, Cuenca M, Guamán M, Yarzabal L. 2022.** Detección de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* en leche de vacas con mastitis clínica y subclínica, en el cantón Biblián, Provincia de Cañar, Ecuador. En: *Jornadas Científicas Unidad Académica de Salud y Bienestar*. Ecuador.
8. **Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno J. 2002.** Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand* 43: 221-230. doi: 10.1186/1751-0147-43-221.
9. **Girma A, Tamir D. 2022.** Prevalence of bovine mastitis and its associated risk factors among dairy cows in Ethiopia during 2005-2022: a systematic review and meta-analysis. *Vet Med Int* 17: 7775197. doi: 10.1155/2022/7775197.
10. **Gómez O, Santivañez C, Arauco F, Espezua O, Manrique J. 2015.** Criterios de interpretación para California Mastitis Test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. *Rev Inv Vet Perú* 26: 86-95. doi: 10.15381/rivep.v26i1.-10912
11. **Guimarães JLB, Brito MAVP, Lange CC, Silva MR, Ribeiro JB, Mendonça LC, Mendonça JFM, et al. 2017.** Estimate of the economic impact of mastitis: a case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. *Prev Vet Med* 142: 46-50. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.04.011
12. **Hogeveen H, Klaas I, Dalen G, Honig H, Zeconi A, Kelton DF, Sánchez M. 2021.** Novel ways to use sensor data to improve mastitis management. *J Dairy Sci* 104: 11317-11332. doi: 10.3168/jds.2020-19097
13. **Instituto Nacional de Estadística y Censos del Ecuador. 2010.** Encuesta anual de superficie y producción agrícola 2010. Microdatos en la FAO.
14. **Lämmle C, Castañeda H, Nawara E, Zschöck M, El Sayed A. 2011.** Resistencia a penicilina G y oxacilina, de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina subclínica. *Vet Méx* 42: 207-217.
15. **Leslie K, Petersson C. 2012.** Assessment and management of pain in dairy cows with clinical mastitis. *Vet Clin N Am-Food A* 28: 289-305. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.04.002
16. **Maldonado F, Santos C, Quilapanta A, Mena L. 2022.** Diagnóstico de mastitis subclínica mediante tres métodos para el control y tratamiento en bovinos de leche Holstein. *Dominio de las Ciencias* 8: 773-790. doi: 10.23857/dc.v8i1.2603
17. **Mazón J, Mazón D, Curay R, Bayas F. 2023.** Isolation and identification of bacteria causing bovine mastitis as a function of lactation time in dairy cows from northwestern Pichincha – Ecuador. *Chelonian Conserv Biol* 18: 1638-1650.
18. **Mesquita A, Rocha C, Bruhn F, Custódio D, Braz M, Pinto S. 2019.** *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. *Pesqui Vet Brasil* 39: 308-316.
19. **Naranjo A, Slowey R. 2023.** Invited review: Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens: A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European countries. *J Dairy Sci* 106: 1-23. doi: 10.3168/jds.2022-22267
20. **Oliveira M, Nunes F, Carneiro C, Bexiga R, Bernardo F, Vilela L. 2007.** Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* 124: 187-191. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.016

21. **Pyörälä S. 2002.** New strategies to prevent mastitis. *Reprod Domest Anim* 37: 211-216. doi: 10.1046/j.1439-0531.-2002.00378.x.
22. **Reyher K, Haine D, Dohoo I, Revie C. 2012.** Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens - a systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci* 95: 6483-6502. doi: 10.3168/jds.2012-5594.
23. **Saidi R, Khelef D, Kaidi R. 2013.** Bovine mastitis: prevalence of bacterial pathogens and evaluation of early screening test. *Afr J Microbiol Res* 7: 777-782. doi: 10.5897/AJMR12.1515
24. **Salamanca A, Vélez M, Tamasaukas R, Jáuregui R, Casanova P, Arias J. 2023.** Assessment of the prevalence of subclinical mastitis through two on-farm tests in dual-purpose livestock system of Colombian Orinoquia. *J Appl Anim Res* 51: 599-607. doi: 10.1080/09712119.-2023.2256829
25. **Sánchez S, Sánchez I, Gómez J, Loor J. 2020.** Mastitis subclínica en hatos lecheros medianos del Cantón Babahoyo provincia de Los Ríos. *J Sci Res* 5: 200-210.
26. **Sears P, McCarthy K. 2003.** Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin N Am-Food A* 19: 171-85. doi: 10.1016/s0749-0720(02)00079-8
27. **Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. 2003.** Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* 34: 475-491. doi: 10.1051/vetres:2003027
28. **Tegegne DT, Yalew ST, Emeru BA, Messele YE, Werid GM, Bora SK, Babura MD. 2020.** Study of prevalence, associated risk factors and causative bacteria of bovine mastitis in Ethiopia. *Int J Vet Sci Technol* 4: 1-6.
29. **Tomanice D, Samardžija M, Kovačević Z. 2023.** Alternatives to antimicrobial treatment in bovine mastitis therapy: a review. *Antibiotics* 12: 683. doi: 10.3390/antibiotics12040683
30. **Yera G, Ramírez W. 2016.** La prevalencia de mastitis clínica en vacas mestizas Holstein x cebú. *Redvet* 17(3). [Internet]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63646040004>
31. **Ying K, Haoyu J, Yasunori T. 2009.** Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Appl Microbiol Biot* 84: 135-142. doi: 10.1007/s00253-009-2008-6