



Prácticas de manejo del ordeño asociadas con la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* en tanques de leche de hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia

Ángela Sofía Ágredo Campos

Trabajo de grado como requisito para optar al título de  
Magister en Ciencias Veterinarias

Director

Nicolás Fernando Ramírez Vásquez, MV, MSc., Dr. An. Sci.

Comité asesor

Jorge A. Fernández Silva, MV, MSP, Dr. Med. Vet.

Jhon Didier Ruiz Buitrago, MV, MSc., Dr. Far. Toxi

Línea de Epidemiología y Salud Pública Veterinaria

Programa de Posgrado en Ciencias Veterinarias

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Antioquia

Medellín

2019

## **Dedicatoria**

A mi familia que acompaña con amor mi vida.

## **Agradecimientos**

Gratitud a los profesores Nicolás Ramírez, Jorge Fernández y Jhon Didier Ruiz por el acompañamiento en este proceso académico.

A las Dras. Cecilia Camussone, Ana Molineri y al Dr. Luis Calvino por su apoyo en la investigación molecular y por recibirme con afecto en su laboratorio.

Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia por financiar la investigación.

A los productores de San Pedro de los Milagros por permitir tomar las muestras y brindar la información solicitada.

A los jóvenes investigadores CODI por su apoyo en la toma de muestra y trabajo en el laboratorio.

A los integrantes de la Línea de Epidemiología y Salud Pública Veterinaria del grupo CENTAURO de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, por el camino de aprendizaje y la discusión académica.

Este trabajo se realizó gracias a la contribución de muchas personas, pero quiero resaltar el apoyo de aquellas que acompañaron este camino, especialmente a mi familia. A la profesora Lina Carrillo, que me ayudó a soñar y ver más allá de las barreras. A mis amigas que con un abrazo me alentaron a seguir adelante. Auxiliares del laboratorio que día a día me dieron una mano. A las personas de INTA, Rafaela, especialmente a Matilde Nahim, Guillermo Suárez y Cacho por recibirme con cariño y solidaridad.

## Resumen general

A nivel mundial es conocido que la mastitis bovina es la enfermedad infecciosa más costosa y común en los hatos bovinos. Esta enfermedad es prevalente también en San Pedro de los Milagros, municipio ubicado en el Norte de Antioquia, que produce el 22.7% de la leche del departamento. Su sistema productivo está basado en lechería de trópico alto, pastoreo intensivo con pasto kikuyo y suplementación mediante concentrado comercial. El ordeño se realiza en potrero o sala, mediante máquina o de forma manual. El núcleo racial es Holstein, Jersey, y cruces de estas, entre otras. Los resultados de estudios efectuados en el municipio de San Pedro de los Milagros podrían, eventualmente, ser extrapolados a otros municipios del país cuyo sistema y técnicas de producción sean similares. Los cuatro primeros objetivos de este trabajo se desarrollan en el Capítulo 2. El primer objetivo fue, determinar la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* en tanques de leche de hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros. Tres muestras de leche de tanque se tomaron en 148 hatos de San Pedro de los Milagros durante diciembre de 2016 y octubre de 2017. Las muestras se tomaron de forma aséptica, se transportaron en refrigeración y se cultivaron en el laboratorio diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. Se encontró una prevalencia aparente para *S. agalactiae* de 8% (12/148) y para *S. aureus* de 23% (34/148). Para el segundo objetivo, identificar las prácticas de manejo relacionadas con el ordeño de los hatos del Municipio, y el tercero, establecer la asociación de las prácticas de manejo con la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* en hatos lecheros del Municipio de San Pedro de los Milagros, se realizó una encuesta en la primera visita a los 148 hatos indagando sobre características de hato y prácticas de manejo del ordeño. Se encontró que el 60% (89/180) de los

hatos tienen menos de 30 vacas en ordeño. El 52% (77/148) de los hatos cuenta con un ordeñador. En el 50% (74/148) el propietario del hato es el ordeñador. El principal núcleo racial de los hatos encuestados fue Holstein 81.8% (81/148). El ordeño en potrero es realizado en 86.5% (128/148) de los hatos. El 45.3% (67/148) de los hatos ordeña en potrero de forma mecánica y el 12.8% (19/148) en forma manual. En cuanto a prácticas durante el ordeño se encontró que 90.5% (134/148) de las personas se lavan las manos antes del ordeño, y 65.5% (97/148) de las personas se desinfectaban las manos antes del ordeño, usando productos clorados 38.5% (57/148) y yodados 27% (40/148). Pocas personas realizaban lavado de manos entre vacas durante el ordeño 27.7% (41/148) y 57.4% personas (85/148) usaban guantes desechables. En el manejo durante el ordeño en 82.43% (122/148) de los hatos se realizaba lavado de la ubre y de estos, 10.14% (15/148) la secaban. De esta manera en 63.5% (94/148) de los hatos lavaban los pezones y 54% (80/148) los secaban. El despunte era realizado por la mayoría de los hatos, 98.7%, (146/148), al igual que el presellado 87.8% (130/148). En 94.6% (122/148) de los hatos se realizaba mantenimiento al equipo de ordeño principalmente cada seis meses en 61.3% de los hatos (76/148). No hubo cambio de ordeñador en el último mes en 79.7% (118/148) de los hatos. En el modelo de regresión logística final se encontró asociación estadística entre hatos con más de 60 vacas en ordeño y positividad a *S. aureus*. Para hatos positivos a *S. agalactiae* se encontró asociación estadísticamente significativa en hatos sin ordeño manual en potrero con la presencia de esta bacteria en tanque. Para el cuarto objetivo, determinar el Recuento de Células Somáticas (RCS) y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en tanques de leche de hatos del Municipio de San Pedro Milagros, se tomó una muestra de leche de forma aséptica de cada tanque durante la primera visita. Las 148 muestras se procesaron en la Unidad de Diagnóstico de

la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia en el equipo Fossomatic® y Bactoscan® para el análisis de RCS y UFC, respectivamente. En RCS se tuvo en cuenta un valor  $\leq 300.000$  cel/ml como resultado negativo a mastitis contagiosa y  $> 300.000$  cel/ml como resultado positivo. Para el RCS se obtuvo una media aritmética de 301.600 cél/ml (IC 270.300 – 332.800) y una media geométrica de 255.643 cél/ml (IC 232.7779 - 280.7558) en los 148 hatos. En cuanto al valor positivo y negativo, el 59.5% (88/148) de los hatos tenían un valor de RCS en tanque  $\leq 300.000$  cel/ml y 60 (40.5%)  $>$  a 300.000 cél/ml. En cuanto a UFC se obtuvo una media geométrica de 18.100 cel/ml (IC 95% 14.133- 23.180 cel/ml) y una media aritmética de 110.939 cel/ml (IC 95% 47.893 - 173.985 (cel/ml)).

El quinto objetivo se desarrolla en el Capítulo 3, Identificar factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de tanques de leche de hatos del Municipio. A las cepas de *S. aureus* se realizó extracción de ADN mediante Kit comercial InnuPrep bacteria®. Se efectuó PCR convencional para identificar los genes 23s rARN, *nuc*, *Spa*, *Clfa*, *hla*, *hly*, *IcaA* e *IcaD*. De las 34 cepas identificadas mediante cultivo microbiológico, 30 fueron confirmadas por la amplificación de los genes 23sr RNA y *nuc*. La frecuencia de amplificación fue, *hla* 86,7% (26/30), *hly* 86,7% (26/30), *IcaA* 93,3% (28/30), *IcaD* 96,7% (29/30), *clfa* 96,7% (29/30) y *Spa* 100% (30/30). Se identificaron nueve *spa* tipos (I, 3% (1/30); II, 33% (10/30); III, 20%(6/30); IV, 6.6% (2/30); V, 3% (1/30); VI, 10% (3/30); VII, 3% (1/30); VIII, 16.7% (5/30); IX, 3% (1/30 cepas)).

Este estudio identificó que *S. aureus* y *S. agalactiae*, principales patógenos de mastitis contagiosa, están presentes en algunos hatos del municipio, a pesar de que los hatos evaluados en

su mayoría instauran prácticas adecuadas durante el ordeño. Sin embargo, evaluar características de producción propias de la región como lo son ordeño manual y mecánico en potrero, permitió identificar factores de riesgo como ordeño en potrero para la transmisión de *S. agalactiae* y hatos con más de 60 vacas en ordeño como factor de riesgo para la transmisión de *S. aureus*. Adicionalmente este trabajo aporta datos de vigilancia epidemiológica en características moleculares de *S. aureus*, ya que, se identificaron nueve spa tipos, evidenciando una alta variabilidad genética entre cepas del Municipio.

## Tabla de contenido

Resumen general.....	4
Lista de tablas .....	10
Introducción general.....	11
Referencias .....	17
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos .....	20
Capítulo 1. Revisión de literatura. ....	21
Mastitis bovina.....	21
Definición .....	21
Etiología de la mastitis bovina.....	22
Mastitis contagiosa.....	22
Mastitis ambiental.....	29
Signos clínicos .....	32
Diagnóstico.....	34
Cultivo microbiológico .....	35
Recuento de Células Somáticas (RCS) .....	37
California Mastitis Test (CMT) .....	39
PCR .....	40
Tratamiento.....	42
Epidemiología de la mastitis bovina .....	45
Factores de riesgo .....	45
Epidemiología de la mastitis en Colombia .....	48
Estrategias de prevención .....	50
Referencias .....	54
Capítulo 2 .....	61
El tamaño del hato y el tipo de ordeño están asociados a la prevalencia de bacterias patógenas en el tanque de almacenamiento de leche. ....	61
Resumen .....	61
Introducción.....	63
Materiales y métodos .....	66
Consideraciones éticas .....	66
Tipo de estudio y tamaño de muestra.....	66

Protocolo de visita.....	67
Recuento de Células Somáticas (RCS) .....	68
Cultivo bacteriológico .....	68
Definición de caso.....	69
Encuesta.....	69
Análisis estadístico.....	69
Resultados.....	71
Estadística descriptiva .....	71
Prevalencia de <i>S. aureus</i> y <i>S. agalactiae</i> en tanques de leche.....	73
Factores de riesgo de hato asociados a la presencia de <i>S. agalactiae</i> y <i>S. aureus</i> en tanque de leche. ....	73
Discusión .....	77
Capítulo 3 .....	93
Identificación molecular de factores de virulencia en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aisladas de leche de tanque en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia .....	93
Resumen .....	93
Introducción.....	95
Materiales y métodos .....	98
Muestreo e identificación microbiológica de <i>S. aureus</i> .....	98
Extracción de ADN.....	99
PCR .....	100
Análisis estadístico.....	101
Resultados.....	102
Discusión .....	104
Conclusión general.....	113
Anexos.....	116
Anexo 1. ....	116
Encuesta realizada por hato. ....	116
Anexo 2. ....	119
Algoritmo procesamiento muestra de leche, cultivo, extracción ADN .....	119
Anexo 3 .....	125
Resultado consolidado <i>S. aureus</i> : cultivo, PCR .....	125

## Lista de tablas

### Capítulo 1.

Tabla 1. Escala de severidad de mastitis clínica .....	34
Tabla 2. Prevalencia de infección estimada y pérdidas en la producción de leche asociadas con elevado Recuento de Células Somáticas en tanque de leche .....	39
Tabla 3. Evaluación de Recuento de Células Somáticas mediante CMT .....	40
Tabla 4. Resumen de las principales diferencias de los factores de riesgo y puntos de control para la prevención de mastitis contagiosa y ambiental. ....	51

### Capítulo 2.

Tabla 1. Variables descriptivas de 148 hatos lecheros en San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. ....	71
Tabla 2. Modelo de regresión logística final evaluando el efecto de las variables significativas ( $p < 0.05$ ) sobre hato positivo a <i>S. aureus</i> .....	74
Tabla 3. Modelo de regresión logística final evaluando el efecto de las variables significativas ( $p < 0.05$ ) sobre hato positivo a <i>S. agalactiae</i> . ....	74

### Capítulo 3.

Tabla 1. Oligonucleótidos y programas de termociclador usados para la amplificación de los genes que codifican 23S rARN y factores de virulencia de <i>S. aureus</i> .....	99
Tabla 2. Resultados obtenidos de PCR convencional para la identificación de genes que codifican para algunos factores de virulencia de <i>S. aureus</i> aislados de leche de tanque en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. ....	102
Tabla 3. Frecuencia y variabilidad del gen Spa que codifica para Región X de la proteína A en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de tanques de leche de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia .....	103

## Introducción general

La mastitis bovina es la enfermedad infecciosa más común y costosa en los hatos lecheros a nivel mundial (Andrews et al., 2004; Keefe, 2012; National Mastitis Council (NMC), 1999). En Estados Unidos se estimó que en promedio un caso clínico de mastitis tiene un valor de 444 dólares, de los cuales los costos directos suman 128 dólares que incluyen, diagnóstico, medicamentos usados, leche de descarte, servicio veterinario, trabajo y pérdidas por muertes. Los costos indirectos por cada caso de mastitis clínica incluyen pérdidas de producción de leche a futuro, sacrificios prematuros, pérdidas por reemplazos y pérdidas reproductivas futuras (Rollin, Dhuyvetter, & Overton, 2015). En Colombia, en un estudio realizado por Rodríguez (2006), en la sabana de Bogotá, reportó una disminución en la producción diaria de leche de hasta 2.4 litros por cuarto positivo con tres cruces en el CMT y pérdidas de hasta cinco litros por vaca afectada debido a mastitis originada principalmente por *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Además de los costos, la mastitis bovina también tiene un impacto negativo sobre el bienestar animal, debido al daño ocasionado en la glándula mamaria en infecciones clínicas o subclínicas como son dolor, pérdida de la función, fiebre (en algunos casos), daño en el tejido glandular, estrés por la manipulación, entre otros. Así mismo, es importante destacar el detrimento ocasionado a la calidad de la leche debido al aumento en el Recuento de Células Somáticas (RCS) (Greg Keefe, 2012) y el impacto potencial en la salud pública por presencia de bacterias como *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* en la leche cruda que va dirigida al consumo humano.

*S. agalactiae* y *S. aureus* son los principales patógenos de tipo contagioso en la mastitis bovina (Greg Keefe, 2012). La principal fuente de propagación de *S. aureus* y *S. agalactiae* de vacas

infectadas a sanas se da mediante fómites, durante el proceso de ordeño o preparación de la ubre, por el equipo de ordeño y las manos del ordeñador (Andrews et al., 2004; Zadoks et al., 2011). La bacteria se establece en la superficie y canal del pezón hasta penetrar a la glándula mamaria (Andrews et al., 2004).

Usualmente la infección por *S. aureus* en el animal es crónica y en esos casos la bacteria está en células epiteliales, neutrófilos y macrófagos (Sandholm et al., 1995). *S. aureus* produce varios factores de virulencia que pueden contribuir en diferentes formas a su patogenicidad (Sutra & Poutrel, 1994). La proteína de unión a fibrinógeno o factor clumping, codificado por los genes *Clfa* y *Clfb*, son proteínas de membrana receptoras de fibrinógeno que contribuyen a la formación del trombo, este mecanismo es importante para permitir la adhesión y permanencia de la bacteria al órgano blanco (Akineden et al., 2001; Hassan et al., 2002; Yadav et al., 2015). La alfa y beta toxina, codificadas por los genes *Hla* y *Hlb*, respectivamente, son proteínas de unión a membrana de las células blanco. La alfa toxina actúa principalmente sobre eritrocitos y la toxina beta sobre neutrófilos y linfocitos T proliferativos. La unión a la membrana de la célula blanco, genera lisis, permitiendo evadir la inmunidad celular y aprovechar los nutrientes intracelulares (Camussone & Calvino, 2013).

La proteína A, codificada por el gen *Spa*, es una proteína de superficie que se une a la Inmunoglobulina G del huésped, evitando la opsonización y la fagocitosis (Frenay et al., 1996). La región X de la proteína A, presenta un número variable de repeticiones y la última región es la que permite la variabilidad entre cepas, debido a que es altamente polimórfica y a que las

secuencias difieren entre ellas (Frenay et al., 1996). La diferenciación de clones se ha identificado mediante la evaluación de la mutación de la región X, estas cepas diferenciadas han sido llamadas spa-tipos (Frenay et al., 1996)

El *S. aureus* es difícil de tratar y una vez establecida en el tejido mamario el tratamiento puede ser ineficaz. La escasa respuesta al tratamiento se puede explicar por las siguientes razones: i) Enzimas y exotoxinas producidas por *S. aureus* injurian las células glandulares, cuyo resultado es la formación de una cápsula gruesa de tejido fibroso, lo cual evita que el antibiótico alcance la bacteria (Blowey & Edmondson, 2010; Morin, 2009), ii) algunas cepas de *S. aureus* pueden vivir dentro de células tales como macrófagos, células epiteliales y polimorfonucleares, por lo cual muchos antibióticos sólo pueden circular en el líquido que rodea las células y no pueden penetrar en las células mismas (Blowey & Edmondson, 2010), iii), pueden persistir en un estado de inhibición o cese de su multiplicación en el cual no son eliminadas por los antibióticos, aunque tienen la capacidad de activarse en una etapa posterior, iv) la mayoría de los *S. aureus* que causan infección intramamaria (IIM) producen la enzima  $\beta$ -lactamasa que les confieren resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y se ha teorizado que el extenso uso de este tipo de antibióticos inducen la producción de formas L de *S. aureus* (sin pared) por lo que muchos antibióticos no los pueden eliminar (Blowey & Edmondson, 2010; Smith, 2009).

Es así como *S. aureus* es una bacteria difícil de eliminar del hato, de fácil propagación entre animales susceptibles y con alto impacto sobre la calidad de leche y el bienestar animal. *S. agalactiae*, a diferencia de *S. aureus* es una bacteria susceptible al tratamiento antibiótico, lo cual indica que se puede eliminar mediante la terapia de secado al final de la lactancia. Sin embargo,

es necesario instaurar programas de identificación, control y prevención en hatos para reducir la incidencia de ambos patógenos en los animales.

En Colombia se han realizado varios estudios para determinar la frecuencia y prevalencia de *S. aureus* y *S. agalactiae* a nivel de animal en algunas zonas lecheras (Calderón et al., 2012; Calderón & Rodríguez, 2008; Keefe et al., 2011; Ramírez et al., 2014). En el altiplano cundiboyacense (n= 11.416 cuartos) (Calderón et al., 2008) y en sistemas doble propósito de Córdoba (n= 4260 cuartos) (Calderón et al., 2012) se evaluaron cuartos positivos a CMT en los cuales se encontró una prevalencia para *S. aureus* de 29.9% y 87.56% y para *S. agalactiae* de 6.84% y 2.1%, respectivamente. En el Altiplano Norte de Antioquia dos estudios evaluaron muestras de cuartos con RCS mayor a 200.000 cel/mL (n= 877 vacas) (Ramírez et al., 2011), (n= 17.622 vacas) (Ramírez et al., 2014) en los cuales se encontró una frecuencia para *S. agalactiae* de 34% y 34.4%, y para *S. aureus* de 5% y 8%, respectivamente. A nivel de tanque se han realizado pocos estudios de prevalencia de patógenos en el país. Uno de ellos corresponde a un estudio no probabilístico efectuado en nueve municipios de Colombia (n= 484 tanques de leche) en el cual se encontró una prevalencia para *S. agalactiae* de 42% (Keefe et al., 2011). Ningún estudio realizado hasta el momento ha evaluado otros patógenos en tanque de leche.

Se ha definido que la presencia de *S. aureus* y *S. agalactiae* en el tanque depende de su prevalencia al interior del rebaño (Greg Keefe, 2012). La infección clínica o subclínica tiene como consecuencia un aumento en el RCS en la leche, es así como valores por encima de 200.000 células/ml en leche de tanque es un indicador de mastitis contagiosa en el hato

(Andrews et al., 2004). Por ende, la evaluación rutinaria del RCS permite identificar la prevalencia e incidencia de la enfermedad en el hato (Ruegg & Erskine, 2015). El cultivo microbiológico es la prueba de oro para el diagnóstico etiológico de la mastitis bovina (National Mastitis Council (NMC), 1999; Taponen et al., 2009). De esta manera, el aislamiento se puede realizar a partir de muestras de leche individuales o por rebaño (tanque de leche) (Ruegg & Erskine, 2015). Por lo tanto, la evaluación rutinaria de RCS en tanque permitirá identificar brotes de casos de mastitis contagiosa en el rebaño y de esta manera se podrán tomar medidas de control, principalmente para la identificación de los animales afectados y de prevención para los animales susceptibles.

Para complementar algunas investigaciones, se han usado pruebas moleculares como método diagnóstico en la identificación de patógenos por los cuales los métodos bioquímicos son inexactos (Ruegg & Erskine, 2015; Zadoks & Watts, 2009). De esta manera la Prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) o PCR en tiempo real (rt-PCR) han permitido identificar la presencia de bacterias no viables en las muestras de leche a partir de ADN bacteriano (Taponen et al., 2009), además que permiten evaluar la diferenciación de cepas entre hatos mediante la identificación de factores de virulencia con potencial patógeno presente en cepas locales. Hasta el momento, en el país no se han realizado estudios para evaluar factores de virulencia presentes en el ADN de *S. aureus* aislados de mastitis bovina.

En cuanto a factores de riesgo en el país a nivel de hato para la presentación de mastitis clínica y subclínica, se han efectuado estudios no probabilísticos que identificaron potencialmente, las siguientes condiciones: raza Holstein, alta paridad, ordeño manual, ausencia de lavado de manos

antes del ordeño e incrementados meses en lactancia (Ramírez et al., 2014). Además, se encontró que alta paridad, incrementados meses en lactancia y ordeño manual son factores de riesgo a nivel de animal para la presentación de *S. aureus* (Ramírez et al., 2014).

Lo anterior indica que la mastitis de tipo contagiosa ocasionada por *S. aureus* y *S. agalactiae* está presente en las zonas lecheras de importancia económica en el país. Es de resaltar que *S. aureus* es una bacteria con alto potencial patogénico debido a su posibilidad de expresar factores de virulencia que le permite adherirse y evadir la barrera celular y humoral en el animal, para establecerse en el tejido de forma crónica lo que la hace de difícil eliminación. Por lo tanto, es necesario indagar acerca de los factores de riesgo específicos para las condiciones del país y de esta manera identificar puntos de intervención específicos para las condiciones de producción en Colombia.

Se detectó un vacío en el conocimiento debido a los pocos estudios realizados a nivel de tanque en el país para identificar la prevalencia de patógenos de tipo contagioso, como *S. agalactiae*, y por la ausencia de estudios enfocados a *S. aureus*, y en vista de los pocos estudios de tipo probabilístico y con diseño adecuado para el estudio de los factores de riesgo asociados a la presencia de bacterias contagiosas *S. aureus* y *S. agalactiae*, lo que motivó la ejecución del presente trabajo de investigación.

## Referencias

- Akineden O, Annemüller, C., Hassan, a, Lämmler, C., Wolter, W., & Zschöck, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(5), 959–964.  
<https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.959>
- Andrews, A., Blowey, R., Boyd, H., & Eddy, R. (2004). *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of cattle*. Blackwell Science. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). *The mastitis organisms. Mastitis Control in Dairy Herds* (2nd ed.). CAB. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Calderón, A., Rodríguez, V., Arrieta, G., Martínez, N., & Vergara, O. (2012). Calidad fisicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del sistema doble propósito en Montería (Córdoba). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 15(2), 399–407. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384913-7.00008-3>
- Calderón, A., & Rodríguez, V. C. (2008). Prevalência de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(4), 582–589.
- Camussone, C. M., & Calvino, L. F. (2013). Revista argentina de Microbiología. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con inmunógenos, 45(2), 119–130.
- Frenay, H. M., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Verhoef, J., & Mooi, F. R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(1), 60–64.
- Hassan, A. A., Akineden, O., Lämmler, C., & Huber-Schlenstedt, R. (2002). Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 49(5), 257–259.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00553.x>
- Keefe, G. (2012). Update on control of *staphylococcus aureus* and *streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>
- Keefe, G., Chaffer, M., Ceballos, A., Londono, M., Jaramillo, M., & Toro, M. (2011). E s c d i, 155–

159.

- Keefe, G., Chaffer, M., Ceballos, A., Londoño, M., Jaramillo, M., & Toro, M. (2011). Effects of *Streptococcus agalactiae* on the Columbian Dairy Industry. 3rd International Symposium on Mastitis and Milk Quality Colanta, 155–159.
- Morin, D. E. (2009). Mammary Gland Health and Disorders. In *Large animal internal Medicine* (Vol. 4 edition, pp. 99–105). <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2013.01.016>
- National Mastitis Council (NMC). (1999). *laboratory handbook on bovine mastitis* (Second edi). Verona, USA.
- Ramírez, N., Arroyave Henao, O., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (22), 31–42. Retrieved from <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/562>
- Ramírez Vásquez, N., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., ... Palacio, L. G. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4141–4150. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6815>
- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.006>
- Ruegg, P. L., & Erskine, R. (2015). Mammary Gland Health. In *Large animal internal Medicine* (pp. 1015–1043).
- Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, Kaartinen, L., & S. Pyörälä, ed, Gummerus, J. (1995). Detection of inflammatory changes in the milk. In *Bovine udder and mastitis* (pp. 89–104). Finland.
- Smith, B. P. (2009). *Large Animal Internal Medicine*. (ELSEVIER, Ed.) (4th ed.). St. Louis, Missouri.
- Sutra, L., & Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 40(2), 79–89.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., & Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical

mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2610–2617.

<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1729>

Yadav, R., Sharma, S. K., Yadav, J., Choudhary, S., & Kataria, A. K. (2015). Profiling of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic milk of cattle and buffalo. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(2), 1539–1544. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.398-402>.

Zadoks, R., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., & Schukken, Y. H. (2011). Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 357–372.

<https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>

Zadoks, R. N., & Watts, J. L. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 20–28.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.012>

### **Objetivo general**

Determinar la prevalencia de *S. agalactiae* y *S. aureus* en tanques de leche y asociar las prácticas de manejo del ordeño con esa prevalencia en hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* en tanques de leche de hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros Antioquia, Colombia.
2. Determinar el Recuento de Células Somáticas (RCS) y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) en tanques de leche de hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros Antioquia, Colombia.
3. Identificar las prácticas de manejo relacionadas con el ordeño y el almacenamiento de la leche, de los hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros Antioquia, Colombia.
4. Establecer la asociación de las prácticas de manejo con la prevalencia de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* en hatos lecheros del Municipio de San Pedro de los Milagros Antioquia, Colombia.
5. Identificar factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de tanques de leche de hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros Antioquia, Colombia.

## **Capítulo 1. Revisión de literatura.**

### **Mastitis bovina**

#### **Definición**

La mastitis bovina se ha definido como la inflamación de la glándula mamaria y cambios en la apariencia de la leche (Blowey & Edmondson, 2010; Divers & Peek, 2008; Ruegg & Erskine, 2015; Smith, 2009). Los cambios físicos y químicos en la ubre y la leche se deben a la respuesta inflamatoria, que evoca mecanismos químicos, físicos, celulares y humorales que protegen la glándula de la invasión bacteriana, neutraliza toxinas y resiste a la injuria física (Smith, 2009).

Cuando la infección está presente en la glándula pero no hay evidencia observable en el animal, en la ubre o en la leche, se conoce como mastitis subclínica (Blowey & Edmondson, 2010; Smith, 2009). La leche obtenida de cuartos mamarios afectados por mastitis subclínica tiene apariencia normal pero contiene un anormal número de células somáticas, por lo cual la evaluación se realiza mediante el Recuento de Células Somáticas (RCS) (Ruegg & Erskine, 2015).

Mastitis clínica se define cuando el cuarto se observa afectado con los signos cardinales de inflamación con signos sistémicos o no y/o la leche evidencia cambios en apariencia (Blowey & Edmondson, 2010; Smith, 2009).

## **Etiología de la mastitis bovina**

La mastitis bovina es una enfermedad esencialmente bacteriana, ocasionalmente puede ser de origen fúngico (Ruegg & Erskine, 2015). Los patógenos de la mastitis se han clasificado de acuerdo a la forma de transmisión y hábitat del agente (Smith, 2009). De esta manera la enfermedad se ha clasificado como mastitis contagiosa y ambiental (Divers & Peek, 2008; Smith, 2009).

### *Mastitis contagiosa*

El principal reservorio de los patógenos de la mastitis contagiosa es la glándula mamaria. La transmisión se efectúa de un animal infectado a un animal sano, principalmente durante el proceso de ordeño mediante la pezonera, las manos del operario, las toallas usadas para el secado y lavado de pezones (Blowey & Edmondson, 2010; Divers & Peek, 2008; NMC, 1999; Smith, 2009; Zadoks et al., 2011).

Después de ingresar al canal del pezón, los organismos contagiosos tienen factores que les permiten adherirse y establecer una colonia, para luego ascender hasta alcanzar el tejido mamario. Una vez allí, proliferan, desencadenando en infecciones persistentes y crónicas (Andrews et al., 2004; Blowey & Edmondson, 2010). De esta manera, se obtiene una infección clínica o subclínica, aumentando el RCS en la leche y disminuyendo la producción de leche por cuarto. Un RCS por encima de 200.000 células /ml es un indicador de mastitis contagiosa en el rebaño (Andrews et al., 2004; Blowey & Edmondson, 2010; Keefe, 2012; Smith, 2009), siendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* los principales patógenos de tipo contagioso

en la mastitis bovina (Blowey & Edmondson, 2010; Greg Keefe, 2012; National Mastitis Council (NMC), 1999; Smith, 2009).

### ***Staphylococcus aureus***

Es una bacteria Gram-positiva, catalasa positiva, con forma de pequeñas esferas y crecimiento en grupos, de ahí su nombre Staphylo (grupos) y coccus (esferas) (Philpot & Nickerson, 1991). En agar sangre se observa hemólisis y sus colonias son amarillas cremosas, grisáceas o amarillas oro (Blowey & Edmondson, 2010; National Mastitis Council 1999).

*S. aureus* se transmite de animales infectados a sanos, principalmente durante el ordeño. Inicialmente se adhiere a la piel del pezón, luego al orificio y canal del mismo. Esta bacteria coloniza las heridas y lesiones en estos lugares anatómicos y logra ascender hasta la glándula, es importante resaltar que esta bacteria no coloniza fácilmente la piel sana (National Mastitis Council (NMC), 1999). Ya en el tejido invade las células epiteliales y tejido intersticial, resistiendo a la fagocitosis debido a los factores de virulencia que posee (Smith, 2009).

*S. aureus* es difícil de eliminar ya que una vez establecido en el tejido mamario el tratamiento puede ser ineficaz. Se ha estimado un 25% de tasa de cura en casos de mastitis clínica y 40% en subclínica, ambos tratados con cloxacilina (Blowey & Edmondson, 2010). La escasa respuesta al tratamiento se puede explicar por las siguientes razones: i) Enzimas y exotoxinas producidas por *S. aureus* injurian las células glandulares, cuyo resultado es la formación de una cápsula gruesa de tejido fibroso, lo cual evita que el antibiótico alcance la bacteria (Blowey & Edmondson, 2010; Morin, 2009), ii) algunas cepas de *S. aureus* pueden vivir dentro de células tales como

macrófagos, células epiteliales y polimorfonucleares, por lo cual muchos antibióticos circulan en el líquido que rodea las células y no alcanzan a penetrar en las células mismas (Blowey & Edmondson, 2010), iii) pueden persistir en un estado de inhibición o cese de su multiplicación y no son eliminadas por los antibióticos, aunque pueden activarse en una etapa posterior. iv) Algunos de los *S. aureus* que causan infección intramamaria (IIM) producen la enzima  $\beta$ -lactamasa que les confieren resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y se ha teorizado que el extenso uso de este tipo de antibióticos induce la producción de formas L de *S. aureus* (sin pared) por lo que muchos antibióticos no los pueden eliminar (Blowey & Edmondson, 2010; Smith, 2009). Esta respuesta hace que la bacteria sea de difícil reconocimiento y por ende eliminación humoral y celular. Adicionalmente, los antibióticos no logran la supresión bacteriana completa en el tejido mamario afectado, principalmente cuando existe formación de abscesos los cuales impiden al antibiótico su llegada al lugar de infección, disminuyendo la tasa de cura en animales positivos y propiciando la resistencia bacteriana a antibióticos (Morin, 2009).

Los animales positivos y con resultados negativos al tratamiento se convierten en animales diseminadores de la bacteria en el hato. Estos individuos deben segregarse de los sanos para evitar infectar vacas sanas. Además del gran riesgo de transmisión que representan estos animales, se suman los costos por tratamientos inefectivos, descarte de leche y el aumento de RCS en tanque. Lo anterior evidencia la importancia de descartar un animal infectado como medida preventiva y de control de *S. aureus* en el rebaño (Morin, 2009).

Las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis bovina no se hallan frecuentemente en la piel sana (Philpot & Nickerson, 1991) y según Zadoks et al. (2002), las cepas de *S. aureus* causantes de

mastitis bovina son diferentes de las que se encuentran en la piel. En un estudio se aislaron cepas de *S. aureus* de la piel de hembras bovinas y se analizaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), evidenciando los mismos tipos de cepas aisladas de la piel de las manos del ordeñador (Zadoks et al., 2002). De esta manera, el equipo de ordeño y las manos de las personas que manipulan los animales son un foco de transmisión de las cepas asociadas a mastitis (Morin, 2009), es así como se ha comprobado que *S. aureus* en leche puede contaminar las siguientes ocho vacas ordeñadas (Blowey & Edmondson, 2010). Por otro lado, las abrasiones de la piel incrementan el riesgo de colonización del pezón por *S. aureus* y el paso subsecuente al tejido glandular mamario (Sandholm et al., 1995).

El sellado es una de las medidas preventivas instauradas a nivel mundial para el *S. aureus*, ya que puede destruir la contaminación bacteriana adquirida por la máquina de ordeño y las manos del ordeñador en la piel del pezón y con esto evitar el ingreso al canal del pezón (Blowey & Edmondson, 2010).

Usualmente la infección por *S. aureus* en el animal es crónica y en esos casos la bacteria está en células epiteliales, neutrófilos y macrófagos (Sandholm et al., 1995). *S. aureus* produce varios factores de virulencia que pueden contribuir en diferentes formas a su patogenicidad (Sutra & Poutrel, 1994), se incluyen acá hemolisinas, polisacáridos capsulares, proteína de unión a fibronectina, proteína de unión a fibrinógeno, leucocidinas, toxinas exfoliativas, enterotoxinas, coagulasa, biopelículas, entre otros (Camussone & Calvino, 2013; Zecconi et al., 2006).

### **Factores de virulencia de *S. aureus***

La patogenicidad de las cepas de *S. aureus* se relaciona con los diferentes factores de virulencia que puede expresar y se han considerado primarios para el desarrollo de la infección de la glándula mamaria (Camussone & Calvino, 2013).

La nucleasa termoestable extracelular, es una proteína codificada por el gen *nuc* (Brakstad et al., 1992). Es una endonucleasa que degrada ADN y ARN y su actividad enzimática resiste 100°C por al menos una hora (Brakstad et al., 1992). Se comprobó que el gen *nuc* es altamente conservado y además es especie- específico para *S. aureus*, por lo cual sirve para la confirmación molecular de cepas de esta bacteria (Brakstad et al., 1992). La sensibilidad de la PCR para el gen *nuc* fue de 1 a 20 UFC o entre 1 a 100 pg de ADN (Brakstad et al., 1992).

Los factores de virulencia del *S. aureus* son los principales responsables de los daños celulares ocasionados en la glándula mamaria. La expresión fenotípica depende de la presión ejercida por el medio siendo las adhesinas de superficie las primeras en interactuar con el huésped las cuales reconocen el sitio para facilitar la colonización, multiplicación y liberación de toxinas (Projan & Novick, 1997).

La proteína A, codificada por el gen *Spa*, es una proteína de superficie que se une a la Inmunoglobulina G del huésped, evitando la opsonización y la fagocitosis. Este gen tiene un tamaño aproximado de 2150 pb y presenta varias regiones funcionales, entre las más importantes está la región de unión a la Fc, llamada proteína A (Frenay et al., 1996). La región X presenta un número variable de repeticiones de 24 pb, la última región es la que permite la variabilidad entre

cepas, ya que es altamente polimórfica debido a que el número y secuencias individuales difieren entre ellas (Frenay et al., 1996). En un estudio realizado por Frenay, et al, (1996) en cepas de *S. aureus MRSA* aisladas de humanos con fibrosis quística con infección persistente durante cinco años, no evidenciaron cambios en la secuencia del ADN de la región X de la proteína A, lo cual demostró que este gen es estable y permite discriminar diferencia entre clones (Frenay et al., 1996). La identificación de esta región se ha usado en brotes de *S. aureus* de hospitales, con el fin de diferenciar clones y mutaciones entre cepas de los brotes diferenciados por la mutación de la región X (Frenay et al., 1996)

La proteína de unión a fibrinógeno o clumping factor, codificado por los genes *Clfa* y *Clfb*, son proteínas de membrana receptora de fibrinógeno, que contribuye a la formación del trombo, este mecanismo es importante para permitir la adhesión y permanencia de la bacteria al órgano blanco (Akineden et al., 2001; Hassan et al., 2002; Yadav et al., 2015).

La alfa y beta toxina, codificadas por los genes *hla* y *hlb*, respectivamente, son proteínas de unión a membrana de las células blanco. La alfa toxina actúa principalmente sobre eritrocitos y la toxina beta sobre neutrófilos y linfocitos T proliferativos. La unión a la membrana de la célula blanco, genera lisis, permitiendo evadir la inmunidad celular y aprovechar los nutrientes intracelulares (Camussone & Calvino, 2013).

Entre los factores de virulencia de mayor relevancia para la salud pública están, toxina exfoliativa A (TEA) relacionada con el síndrome de la piel escaldada, la toxina del Síndrome del Shock Séptico 1 (TSS-1) y Enterotoxinas estafilocócicas (ES) (Bailey, 2004; Hassan et al.,

2002; Ministerio de salud y protección social, Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA), & Instituto Nacional de Salud (INS), 2011).

### *Streptococcus agalactiae*

Son bacterias Gram positivas y catalasa negativa que forman cadenas de esferas de ahí su nombre strepto (cadenas) y agalactiae (falta de leche o sin leche) (Philpot & Nickerson, 1991). En el agar sangre se observan colonias pequeñas de aproximadamente 1 a 2 mm, son convexas y translúcidas. Las pruebas de identificación son características CAMP positivo y esculina negativa (National Mastitis Council (NMC), 1999).

Es un patógeno obligado de la glándula mamaria bovina que causa principalmente mastitis subclínica (Blowey & Edmondson, 2010; G Keefe, 1997; National Mastitis Council (NMC), 1999). Tiene la habilidad de adherirse al tejido mamario de las vacas y el microambiente específico de la ubre bovina es necesario para el crecimiento de la bacteria. Se localiza principalmente en los ductos y células epiteliales de la glándula mamaria. El tratamiento a tiempo disminuye el daño en el tejido glandular evitando fibrosis por mastitis crónica. La infección por esta bacteria disminuye la producción por cuarto y eleva sustancialmente el RCS (Smith, 2009).

La patogenicidad de la bacteria depende de la expresión fenotípica de factores de virulencia. Algunos de ellos como la cápsula, proteína de unión a laminina, la proteína de superficie Rib y la enzima ScpB, permiten a la bacteria evadir a los neutrófilos y así lograr la invasión en las células

epiteliales (Beckmann et al., 2002). La proteína de superficie alfa C y la beta hemolisina son factores de virulencia que generan injuria en el tejido, permitiendo su permanencia en el sitio blanco (Beenu et al., 2012).

La respuesta de las infecciones por *S. agalactiae* a los antibióticos es buena, por lo cual en varios países se ha logrado erradicarla de los hatos (Blowey & Edmondson, 2010; National Mastitis Council (NMC), 1999; Ruegg, 2017; Smith, 2009). La transmisión del patógeno en el hato puede ocurrir durante el ordeño a través del uso de fómites para el aseo de la ubre contaminados con leche de vacas infectadas (Blowey & Edmondson, 2010; Dargent-Molina et al., 1988; National Mastitis Council (NMC), 1999; Smith, 2009). Se considera que este patógeno ingresa por el canal del pezón por crecimiento lento.

### **Mastitis ambiental**

El principal reservorio de los patógenos de este tipo de mastitis es el ambiente, de esta manera el ingreso de las bacterias ambientales se da entre el final del ordeño o durante el mismo (Blowey & Edmondson, 2010; Divers & Peek, 2008; Smith, 2009). Estos agentes se encuentran en el lodo, heces, humedad, agua contaminada y suelo, por lo que el flujo inverso de leche por el canal del pezón es la principal forma de ingreso durante el ordeño (Blowey & Edmondson, 2010; Ruegg, 2011). La desinfección inadecuada al momento de iniciar el ordeño y la ausencia de sellado al final del ordeño, son factores que permiten el ingreso de estas bacterias al pezón o cisterna. El principal punto de control para la mastitis ambiental es reducir la exposición de los

pezones a los agentes medioambientales, limpieza de los lugares de cama, aseo durante el ordeño y el uso de presellado (Ruegg, 2011; Smith, 2009)

Los patógenos comunes en este tipo de mastitis son bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella spp*) y bacterias Gram-positivas (*Streptococcus* ambientales como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*) (Ruegg, 2011), además otros microorganismos ambientales pueden causar mastitis (Blowey & Edmondson, 2010). Las bacterias que ocasionan este tipo de mastitis por lo general no son de presentación subclínica sino clínica, por lo tanto, las infecciones no pasan de una lactancia a otra (Blowey & Edmondson, 2010).

La presentación clínica se debe principalmente a que los microorganismos medioambientales están menos adaptados al hábitat de la glándula mamaria por lo que con frecuencia activan una respuesta inmune aguda cuando ingresan a la ubre. Sin embargo, la respuesta inmune generalmente elimina estos patógenos lo que resulta en una cura espontánea (Ruegg, 2011). Debido a esto la infección puede ser relativamente corta y los signos clínicos duran un breve periodo de tiempo, y en algunos casos pueden convertirse en mastitis de tipo subclínica (Ruegg, 2011).

### ***Escherichia coli* y *Klebsiella sp***

Son bacilos gramnegativos fermentadores de lactosa, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. En el tipo de alojamiento estabulado en puestos individuales libres, se predisponen a mastitis por estos agentes (Divers & Peek, 2008). Se han asociado brotes mastitis por *Klebsiella sp*, con el uso de aserrín húmedo para camas de los establos. La cama de paja y los materiales inorgánicos

como la arena y la piedra caliza triturada reducen la exposición ambiental a estas bacterias (Divers & Peek, 2008).

Las lesiones en el extremo de los pezones causadas por superficies abrasivas, irritación de la piel, excesivo vacío de ordeño, lesiones, infecciones y enfermedades como postraciones por hipocalcemia predisponen a la colonización de la glándula por estas bacterias (Divers & Peek, 2008). Luego de ingresar a la cisterna del pezón, las bacterias se multiplican en 16 horas. Luego deben superar los mecanismos inmunológicos, como la fagocitosis, la cual ejecuta la muerte intracelular pero luego de la lisis bacteriana y la liberación de endotoxinas activa la cadena inflamatoria local y aparecen los signos locales y en casos más severos los signos sistémicos (Divers & Peek, 2008).

La cura espontánea es difícil para el animal que ha sido infectado reincidentemente, ya que algunas vacas mueren debido a la endotoxina y a la infección profunda de la glándula. La bacteriemia asociada a este tipo de mastitis puede estar presente en hasta el 40% de las vacas gravemente infectadas, lo que a veces causa uveítis, artritis, meningitis o tenosinovitis asociada con su enfermedad (Divers & Peek, 2008).

### **Especies de *Streptococcus* ambientales**

*Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, son los agentes comúnmente aislados de IIM, sin embargo, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus saccharolyticus*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus canis* también han sido asociados a casos de mastitis bovina (Ruegg & Erskine, 2015). Son cocos en cadena, Gram positivos, catalasa negativos,

anaerobios facultativos, habitualmente inmóviles (Quinn et al., 2002). El principal reservorio es el material de cama y áreas de alojamiento bovino (Ruegg & Erskine, 2015), se propagan principalmente por las heces y son ubicuos en el medio ambiente de la granja (Zadoks et al., 2005).

### **Signos clínicos**

La mastitis bovina inicia con la invasión de un patógeno, seguido por un breve periodo de latencia y finalmente desencadena en mastitis clínica, subclínica o resolución de la infección gracias a la respuesta del sistema inmune (Ruegg & Erskine, 2015). Luego de superar la barrera física en la glándula mamaria, los patógenos son detectados en primera instancia por el sistema inmune innato, conformado por los neutrófilos polimorfonucleares, los cuales, mediante un sistema complejo de mediadores celulares y factores solubles, reconocen y activan la fagocitosis para eliminar las bacterias presentes (Ruegg & Erskine, 2015).

Entre los factores solubles están el complemento, lactoferrina y proteínas de la fase aguda. Estos factores permiten contrarrestar algunos efectos expresados por las bacterias. La lactoferrina es una glicoproteína de unión al hierro producida por células epiteliales y contenidas en el interior de los gránulos de los neutrófilos (Hurley et al., 1993). Gracias a su capacidad de secuestrar el hierro, la lactoferrina ayuda a controlar la multiplicación de microorganismos dependientes de hierro como las bacterias coliformes (Ruegg & Erskine, 2015). Entre las proteínas de fase aguda, sobresalen la manosa unida a la lectina y la proteína C reactiva, las cuales se unen a patógenos con pared celular y activan la cascada de complemento (Ruegg & Erskine, 2015).

La duración de la fase subclínica depende de la etiología, en la mayoría de los rebaños una mayor proporción de mastitis subclínica es causada por bacterias Gram-positivas más que por Gram-negativas (Ruegg & Erskine, 2015). Entre el 25% al 30% de las vacas experimentan mastitis subclínica crónica causada por patógenos Gram positivos. Para patógenos oportunistas medioambientales la ocurrencia de mastitis clínica varía de acuerdo al tipo de bacteria, es así como el 50% de IIM causada por *Streptococcus* presentan signos clínicos y el 80% de las infecciones por Coliformes evidencian signos clínicos (Ruegg & Erskine, 2015).

La mastitis clínica se detecta de acuerdo a la severidad de los signos. Los signos clínicos resultan de la inflamación de la ubre y pueden incluir apariencia anormal de la leche (presencia de coágulos o suero), tumefacción, enrojecimiento, edema, o severos signos sistémicos como anorexia, fiebre o agalactia. La mayor proporción de casos clínicos son causados por patógenos gramnegativos (Ruegg & Erskine, 2015). La desaparición de los signos clínicos, indica disminución de la inflamación, pero no siempre coincide con la cura bacteriológica (Ruegg & Erskine, 2015). Para facilitar la detección y severidad de los casos clínicos existe una escala de medición que combina la apariencia de la leche con el desarrollo de los signos clínicos (tabla 1). En la mastitis por coliformes inicialmente se da una mastitis local y aguda, luego aparecen los signos sistémicos, acompañados de inapetencia, depresión, fiebre, estasis ruminal, taquicardia, taquipnea y deshidratación, en caso severos se observan signos de endotoxemia, recumbencia inyección escleral, miosis, hipopión e hifema (Divers & Peek, 2008).

Los animales con mastitis subclínica infecciosa disminuyen su producción de leche considerablemente, además son consideradas como reservorio de infección y foco infeccioso para los animales sanos (Ruegg & Erskine, 2015)

Tabla 1. Escala de severidad de mastitis clínica

Puntaje	Nombre	Signos clínicos
1	Mastitis leve	Leche anormal
2	Mastitis moderada	Leche anormal y ubre anormal
3	Severa	Síntomas sistémicos

(Adaptado (Ruegg & Erskine, 2015))

### **Diagnóstico**

La detección de mastitis bovina depende de las características de los patógenos, los cambios en el animal y la magnitud de la inflamación, además de la exactitud de los métodos de diagnóstico usados en la granja (Ruegg & Erskine, 2015). Para la identificación de agentes etiológicos causantes de mastitis bovinas se pueden realizar pruebas diagnósticas a partir de muestras de leche de cuartos de animales afectados o a partir de leche de tanque.

Las muestras pueden ser recolectadas individualmente por cuartos o combinadas homogéneamente de los cuatro cuartos en una sola muestra (Ruegg & Erskine, 2015). Las muestras de tanque de leche se realizan para monitorear la salud de la ubre en el hato (B.M. Jayarao, Pillai, Sawant, Wolfgang, & Hegde, 2004).

Los procedimientos diagnósticos de infecciones intramamarias (IMM) permiten identificar el agente etiológico y de esta manera desarrollar medidas de control respecto a los microorganismos involucrados, por lo tanto, es importante realizar un diagnóstico rápido y confiable para solucionar el problema en las granjas (Hiitiö et al., 2016).

### **Cultivo microbiológico**

El cultivo microbiológico es la prueba de oro para el diagnóstico etiológico de la mastitis bovina (NMC, 1999; Taponen et al., 2009). El estado de infección de los cuartos mamarios está determinado por el cultivo microbiológico de muestras de leche obtenidas asépticamente (National Mastitis Council (NMC), 1999). Debido a que la mastitis bovina de tipo contagiosa es un problema de hato que se puede caracterizar por el diagnóstico a nivel de vaca y de tanque, es necesario realizarlo a partir de muestreos asépticos de leche. En aquellos casos donde la muestra no se tome debidamente, pueden presentarse falsos positivos o falsos negativos en el resultado, evidenciando cultivos sin crecimiento (Taponen et al., 2009), y crecimiento de dos o más colonias (contaminación) (National Mastitis Council (NMC), 1999).

Los falsos positivos ocurren cuando se aísla un patógeno que en realidad no estaba presente en el animal, la muestra de leche se puede contaminar al momento de la toma, transporte o manipulación en el laboratorio. Con respecto a los falsos negativos se dan en muestras donde el cultivo no presenta crecimiento, pero el animal está infectado. Esto se puede deber a varios factores a saber: i) las unidades formadoras de colonias son menores al límite de detección de las pruebas, ii) la bacteria requiere medios específicos de crecimiento, iii) la muestra no fue

transportada en condiciones óptimas y las bacterias murieron (National Mastitis Council (NMC), 1999).

El cultivo de leche para la identificación de agentes causales de mastitis, se realiza a partir de muestreos asépticos de leche, conservadas en refrigeración o en congelamiento (National Mastitis Council ((NMC), 1999). El principio general consiste en que se realiza cultivo de leche en un medio enriquecido en una incubadora con temperatura y atmósfera controlada. Pasadas 24-48 horas, se observa el crecimiento bacteriano y se realizan pruebas para determinar género, especie y susceptibilidad antibiótica.

De la muestra obtenida del animal o el tanque de leche se adiciona 10 a 100  $\mu$ L de cada muestra en un plato de agar base complementada con sangre de cordero al 5%. El volumen inoculado determina el más bajo límite de detección, es decir, una colonia observada en el plato inoculado con 10  $\mu$ L equivale aproximadamente a 100 UFC/ml de leche, de esta manera usar más volumen de inóculo podría mejorar la tasa de recuperación en patógenos con baja concentración (*E. coli*, *S. aureus*) (Ruegg & Erskine, 2015). Se ha definido que la presencia de al menos 100 a 300 UFC/ml son necesarias para definir un estado de infección (Ruegg & Erskine, 2015).

Posterior a la siembra en plato de agar sangre, se incuba a 37°C por 24-48 horas. Pasado este periodo se evalúan las colonias mediante características fenotípicas y bioquímicas. Se realiza tinción de Gram y pruebas específicas para Gram positivas y Gram negativas (National Mastitis Council (NMC), 1999). Para la identificación de bacterias Gram negativas, se realiza la siembra de las colonias identificadas en agar MacConkey, el cual es un medio selectivo para el aislamiento de enterobacterias y otros gramnegativos, este medio permite la identificación de

fermentadores de lactosa y no fermentadores de lactosa (Quinn et al., 2002) . Las pruebas para cocos Gram positivos, son realizados de acuerdo a los resultados de las pruebas de catalasa. A las colonias negativas se les realizan pruebas para *Streptococcus*, las cuales son prueba de Esculina y Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP). Para las colonias catalasa positivas se realizan pruebas bioquímicas para identificación de *S. aureus* o Estafilococos coagulasa negativos (Ruegg & Erskine, 2015).

Se ha estimado que cerca del 27% de las infecciones por *S. aureus* son identificadas por muestras de cuartos. Si se toman dos o tres muestras por animal la sensibilidad de la prueba puede aumentar 94% y 98%, respectivamente (Divers & Peek, 2008). La evaluación de la leche de tanque ayuda a definir la infección del hato con patógenos cuyo principal reservorio es la glándula mamaria como lo son, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Mycoplasma* spp, ya que el aislamiento indica infección en uno o más animales en el hato (Jayarao et al., 2004).

### ***Recuento de Células Somáticas (RCS)***

El RCS en leche es un indicador de salud de la ubre y de calidad de leche. Las células somáticas son en su mayoría leucocitos y un pequeño porcentaje son células epiteliales (Blowey & Edmondson, 2010; National Mastitis Council (NMC), 1999). El RCS es una medida cruda, los organismos causantes de mastitis contagiosa son los responsables de un alto conteo de células debido a mastitis subclínica, la cual activa constantemente la respuesta inmune celular (Blowey & Edmondson, 2010).

El RCS se puede determinar mediante conteo electrónico de células teñidas en muestras frescas, preservadas o congeladas de leche (National Mastitis Council (NMC), 1999; Ruegg & Erskine, 2015). El RCS puede ser medido usando muestreos asépticos de leche obtenidas de cuartos mamarios individuales, muestras de leche compuestas, que son una mezcla homogénea obtenida de los cuartos de un animal (Ruegg & Erskine, 2015) y para monitorear la mastitis a nivel poblacional se realiza en muestras de tanque de leche (Jayarao et al., 2004). Sin embargo, algunas infecciones subclínicas no logran ser detectadas debido al efecto dilución de la leche proveniente de animales sanos (Ruegg & Erskine, 2015)

La evaluación rutinaria del RCS individual permite identificar importantes características epidemiológicas de infecciones subclínicas, como lo son prevalencia e incidencia de la enfermedad en el hato y de esta manera implementar programas de control y prevención (Ruegg & Erskine, 2015).

Se considera que un RCS inferior a 100.000 cel/ml corresponde a cuartos sanos, sin embargo, se ha definido para la detección de infecciones intramamarias un punto de corte menor a 200.000 cel/ml para definir sanidad en la glándula mamaria (Ruegg & Erskine, 2015). Un RCS mayor a 200.000 cél/ml en tanque es un indicador de anomalías en la salud de la glándula mamaria, principalmente debido a patógenos de mastitis contagiosa, de esta manera el monitoreo constante en tanque permite identificar cambios en la salud de la ubre (National Mastitis Council (NMC), 1999). Se ha estimado que por encima de la mitad de los animales pueden estar infectados con *S. aureus* antes de que se aumente el RCS en tanque, a diferencia de la presencia de *S. agalactiae* que en pocos animales aumenta considerable y rápidamente el RCS en tanque (Divers & Peek,

2008). Lo anterior es importante ya que permite al productor identificar el problema en el hato, para instaurar medidas de control y prevención a tiempo, disminuyendo las pérdidas ya que se ha estimado que más de 50.000 células/ml genera pérdidas aproximadas de 0.5 kg/leche/día (Divers & Peek, 2008) o más, de acuerdo al aumento por cuarto (ver tabla 2).

La evaluación mensual de RCS a nivel de hato es un componente crucial para los programas de salud de la ubre y debería ser parte de las actividades rutinarias en las granjas lecheras (Ruegg & Erskine, 2015)

Tabla 2. Prevalencia de infección estimada y pérdidas en la producción de leche asociadas con elevado Recuento de Células Somáticas en tanque de leche

RCS /ml	Porcentaje de cuartos infectados en rebaño	Porcentaje de pérdidas en producción
200.000	6	0
500.000	16	6
1.000.000	32	18
1.500.000	48	29

(Tomado de National Mastitis Council (NMC), 1999)

### ***California Mastitis Test (CMT)***

Es una prueba indirecta desarrollada para evaluar la leche de cuartos mamarios, muestras compuestas y de tanque de leche. El reactivo para realizar la prueba es una mezcla de detergente con púrpura de bromocresol. La respuesta se observa de acuerdo al grado de reacción entre el

detergente y el ADN nuclear, lo que corresponde al RCS en leche (Ruegg & Erskine, 2015). La lectura se realiza basada en una medida de cinco puntos: negativo, trazas, uno, dos y tres. Los valores correspondientes se observan en la tabla 3.

Tabla 3. Evaluación de Recuento de Células Somáticas mediante CMT

CMT	RCS (cel /ml)
Negativo	0-200.000
Trazas	150.000 – 500.000
Uno	400.000 - 1.500.000
Dos	800.000 - 5.000.000
Tres	> 5.000.000

Adaptado de (Ruegg & Erskine, 2015)

La lectura en la escala “trazas” indica la presencia de mastitis subclínica, sin embargo, la prueba puede presentar dificultad al momento de leerla cuando se realiza en leche de vacas con pocos días de infección (Ruegg & Erskine, 2015).

### **PCR**

Algunos estudios han demostrado que pruebas diagnósticas como PCR convencional y PCR en tiempo real (rt-PCR, por sus siglas en inglés) son herramientas rápidas, en cuanto a su elaboración y resultado final. Estas pruebas permiten detectar bajas concentraciones de ADN bacteriano por mililitro de leche (Steele et al., 2017; Taponen et al., 2009; Zanardi et al., 2014).

El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido el uso de estos métodos diagnósticos para mastitis bovina, sobre todo para la identificación de patógenos, identificación de agentes potencialmente zoonóticos e investigación de brotes de mastitis (Ruegg & Erskine, 2015). Los métodos genotípicos de detección se basan en la identificación de secciones únicas de ADN bacteriano. Para esto se ha desarrollado diagnóstico basado en PCR convencional y PCR en tiempo real (rt-PCR) (Ruegg & Erskine, 2015). Se proyecta el uso de pruebas moleculares como método diagnóstico para la identificación de patógenos para los cuales los métodos bioquímicos son inexactos (Ruegg & Erskine, 2015; Zadoks & Watts, 2009). De esta manera en muestras de leche con bacterias no vivas se podrían identificar mediante rt-PCR, ya que, esta prueba no depende de bacterias vivas viables en las muestras de leche, sino en la identificación de ADN bacteriano (Taponen et al., 2009). Esto resolvería las muestras que en cultivo se establecen como "sin crecimiento".

En un estudio realizado por Taponen et al., (2009), 79 muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínica que no tuvieron crecimiento en el cultivo microbiológico, fueron almacenadas a -20°C para análisis de rt-PCR usando un kit comercial (Patho-Proof Mastitis PCR Assay, Finnzymes Oy). Este estudio tuvo como objetivo 11 especies bacterianas de importancia en mastitis, entre ellos *S. aureus*, y *S. agalactiae*. De las 79 muestras 34 (43%), mostraron un resultado positivo en la rt-PCR. *S. aureus* fue detectado en tres muestras. Parece probable que una baja concentración bacterias en las muestras de leche podría ser una explicación para los cultivos negativos, sin embargo, este estudio no logró comprobar esta

hipótesis. Por otro lado, es importante resaltar de este estudio que la rt-PCR es una herramienta útil para identificar la etiología bacteriana de las muestras negativas al cultivo microbiológico.

Las pruebas de leche para evaluación de patógenos de mastitis rt-PCR usando un kit comercial (Patho- Proof Mastitis PCR Assay, Finnzymes Oy) no necesitan ser previamente cultivadas y el análisis requiere entre 3 y 4 horas, por lo tanto, los resultados son rápidos, permitiendo un diagnóstico a tiempo para realizar un tratamiento y disminuir la necesidad de usar antimicrobianos innecesarios (Barkema et al., 2006; Taponen et al., 2009). La especificidad y sensibilidad encontrada para esta prueba fue de 100% (Koskinen et al., 2009)

### **Tratamiento**

La terapéutica instaurada para mastitis bovina se enfoca de acuerdo a la etiología de la enfermedad con el fin de eliminar el agente. Es importante realizar un diagnóstico confiable y eficaz para obtener una mejor tasa de cura. La resolución del tratamiento se ha evaluado en la reducción de los signos clínicos, lo cual no garantiza la eliminación completa del patógeno en el tejido (Erskine, Wagner, & DeGraves, 2003).

Para alcanzar las concentraciones terapéuticas, se han considerado tres compartimentos farmacológicos para mastitis bovina: la leche, el revestimiento epitelial de los conductos y alvéolos de la glándula mamaria. Los patógenos que se ubican en estas áreas anatómicas generalmente no son invasivos y no se creen que causan abscesos en el parénquima, los

organismos identificados son: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, y Estafilococo coagulasa negativo (Ruegg & Erskine, 2015).

La terapia antimicrobiana beneficia la salud y bienestar animal, sin embargo, los costos estimados para este tratamiento se deben a medicamentos, servicios veterinarios, personal y descarte de leche (Erskine et al., 2003). Por otro lado, los antimicrobianos usados contra agentes de mastitis bovina pueden ser residuales en la leche para el consumo, afectando la seguridad alimentaria del consumidor (Ruegg & Erskine, 2015).

El uso inadecuado de antimicrobianos en animales y humanos ha contribuido a la resistencia a los antibióticos, es por esto que a nivel mundial se ha definido la campaña para el uso racional de antibióticos liderada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y en este sentido la tendencia mundial es disminuir el uso y abuso de estos medicamentos, sobre todo porque representa riesgo para la salud humana (WHO, 2019).

En medicina veterinaria, en su mayoría el uso de antibióticos se realiza de forma empírica (Ruegg & Erskine, 2015) por los productores, los cuales en algunas ocasiones desconocen los periodos de retiro, lo que puede llevar a penalizaciones por residuos en países en los que son evaluados (Ruegg & Erskine, 2015).

Los factores de riesgo para disminuir la eficacia terapéutica incluyen incremento de la edad de la vaca, existencia de altos RCS antes del tratamiento, duración de la infección, número de cuartos infectados, e infecciones por *S. aureus* (Barkema et al., 2006).

Para reducir el uso de antimicrobianos asociados con mastitis es necesario cambiar el comportamiento del personal: i) utilizar métodos diagnósticos como el cultivo microbiológico para la identificación de patógenos que ocasionan mastitis, ii) determinar la historia del animal, identificar los factores de riesgo a nivel de la vaca que pueden tener impacto en la eficacia de la terapia, y iii) aplicar protocolos de terapia estandarizados en la farmacología (Ruegg & Erskine, 2015).

Lógicamente, el énfasis en la investigación y la aplicación clínica de los antibacterianos para el tratamiento de la mastitis se ha centrado en la eliminación de agentes infecciosos. El éxito terapéutico para algunas infecciones intramamarias, puede medirse evaluando la reducción de los signos clínicos en lugar de la eliminación total del patógeno de la glándula.

La historia de presentación de mastitis clínica en el animal es el único factor de riesgo que se encontró tanto para mastitis subclínica como para *S. aureus*. Sarker et al. (2013) ha reportado mayores probabilidades de mastitis subclínica en vacas con antecedentes de mastitis clínica en Bangladesh. La explicación más probable es que los casos de mastitis clínica no se curaron completamente debido a un tratamiento ineficaz que conduce a una mastitis subclínica crónica. Hay muchos factores que pueden influir en la curación bacteriológica después del tratamiento de

la mastitis clínica (Sol et al., 1997). Barkema et al. (2006) informaron que en *S. aureus*, la probabilidad de curación depende de la vaca, el patógeno y los factores de tratamiento. Las bajas tasas de curación pueden deberse, por ejemplo, a un tratamiento subóptimo o a la detección de casos de mastitis clínica en una etapa crónica de la infección. Se ha observado que el examen de la ubre para buscar mastitis clínica disminuyó la probabilidad de mastitis subclínica, quizá por el hecho de que los productores identifican problemas a tiempo, lo que les permite tomar las medidas adecuadas, como realizar un tratamiento instaurado por el médico veterinario. De esa manera, también pueden reducir la propagación de la infección en sus rebaños (Mekonnen et al., 2017).

## **Epidemiología de la mastitis bovina**

### ***Factores de riesgo***

La leche de alta calidad higiénica, es aquella con bajos recuentos bacteriológicos y depende de los procesos realizados en el hato que involucra factores relacionados con la higiene de los animales, el medio ambiente y el equipo (Elmoslemany et al., 2009). Para lograr una alta calidad de la leche cruda, los productores deben ser conscientes de los factores que influyen en la contaminación de la leche cruda y cómo se pueden controlar (Elmoslemany et al., 2009).

Se han identificado dentro de los factores de riesgo para la calidad higiénica de la leche de tanque la importancia de la higiene de la ubre, la alta suciedad de ubres, patas y flancos, la temperatura de la solución de lavado utilizada para limpiar el sistema de ordeño y los factores relacionados con la calidad del agua para lavado de equipos y tanque (Elmoslemany et al., 2009).

Un alto recuento de bacterias ambientales en leche de tanque indica problemas relacionados con la higiene del medio ambiente y el ordeño (Bhushan, Jayarao & Wolfgang, 2003). Se han asociado altos conteos de coliformes con el uso de bajas temperaturas de agua para limpieza de equipos, y predominio de tipos específicos de microorganismos en el equipo de ordeño por factores como la limpieza química (Elmoslemany et al., 2009). En cuanto a los factores ambientales se ha identificado que el agua muy dura o el uso de limpiadores altamente alcalinos mejoran el desarrollo de la piedra de leche. Además, la alta alcalinidad también puede conducir a la corrosión de las superficies y aumentar el deterioro de las piezas de goma, dando como resultado condiciones para la adherencia bacteriana y la formación de biopelículas (Austin & Bergeron, 1995).

Se ha considerado que la contaminación de la leche del tanque por bacterias ambientales se debe principalmente a pezones y ubres sucias cuya fuente es el estiércol y material de cama (Elmoslemany et al., 2009). La ausencia de desinfección y secado de los pezones antes del ordeño contribuirá a que los microorganismos ambientales, como estreptococos, estafilococos, coliformes y otras bacterias gramnegativas proliferen y que a su vez sean detectados en pruebas como recuento aeróbico total, recuento de incubación preliminar, recuento de pasteurización de laboratorio y recuento de coliformes (Elmoslemany et al., 2009; Murphy & Boor, 2000)

Se han identificado factores de riesgo para la presentación de mastitis a nivel de granja como deficiente higiene del ordeño, ausencia de presellado, uso de paños para el secado de la ubre, inadecuado funcionamiento del equipo de ordeño, ubre sucia al inicio del ordeño y ausencia de

terapia de vaca seca (Dargent-Molina et al., 1988; Mungube et al., 2004; Ramírez et al., 2014). A nivel de vaca se han identificado factores de riesgo como raza (como raza Holstein en mastitis subclínica), paridad (mayor riesgo de Mastitis clínica en vacas más viejas), el periodo periparto, especies patógenas involucradas en el caso anterior de mastitis clínica (Jamali et al., 2018; Leelahapongsathon, Schukken, & Suriyasathaporn, 2014; N. F. Ramírez et al., 2014).

Se han encontrado factores de riesgo específicos relacionados con mastitis subclínica producidas por *S. agalactiae*, como raza Holstein, mayor paridad, mayor mes de lactancia, ubre sucia al inicio del ordeño, ordeño manual e inadecuado sellado de la ubre (Ramírez Vásquez et al., 2014). En relación a mastitis clínica originada por *S. aureus*, un estudio realizado en Suecia, lo asoció con el sistema de alojamiento y el tamaño del rebaño, como lo son las estabulaciones en puestos de gancho y grandes rebaños, respectivamente. Además, asociaron el material de cama como el aserrín que favorece el aislamiento *Klebsiella spp.*, pero con menos riesgo de aislar *Streptococcus uberis*, los sistemas estabulados sueltos con *Escherichia coli* y lesiones en los pezones con *Arcanobacterium pyogenes* y *Streptococcus dysgalactiae* (Ericsson Unnerstad et al., 2009).

Entre los factores de riesgo para el aumento en el RCS en leche de tanque se han identificado, el prolongado tiempo de ordeño, retiro de la pezonera antes de terminar el ordeño y escurrido manual posterior al ordeño (Jamali et al., 2018; Leelahapongsathon et al., 2014).

Los programas de control de mastitis bovina deben tener en cuenta las particularidades de la granja y la etiología del brote que se presente (Ruegg, 2012), además deben considerar que en países tropicales, estas condiciones epidemiológicas están relacionadas con las características de las vacas y el manejo del ordeño (Leelahapongsathon et al., 2014), esto debido a que en países tropicales como Brasil los sistemas de producción lecheros se caracterizan por prácticas de manejo del rebaño inadecuadas, prácticas sanitarias durante el ordeño ineficientes, cambio de operarios constante, bajo nivel de profesionalización, que se estima pueden favorecer los casos de mastitis bovina en los hatos (Ferreira et al., 2007). De esta manera se ha identificado que un bajo nivel de educación y que el operario no sea el propietario de los animales pueden realizar un manejo poco adecuado de los casos de mastitis y puede propender a propagar los patógenos implicados en el brote (Mekonnen et al., 2017).

Por otro lado, prácticas como el lavado de manos antes del ordeño y la desinfección del pezón posterior al ordeño o sellado, se ha considerado como factores de protección para la presentación de mastitis (Barkema et al., 2006; Mekonnen et al., 2017; Mungube et al., 2004; Ramírez et al., 2014).

### *Epidemiología de la mastitis en Colombia*

En Colombia se han realizado varios estudios de frecuencia y prevalencia de mastitis en distintas regiones del país con el fin de determinar las principales bacterias involucradas en la mastitis bovina (Calderón & Rodríguez, 2008; Calderón et al., 2012; Keefe et al., 2011; Ramírez et al., 2014). Se destaca de estos estudios, que los principales patógenos involucrados en la mastitis

bovina han sido *S. aureus* y *S. agalactiae*. Calderón, et al., (2008), realizaron un estudio no probabilístico en el Altiplano cundiboyacense, donde evaluaron 11.416 cuartos pertenecientes a 2.854 vacas de 40 fincas especializadas en producción de leche. Las muestras procedían de cuartos positivos al Californian Mastitis Test (CMT), donde el patógeno más frecuente fue el *S. aureus* con un 29.9% de los aislamientos, seguido de *S. agalactiae* con un 6.84%. En otro estudio de tipo no probabilístico realizado en 15 hatos con sistema doble propósito en el municipio de Montería (Córdoba), se evaluaron 4.260 cuartos de 1.065 vacas mediante CMT. De las muestras de leche positivas, el microorganismo más aislado fue *S. aureus* con 87.56%, seguido de *S. uberis* en un 3.6% y *S. agalactiae* fue aislado en un 2.1% (Calderón et al., 2011). En el Altiplano Norte de Antioquia se realizó un estudio de corte, en el cual, las muestras de leche se tomaron a 877 vacas en 37 predios. En este estudio se encontró una frecuencia de aislamiento para *S. agalactiae* de 34%, 23.9% fueron cultivos negativos y 5% correspondió a *S. aureus* (Ramírez et al., 2011). En otro estudio no probabilístico efectuado en muestras de 484 tanques de leche de nueve municipios de Colombia se determinó una prevalencia para *S. agalactiae* de 42% (Greg Keefe et al., 2011). En una investigación de tipo longitudinal realizada durante 24 meses en el Altiplano Norte de Antioquia, 11.312 muestras de leche fueron evaluadas mediante cultivo microbiológico, de las cuales, el patógeno más aislado fue *S. agalactiae*, con una frecuencia de 34.4% y 8% correspondió a *S. aureus* (Ramírez et al., 2014)

La base de la diferenciación entre cepas es el estudio epidemiológico molecular, ya que permite la identificación de fuentes de microepidemias o brotes y de clones con virulencia diferenciada (Frenay et al., 1996). Es decir, las cepas aisladas entre regiones, hatos y animales, pueden

presentar información genética variable, por lo cual la presentación clínica y la patología de la enfermedad puede variar de acuerdo a la expresión fenotípica generada por la presión ejercida en el medio ambiente. Debido a lo anterior y en el contexto de la mastitis bovina en Colombia que hasta la fecha, no se han realizado estudios que permitan entender la epidemiología molecular de agentes de la mastitis de tipo contagiosa, como el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus agalactiae*, es necesario realizar investigaciones con una estructura epidemiológica molecular. Un estudio que sea definido en un marco muestral compatible con zonas lecheras cuyas características sean similares y que permitan extrapolar los resultados obtenidos, con el fin de ayudar a entender la situación de la mastitis de tipo contagiosa específicamente en el contexto socio ambiental de un país tropical como Colombia.

### ***Estrategias de prevención***

Obtener leche de alta calidad sanitaria y composicional es uno de los objetivos en los sistemas de producción láctea. Los programas de control y prevención son importantes ya que permiten identificar mastitis de tipo contagiosa en el hato. Estos programas empiezan con la evaluación de conteo bacteriano y RCS en tanque (Jayarao et al., 2004). Para poder ejercer control sobre esto, es preciso realizar un diagnóstico a tiempo de los animales que están presentando mastitis de tipo subclínica o clínica, identificar el patógeno que lo está produciendo y así tomar medidas para evitar nuevos contagios.

Las estrategias implementadas se han instaurado de acuerdo a los factores de riesgo para cada tipo de mastitis, ambiental y contagiosa. En la tabla 4 se observan las principales diferencias y puntos de control para ambos tipos de mastitis.

Tabla 4. Resumen de las principales diferencias de los factores de riesgo y puntos de control para la prevención de mastitis contagiosa y ambiental.

Característica	Mastitis contagiosa	Mastitis ambiental
Fuente de infección	Pezones y ubre	Ambiente contaminado
Transferencia de infección dentro de la ubre	Durante el ordeño	Entre ordeños y durante el periodo seco
Mastitis clínica	La mayoría de casos son clínicos	Una alta proporción es clínico ( <i>Streptococcus uberis</i> ) puede ser subclínico
Controlado por	Sellado Terapia de vaca seca Higiene de ordeño Sacrificio	Higiene en el medio ambiente Presellado Sellado de pezones en el periodo seco

(Tomado de Blowey & Edmondson, 2010)

Desde 1970 en USA, Reino Unido y Australia, investigaciones llevadas a cabo por más de 30 años en Mastitis Field Experiment (MFE) y National Institute for Research into Dairying (NIRD) permitieron construir los planes de manejo y control para la mastitis y formaron la base de los programas modernos, de esta manera el National Mastitis Council replicó el programa de los cinco puntos de control para la mastitis contagiosa, los cuales son (Blowey & Edmondson, 2010; Ruegg, 2017):

1. Efectivo sellado con desinfectante al final de cada ordeño
2. Uso de antibiótico en cada cuarto al final de cada lactancia

3. Apropiado tratamiento de mastitis clínica
4. Sacrificio de animales crónicamente infectados
5. Mantenimiento del equipo de ordeño

Otras medidas de prevención que se han instaurado a nivel internacional son:

#### ***Uso de guantes durante el ordeño***

Como se ha dicho una de las principales fuentes de contaminación de *S. aureus* y *S. agalactiae* son las manos del ordeñador, por lo cual a nivel mundial se ha establecido el uso de guantes durante el ordeño y cambio de los mismos entre animales. Esto se desarrolló debido a que en la piel y manos de los operarios pueden presentar grietas o heridas, que serían fuente de infección. El uso de guantes tiene como fin facilitar la desinfección de la superficie de la mano y evitar la contaminación por la manipulación entre animales. Adicionalmente, esta práctica propende por disminuir la tasa de incidencia de mastitis clínica y subclínica (Blowey & Edmondson, 2010), causada por patógenos contagiosos y reducir el RCS en tanque, es decir, mejorar la calidad sanitaria de la leche mediante la prevención de mastitis de tipo contagiosa.

#### ***Despunte***

Esta práctica se realiza principalmente con el fin de detectar cambios en la leche al inicio del ordeño. Además, estimula la eyección de leche y remueve bacterias del canal del pezón (Blowey & Edmondson, 2010). La detección temprana de mastitis clínica permite realizar tratamientos rápidos y de esa manera mejorar la tasa de cura. Por otro lado, evita que leche con alto RCS sea adicionada al tanque (Blowey & Edmondson, 2010).

### *Presellado*

El objetivo de esta práctica es disminuir la cantidad de bacterias al iniciar el ordeño, ya sea para instaurar la pezonera o para el ordeño manual. Esto disminuye las bacterias que podrían ocasionar mastitis ambiental (Blowey & Edmondson, 2010).

## Referencias

- Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A. A., Lammler, C., Wolter, W., & Zschock, M. (2001). Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 8(5), 959–964. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.959-964.2001>
- Andrews, A., Blowey, R., Boyd, H., & Eddy, R. (2004). *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of cattle*. Blackwell Science. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Austin, J. W., & Bergeron, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of Dairy Research*, 62(3), 509–519. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S0022029900031204>
- Bailey, W. R. (2004). *Diagnóstico microbiológico* (11th ed.). Buenos aires: Editorial Panamericana.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. (2006). Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877–1895. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)
- Beckmann, C., Waggoner, T., Harris, G., Tamura, C., & Rubens. (2002). Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that c5a peptidase mediates fi bronectin binding. *Infect. Immun.*, 70, 2869–2876.
- Beenu, J., Anuj, T., Bhandari, B. B., & Jhala, M. K. (2012). Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae*. *VETERINARSKI ARHIVE*, 82(5), 423–432.
- Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). *The mastitis organisms. Mastitis Control in Dairy Herds* (2nd ed.). CAB. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Brakstad, O. D. D. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. a. (1992). polymerase chain reaction amplification of the Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene, 30(7), 1654–1660. <https://doi.org/citeulike-article-id:9739471>
- Calderón, A., & Rodríguez, V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia).

*Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 582–589. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902008000400006&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902008000400006&nrm=iso)

Calderón, A., Rodríguez, V., Arrieta, G., Martínez, N., & Vergara, O. (2012). Calidad fisicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del sistema doble propósito en Montería (Córdoba). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 15(2), 399–407. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384913-7.00008-3>

Camussone, C. M., & Calvino, L. F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 119–130.

Dargent-Molina, P., Scarlett, J., Pollock, R., Erb, H., & Sears, P. (1988). Herd-level risk factors for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. *Preventive Veterinary Medicine*, 6, 127–142.

Divers, T., & Peek, S. (2008). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. (Elsevier, Ed.), *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3137-6.X0001-5>

Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., & Jayarao, B. M. (2009a). Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2644–2652. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1813>

Elmoslemany, A. M., Keefe, G. P., Dohoo, I. R., & Jayarao, B. M. (2009b). Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 2: Bacteria count-specific risk factors. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2644–2652. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1813>

Ericsson Unnerstad, H., Lindberg, A., Persson Waller, K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., & Bengtsson, B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology*, 137(1–2), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.005>

- Erskine, R. J., Wagner, S., & DeGraves, F. J. (2003). Mastitis therapy and pharmacology. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 19(1), 109–138.  
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00067-1)
- Ferreira, J. L., Freitas, J. L., Vasconcelos, T., Alves, N., & Reyes, A. de L. (2007). Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Ciência Animal Brasileira*, 8(2), 261–266.
- Frenay, H. M., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Verhoef, J., & Mooi, F. R. (1996). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(1), 60–64.
- Hassan, A. A., Akineden, Ö., Lämmler, C., & Huber-Schlenstedt, R. (2002). Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 49(5), 257–259.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00553.x>
- Hiitiö, H., Simojoki, H., Kalmus, P., Holopainen, J., Pyörälä, S., & Taponen, S. (2016). The effect of sampling technique on PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6532–6541. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10811>
- Hurley, W. ., Grieve, R. C. J., Magura, C. E., Hegarty, H. M., & Zou, S. (1993). Electrophoretic Comparisons of Lactoferrin from Bovine Mammary Secretions, Milk Neutrophils, and Human Milk. *Journal of Dairy Science*, 76(2), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2005.07.160>
- Jamali, H., Barkema, H. W., Jacques, M., Malouin, F., Saini, V., Stryhn, H., & Dufour, S. (2018). Invited review : Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows, 4729–4746.
- Jayarao, B. M., Pillai, S. R., Sawant, A. A., Wolfgang, D. R., & Hegde, N. V. (2004). Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3561–3573. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73493-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73493-1)

- Jayarao, B. M., & Wolfgang, D. R. (2003). Bulk-tank milk analysis: A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 19(1), 75–92. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00075-0)
- Keefe, G. (1997). Streptococcus agalactiae mastitis: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 38(7), 429–437. <https://doi.org/1997-008>
- Keefe, G. (2012). Update on control of staphylococcus aureus and streptococcus agalactiae for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>
- Keefe, G., Chaffer, M., Ceballos, A., Londono, M., Jaramillo, M., & Toro, M. (2011). E s c d i, 155–159.
- Leelahapongsathon, K., Schukken, Y. H., & Suriyasathaporn, W. (2014). Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 46(6), 1067–1078. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0603-8>
- Mekonnen, S. A., Koop, G., Melkie, S. T., Getahun, C. D., Hogeveen, H., & Lam, T. J. G. M. (2017). Prevalence of subclinical mastitis and associated risk factors at cow and herd level in dairy farms in North-West Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 145, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.06.009>
- Ministerio de salud y protección social, Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA), & Instituto Nacional de Salud (INS). (2011). *Evaluación de riesgos de staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia*.
- Morin, D. E. (2009). Mammary Gland Health and Disorders. In *Large animal internal Medicine* (Vol. 4 edition, pp. 99–105). <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2013.01.016>
- Mungube, E. O., Tenhagen, B. A., Kassa, T., Regassa, F., Kyule, M. N., Greiner, M., & Baumann, M. P. O. (2004). Risk factors for dairy cow mastitis in the central highlands of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 36(5), 463–472. <https://doi.org/10.1023/B:TROP.0000034999.08368.f3>

- Murphy, S. C., & Boor, K. J. (2000). Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 20(8), 606–611.
- National Mastitis Council (NMC). (1999). *laboratory handbook on bovine mastitis* (Second edi). Verona, USA.
- NMC. (1999). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis Revised Edition*. National Mastitis Council, Madison.
- Philpot, N., & Nickerson, s. (1991). *Mastitis: Counter Attack a strategy to combat mastitis*. Illinois USA: Babson Bros. Co.
- Projan, S., & Novick, R. (1997). The molecular basis of pathogenicity. In K. Crossley & G. Archer (Eds.), *The staphylococci in human disease* (pp. 55–81). Nueva York, Churchill Livingstone.
- Quinn, P. ., Markey, B. ., Carter, M. ., Donnelly, W. ., Leonard, F. ., & Maghire, D. (2002). *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. U.K: Editorial Acribia.
- Ramírez, N., Arroyave Henao, O., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (22), 31–42. Retrieved from <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/562>
- Ramírez, N. F., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., ... Palacio, L. G. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4141–4150. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6815>
- Ruegg, P. L. (2011). Managing Mastitis and Producing Quality Milk. In *Dairy Production Medicine* (pp. 207–232).
- Ruegg, P. L. (2012). New Perspectives in Udder Health Management. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.001>
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>

- Ruegg, P. L., & Erskine, R. (2015). Mammary Gland Health. In *Large animal internal Medicine* (pp. 1015–1043).
- Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, Kaartinen, L., & S. Pyörälä, ed, Gummerus, J. (1995). Detection of inflammatory changes in the milk. In *Bovine udder and mastitis* (pp. 89–104). Finland.
- Smith, B. P. (2009). *Large Animal Internal Medicine*. (ELSEVIER, Ed.) (4th ed.). St. Louis, Missouri.
- Steele, N. M., Williamson, J. H., Thresher, R., Laven, R. A., & Hillerton, J. E. (2017). Evaluating a commercial PCR assay against bacterial culture for diagnosing *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* throughout lactation. *Journal of Dairy Science*, *100*(5), 3816–3824. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11752>
- Sutra, L., & Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, *40*(2), 79–89.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., & Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*, *92*(6), 2610–2617. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1729>
- WHO.int. (2019). Acceso. [online] Available at: <https://www.who.int/es> [Accessed 28 Dec. 2018].
- Yadav, R., Sharma, S. K., Yadav, J., Choudhary, S., & Kataria, A. K. (2015). Profiling of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic milk of cattle and buffalo. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *9*(2), 1539–1544. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.398-402>.
- Zadoks, R., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J., & Schukken, Y. H. (2011). Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *16*(4), 357–372. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>

- Zadoks, R. N., Tikofsky, L. L., & Boor, K. J. (2005). Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. *Veterinary Microbiology*, *109*(3–4), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.05.008>
- Zadoks, R. N., & Watts, J. L. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*, *134*(1–2), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.012>
- Zanardi, G., Caminiti, A., Delle Donne, G., Moroni, P., Santi, A., Galletti, G., ... Bertocchi, L. (2014). Short communication: Comparing real-time PCR and bacteriological cultures for *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* in bulk-tank milk samples. *Journal of Dairy Science*, *97*(9), 5592–5598. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7947>
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., & Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, *40*(4), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.01.001>

## Capítulo 2

### **El tamaño del hato y el tipo de ordeño están asociados a la prevalencia de bacterias patógenas en el tanque de almacenamiento de leche.**

Ángela-Sofía Ágredo Campos<sup>1</sup>, MV, Est MSc; Jorge A Fernández Silva<sup>1</sup>, MV, MSP, Dr Med vet;

Edilberto Martínez<sup>1</sup>, MV; Nicolás F Ramírez Vásquez<sup>1</sup>, MV, MSc, Dr Sci Anim;

<sup>1</sup>Grupo CENTAURO, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

### **Resumen**

**Antecedentes:** La Mastitis Bovina afecta la salud, el bienestar de los animales y la calidad de la leche. *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* son los principales agentes causales de mastitis contagiosa bovina y habitan obligatoriamente la glándula mamaria. Se ha identificado un mayor Recuento de Células Somáticas (RCS) en hatos con ordeño manual en comparación con aquellos que tienen ordeño mecánico. Los cultivos de tanque de leche y los valores de RCS, suministran una base para evaluar la calidad de la leche y los problemas de mastitis contagiosa en el hato. **Objetivo:** determinar la prevalencia de *S. agalactiae* y *S. aureus* en tanques de leche y su asociación con las prácticas de manejo del ordeño en hatos del municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. **Métodos:** Se efectuó un estudio transversal entre diciembre de 2016 y octubre de 2017. El tamaño de muestra fue 148 hatos, se estimó basado en la fórmula de comparación de proporciones. La selección de los hatos se ejecutó mediante muestreo aleatorio simple. Se realizaron tres visitas por hato con un intervalo de dos meses. En la primera visita se realizó una encuesta sobre las prácticas de manejo del hato y se tomó una muestra para

RCS. En cada visita se colectó una muestra de leche de tanque para cultivo bacteriológico de *S. agalactiae* y *S. aureus*. **Resultados:** el 60% de los hatos tiene 30 o menos animales en ordeño. El 86.5% de los hatos ordeña en potrero y el 30.4% realizaban presellado adecuado. La prevalencia aparente de *S. aureus* en tanque de leche a nivel de hato fue del 23% (34/148) y la de *S. agalactiae* del 8% (12/148). En el análisis de regresión logística multivariado se encontró asociación estadística significativa entre la positividad a *S. aureus* y tener más de 60 vacas en ordeño y la positividad a *S. agalactiae* y uso de ordeño mecánico en sala o en potrero, en comparación con los que ordeñan de forma manual en potrero. **Conclusiones:** Se encontró una prevalencia menor para *S. agalactiae* en comparación con otros estudios realizados a nivel de tanque y a nivel animal. El ordeño mecánico en sala o en potrero, y tener un número mayor de 60 vacas en ordeño es un factor de riesgo para la presentación de *S. agalactiae* y *S. aureus*, respectivamente.

*Palabras clave: Factores de riesgo, Lechería especializada, Mastitis contagiosa, ordeño manual, Recuento de Células Somáticas.*

## Introducción

La mastitis bovina es un problema que afecta la salud y el bienestar de los animales (Ruegg, 2012) y es una enfermedad con gran impacto económico en el hato y la industria, debido al daño directo sobre la calidad y cantidad de la leche (Keefe, 2012). A nivel mundial la mastitis es la enfermedad infecciosa más prevalente y costosa en las vacas lecheras, debido a los costos por pérdidas en la producción, sacrificio de animales, tratamiento de animales enfermos y medidas de control y prevención (Andrews, Blowey, Boyd, & Eddy, 2004; Green et al., 2012). En Holanda se estimó que los costos por pérdidas debidas a mastitis bovina, sumados a los costos en su prevención, están alrededor de 240 euros por lactancia por vaca por año (van Soest, Santman-Berends, Lam, & Hogeveen, 2016). En Colombia se registraron pérdidas de hasta 2.4 litros diarios por vaca afectada con tres cruces al California Mastitis Test (CMT) (Rodríguez, 2006) .

La mastitis es el principal factor que causa un elevado RCS (Blowey y Edmondson, 2010). Se ha relacionado el incremento en los valores de RCS en tanque, con la frecuencia de aislamiento de *S. aureus* y *S. agalactiae* (Jayarao et al., 2004). En Colombia se identificó mayor valor de RCS en leche de tanques con sistemas de ordeño manual en comparación con aquellos que tenían ordeño mecánico (Reyes et al., 2017). La identificación de patógenos mediante cultivos de leche de tanque y la evaluación periódica de valores de RCS, permiten valorar la calidad de la leche y reconocer mastitis contagiosa en el hato (Jayarao et al., 2004).

Las bacterias *S. agalactiae* y *S. aureus* son los principales agentes causales de la mastitis contagiosa bovina (Bhushan, Jayarao & Wolfgang, 2003; Keefe, 2012). El aislamiento de *S.*

*aureus* o *S. agalactiae* en leche de tanque podrían indicar infección en uno o más animales (Jayarao et al., 2003), ya que ambas bacterias son habitantes obligadas de la glándula mamaria (Divers & Peek, 2008; Jayarao et al., 2004; Olde Riekerink et al., 2010).

En varios estudios realizados en provincias de Brasil, se reportó una prevalencia de mastitis subclínica para *S. aureus* y para *S. agalactiae* desde 4.8% hasta 28.2% y de 3.1% hasta 13.7%, respectivamente (Busanello et al., 2017). En Colombia estudios no probabilísticos efectuados a nivel de cuarto, determinaron mayor frecuencia en los aislamientos de *S. aureus* y *S. agalactiae* (Rodríguez, 2006, Calderón & Rodríguez, 2008b, Ramírez et al., 2014; Trujillo et al., 2011). En cuanto a tanque, en un estudio estratificado en hatos de Canadá se encontró una prevalencia de *S. aureus* en tanque del 74% (Riekerink et al., 2010). En México, en 224 tanques de leche se halló una frecuencia de 30% para *S. aureus*, no se aisló *S. agalactiae* en ninguna muestra (Miranda-Morales et al., 2008). En Colombia han sido muy pocos los estudios realizados a nivel de tanque y los que se han hecho son de tipo no probabilísticos (Keefe et al., 2011, Velasco-Bolaños et al., 2014).

En el país se han identificado prácticas en lechería especializada asociadas con mastitis clínica y subclínica a nivel de cuarto ocasionadas por *S. agalactiae* y *S. aureus* (Ramírez et al., 2014). Estas asociaciones se han encontrado en estudios no probabilísticos, sin diseño específico para comparación de proporciones (análisis de factores de riesgo) y en los cuales el número de hatos es muy pequeño, lo cual podría llevar a incertidumbre en la validez de los resultados. El objetivo de este trabajo fue estimar la prevalencia de *S. agalactiae* y *S. aureus* en tanques de leche y

asociar las prácticas de manejo del ordeño a la prevalencia en hatos del Municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia.

## **Materiales y métodos**

### ***Consideraciones éticas***

Este trabajo recibió aval expedito del Comité de Ética para la Experimentación con Animales (CEEAA) de la Universidad de Antioquia (Acta del 29 de abril de 2015).

### ***Tipo de estudio y tamaño de muestra***

Este estudio transversal fue realizado en el municipio de San Pedro de los Milagros, ubicado en el Altiplano Norte de Antioquia, entre diciembre de 2016 y octubre de 2017. La población bovina al momento del estudio era de 73.136 bovinos (ICA, 2017). El municipio de San Pedro de los Milagros tiene un sistema de lechería especializada similar al de otras cuencas de lechería especializada en Colombia, lo que hace de este municipio un buen modelo para estudios epidemiológicos relacionados con la producción lechera en Colombia. En el municipio se produjeron 576.400 litros de leche por día en el 2016 (Gobernación de Antioquia, 2016) lo que representa el 19.5% de la producción láctea departamental. El tamaño de muestra (n=148 hatos) se estimó basado en la fórmula de comparación de proporciones (Dohoo, Stryhn, & Martin, 2010) mediante el Software PROMESA®. En el cálculo del tamaño de muestra se utilizó un nivel de confianza del 95% y un poder del 80%. La prevalencia esperada sin el factor de riesgo para *S. aureus* (P1) fue del 8%. La prevalencia esperada con el factor de riesgo para *S. aureus* (P2) fue del 40% (Riekerink et al., 2010). El factor de riesgo se estableció como “no lavado de manos del ordeñador”, de acuerdo a Ramírez et al., 2014.

El número total de hatos obtenidos en el cálculo del tamaño de muestra fue de 66 con el factor y 66 sin el factor. Este dato se ajustó según el análisis multivariable de Elashoff y Lemeshow

(2007), el cual resultó en un número total de hatos de 148. Para la selección de la muestra se eligieron aquellas veredas, que en conjunto sumaron el 70% de la población bovina en el municipio. Este porcentaje correspondió a 15 de las 37 veredas que componen el municipio. El número de hatos en cada vereda fue calculado por afijación proporcional, de acuerdo al número de hatos por vereda en relación a las demás veredas. De este modo las veredas con mayor número de hatos tuvieron más representación en la muestra. La selección de los hatos por cada vereda se realizó mediante un muestreo aleatorio simple usando el software Microsoft® Excel®2016. Los criterios de inclusión fueron: posibilidades de acceso al hato, que el hato tuviera tanque de almacenamiento propio no compartido y autorización del administrador o propietario para la toma de la muestra y la información.

### ***Protocolo de visita***

Durante el periodo de estudio se realizaron tres visitas por hato, con un intervalo de dos meses entre cada una. En cada visita fue colectada una muestra de leche de tanque para cultivo bacteriológico según las indicaciones del National Mastitis Council (NMC, 1999), la cual se transportó en refrigeración hasta el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias (Universidad de Antioquia). Las dos primeras muestras fueron almacenadas en tres viales de 2 ml por muestra y fueron congeladas a -20°C hasta un máximo de 12 semanas, debido a que la recuperación de *S. agalactiae* disminuye después de este periodo (Petzer et al., 2012; Schukken et al., 1989). Las muestras correspondientes al tercer muestreo no se congelaron y fueron procesadas en fresco después del transporte en refrigeración.

### ***Recuento de Células Somáticas (RCS)***

En la primera visita se tomó una muestra de leche del tanque de forma aséptica, según el protocolo establecido por el National Mastitis Council (NMC), 1999 y se transportó en refrigeración para su análisis en el Laboratorio de Calidad de la Leche de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad de Antioquia, donde fue procesado en el equipo Fossomatic®.

### ***Cultivo bacteriológico***

El diagnóstico bacteriológico de *S. aureus* y *S. agalactiae* se realizó siguiendo los lineamientos del National Mastitis Council (NMC, 1999). El cultivo de las muestras de leche se realizó en una cabina de bioseguridad Tipo II. Para el cultivo bacteriológico, uno de los tres viales almacenados se descongeló a temperatura ambiente por 40 minutos, luego se mezcló por inversión durante 30 segundos. Posteriormente fue realizada la siembra por superficie (0.01 ml de leche) en agar sangre e incubación a 37°C en CO<sub>2</sub> por 12 a 24 horas. Las muestras que presentaron tres o más colonias diferenciadas fueron consideradas contaminadas y descartadas para efectos de análisis. A las 24 horas de incubación cada colonia diferenciada fue sembrada en agar azida por 12 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub>. Posteriormente se le realizó tinción de Gram y prueba de catalasa. Las colonias Gram positivas y catalasa positivas y las colonias Gram positivas y catalasa negativas fueron seleccionadas para la identificación por medio de pruebas bioquímicas específicas para *S. aureus* y *S. agalactiae*, respectivamente. Para la identificación de *S. aureus* se realizó la prueba de manitol en plato, urea en tubo inclinado, coagulasa en tubo, y DNasa en plato (Ramírez et al., 2014). Se consideró una colonia positiva cuando todas las pruebas fueron positivas. Para la identificación de *S. agalactiae* se realizó la prueba de CAMP, esculina y bacitracina. Se consideró una colonia positiva cuando la prueba de CAMP fue positiva, esculina negativa, y

bacitracina sensible.

### ***Definición de caso***

Un hato se consideró positivo a *S. agalactiae* o a *S. aureus* si se aislaba el respectivo patógeno, en al menos uno de los tres muestreos efectuados.

### ***Encuesta***

Para evaluar los factores de riesgos asociados a las prácticas de ordeño, se diseñó una encuesta con 52 variables agrupadas en cinco categorías: 1. información general, 2. higiene del ordeño, 3. instalaciones, 4. variables relacionadas con la mastitis, y 5. Bioseguridad. Para la toma de información se solicitó la firma de un consentimiento informado por cada hato. La encuesta presentó opciones de respuestas cerradas y semiabiertas, las cuales se codificaron para facilitar su análisis. La encuesta fue realizada al ordeñador, administrador o propietario de acuerdo a quien realizara las labores en el lugar. Antes de su aplicación definitiva, la encuesta se evaluó en 5 hatos de una de las veredas del estudio, en la cual se identificaron las preguntas que se prestaran para confusión en su aplicación y en el análisis de los datos. Durante la evaluación de la encuesta los entrevistadores se prepararon y armonizaron en lo relacionado a la formulación de las preguntas y la recolección de la información, para evitar sesgos del entrevistador (Delgado-Rodríguez & Llorca, 2004).

### ***Análisis estadístico***

Toda la información obtenida fue ingresada en una hoja de cálculo Excel (Microsoft Corp., Redmond, 2010) y luego exportada a Stata® 12.0 (StataCorp, 2011) para todos los análisis estadísticos. En primera instancia se estimó la prevalencia aparente para *S. agalactiae* y *S.*

*aureus*. Para el análisis de factores de riesgo las variables nominales fueron categorizadas en variables ordinales para ingresarlas al modelo. Sólo variables con menos de 30% de datos perdidos fueron seleccionadas para el análisis univariado, luego se realizó análisis de regresión logística usando como variable respuesta la prevalencia de *S. aureus* y de *S. agalactiae*. Se estableció significancia estadística a un  $p < 0.05$ . Se efectuó análisis de correlación de Spearman y cuando se obtuvo un coeficiente de correlación  $> 0.40$  entre un par de variables se seleccionó sólo una para incluirla en el modelo, esto basado en los criterios de plausibilidad biológica y menores valores perdidos. Las variables que en el análisis bivariable tuviesen un  $p < 0.25$  fueron seleccionadas para el modelo de regresión logística multivariable. Se construyó un modelo de regresión logística multivariable por medio de la metodología backward, en el cual las variables que tuviesen un  $p < 0.05$  permanecían en el modelo. Se efectuó análisis de interacción entre los pares de predictores que tuviesen plausibilidad biológica. Se utilizó la prueba de Wald para comparar modelos sin y con el término de interacción incluido. Se efectuó análisis de confusión, pero no se lograron evidenciar variables confusoras.

Para la evaluación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y RCS se estimó la media geométrica y aritmética con sus respectivos intervalos de confianza. Adicionalmente para RCS se calculó media geométrica y aritmética para hatos positivos y negativos de los resultados obtenidos en el primer muestreo para *S. aureus* y *S. agalactiae*. Se dicotomizaron los resultados de RCS tomando un valor de  $RCS \geq 300.000$  cel/ml como hato positivo a patógenos contagiosos y valores  $< 300.000$  cel/ml se tomaron como hatos negativos. Posterior a la categorización de esta variable se realizó regresión logística multivariable.

## Resultados

### *Estadística descriptiva*

La caracterización de los hatos está resumida en la tabla 1. Los productos más usados para la desinfección de manos fueron, clorado en 38.5% (57) y yodado en 27% (40). El 27.7% (41) de los entrevistados realizaban lavado de manos entre vacas durante el ordeño y 72.3% (107) no lo hacían. En 82.43% (122) de los hatos no realizaban lavado de la ubre, mientras que 17.57% (26) dijo que lo hacía siempre o cuando la ubre estuviera muy sucia. De estos 26 hatos en donde se lavaba la ubre 10.14% (15) la secaban. En 63.5% (94) de los hatos lavaban los pezones y en 36.5% (54) no lo hacían. De 94 hatos en donde mencionaron lavar los pezones, 54% (80) los secaban y de estos, 33.8% (50) los seca individualmente. De los 148 hatos encuestados sólo el 1.3% (2) no realizaba despunte durante la rutina de ordeño, el resto 98.7% (146) sí lo ejecutaba. Respecto al presellado, 87.8% (130) de las personas manifestaron realizarlo y 12.16% (18) no. De los que presellaban, 15.4% (20) usaban productos clorados, 80.8% (105) productos yodados y 3.8% (5) otros productos. Se construyó la variable *presellado adecuado* agrupando las variables, presellado de pezones, producto adecuado para el presellado, concentración del producto usado para el presellado, tiempo de contacto del producto con el pezón, tipo de material para el secado. *Presellado adecuado* se consideraba cuando se usaba un producto diseñado para tal fin, con la concentración indicada por el fabricante, se deja actuar de 15 a 30 segundos en la piel del pezón y se realiza secado con toalla de papel desechable por pezón. De esta manera, 30.4% (45) de los hatos realizaban presellado adecuado y 69.6% (103) no lo realizaban adecuadamente.

Tabla 1. Variables descriptivas de 148 hatos lecheros en San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia.

Variable	Categoría	Observaciones	%
Número de vacas en ordeño	< 30	89	60
	30 a 60	40	27
	> 60	19	12.8
Número de ordeñadores	1	77	52
	2	57	38.5
	≥ 3	14	9.5
El ordeñador es el propietario	Si	74	50
	No	74	50
Raza	Holstein	121	81.8
	Jersey	16	10.8
	Otras **	11	7.4
Sitio de ordeño	Potrero	128	86.5
	Sala	20	13.5
Ordeño mecánico en potrero	Si	67	45.3
	No	81	54.7
Ordeño manual en potrero	Si	19	12.8
	No	129	87.2
Lavado de manos	Si	134	90.5
	No	14	9.5
Desinfección de manos	Si	97	65.5
	No	51	34.5
Uso de guantes	Si	63	42.6
	No	85	57.4
Mantenimiento del equipo de ordeño	Si	122	82.4
	No	7	4.7
	A veces	19	12.8
Segregación	Si	120	81.1
	No	28	18.9
CMT	Si	141	95.3
	No	7	4.7
Tipo de sistema	Cerrado	102	68.9
	Abierto	46	31.1
Cambio de ordeñador	Si	30	20.3
	No	118	79.7

\*\* Otras razas incluyen: Holstein rojo, Jerhol y Simmental

En relación a la variable mantenimiento del equipo de 29.8% (37) lo hacían cada tres meses, 61.3% (76) cada seis meses y 8.9% (11) cada año. El 81% (120) de los hatos ordeñan de último

las vacas con leche anormal y 18.9% (28) no tenían orden establecido durante ordeño. El 48% (71) de los encuestados mencionaron que usaban la leche de descarte para alimentar a las terneras, 13.5% (20) la elimina en el ambiente y 38.5% (57) tiene otra disposición.

De los 148 encuestados 69% (102) mencionaron que eran cerrados, lo que significa que no ingresaban animales de otros predios, mientras que 31% (46) se consideraron abiertos (significa que ingresaban animales nuevos al hato por compra o cambio)

### ***Prevalencia de *S. aureus* y *S. agalactiae* en tanques de leche***

La prevalencia aparente de *S. aureus* y de *S. agalactiae* por hato fue de 16.2% (24/148) y 2.1% (3/148) para el primer muestreo, 7.4% (11/148) y 3.4% (5/148) para el segundo muestreo, y 2% (3/148) y 3.4% (5/148) para el tercer muestreo, respectivamente. En total se encontró una prevalencia aparente en tanque de leche por hato para *S. aureus* de 23% (34/148) y para *S. agalactiae* de 8% (12/148).

### ***Factores de riesgo de hato asociados a la presencia de *S. agalactiae* y *S. aureus* en tanque de leche.***

Las variables que se descartaron por colinealidad fueron sitio de ordeño y ordeño mecánico en sala. Las variables evaluadas a nivel de hato relacionadas con la variable respuesta hato positivo a *S. aureus* en el análisis de regresión logística bivariado ( $p < 0.25$ ) que ingresaron al modelo final fueron: hatos con más de 60 vacas en lactancia ( $OR= 3.89$ ), ordeño mecánico en potrero ( $OR= 0.41$ ) y hatos que cambiaron el ordeñador en el último mes ( $OR= 2.39$ ). En relación a la variable hato positivo a *S. agalactiae* que ingresaron al modelo final ( $p < 0.25$ ) fueron: hatos

donde el ordeñador era el propietario ( $OR= 5.6$ ) y ordeño manual en potrero ( $OR= 6.2$ ) (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Modelo de regresión logística final evaluando el efecto de las variables significativas ( $p < 0.05$ ) sobre hato positivo a *S. aureus*.

Variable	OR	ES	Valor -P	IC 95%
Tamaño de hato				
<30	Ref			
30-60	2.29	1.04	0.069	0.93 – 5.61
> 60	3.58	1.99	0.022*	1.20 – 10.69
Ordeño mecánico en potrero				
Si	Ref			
No	0.56	0.24	0.19	0.23 – 1.34
Cambio de ordeñador el último mes				
No	Ref			
Si	2.21	1.01	0.082	0.90 -5.45

\* Variables estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

Se encontró asociación estadística entre positividad a *S. aureus* y hatos con más de 60 vacas en ordeño. El odds de presentar positividad en tanque para *S. aureus* fue 3.58 veces más en hatos con más de 60 animales en comparación con los de menos de 30 ( $p<0.05$ ). Para hatos positivos a *S. agalactiae* se encontró asociación estadísticamente significativa entre hatos con ordeño

mecánico en sala o en potrero, en comparación con los que ordeñan de forma manual en potrero. El odds de presentar positividad en tanque para *S. agalactiae* fue 4.43 veces más en hatos que no tenían ordeño manual en potrero en comparación con los que sí ( $P < 0.05$ ) (tablas 2 y 3).

Tabla 3. Modelo de regresión logística final evaluando el efecto de las variables significativas ( $p < 0.05$ ) sobre hato positivo a *S. agalactiae*.

Variable	OR	ES	Valor -P	IC 95%
El ordeñador es el propietario				
No	Ref			
Si	4.23	3.45	0.076	0.85 – 20.9
Ordeño manual en potrero				
Si	Ref			
No	4.43	2.97	0.027*	1.18 – 16.54

\* Variables estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

#### *Recuento de células Somáticas (RCS) y Unidades Formadoras de Colonia (UFC)*

Para los 148 tanques de leche evaluados se calculó para UFC una media geométrica de 18.100 cel/ml (IC 95% 14.133- 23.180 cel/ml) y una media aritmética de 110.939 (IC 95% 47.893 - 173.985 (cel/ml)). De los 148 hatos evaluados para RCS se obtuvo una media aritmética de 304.400 cel/ml (IC 270.300 – 332.800) y una media geométrica de 255.643 cél/ml (IC 232.7779 - 280.7558.). El 59.5% (88) de los hatos tenían un valor de RCS en tanque  $\leq 300.000$  cel/ml y el 40.5% (60)  $>$  a 300.000 cél/ml. De los hatos positivos a *S. aureus* se obtuvo una media aritmética de 404.041 Cel/ml (IC 95% 280.229 - 527.853) y una media geométrica de 342.081 cel/ml (IC

95% 272.059 - 430.124 cel/ml ). De los hatos negativos a *S. aureus* se obtuvo una media aritmética de 281.798 cel/ml (IC 95% 253.334 - 310.261) y una media geométrica de 241.631 cel/ml (IC 95% 218.417 - 267.311 cel/ml ). De los hatos positivos a *S. agalactiae* se obtuvo una media aritmética de 496.333 ( -114.453 - 1.107.119 cel/ml) y una media geométrica de 445.688 cel/ ml (IC 95% 98.929 - 2.007.883 cel/ml), de los cuales 100% (2/2) se encontraron con un RCS  $\geq 300.000$  c/ml. En cuanto a los hatos negativos se calculó una media aritmética de 297.593 cel/ml ( 266.417 - 328.769 cel/ml) y una media geométrica de 252.720 cel/ ml (IC 95% 230.046 277.630 cel/ml). El 46% (11/24) de los hatos tenían un RCS  $< 300.000$  cel/ml y 54% (13/24) un RCS  $\geq 300.000$  c/ml.

## Discusión

Este es el primer estudio con un diseño basado en comparación de proporciones, para evaluar la asociación de las prácticas de manejo del ordeño a nivel de hato con la prevalencia de *S. aureus* y *S. agalactiae* aislados de tanque de leche, en San Pedro de los Milagros. Esta zona presenta características de producción muy similares a otras regiones lecheras de Colombia, que la hacen un buen modelo del sistema de producción de lechería especializada para la evaluación de este tipo de asociaciones y podría representar lo que está sucediendo en otras zonas de lechería especializada del país.

Este estudio reveló una prevalencia en tanque menor para *S. agalactiae* (8%) en comparación con estudios realizados en el departamento de Caldas (Colombia) y en el departamento de Córdoba en donde se encontraron prevalencias de 42%, 53.3% y 23% (Keefe et al., 2011; Velasco-Bolaños et al., 2014; Cogollo-Cordero et al., 2016). En investigaciones previas efectuadas a nivel de cuarto y vaca en la zona del presente estudio, el *S. agalactiae* ha sido una de las bacterias con mayor prevalencia (Ramírez et al., 2014), por lo cual la asistencia técnica de los médicos veterinarios de la zona se ha enfocado al control de este patógeno lo que pudo ayudar a reducir su frecuencia a nivel de animal y a su vez en tanque a través del tiempo. La diferencia entre los resultados de la investigación realizada en el departamento de Córdoba en comparación con los ejecutados en lechería especializada en el departamento de Caldas y Antioquia, podría deberse a que el clima y el nivel tecnológico es en general, mejor en las zonas de lechería especializada que en las zonas de trópico bajo. Adicionalmente, la baja prevalencia reportada puede deberse a que la carga de esta bacteria en los animales disminuye en el tanque

producto del efecto de dilución de la muestra tomada. En cualquier caso estudios internacionales han revelado que la prevalencia de este patógeno es muy variable (Riekerink et al., 2006), al igual que para *S. aureus* en tanque, en donde se ha encontrado una prevalencia mayor en Uruguay 96% (n=29) (Peés, 2016), México 30% (n= 224) (Miranda-Morales et al., 2008), Canadá 40% (n= 904) (Olde Riekerink et al., 2010), y en Estados Unidos (Ohio) 69% (n= 213)(Da Costa & Schuenemann, 2016), mientras que un estudio efectuado en Brasil encontró un 10.8% (n= 37)(Fagundes, et al., 2010). Esto muestra que existe una gran variabilidad en la prevalencia de este patógeno entre países, lo cual podría deberse a que la transmisión se altera de acuerdo a las condiciones de la zona, de higiene durante el ordeño, prácticas de manejo (Jayarao et al., 2004), y a que *S. aureus* es un patógeno de difícil control a pesar de la tecnificación lograda en algunos países sobre todo del hemisferio norte.

Es importante resaltar que en este estudio se encontró una prevalencia aparentemente baja de los patógenos del estudio en comparación con otras regiones del país, sin embargo, el aislamiento de *S. aureus* y *S. agalactiae* en tanque evidencia infección en uno o más animales en el hato (Da Costa & Schuenemann, 2016; Olde Riekerink et al., 2010), lo cual indica que los patógenos están presentes en la zona y en los hatos evaluados, por lo tanto, existe riesgo de transmisión y de diseminación a los animales sanos, debido a que el reservorio primario son las vacas infectadas (Keefe, 2012a) y a que *S. aureus* se transmite de animales infectados a sanos a través de la máquina o manos del ordeñador (Zadoks et al., 2002).

Debido a que *S. aureus* y *S. agalactiae* son patógenos altamente contagiosos, la medidas de

control deben enfocarse en la bioseguridad del rebaño con el fin de disminuir nuevas infecciones (Keefe, 2012b) y por lo tanto, se recomiendan programas de monitoreo regional en tanques de leche mediante el aislamiento microbiológico y evaluación periódica de RCS ya que ambas se han considerado una herramienta para el productor y el médico veterinario con el fin de identificar mastitis contagiosa en la población de manera rápida y económica (Olde Riekerink et al., 2010). Estos monitoreos deben ser acompañados por el refuerzo de las buenas prácticas de ordeño en los hatos.

Aunque el congelamiento de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un periodo máximo de cuatro semanas pudiera pensarse como un factor que afecta la tasa de aislamiento de los patógenos, es importante anotar que se ha documentado que dicho congelamiento no interfiere con la recuperación de *S. aureus* ni *S. agalactiae* (Murdough, Deitz, & Pankey, 1996; Petzer et al., 2012; Schukken et al., 1989). Sin embargo, para descartar cualquier influencia del congelamiento en la tasa de aislamiento bacteriano, el cultivo de la leche obtenido en el último muestreo, se efectuó en leche fresca con resultados similares a los cultivos anteriores realizados con leche descongelada, adicionalmente, para mejorar la sensibilidad de la prueba se realizaron tres repeticiones de las muestras de tanque para cultivo microbiológico en los mismos hatos (Barkema, Schukken, & Zadoks, 2006; Bartlett et al., 1991; Morin, 2009; Olde Riekerink et al., 2009).

La prevalencia aparente de *S. aureus* a nivel de hato en cada periodo disminuyó de 16.2% en el primer muestreo a 7.4% y 2% en el segundo y tercer muestreo. Se presume que la variación entre los resultados se debe a que las vacas persistentemente infectadas liberan la bacteria

intermitentemente, no coincidiendo con el momento de toma de la muestra (Farnsworth, 1993; Jayarao et al., 2004), ya que la muestra se tomó cada dos meses. Además, en animales con estados clínicos de la enfermedad, la leche no se adiciona al tanque por lo que disminuye la probabilidad de detectar la bacteria en el cultivo (Bartlett et al., 1991) y a que, en hatos con baja prevalencia, el efecto de dilución en el tanque disminuye el límite de detección de los organismos en el cultivo bacteriano (Jayarao et al., 2004; Soltau et al., 2017). De lo anterior se puede decir que si bien es conocido que aislar *S. aureus* en tanque de leche es un indicador de infección en glándula mamaria, la cantidad de aislamientos no demuestra la severidad del problema en el hato (Jayarao et al., 2004), por lo tanto los programas de control en hato deben estar acompañados por cultivo del cuarto para identificar los animales afectados.

En este estudio se halló que el 86.5% de los hatos realizan ordeño en potrero y de estos 45% es mecánico, esto concuerda con lo identificado previamente en la zona (Múnera-Bedoya, Cassoli, Olivera, & Cerón, 2018). Lo anterior evidencia que el ordeño mecánico en potrero es un sistema vigente en la región y que hace parte de la lechería especializada en el Norte de Antioquia (Arias, 2012; Calderón & Rodríguez, 2008a; Ramírez et al., 2011; Ramírez et al., 2014; Ruiz-Cortés, Orozco, Rodríguez, Lizárraga, & Olivera, 2012), por lo tanto, es necesario investigar y conocer los factores de riesgo originados por la implementación de esta tecnología en los hatos lecheros.

En este estudio el 12.8% de los hatos contaba con ordeño manual en potrero, en contraste con estudios efectuados en la zona del Altiplano Norte de Antioquia en donde el ordeño de tipo manual estaba presente en 81% de los hatos (Ramírez et al., 2014; Ruiz-Cortés et al., 2012). Esto

podría deberse a que el municipio de San Pedro de los Milagros es uno de los más tecnificados de la zona donde el ordeño manual ha sido reemplazado por el ordeño mecánico en sala y en potrero.

En un estudio previo efectuado en la región se encontró que el ordeño manual aumenta el riesgo de presentación de mastitis (Ramírez et al., 2011) y estuvo asociado con la infección por *S. agalactiae* en los cuartos mamarios (Ramírez et al., 2014), en contraste, en el presente estudio se encontró asociación estadísticamente significativa entre hatos positivos a *S. agalactiae* con ordeño mecánico en sala y en potrero en comparación con los que ordeñan de forma manual. De la misma manera, en otros estudios se encontró asociación entre la ocurrencia de infecciones por *S. agalactiae* y la superficie de la pezonera, el nivel de vacío, el lavado regular de la ubre, esto se debe a que el origen probable de la bacteria son los cuartos infectados (Leelahapongsathon et al., 2014), y que la máquina de ordeño sea el mecanismo de transmisión.

Para la región el promedio de animales en ordeño es de 49.2 animales/día por hato (Múnere-Bedoya et al., 2018), lo que concuerda con lo encontrado en este estudio para el Municipio de San Pedro de los Milagros, el 60% de los hatos cuenta con 30 o menos animales en ordeño. Basados en esto, se puede afirmar, que la producción de leche de San Pedro de los Milagros y de la región se debe a predios pequeños (menos de 30 animales en lactancia) y medianos (entre 30 y 60 animales en producción).

En relación a la presentación de mastitis contagiosa en el hato, se ha sugerido una posible

asociación entre el tamaño del hato y la enfermedad debido a que los diferentes sistemas de alojamiento y de ordeño varían según el tamaño del mismo (Schewe et al., 2015), en este sentido, se ha encontrado mayor riesgo de presentación de *S. aureus* en hatos grandes, en comparación con los pequeños (Mekonnen et al., 2017). Lo anterior concuerda con lo encontrado en esta investigación, en donde se encontró mayor riesgo de presentación de *S. aureus* en hatos mayores de 60 animales en ordeño.

Como se ya se mencionó la lechería especializada en este municipio se desarrolla principalmente por pequeños productores, y la mitad de ellos cuenta con trabajo de tipo familiar (en el 50% de los hatos el ordeñador era el propietario), esto es importante, ya que se ha demostrado que el mejoramiento de la calidad higiénica y sanitaria de la leche está influenciada por la actitud del ordeñador sobre todo por la implementación de la rutina de ordeño y la conducción adecuada de las vacas al sitio de ordeño con el fin de disminuir la mastitis contagiosa y el RCS (Múnera-Bedoya, Cassoli, Machado, & Cerón-Muñoz, 2017; Schewe et al., 2015). En este sentido los autores consideran que la implementación de las medidas de manejo para la prevención de la mastitis en los hatos sería más factible en los hatos donde el ordeñador es el propietario por la preocupación a obtener pérdidas económicas debido al impacto de la enfermedad en el hato. Por otro lado, se ha identificado que uno de los obstáculos en el control de mastitis en hatos grandes ha sido el manejo de los empleados, ya que en granjas en donde los encuestados aseguran el estricto cumplimiento de los protocolos y en donde se realizan bonificaciones a los empleados por disminución de RCS, fue más probable encontrar menores RCS en tanque (Schewe et al., 2015). De esta manera, es importante que el personal del hato implemente y estandarice los

procesos para disminuir la incidencia de mastitis clínica y subclínica en el ható.

En el presente estudio el despunte y el secado con antibiótico al inicio del periodo fue realizado en la mayoría de los hatos esto puede deberse a que el sistema de producción lechera en el Altiplano Norte de Antioquia es especializada, con mayor implementación tecnológica en comparación con otros municipios de esa subregión (Vásquez et al., 2014) por lo cual la rutina de ordeño y los cinco puntos para el control de la mastitis (Smith, 2009), serían prácticas conocidas e implementadas por los productores.

Para evaluar los factores de riesgo de mastitis de tipo contagiosa en el ható valoramos la rutina de ordeño teniendo en cuenta, entre otros, los cinco puntos para el control establecidos a nivel mundial (Smith, 2009) y encontramos que en 30.4% de los hatos no se realiza presellado de forma adecuada y el mantenimiento del equipo fue realizado en 94.6% hatos. Esto demuestra que a pesar de la especialización e implementación tecnológica en la zona aún se ejecuta de forma ineficaz la rutina de ordeño lo que podría aumentar el riesgo de diseminación de *S. agalactiae* y *S. aureus*, de animales infectados a sanos en un ható e incluso en la zona, ya que la etapa de preparación de la ubre es efectiva en la prevención de infecciones intramamarias si se realiza correctamente (Keefe, 2012a; Olde Riekerink et al., 2010)

*S. agalactiae* y *S. aureus* se han considerado patógenos mayores debido a que tienen impacto sobre la calidad de la leche y el RCS (Jayarao et al., 2004; Keefe, 2012). Un RCS en tanque entre 250.000 cel/ml y 400.000 cel/ml es un indicador de infección por *S. aureus* en el rebaño (Jayarao

et al., 2004), lo que concuerda con lo hallado en este estudio en el cual los hatos positivos a *S. aureus* tenían una media aritmética de 404.000 cel/ml.

Interesantemente se encontró que hatos pequeños tenían en promedio un RCS menor a los hatos medianos y grandes, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, lo que concuerda con lo encontrado por (Schewe et al., 2015) en el que no hubo asociación estadísticamente significativa entre el tamaño del hato y valores de RCS, pero difiere de Jayarao et al., (2004) en el cual los valores promedios fueron significativamente menores en hatos grandes.

En contraste con valores de RCS hallados en otras regiones del país como en el departamento de Caldas (Velasco-Bolaños et al., 2014), Antioquia (Trujillo et al., 2011) y valores de un estudio realizado en plantas acopiadoras de leche cruda en varios municipios del país (Vásquez et al., 2012), en este estudio se encontraron valores promedios menores. La mayoría de los productores (59.5%) tenían un RCS en tanque menor de 300.000 cel/ml, lo que podría significar que los productores están efectuando un manejo estratégico de la leche de vacas con altos RCS, no vaciándola al tanque y que, a pesar de tener un aparente valor reducido de RCS, la mastitis de tipo contagiosa sigue siendo un reto en algunos hatos. Es de anotar que a pesar de que la normativa colombiana no exige pago obligatorio por bajos RCS, algunas acopiadoras bonifican valores inferiores a 200.000 cel/ml. Esto garantiza mejor calidad sanitaria y composicional para transformar los productos lácteos, por lo tanto, mejorar este parámetro en los hatos ayudaría a potenciar el nivel de ingresos debido al valor del producto y permitiría mejorar la competitividad

del sector (Vásquez et al., 2012).

A juzgar por los resultados obtenidos, a pesar de la tecnificación del Municipio, aún hay presencia de bacterias de tipo contagioso en la glándula mamaria de las vacas. Lo anterior verifica que es necesario fortalecer el sector, ya que se cuenta con potencial tecnológico y humano para mejorar las prácticas establecidas y por ende para disminuir la prevalencia de bacterias de tipo contagioso a nivel de hato. Esto tiene como fin mejorar la salud de los animales y la calidad de la leche, los cuales son factores para mejorar la productividad del sector lechero (Barrios et al., 2013; Vásquez et al., 2012) y en algunos casos mejorar estas condiciones se puede ver reflejado en bonificaciones por calidad higiénica y composicional de la leche (Jayarao, et al 2004; Barrios et al., 2013).

## **Conclusiones**

La prevalencia aparente de *S. agalactiae* (8%) fue menor a lo encontrado en otros estudios realizados en tanque. Para *S. aureus*, la prevalencia aparente fue alta (23%) para la región. Se identificó el ordeño mecánico en sala y en potrero como un factor de riesgo para la presentación de *S. agalactiae*, la presencia de *S. aureus* en tanque se asoció con hatos con un número mayor de 60 vacas.

## Referencias

- (ICA), I. C. A. (2017). Censo Pecuario Nacional-2017. Retrieved from <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>
- Andrews, A., Blowey, R., Boyd, H., & Eddy, R. (2004). *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of cattle*. Blackwell Science. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Arias, M. (2012). Anatomía topográfica veterinaria. *Topografía Veterinaria*, 9.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. (2006). Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877–1895. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)
- Barrios Hernández, D., & Olivera Ángel, M. (2013). Análisis de la competitividad del sector lechero: Caso aplicado al norte de Antioquia, Colombia. *Innovar*, 23(48), 33–42.
- Bartlett, P. C., Miller, G. A. Y. Y., Lance, S. U. E. E., & Heider, L. E. (1991). Use of Bulk Tank and Milk Filter Cultures in Screening for *Streptococcus agalactiae* and Coagulase-positive *Staphylococci*, 54(II), 848–851.
- Busanello, M., Rossi, R. S., Cassoli, L. D., Pantoja, J. C. F., & Machado, P. F. (2017). Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6545–6553. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12042>
- Calderón, A., & Rodríguez, V. (2008a). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 582–589. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902008000400006&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902008000400006&nrm=iso)
- Calderón, A., & Rodríguez, V. C. (2008b). Prevalência de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(4), 582–589.
- Cogollo-Cordero, Y., Rodríguez-Rodríguez, V., & Calderón-Rangel, A. (2016). Determinación de patógenos asociados a leches crudas en empresas ganaderas doble propósito en Córdoba, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 34(1 Supl), S 1434–S 1436. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58558>
- Da Costa, L. B., & Schuenemann, G. M. (2016). Management practices associated with presence of

- Staphylococcus aureus in bulk tank milk from Ohio dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1364–1373. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9870>
- Divers, T., & Peek, S. (2008). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. (Elsevier, Ed.), *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3137-6.X0001-5>
- Dohoo, I., Stryhn, H., & Martin, W. (2010). *Veterinary epidemiologic research* (Second). Canada-University Prince Edward Island- 2010.
- Elias, A. O., Cortez, A., Brandão, P. E., Costa Da Silva, R., & Langoni, H. (2012). Molecular detection of Streptococcus agalactiae in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. *Research in Veterinary Science*, 93, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.016>
- Fagundes, H., Barchesi, L., Filho, A., Menezes, L., & Fernandes, C. A. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in Pão Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 376–380.
- FAO. (2016). Faostat: Ganadería primaria, producción leche entera fresca, vaca. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
- Farnsworth, R. J. (1993). Microbiologic examination of bulk tank milk. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 9(3), 469–474. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30614-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30614-9)
- Gobernación de Antioquia. (2016). Anuario estadístico de Antioquia. Producción. Sector agropecuario: Explotación bovina y producción de leche en los municipios de Antioquia. Retrieved from <http://www.antioquiadatos.gov.co/index.php/9-1-6-explotacion-bovina-y-produccion-de-leche-en-los-municipios-de-antioquia-ano-2015>
- Green, M., Bradley, A., Breen, J., Higgins, H., Hudson, C., & Huxley, J. (2012). *Dairy herd health*. CABI (Vol. 53). <https://doi.org/10.1079/9781845939977.0000>
- Jayaroo, B. M., Pillai, S. R., Sawant, A. A., Wolfgang, D. R., & Hegde, N. V. (2004). Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3561–3573. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73493-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73493-1)
- Jayaroo, B. M., & Wolfgang, D. R. (2003). Bulk-tank milk analysis: A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 19(1), 75–92. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00075-0)
- Keefe, G. (2012). Update on control of staphylococcus aureus and streptococcus agalactiae for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>
- Keefe, G., Chaffer, M., Ceballos, A., Londoño, M., Jaramillo, M., & Toro, M. (2011). E s c d i, 155–

- Leelahapongsathon, K., Schukken, Y. H., & Suriyasathaporn, W. (2014). Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 46(6), 1067–1078. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0603-8>
- Mekonnen, S. A., Koop, G., Melkie, S. T., Getahun, C. D., Hogeveen, H., & Lam, T. J. G. M. (2017). Prevalence of subclinical mastitis and associated risk factors at cow and herd level in dairy farms in North-West Ethiopia. *Preventive Veterinary Medicine*, 145, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.06.009>
- Miranda-Morales, R. E., Rojas-Trejo, V., Segura-Candelas, R., Carrillo-Casas, E. M., Sánchez-González, M. G., Castor, R. S., & Trigo-Tavera, F. J. (2008). Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*, 1149, 300–302. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.012>
- Morin, D. E. (2009). Mammary Gland Health and Disorders. In *Large animal internal Medicine* (Vol. 4 edition, pp. 99–105). <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2013.01.016>
- Múnera-Bedoya, O., Cassoli, L. D., Machado, P. F., & Cerón-Muñoz, M. F. (2017). Influence of attitudes and behavior of milkers on the hygienic and sanitary quality of milk. *PLoS ONE*, 12(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184640>
- Múnera-Bedoya, O., Cassoli, L. D., Olivera, M., & Cerón, M. (2018). Caracterización de sistemas de producción lechera de Antioquia con sistemas de ordeño mecánico Characterization of dairy farms with mechanical milking in Antioquia, Colombia. *Livestock Research for Rural Development*, 30.
- Murdough, P. a, Deitz, K. E., & Pankey, J. W. (1996). Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 334–336. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76368-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76368-3)
- National Mastitis Council (NMC). (1999). *laboratory handbook on bovine mastitis* (Second edi). Verona, USA.
- Olde Riekerink, R. G. M., Barkema, H. W., Kelton, D. F., & Scholl, D. T. (2008). Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1366–1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
- Olde Riekerink, R. G. M., Barkema, H. W., Scholl, D. T., Poole, D. E., & Kelton, D. F. (2010). Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(1), 20–28.

<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.002>

- Olde Riekerink, R. G. M., Sampimon, O. C., Pedersen, L. H., Katholm, J., & Lam, T. J. G. M. (2009). Comparison of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* culture results from bulk milk and quarter milk samples, 701248.
- Peés, L. G. (2016). Caracterización estacional de la calidad de la leche de tanque en predios de la región litoral norte del Uruguay. Universidad de la república.
- Petzer, I.-M., Karzis, J., Van der Schans, T. J., Watermeyer, J. C., Mitchell-Innes, N., Eloff, S., & Fosgate, G. T. (2012). Comparing effects of freezing at -196 °C and -20 °C on the viability of mastitis pathogens. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 79(1), 1–6. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v79i1.343>
- Ramírez, N., Arroyave Henao, O., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (22), 31–42. Retrieved from <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/562>
- Ramírez Vásquez, N., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., ... Palacio, L. G. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4141–4150. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6815>
- Reyes, J., Sanchez, J., Stryhn, H., Ortiz, T., Olivera, M., & Keefe, G. P. (2017). Influence of milking method, disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia. *Veterinary Journal*, 220, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.12.011>
- Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Veenstra, S., Poole, D. E., Dingwell, R. T., & Keefe, G. P. (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *The Canadian Veterinary Journal*, 47, 567–572.
- Rodríguez, G. (2006). Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 12, 35–55.
- Ruegg, P. L. (2012). New Perspectives in Udder Health Management. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.001>
- Ruiz-Cortés, T., Orozco, S., Rodríguez, L., Idárraga, J., & Olivera, M. (2012). Affect Colony Forming Units in Bulk Milk of North Antioquia-Colombia Dairy Farms. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 147–155.

- Schewe, R., Kayitsinga, G., Contreras, C., Odom, C., Coats, W., Coats, W., ... Erskine, R. J. (2015). Herd management and social variables associated with bulk tank somatic cell count in dairy herds in the eastern United States. *Journal of Dairy Science*, 98, 7650–7665. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8840>
- Schewe, R. L., Kayitsinga, J., Contreras, G. A., Odom, C., Coats, W. A., Durst, P., ... Erskine, R. J. (2015). Herd management and social variables associated with bulk tank somatic cell count in dairy herds in the eastern United States. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7650–7665. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8840>
- Schukken, Y. H., Grommers, F. J., Smit, J. A., Vandegeer, D., & Brand, A. (1989). Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *Journal of Dairy Science*, 72(7), 1900–1906. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79309-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79309-7)
- Smith, B. P. (2009). *Large Animal Internal Medicine*. (ELSEVIER, Ed.) (4th ed.). St. Louis, Missouri.
- Soltau, J. B., Einax, E., Klengel, K., Katholm, J., Failing, K., Wehrend, A., & Donat, K. (2017). Within-herd prevalence thresholds for herd-level detection of mastitis pathogens using multiplex real-time PCR in bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 8287–8295. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12385>
- StataCorp. (2011). Stata Statistical Software.
- Trujillo, C. M., Gallego, A. F., Ramírez, N., & Palacio, L. G. (2011). Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente Antioqueño. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(1), 11–18.
- van Soest, F. J. S., Santman-Berends, I. M. G. A., Lam, T. J. G. M., & Hogeveen, H. (2016). Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8365–8374. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10561>
- Vásquez, J. F., Loaiza, E. T., & Olivera, M. (2012). Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Orinoquia*, 16(2), 13–23. <https://doi.org/10.22579/20112629.251>
- Velasco-Bolaños, J., Cobo, C., Duque, P. C., Villa, N. A., Lasso, L., & Ceballos, A. (2014). Prevalencia y Factores de Riesgo para *Streptococcus agalactiae* en Tanques de Leche en el Departamento de Caldas, Colombia. *Investigación En Mastitis y Salud Mamaria*, 1(1), 79–80. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2709.4249>
- Zadoks, R., Van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H., &

Van Belkum, A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 40(11), 3894–3902. [https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.3894–3902.2002](https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.3894-3902.2002)

## Capítulo 3

### Identificación molecular de factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche de tanque en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia

Ángela-Sofía Ágredo Campos<sup>1</sup>, MV; Luis F. Calvino<sup>2</sup>, MV, Dr; Cecilia Camussone<sup>2</sup>, <sup>3</sup> Lic Biotec, Dr; Jorge A.

Fernández Silva<sup>1</sup>, MV, MSP, Dr; Nicolás F. Ramírez Vásquez<sup>1</sup> MV, MSc, Dr.

<sup>1</sup>Línea Epidemiología y Salud Pública Veterinaria, Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias (CENTAURO), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup>Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA, Rafaela, Santa Fe, Argentina

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina

#### Resumen

Los factores de virulencia expresados por *S. aureus* en los casos de mastitis bovina le permiten evadir la barrera celular y humoral del animal y favorecen la adherencia y permanencia en el tejido mamario. La identificación molecular de dichos factores ha posibilitado entender el comportamiento mediante la amplificación de genes como *spa*, ya que evalúa la variación molecular entre cepas debido a su polimorfismo. Otros genes permiten entender el potencial patogénico que pueden expresar en el animal. En el presente estudio se evaluaron 34 cepas de *S. aureus* aisladas de tanque de leche en el Municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. La identificación y la confirmación se realizaron mediante cultivo microbiológico de leche y PCR convencional amplificando el gen 23S rARN y *nuc*. Para la identificación de los factores de virulencia se realizó amplificación por medio de PCR convencional de los genes *spa*, *clfA*, *hla*, *hly*, *IcaA*, *IcaD*. De las 34 cepas evaluadas, 30 resultaron positivas al gen 23S rARN y *nuc*. Todos los factores de virulencia evaluados fueron amplificados en diferentes proporciones en las 30 cepas, así *Hla* y *Hly* (86.7%), *IcaA* (93.3%), *IcaD* (96.7%), *ClfA* (96.7%) y *Spa* (100%).

Se encontraron nueve spa-tipos en las treinta cepas de *S. aureus* evaluadas. Este estudio reveló que *S. aureus* aislado de tanque está presente en algunos hatos analizados en el presente estudio, que los aislamientos son variables genéticamente, y que la presencia de factores de virulencia sugiere alta patogenicidad y transmisibilidad de mastitis entre los animales y hatos de la zona.

**Palabras clave:** *spa-tipos, variabilidad genética, genotipificación*

## Introducción

*Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes causales de mastitis bovina de tipo contagiosa en el mundo (Blowey & Edmondson, 2010; Keefe, 2012; NMC, 1999; Smith, 2009). Cuando *S. aureus* se ha establecido en la glándula mamaria, la infección en el animal es de difícil erradicación, ya que sus factores de virulencia le permiten adherirse y evadir la respuesta celular y humoral (Blowey & Edmondson, 2010; Camussone & Calvino, 2013; Keefe, 2012; Morin, 2009; NMC, 1999; Smith, 2009).

De acuerdo a la expresión de factores de virulencia de *S. aureus* en la glándula mamaria, se evidencia el potencial virulento y patogénico en el animal (Raimundo et al., 1999). La identificación de factores de virulencia en cepas de *S. aureus* como term nucleasa (*nuc*), factor clumping (*Clfa*), alfa y beta hemolisina (*hla-hlb*) tienen una importante relación con la patogenicidad de la mastitis bovina (Salasia et al., 2004). Los factores de virulencia no están presentes en todo el genoma de la bacteria, es decir, solo algunas bacterias poseen la información para expresarlos (Kalorey et al., 2007), por lo cual el desarrollo de mastitis puede estar relacionado con las características y la expresión de combinaciones específicas de factores de virulencia (Zecconi et al., 2006). Se ha descrito que la variabilidad genética de las cepas se puede identificar mediante el gen *spa* (región X de unión a la proteína A), ya que es un gen polimórfico y puede variar entre cepas de *S. aureus* (Akineden et al., 2001).

Para optimizar el control de mastitis causada por *S. aureus* es importante realizar el aislamiento y la caracterización adecuada de las cepas. Para prevenir su propagación se recomienda realizar

segregación de los animales diagnosticados, tratamiento de los casos clínicos durante la lactancia, terapia antibiótica al final del periodo seco y sacrificio de animales crónicamente afectados (Hoque et al., 2018). La caracterización de las cepas de *S. aureus* contribuye a identificar diferentes patrones de infección entre hatos. Esto ha permitido dar a entender que las cepas difieren debido a clones especializados responsables de la mayoría de casos de mastitis (Akineden et al., 2001; Stephan et al., 2001). Los patrones de infección se han definido por la variabilidad de la presentación fenotípica y genotípica de factores de virulencia, un ejemplo de ellos es la identificación del gen *Spa* (región X de unión a la proteína A), cuyo tamaño y presencia puede variar entre cepas (Akineden et al., 2001; Kalorey et al., 2007) debido a que es polimórfico, ya que contiene un número variable de pequeñas repeticiones (Frenay et al., 1996). Esta característica permite evaluar la variabilidad de las cepas y caracterizarlas, para definir clones de *S. aureus*, su virulencia y distribución geográfica (Kalorey et al., 2007). Las cepas polimórficas son llamadas Spa-tipos (Frenay et al., 1996).

Los estudios de epidemiología molecular permiten la identificación de fuentes de microepidemias o brotes y de clones con virulencia aumentada entre cepas de patógenos (Frenay et al., 1996). Además, se ha reportado que la presencia, diversidad y variación genética de algunos factores de virulencia se han asociado con la severidad y patogenicidad de la enfermedad en el animal (Le Maréchal et al., 2011; Zecconi et al., 2006) . De esta manera es importante entender las características genotípicas de las cepas circulantes en las zonas de producción lechera en el país.

Identificar los factores de virulencia de *S. aureus* en un área definida, permite evaluar la distribución de la prevalencia, la variación genética de las cepas entre hatos, además, la relación de la respuesta en el animal (Akineden et al., 2001; Kalorey et al., 2007; Zecconi et al., 2006). Es así como la epidemiología molecular consigue evaluar el comportamiento de la enfermedad y proporcionar información para opciones de control, prevención y en alguna medida opciones terapéuticas (Kalorey et al., 2007; Le Maréchal et al., 2011).

Hasta el momento es poco conocida la detección y distribución de los factores de virulencia presentes en cepas de *S. aureus*, provenientes de glándula mamaria bovina en Colombia. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar los principales factores de virulencia presentes en cepas de *S. aureus* aisladas de tanques de leche ubicados en el Municipio de San Pedro de los Milagros, Colombia.

## **Materiales y métodos**

### ***Muestreo e identificación microbiológica de S. aureus***

Se tomaron 148 muestras de tanques de leche de hatos localizados en quince veredas del Municipio de San Pedro de los Milagros, según el protocolo indicado por el National Mastitis Council (NMC, 1999). El cultivo bacteriológico de leche se realizó en una cabina de bioseguridad Tipo II en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, para lo cual se tomó una muestra de 10 µl de leche con una pipeta calibrada, y se sembró en placas con agar base suplementado con 5% de sangre de cordero con asa de aro estéril. Cada agar fue incubado a 37°C en CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Las muestras que presentaron tres o más colonias diferenciadas se consideraron contaminadas y se descartaron para el análisis (NMC, 1999; Ramírez et al., 2014). A las 24 horas de incubación, las colonias viables se sembraron en agar azida por 12 horas a 37 °C en CO<sub>2</sub> (Ramírez et al., 2014). A las colonias viables se les realizó tinción de Gram y prueba de catalasa. Las colonias Gram positivas y catalasa positivas fueron seleccionadas para la identificación por medio de pruebas bioquímicas específicas para *S. aureus*: prueba de manitol en plato, urea en tubo inclinado, coagulasa en tubo, DNasa en plato (Ramírez et al., 2014). Una colonia se consideró positiva para *S. aureus* cuando todas las pruebas mencionadas fueron positivas.

Tabla 1. Oligonucleótidos y programas de termociclador usados para la amplificación de los genes que codifican 23S rARN y factores de virulencia de *S. aureus*.

Oligo-nucleótido	Gen	Tamaño (pb)	Secuencia (5'-3')	Programa del termociclador <sup>a</sup>	Referencia
Staur 4	23S rARN	1250	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	1.	Straub, et al 1999
Staur 6			AGCTCAGCCTTAACGAGTAC		
CLFA-1	Clumping factor	1000	GGCTTCAGTGCTTGTAGG	2.	Stephan et al., 2001
CLFA-2			TTTTTCAGGGTCAATATAAGC		
SPA-III	Región X de la proteína A	Variable	CAAGCACCAAAAAGAGGAA	3.	Frenay et al., 1996
SPA-IV			CACCAGGTTTAACGACAT		
NucA-1	Termonucleasa	300	GCGATTGATGGTGATACGGTT	4.	Brakstad, et al, 1992
NucA-2			AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
Hla-1	Alfa hemolisina	535	GGTTTAGCCTGGCCTTC	5.	Booth, et al, 2001
Hla-2			CGAACGAGTTCGTGATG		
Hlb-1	Beta hemolisina	833	GCCAAAGCCGAATCTAAG	5.	
Hlb-2			GCCATGGGATGTATATGC		
IcA-1	Operon IcA	1315	CCTAAC TAA CGA AAG GTA G	6.	Potter et al., 2009
IcA-2			AAG ATATAG CGA TAA GTG C		
IcD-1	OperonIcD	381	AAA CGT AAG AGA GGT GG	6.	Potter et al., 2009
IcD-2			GGC AAT ATG ATC AAG ATA C		

<sup>a</sup>Desnaturalización inicial: 94°C, 5 min; Extensión final: 72°C, 5 min. 35 ciclos 1. (94°C, 40 s; 60°C, 1 min; 72°C, 75 s) 2. (95°C, 30 s; 57°C, 30 s; 72°C, 1 min) 3 (95°C, 30s; 54.1°C, 30seg; 72°C, 1 min); 4. (95°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C 1 min) 5. (95°C, 1 min; 54°C, 30 s; 72°C 30s; 72°C 3 min); 6. (95°C, 30 s; 50°C, 30seg; 72°C, 30 s) 7. (95°C, 30 s; 55°C, 30seg; 72°C, 30s)

### ***Extracción de ADN***

Cada colonia fue sembrada en agar base suplementada con 5% de sangre de cordero 24 horas antes de la extracción de ADN. Para la extracción del ADN bacteriano se realizó pre incubación

de una única colonia bacteriana de cultivos frescos de cada aislamiento de *S. aureus* con lisozima por una hora en baño maría a 50°C. Luego se realizó extracción de ADN mediante el kit comercial InnuPREP® bacteria (Analytik, Jenna) basado en un sistema de extracción por columnas de sílica. El protocolo se realizó según las indicaciones del fabricante en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Un total de 34 cepas de *S. aureus* fueron aisladas e identificadas. Cada cepa aislada proviene de un tanque de leche diferente, por lo que las 34 cepas equivalen a 34 tanques positivos.

### **PCR**

La confirmación de *S. aureus* se efectuó mediante amplificación por PCR de los genes 23S rARN y *nuc* (Tabla 1). Se usó la cepa ATCC 35556 de *S. aureus* (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) como control positivo. Se amplificaron también los genes que codifican para los factores de virulencia de *S. aureus*, clumping factor (*CfIA*), región X de la proteína A (*spa*), Alfa y beta hemolisina (*hla-B*), Operon Ica-D (*ica-D*) (Tabla 1.). Como controles positivos de estos oligonucleótidos, se usaron cepas de *S. aureus* identificadas previamente como poseedoras del gen de interés, las cuales fueron proveídas amablemente por el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Para la PCR se utilizó un volumen de reacción final de 30 µl conteniendo 25 Mm MgCl<sub>2</sub>, 10 Mm de cada nucleótido, 10 µM dNTP, 15 U de Taq polimerasa y 2 µl de ADN de cada muestra problema o control positivo, en un termociclador PTC 200 MJ Research PTC-200® (Bio-Rad Laboratories,

Inc.USA) (Tabla 1). La presencia y tamaño de los productos amplificados se confirmaron mediante gel de agarosa al 1.5% usando intercalante Gel red® (Biotium, Inc. Fremont, CA, USA). Las pruebas para la identificación del gen 23S rARN se realizaron en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, mientras que las demás pruebas se realizaron en el Laboratorio de Sanidad Animal en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA, Rafaela, Argentina.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos se analizaron para estimar proporciones utilizando el Software Excel® (Microsoft, Redmond, Washington, EE.UU).

## Resultados

Se identificaron 34 aislamientos de *S. aureus* mediante cultivo microbiológico, de los cuales 30 se confirmaron positivos para dicho género y especie mediante la amplificación del gen 23SrARN y *nuc*. Las 30 cepas confirmadas molecularmente como *S. aureus* estaban distribuidas en trece veredas de las quince evaluadas. En las treinta cepas (100%) se encontró el gen que codifica para la región X de la proteína A (*Spa*), mientras que los demás genes, *Clfa*, *Hla*, *Hlb*, *IcaA* e *IcaD* se amplificaron con una frecuencia de 96.7, 86.7, 86.7, 93.3 y 96.7%, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos de PCR convencional para la identificación de genes que codifican para algunos factores de virulencia de *S. aureus* aislados de leche de tanque en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia.

Factor de virulencia	Presencia %	Ausencia%
23S rARN*	88.2 (30)	11.8 (4)
Termonucleasa ( <i>nuc</i> )*	88.2 (30)	11.8 (4)
Proteína de unión a fibrinógeno ( <i>Clfa</i> )	96.7 (29)	3.3 (1)
Región X de la proteína A ( <i>Spa</i> )	100 (30)	0 (0)
Alfa toxina ( <i>Hla</i> )	86.7 (26)	13.3 (4)
Beta toxina ( <i>Hlb</i> )	86.7 (26)	13.3 (4)
Operon de adhesión intercelular ( <i>IcaD</i> )	96.7 (29)	3.3 (1)
Operon de adhesión intercelular ( <i>IcaA</i> )	93.3 (28)	6.7 (2)

\*PCR confirmatoria como *S. aureus*

La diversidad genética de las cepas se evaluó mediante el polimorfismo del gen *spa* (Región X de la proteína A). En las 30 cepas analizadas se encontraron nueve diferentes tamaños de amplicon así, 110, 140, 190, 220, 270, 300, 320, 350 y 450 pb. La frecuencia de presentación de acuerdo al tamaño fue 140 pb (33.3%), seguido de 190 pb (20%), 350 pb (16.7%), 300 pb (10%), 220 pb (6.7%), 110 pb (3.3%), 270 (3.3%), 320 (3.3%), 450 pb (3.3%). Los nueve *spa*-tipos obtenidos se clasificaron mediante número romano, de acuerdo al tamaño del amplicon obtenido (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia y variabilidad del gen *Spa* que codifica para Región X de la proteína A en cepas de *S. aureus* aisladas de tanques de leche de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia

<i>Spa</i> -tipo	Tamaño amplicon (pb)	Número de repeticiones (cepas)	Distribución (%)
I	110	1	3.3
II	140	10	33.3
III	190	6	20.0
IV	220	2	6.7
V	270	1	3.3
VI	300	3	10
VII	320	1	3.3
VIII	350	5	16.7
IX	450	1	3.3
Total		30	100

## Discusión

El objetivo de este trabajo fue identificar factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* aislados de tanques de leche de hatos de San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. De las 34 cepas identificadas mediante cultivo microbiológico, 30 fueron confirmadas por amplificación de los genes 23S *rARN* y termonucleasa (*nuc*) (Brakstad et al., 1992; Hoque et al., 2018). Las cepas se confirmaron mediante la amplificación de los dos genes debido a que se han reportado aislamientos de *S. aureus nuc* negativas debido a delección o mutación de este gen (Costa et al., 2005; Pilla et al., 2013). El uso de un gen específico adicional para la identificación de especie ayuda a mejorar la probabilidad de detección y la robustez de la prueba (Van Leeuwen et al. 2008), de esta manera también se amplificó el gen 23S *rARN* debido a su alta sensibilidad y especificidad en ADN de *S. aureus* (Akineden O et al., 2001).

De las cuatros cepas no confirmadas por PCR como *S. aureus* se puede atribuir a identificación errónea, pues se ha reportado similitud bioquímica entre *S. aureus* y otras cepas coagulasa positiva con similares características fenotípicas, como *S. pseudintermedius*, *S. epidermidis*, *S. sciuri* y *S. hyicus* (Pilla et al., 2013; Rajiv et al., 2013).

Una alta proporción de aislamientos presentó el gen *clfA* (96,7%) lo que concuerda con lo encontrado en muestras de leche de mastitis clínica y subclínica en bovinos de Colombia, Argentina, Alemania, y Brasil (Monistero et al., 2018). Sin embargo, difiere de lo encontrado en Italia, China, Estados Unidos y Sur África (Memon et al., 2013; Monistero et al., 2018). El gen *clfA* está relacionado con la adherencia, colonización y establecimiento de la infección en la ubre

por lo que puede tener potencial patogénico principalmente frente a mastitis crónicas y persistentes en el animal (Camussone & Calvino, 2013b; Kalorey et al., 2007; da Costa et al., 2014; Monistero et al., 2018). Esto podría sugerir que las cepas encontradas en el presente estudio tienen el potencial para generar mastitis subclínicas crónicas, pues *clfA* ha sido, significativamente más común en cepas aisladas de cuartos con RCS mayor a 400.000 cel/ml (da Costa et al., 2014).

La variabilidad genética entre las cepas, demostrada en la identificación de los nueve Spa tipos (Akineden et al., 2001) y la presencia de varios factores de virulencia, podrían indicar que existen relativamente pocos clones causantes de los casos de mastitis subclínica en San Pedro de los Milagros, los cuales podría aumentar el recuento de células somáticas (RCS) en casos de mastitis subclínica causada por cepas de *S. aureus* del Spa-tipo con más de 4 repeticiones (Zecconi, et al. 2006).

En el presente estudio el gen para alfa hemolisina fue identificado en menor proporción (86.7%) en comparación a lo encontrado previamente en Indonesia, Alemania y Suecia (Artursson, et al 2016) en donde el gen *hla* estuvo en el 100% de las muestras. Se ha reportado que las cepas de *S. aureus* que presentan el gen beta hemolisina son más virulentas en el desarrollo de mastitis bovina (Larsen et al., 2002), debido a que cepas con la toxina en cultivos in vitro están implicadas en ruptura de la membrana del endosoma, lo cual le permite a la bacteria escapar de la apoptosis celular (Camussone & Calvino, 2013).

En este estudio el 86.7% de las cepas de *S. aureus* presentaron genes para el Operon IcaA e IcaD. En otros países como Brasil, ambos genes estaban presentes en el 100% de las cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de mastitis bovina y todos formaron biopelícula en pruebas fenotípicas (Salimena et al., 2016). Lo encontrado en este estudio indica que el potencial para la formación de biopelícula en glándula mamaria está presente en las cepas circulantes en la zona, esto es relevante porque la biopelícula le permite tolerar los mecanismos de defensa a la bacteria y evita que la terapia antibiótica tenga efecto (Salimena et al., 2016), lo que podría conllevar a mastitis subclínicas crónicas.

## **Conclusión**

*Staphylococcus aureus* está presente en el 20% de los hatos analizados en el presente estudio, por lo que es un problema vigente en la producción de leche. Por otro lado, la genotipificación de las cepas evidenció presencia de genes de virulencia con potencial patogénico, encontrándose alta diversidad molecular en las cepas. Los factores de virulencia identificados han sido relacionados con adherencia y permanencia de la bacteria en el tejido, por lo que se presume que las cepas de *S. aureus* aisladas de tanque de leche en San Pedro de los Milagros, tendrían el potencial de generar mastitis de tipo subclínicas y crónicas.

### **Agradecimientos**

A los productores de leche de San Pedro de los Milagros por permitir el acceso a la información y la disposición para la toma de muestras. Al Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, por la financiación de este proyecto. A los profesores Nicolás Ramírez y Jorge Fernández por el acompañamiento en la elaboración de este trabajo. A las Doctoras Cecilia Camussone, Ana Molineri y Dr. Luis Calvinho del Laboratorio de Sanidad Animal en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA, Rafaela, Argentina, por el apoyo prestado en la ejecución de las pruebas moleculares. A la Unidad de Diagnóstico de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, por el acceso al espacio de trabajo y la donación de algunas bacterias.

## Referencias

- Akineden O, Annemüller, C., Hassan, a, Lämmler, C., Wolter, W., & Zschöck, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(5), 959–964. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.5.959>
- Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). *The mastitis organisms. Mastitis Control in Dairy Herds* (2nd ed.). CAB. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Booth, M. C., Pence, L. M., Mahasreshti, P., Callegan, M. C., & Gilmore, M. S. (2001). Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infection and Immunity*, 69(1), 345–352. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.345-352.2001>
- Brakstad, O. D. D. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Brakstad et al\_1992\_Detection of *Staphylococcus aureus*\_nuc pcr und primer, 1654–1660.
- Camussone, C. M., & Calvino, L. F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: Relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7)
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., ... Castiglioni, B. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes*, 19(5), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.03.002>
- da Costa, L. B., Rajala-Schultz, P. J., Hoet, A., Seo, K. S., Fogt, K., & Moon, B. S. (2014). Genetic relatedness and virulence factors of bovine *Staphylococcus aureus* isolated from teat skin and milk. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6907–6916. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7972>
- Frenay, H., Bunschoten, E., Schouls, L. M., Van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Verhoef, J., & Mooi, E. (1996). Molecular Typing Methicillin-Resistant *Staphylococcus*

aureus on the Basis of Protein A Gene Polymorphism. *Journal Clinical Microbiology and Infection Diseases*, 15(7), 60–64.

Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A. N. M. A., Haider, M. G., & Islam, M. A. (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 53–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>

Kalorey, D. R., Shanmugam, Y., Kurkure, N. V., Chousalkar, K. K., & Barbuddhe, S. B. (2007). PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *Journal of Veterinary Science*, 8(2), 151–154.  
<https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.2.151>

Keefe, G. (2012). Update on control of *staphylococcus aureus* and *streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.010>

Le Maréchal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., ... Le Loir, Y. (2011). Molecular basis of virulence in *staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS ONE*, 6(11).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027354>

Morin, D. E. (2009). Mammary Gland Health and Disorders. In *Large animal internal Medicine* (Vol. 4 edition, pp. 99–105). <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2013.01.016>

NMC. (1999). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis Revised Edition. National Mastitis Council, Madison.

Pilla, R., Snel, G. G. M., Malvisi, M., & Piccinini, R. (2013). Duplex real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. *Journal of Dairy Research*, 80(2), 223–226. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000022>

Potter, A., Ceotto, H., Giambiagi-deMarval, M., dos Santos, K. R. N., Nes, I. F., & Bastos, M. do C. de F. (2009). The gene *bap*, involved in biofilm production, is present in *Staphylococcus* spp. strains from nosocomial infections. *Journal of Microbiology*, 47(3), 319–326.  
<https://doi.org/10.1007/s12275-009-0008-y>

- Raimundo, O., Deighton, M., Capstick, J., & Gerraty, N. (1999). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Veterinary Microbiology*, 66(4), 275–284. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00020-6)
- Ramírez, N. F., Keefe, G., Dohoo, I., Sánchez, J., Arroyave, O., Cerón, J., ... Palacio, L. G. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4141–4150. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6815>
- Salasia, S. I. O., Khusnan, Z., Lammler, C., & Zschock, M. (2004). Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *Journal of Veterinary Science (Suwon-Si, Korea)*, 5(2), 103–109. <https://doi.org/200406103> [pii]
- Salimena, A. P. S., Lange, C. C., Camussone, C., Signorini, M., Calvinho, L. F., Brito, M. A. V. P., ... Mendonça, L. C. (2016). Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms, (2300). <https://doi.org/10.1007/s11259-016-9658-5>
- Smith, B. P. (2009). *Large Animal Internal Medicine*. (ELSEVIER, Ed.) (4th ed.). St. Louis, Missouri.
- Stephan, R., Annemüller, C., Hassan, A. A., & Lämmler, C. (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 78(4), 373–382. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00341-2)
- Straub, J. a, Hertel, C., & Hammes, W. P. (1999). A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection*, 62(10), 1150–1156. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.10.1150>

Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., & Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, 40(4), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.01.001>

## Conclusión general

Es conocido a nivel mundial que la mastitis bovina es la enfermedad más prevalente y contagiosa de la lechería bovina. Así mismo se ha evaluado la epidemiología de esta enfermedad encontrando factores de riesgo que propician la transmisión entre animales. Sin embargo, es necesario conocer los factores de riesgo involucrados en la transmisión de patógenos contagiosos en sistemas de lechería especializada en países tropicales como Colombia, con un sistema productivo basado en pastoreo rotacional con base forrajera kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), suplementado con concentrado comercial y animales con núcleo racial Holstein y Jersey, principalmente. Adicionalmente el tipo de ordeño, es especialmente particular (ordeño manual y con máquina en potrero o sala de ordeño) en comparación con lo que se implementa en sistemas de ganadería especializada en los países de Norte América y Europa. Estas condiciones son similares a los demás municipios de la zona y de otras regiones lecheras del país.

De esta manera esta es una investigación probabilística, realizada en el municipio de San Pedro de los Milagros, que proporcionó información de prevalencia aparente de *S. aureus* (23%) y *S. agalactiae* (8%) a nivel hato, evidenciando que, a pesar de la implementación tecnológica y la instauración de buenas prácticas durante el ordeño, estos dos patógenos son un problema activo en el municipio y probablemente en la región. Uno de los hallazgos que consideran los autores tienen mayor relevancia epidemiológica es que el ordeño mecánico en sala o en potrero es un factor de riesgo para la presentación de *S. agalactiae* en comparación con el ordeño manual en potrero y que se identificó mayor riesgo de contagio para *S. aureus* en hatos con menos de 30 animales en producción. Lo anterior demuestra que es necesario seguir investigando en este

contexto con el fin de reconocer los factores críticos que propicien el comportamiento de esta enfermedad en el animal, ya que, como se mencionó las condiciones de ordeño y manejo propias de un país tropical son variables específicas para el desarrollo de la enfermedad en el hato, esto con el fin de identificar estrategias de prevención y control propias de la región.

Evaluar RCS en tanque de leche es una herramienta practica y económica que puede ayudar al productor de leche y al veterinario a identificar problemas en el hato para intervenir la población. Identificar asociación de un RCS mayor a 300.000 Cel/ml en hatos con menos de 30 animales en producción de leche, podría sugerir que es necesario mayor acompañamiento técnico en los hatos pequeños para instaurar medidas de control eficaces en una población bovina más pequeña. Contradictoriamente *S. aureus* estuvo asociado con los hatos con más de 60 animales en producción, esto sugiere que es necesario la implementación de medidas de identificación etiológica en el animal, de contención y control en la población, para disminuir la transmisión de este patógeno entre animales en hatos grandes y pequeños en la zona. Adicionalmente, sería importante indagar y asociar estos hallazgos en relación a la infección presente en los cuartos, como perspectiva para futuras investigaciones.

Los hallazgos genotípicos de las 30 cepas de *S. aureus* evaluadas, da a entender que estas cepas tienen características virulentas similares entre ellas y que existe variabilidad entre cepas, que están circulando entre hatos del municipio. Esto se podría sospecharse por el movimiento de animales entre hatos. Este estudio indica que todas las cepas aisladas de la zona tienen un alto porcentaje de factores de virulencia que probablemente ejercen un alto potencial patogénico en la

glándula mamaria, ya que la expresión fenotípica de factores de virulencia le permitirían adherirse y permanecer de forma crónica en el tejido mamario.

De esta manera este estudio evidencia la importancia de continuar investigando e indagando acerca de la epidemiología de *S. aureus* y *S. agalactiae* y los factores de riesgo entre animales a nivel de hato para aumentar el conocimiento de la enfermedad en el país.

## Anexos

### Anexo 1.: Encuesta realizada por hato.

Información general				Código		
1. Número del cuestionario				1. [   ]		
Altitud	Latitud	Longitud				
Fecha (día-mes-año)						
Hora toma de muestra:		Fecha congelamiento				
2. Nombre de predio				2. [   ]		
Nombre del propietario o administrador						
Teléfonos						
3. Municipio				3. [   ]		
4. Vereda				4. [   ]		
5. ¿Cuántas vacas en ordeño tiene al día de hoy?		[1] <30	[2] ≥ 30 - ≤60	[3] >60	5. [   ]	
6. ¿Cuántos ordeñadores tiene el hato al día de hoy?		[1] 1	[2] 2	[3] 3	[4] > 3	6. [   ]
7. ¿Cuál es la raza predominante en el hato?		[1] Holstein	[2] Jersey	[3] Otra ¿Cuál?	7. [   ]	
8. ¿Es el propietario el ordeñador?		[0] No		[1] Si	8. [   ]	
9. ¿Qué tipo de ordeño emplea?		[1] Mecánico	[2] Manual	[3] Ambos	9. [   ]	
10. ¿Dónde está ubicado el ordeño?		[1] Potrero	[2] Sala	[3] Ambos	10. [   ]	
Higiene del ordeño						
11. ¿Se lavan las manos los ordeñadores antes del ordeño?		[0] No		[1] Si	11. [   ]	
12. ¿Se desinfectan los ordeñadores las manos previas al ordeñado de cada vaca?		[0] No		[1] Si	12. [   ]	
13. ¿Qué producto usa para la desinfección?		[1] Clorado	[2] Yodado	[3] Otros	[4] N/A	13. [   ]
14. ¿Se lavan las manos los ordeñadores entre vaca y vaca?		[0] No		[1] Si	14. [   ]	
15. ¿Se usan guantes desechables para cada ordeño?		[0] No		[1] Si	15. [   ]	
16. ¿Lava la ubre antes del ordeño?		[0] No		[1] Si	16. [   ]	

17. ¿Lava los pezones antes del ordeño?			[0] No	[1] Si	17. [ ]
18. ¿Qué seca?	[1] Ubre	[2] Pezones	[3] N/A		18. [ ]
19. ¿Seca individualmente cada pezón?		[0] No	[1] Si	[2] N/A	19. [ ]
20. ¿Qué material usa para el secado?	[1] Trapo	[2] Periódico	[3] Otros	[4] N/A	20. [ ]
21. ¿Realiza descarte de los primeros chorros (despunte)?			[0] No	[1] Si	21. [ ]
22. ¿Efectúa presellado de los pezones?			[0] No	[1] Si	22. [ ]
23. ¿Qué producto usa para el presellado?	[1] Clorado	[2] Yodado	[3] Otros	[4] N/A	23. [ ]
24. ¿Cuál es la concentración del presellado?	[1] Recomendada por el fabricante	[2] No recomendada por el fabricante	[3] N/A		24. [ ]
25. ¿Cuál es el tiempo de contacto del presellado con los pezones?	[1] <15 seg	[2] 15-30 seg	[3] >30 seg	[4] N/A	25. [ ]
26. ¿Seca el producto del presellado?		[0] No	[1] Si	[2] N/A	26. [ ]
27. ¿Realiza secado individual del pezón?		[0] No	[1] Si	[2] N/A	27. [ ]
28. ¿Qué material usa para el secado?	[1] Trapo	[2] Periódico	[3] Otros	[4] N/A	28. [ ]
29. ¿Efectúa sellado de los pezones?			[0] No	[1] Si	29. [ ]
30. ¿Qué producto usa para el sellado?	[1] Clorado	[2] Yodado	[3] Otros	[4] N/A	30. [ ]
31. ¿Cuál es la concentración del sellado?	[1] Recomendada por el fabricante	[2] No recomendada por el fabricante	[3] N/A		31. [ ]
32. ¿Se efectúa mantenimiento del equipo de ordeño?		[0] No	[1] Si	[2] N/A	32. [ ]
33. ¿Cada cuánto se hace el mantenimiento del equipo?	[0] Cada 3 meses	[1] Cada 6 meses	[2] Cada año	[3] No se realiza	33. [ ]
34. ¿Ordeña de último las vacas con leche anormal?			[0] No	[1] Si	34. [ ]
35. ¿Dónde depositan la leche anormal?	[1] Para las terneras	[2] Eliminación en el ambiente		[3] Otros	35. [ ]
36. ¿Se desinfecta las manos después de ordeñar vacas con producción de leche anormal? Ordeño manual			[0] No	[1] Si	36. [ ]

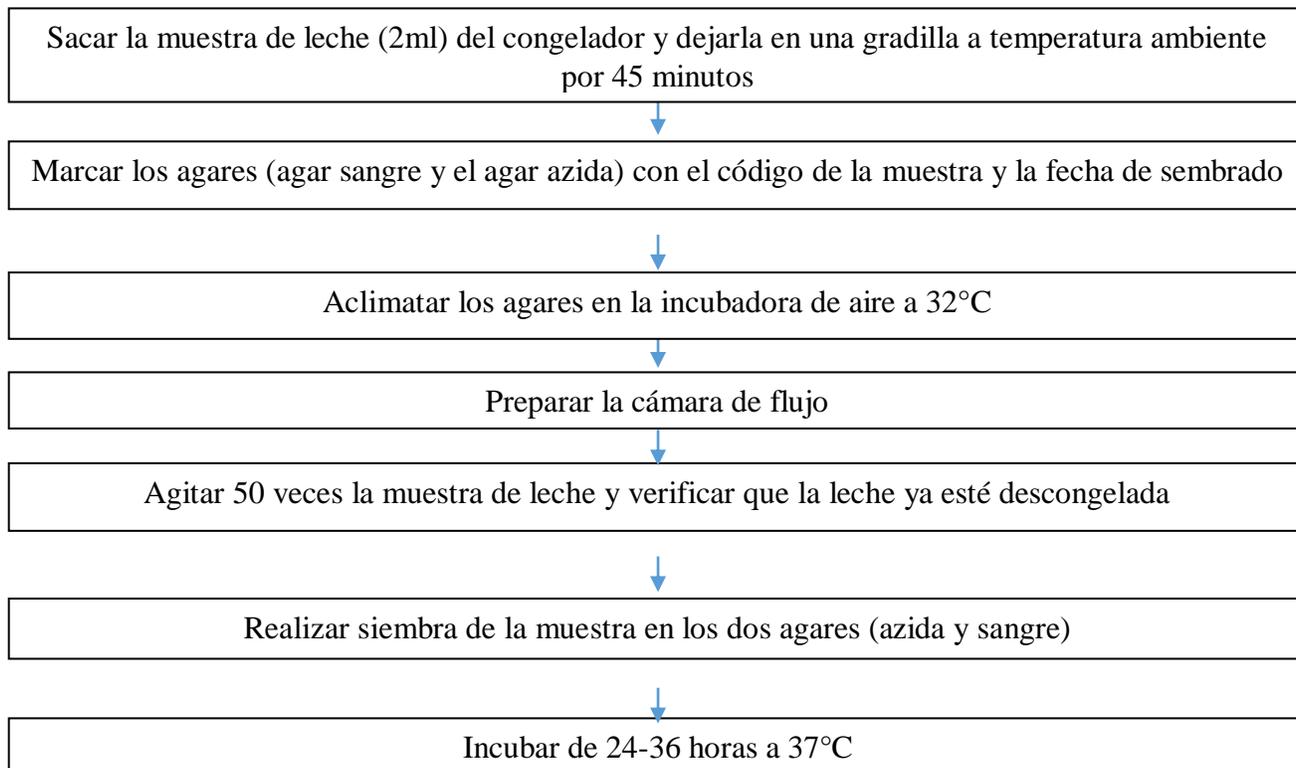
37. ¿Existe separación del sistema de ordeño para la leche anormal? Ordeño mecánico	[0] No	[1] Si	37. [ ]	
38. ¿Existe una caneca marcada para depositar la leche anormal? Ordeño manual	[0] No	[1] Si	38. [ ]	
<b>Instalaciones</b>				
39. ¿Existen adecuaciones para el lavado de manos en el área de ordeño con agua limpia y jabón? (Diferente a las canecas)	[0] No	[1] Si	39. [ ]	
<b>Otras variables relacionadas con la mastitis</b>				
40. ¿Realizan terapia de secado a las vacas en el último tercio de preñez?	[0] No	[1] Si	40. [ ]	
41. ¿La terapia de secado la realizan con antibiótico?	[0] No	[1] Si	41. [ ]	
42. ¿Cuál es el principio activo más usado para la terapia de secado en el hato?	Principio activo:		42. [ ]	
43. ¿Realiza secado selectivo o en sábana?	[1] Selectivo	[2] Sábana	43. [ ]	
<b>Bioseguridad</b>				
44. ¿Las vacas identificadas con alto recuento de células somáticas, son separadas para ordeñar al final?	[0] No	[1] Si	[3] N/A	44. [ ]
45. ¿El hato es cerrado o abierto?	[1] Cerrado	[2] Abierto	45. [ ]	
46. ¿De dónde ingresan los animales?	[1] De otras fincas	[2] Del exterior	[3] N/A	46. [ ]
47. ¿Se hace cuarentena a los bovinos que adquieren?	[0] No	[1] Si	47. [ ]	
48. ¿Cuántos días dura la cuarentena?	Número		48. [ ]	
49. ¿Existe un área delimitada en el predio para cuarentena?	[0] No	[1] Si	49. [ ]	
50. ¿Se realiza alguna prueba de sanidad a los bovinos adquiridos?	[0] No	[1] Si	50. [ ]	
51. ¿Qué prueba? Nómbrela	Número		51. [ ]	
52. ¿Hubo cambio de ordeñador el último mes?	[0] No	[1] Si	52. [ ]	

## Anexo 2.

### Algoritmo procesamiento muestra de leche, cultivo, extracción ADN

#### Día 1

#### Descongelamiento y siembra de la muestra



## **Día 2 – Cultivo -**

Dividir el agar sangre en 4 partes iguales

Marcar los agares (agar sangre y agar azida) con el código de la muestra, la fecha de sembrado y el consecutivo del repique (R1 o R2)

Aclimatar los agares marcados en la incubadora de aire a 37°C

Preparar la cámara de flujo

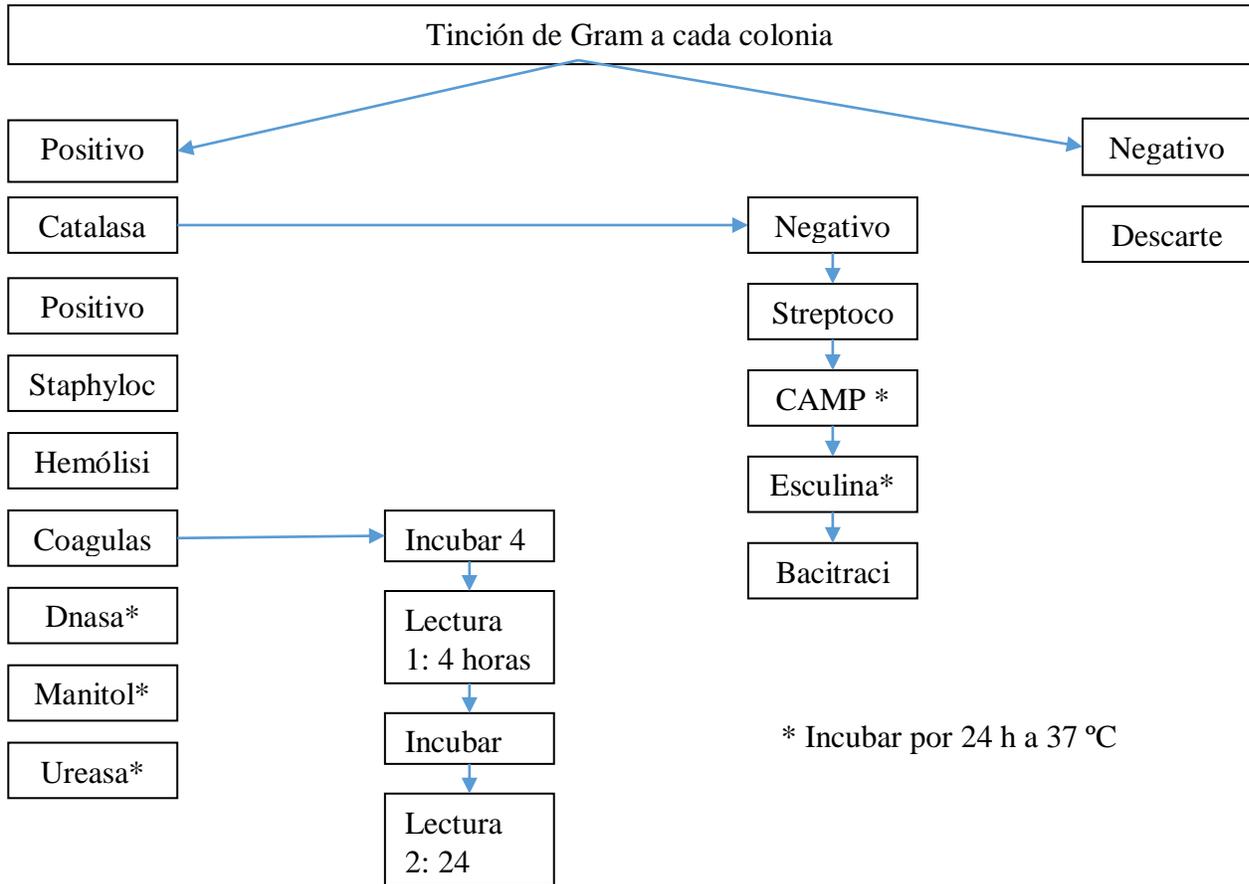
Diferenciar cada colonia fenotípicamente (color y hemólisis)

Subcultivar cada colonia en la porción correspondiente de agar

Incubar 24-36 horas a 37°C

### Día 3

### Identificación microbiológica



**Día 4**  
**Lectura de pruebas específicas microbiológica**

**Pruebas específicas para *Streptococcus***

Prueba	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Enterococcus spp</i>
Bacitracina 0.04 IU	- /R	+ /S	- /R	- /R	- /R
Factor CAMP	+	-	-	-	-
Hidrolisis de la Esculina	-	-	+	-	+
Crecimiento NaCl 6.5%	-	-	-	-	+

**Pruebas específicas para *Staphylococcus***

Prueba	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulasa en tubo	+	+	-	-	-
DNAsa	+	+	V	V	-
Manitol	+	-	-	V	V
Urea	V	V	+	-	+
Novobiocina	- /S	- /S	- /S	- /S	+ /R

**Día 5**  
**Extracción de ADN**

Precalentar baño María a 50 °C

Preparar solución de lavado, solución HS, solución MS y proteinasa K

Sacar los subcultivos (R2) de *S. aureus* de la incubadora o nevera

Marcar tubos de reacción (1,5 ml) con el código de cada muestra y aislamiento

Adicionar 200 microlitros de solución buffer TE a cada tubo de reacción

Tomar una colonia de cada subcultivo (R2) y depositarla en el tubo de reacción con buffer TE

Adicionar 15 microlitros de lisozima

Vortex pulsado por 5 segundos

Incubar a 37 °C al menos 1 h

Adicionar 200 microlitros solución TLS y 25 microlitros de proteína K

Vortex pulsado por 5 segundos

Incubar a 50 °C al menos 1 h

Centrifugar 10.000 x g (12.000 rpm) por 1 minuto

Transferir sobrenadante a un tubo de 1.5 ml marcado

Adicionar 400 microlitros TBS

Vortex por 15 segundos

Descartar filtrado

Adicionar el filtro de giro al tubo receptor

Añadir la muestra al filtro de giro
Centrifugar 10.000 x g (12.000 rpm) por 2 minutos
- Nuevo tubo receptor- Adicionar 500 microlitros HS
Centrifugar 10.000 x g (12.000 rpm) por 1 minuto
Adicionar 750 microlitros MS
Centrifugar 10.000 x g (12.000 rpm) por 1 minuto
Nuevo tubo receptor - Descartar filtrado -
Adicionar el filtro de giro l tubo receptor
Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos
Poner columna en un tubo de elución
Adicionar 50- 100 microlitros buffer de elución
Incubación temperatura ambiente
Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm): 1 minuto
Adicionar 750 microlitros de MS
Congelar a -20°C

### Anexo 3

#### Resultado consolidado *S. aureus*: cultivo, PCR

Hato	RCS	Cultivo_11	Cultivo_2	Cultivo_3	Staur4	Alfa toxina	Pb	Beta toxina	Nuc	Clum. factor	Spa	Pb
1	256,0	1	0	0	1	1	1090	1	1	1	1	220
4	324,0	1	0	0	1	1	1050	1	1	1	1	110
9	212,0	1	0	0	1	1	1050	1	1	1	1	190
19	178,0	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	190
21	222,0	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	190
23	253	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	140
29	256,0	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	350
40	572,0	0	0	1	1	1	1000	1	1	1	1	350
47	219,0	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	350
48	571,0	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	190
52	158,0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	350
55	563,0	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	300
60	303,0	0	1	0	1	1	1000	1	1	1	1	190
65	237,0	0	1	0	1	1	1000	1	1	1	1	190
66	157,0	1	0	0	1	1	1000	0	1	1	1	350
68	353,0	1	0	0	1	1	1090	1	1	1	1	450
104	219	0	1	0	1	1	1000	0	1	1	1	140
71	451	1	0	0	1	1	1000	0	1	1	1	140
73	322,0	0	1	0	1	1	1000	0	1	1	1	300
79	234	1	0	0	1	1	1050	1	1	1	1	140
80	163	0	1	0	1	1	1050	1	1	1	1	140
84	702	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	140
90	1451	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	310
102	279,0	1	0	0	1	1	1000	1	1	1	1	270
115	987,0	1	0	0	1	1	1000	1	0	1	1	270
120	335	1	1	0	1	1	1000	1	1	1	1	140
132	397	0	1	0	1	1	1050	1	1	1	1	140
133	319	1	0	0	1	0		1	1	1	1	140
134	212	1	0	0	1	0		1	1	1	1	140
141	303,0	1	0	0	1	0		1	1	1	1	220