

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGÍA MICROBIANA DE LA
MASTITIS BOVINA EN HATOS LECHEROS DE SEIS MUNICIPIOS DEL ALTIPLANO
NORTE ANTIOQUEÑO. 2009-2010**

NICOLÁS FERNANDO RAMÍREZ VÁSQUEZ

Medellín, Colombia

2013

**DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGÍA MICROBIANA DE LA
MASTITIS BOVINA EN HATOS LECHEROS DE SEIS MUNICIPIOS DEL ALTIPLANO
NORTE ANTIOQUEÑO. 2009-2010**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia,
como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias Animales, Área:
Epidemiología

TUTOR

Profesor Luis Guillermo Palacio Baena. Médico Veterinario, Magister en Epidemiología,
Doctor en Biología

COMITÉ TUTORIAL

Profesor Luis Guillermo Palacio Baena MV., MSc., Dr. Biol.

Profesor Juan David Rodas González, MV., MSc., PhD

Profesor Juan Guillermo Maldonado Estrada, MV., MSc., Dr. Sci.

Medellín, Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

2013

Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia por facilitarme el tiempo para realizar los estudios de doctorado y por la cofinanciación del proyecto de investigación.

Al Comité Tutorial doctores Luis Guillermo Palacio Baena, Juan Guillermo Maldonado Estrada y Juan David Rodas González por el acompañamiento durante el proceso.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia por la financiación del proyecto de investigación.

A la Empresa Colanta por la cofinanciación del proyecto y por su permanente colaboración durante la recolección y procesamiento de las muestras y obtención de la información a nivel de campo. Al Departamento Técnico de la empresa y en especial a los técnicos: Manuel Jaramillo, Juan Manuel Cerón, Luis Hernando Benjumea, Carlos Salazar, Luis Fernando Giraldo, Carlos Londoño, Santiago Valencia, Silverio Llano, Alberto Giraldo y Juan Maya.

A los siguientes productores de leche por su permanente disposición a participar en el estudio y por acoger las recomendaciones efectuadas: José Gilberto Posada, Luis Carlos Chavarría, Juan Carlos Velásquez, Porfirio Arango, Augusto Arango, Arturo Preciado, Edgar Mesa, Abelardo Arboleda, Melkin Arango, Cipriano Correa, Rubén Galvis, Gabriel Lopera, Mario González, Javier Alberto Gil, Jairo E. Ruiz Tamayo, Luis Carlos Pérez, Jorge Morales, Edgar Gonzales, Alberto Osorio, Gabriela Múnera, Víctor Pemberty, Rafael Gil, Carlos Enrique Vallejo Bravo, Javier Restrepo Mora, Jorge Morales, Gustavo Mesa, David Botero, Jaime Alberto Lopera, Jaime Marín, Luz Edilia Lopera, Hacienda La Montaña (U de A), Henry Restrepo, Reinaldo Zuluaga, David Oswaldo Taborda, Diego González, Gustavo Álvarez y Jairo Patiño.

A los estudiantes, rotantes y pasantes de la Facultad de Ciencias Agrarias y a los pasantes de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo en el trabajo de campo.

Deseo también agradecer al profesor Mario Fernando Cerón Muñoz por sus Consejos y siempre atinadas recomendaciones durante el desarrollo del proyecto efectuado para el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y las recomendaciones para con el desarrollo del doctorado.

A los doctores Ian Dohoo, Greg Keefe y Javier Sánchez de la Universidad de Prince Edward Island por su asesoría permanente en el análisis estadístico de la información.

Al profesor Jorge Arturo Fernández Silva por sus recomendaciones para la elaboración de la Tesis.

Agradezco a la profesora Alba Montoya por el tiempo dedicado a la asesoría en la parte genética.

Dedicatoria

A Libia, Martha, Julián y Mariana

TABLA DE CONTENIDO

Determinación de factores de riesgo y etiología microbiana de la mastitis bovina en hatos lecheros de seis municipios del altiplano norte antioqueño. 2009-2010

1. Introducción general	25
2. Objetivos	26
2.1 Objetivo general	26
2.2. Objetivos específicos	27
3. Hipótesis	27
4. Metodología	27
4.1 Tipo de estudio	27
4.2 Aspectos éticos	28
4.3 Población y muestra	28
5. Referencias	32
6. Resumen general	33
7. Abstract	36

CAPITULO 1.

MARCO TEORICO

Mastitis bovina	38
1. Definición	38
2. Ruta de infección y Patogenia	38
3. Diagnóstico	39
3.1 Examen físico	39
3.2 Despunte	39
3.3 California Mastitis Test	40
3.4 Método de conductividad eléctrica	41

CAPITULO 1. CONTINUACIÓN....

3.5	Conteo de células somáticas en muestra de leche de cuarto y de vaca	41
3.6	Análisis de muestras procedentes de leche de tanque de enfriamiento	43
3.7	Cultivo de muestras de leche	44
4.0	Etiología de la mastitis	45
4.1	Patógenos Contagiosos	45
4.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	46
4.1.2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	47
4.1.3	<i>Mycoplasma bovis</i>	47
4.1.4	<i>Corynebacterium bovis</i>	48
4.2	Patógenos Ambientales	48
4.2.1	Estreptococos ambientales	49
4.2.1.1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	49
4.2.1.2	<i>Streptococcus uberis</i>	50
4.2.2	Coliformes	50
4.3	Patógenos oportunistas (ECN)	51
4.4	Otros Patógenos	52
4.4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
4.4.2	<i>Trueperella pyogenes</i>	52
4.5	Otras etiologías microbianas menos frecuentes como causantes de mastitis	52
4.6	Mastitis causadas por plantas	53
5.0	Epidemiología de la mastitis	54
5.1	Prevalencia y Tasa de incidencia de mastitis y de patógenos específicos	54
5.2	Factores de riesgo asociados a la mastitis	55
5.3	Estudios sobre prevalencia, etiología y factores de riesgo asociados a la mastitis en Colombia	57
5.4	La genética como factor de riesgo para la mastitis	58

CAPITULO 1. CONTINUACIÓN....

6.0 Tratamiento	60
7.0 Control y prevención	66
7.1 Bioseguridad en el hato	67
7.2 Vacunas	69
8.0 Referencias	70

CAPITULO 2.

FACTORES ASOCIADOS A MASTITIS EN VACAS DE LA MICROCUENCA LECHERA DEL ALTIPLANO NORTE DE ANTIOQUIA, COLOMBIA. (ANÁLISIS DE LA LÍNEA DE BASE)

Objetivos	83
Resumen	85
Palabras clave	85
Abstract	86
Key words	86
Resumo	87
Palavras chave	87
Introducción	88
Materiales y métodos	90
Colecta de muestras y realización de pruebas	90
Procedimiento para la colección de la muestra de leche	91
Cultivo y aislamiento bacteriano	92
Análisis estadístico	92
Resultados	93
Información de hatos y de animales	93
California Mastitis Test	93

CAPITULO 2. CONTINUACIÓN....

Recuento de células somáticas (RCS)	94
Cultivo y aislamiento de microorganismos	94
Análisis de los factores de riesgo y mastitis	95
Modelo de factores de riesgo y mastitis por la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i>	98
Discusión	98
Conclusiones	100
Agradecimientos	101
Referencias	101

CAPITULO 3.
PREVALENCIA, TASA DE INCIDENCIA Y ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS BOVINA EN GANADO LECHERO DE COLOMBIA

Objetivos	105
Resumen	107
Palabras clave	108
Abstract	108
Key words	109
Introducción	110
Materiales y Métodos	111
Consideraciones éticas	111
Sitio de estudio	111
Selección de hatos	111
Protocolo de visita	112
Cultivo bacteriológico	113

CAPITULO 3. CONTINUACIÓN....

Determinación de la sensibilidad bacteriana	115
Definición de caso	115
Análisis estadístico	116
Resultados	117
Prevalencia de mastitis subclínica	117
Tasa de incidencia de mastitis clínica	117
Aislamientos bacterianos	118
Prevalencia de infección por <i>Streptococcus agalactiae</i>	120
Prueba de sensibilidad antimicrobiana	121
Discusión	125
Conclusiones	131
Agradecimientos	131
Referencias	132

CAPITULO 4.

HERD- AND COW-LEVEL RISK FACTORS ASSOCIATED WITH SUBCLINICAL MASTITIS IN DAIRY FARMS FROM THE HIGH PLAINS OF THE NORTHERN ANTIOQUIA, COLOMBIA

Objetivos	136
Abstract	138
Key words	139
Introduction	140
Materials and methods	142

CAPITULO 4. CONTINUACIÓN....

Ethical considerations	142
Herd selection	142
Visit protocol	143
Bacteriological culture	143
Case definition	145
Risk factors	145
Statistical analysis	148
Results	150
Herd Characteristics and practices	150
California Mastitis Test and quarter level subclinical mastitis	151
Bacteriological cultures	152
Geometric mean of quarter SCC by pathogen	152
Cow-level subclinical mastitis	153
Risk factors for subclinical mastitis at the quarter level	154
Risk factors for <i>Streptococcus agalactiae</i> infection at the quarter level	155
Discussion	157
Conclusions	162
Acknowledgments	163
References	163

CAPITULO 5**ASSOCIATION OF BOLA-DRB3 AND TLR4 ALLELES WITH SUBCLINICAL MASTITIS IN CATTLE FROM COLOMBIA**

Objetivos	167
Summary	169

CAPITULO 5. CONTINUACIÓN....

Key words	169
Resumen	170
Palabras clave	170
Resumo	171
Palavras-chave	171
Introduction	172
Materials and methods	173
Ethical considerations	173
Herd selection	173
Visit protocol and sample collection	173
Bacteriological culture	174
Case definition	174
Blood collection and DNA extraction	174
Amplification of gen DRB3.2 (GenBank accession No. 282530)	175
Amplification of gen TLR4 (GenBank accession No. DQ839566)	175
Statistical Analysis	176
Analysis of allele frequencies	176
Logistic regression analysis	176
Results	177
<i>Allele frequencies of BoLA DRB3.2 genes digested with RsaI, HaeIII and BstYI</i>	178
Allele Frequencies of the TLR4 (T4CRBR2 region)	178
Allele Frequencies of the BoLA DRB3.2	179
Logistic regression analysis	180
Discussion	181
Relationship between bovine subclinical mastitis, Strept. agalactiae and CNS infection and the polymorphisms of the gens TLR4 (T4CRBR2) and DRB3.2	184
Acknowledgements	186

CAPITULO 5. CONTINUACIÓN....

References	186
CONSIDERACIONES FINALES	190
Anexo 1. Información Procedimiento de ordeño en la finca	197
Anexo 2. Formato por animal (caso clínico)	198
Anexo 3. Colección de la información por granja	199

LISTA DE TABLAS**CAPITULO 1.****MARCO TEORICO**

Tabla 1	Interpretación de la prueba del California Mastitis Test	40
Tabla 2	Clasificación de los resultados del CMT, variación en el conteo de células y promedios en cada clase	41
Tabla 3	Criterios para el diagnóstico de mastitis, basados en los resultados de una muestra de leche de cuarto según IDH (International Dairy Federation, 1971)	43
Tabla 4	Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su distribución potencial en la ubre luego de la administración parenteral o intramamaria	61
Tabla 5	Blanco de tratamiento antibiótico en mastitis clínicas ocasionadas por diferentes patógenos	64
Tabla 6	Sugerencias para el tratamiento antibiótico de la mastitis clínica causada por diferentes patógenos.	65

CAPITULO 1. CONTINUACIÓN....

Tabla 7	Efecto preventivo de algunas medidas de manejo del hato para reducir la incidencia de mastitis	68
---------	--	----

CAPITULO 2.

FACTORES ASOCIADOS A MASTITIS EN VACAS DE LA MICROCUENCA LECHERA DEL ALTIPLANO NORTE DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

Tabla 1	Resultados del CMT según el grado de reacción de muestras de leche de 877 vacas de 37 hatos bovinos del Altiplano Norte de Antioquia	94
Tabla 2	Frecuencia de aislamiento de bacterias en leche procedente de cuartos afectados con mastitis	95
Tabla 3	Análisis de razón de prevalencias de mastitis para varios factores relacionados con la vaca y la finca	96
Tabla 4	Análisis de regresión de varios factores asociados a mastitis bovina	97
Tabla 5	Factores asociados a mastitis bovina en cuyo diagnóstico bacteriológico se halló la bacteria <i>Streptococcus agalactiae</i>	98

CAPITULO3.

PREVALENCIA, TASA DE INCIDENCIA Y ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS BOVINA EN GANADO LECHERO DE COLOMBIA

CAPITULO 3. CONTINUACIÓN....

Tabla1	Prevalencia de mastitis subclínica por cuarto y por mes en 71.915 observaciones en 1,662 vacas de 37 hatos que participaron en el estudio sobre la prevalencia y etiología de mastitis en el Altiplano Norte de Antioquia, Colombia	118
Tabla 2	Microorganismos aislados según tipo de ordeño de 8.001 muestras positivas a cultivo de cuartos con mastitis clínica y subclínica en la investigación de los patógenos asociados a la mastitis en ganado de leche del Altiplano Norte de Antioquia, Colombia	120
Tabla 3	Resultados (Número y porcentaje) de la prueba de sensibilidad antimicrobiana efectuada a cepas del genero Estreptococos para varios antibióticos. Cepas procedentes de cuartos afectados con mastitis de vacas del Altiplano Norte de Antioquia.	122
Tabla 4	Resultados (Número y porcentaje) de la prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas del genero Estafilococo Coagulasa Positivo a varios antibióticos. Cepas procedentes de cuartos afectados con mastitis de vacas del Altiplano Norte de Antioquia.	124
Tabla 5	Resultados (Número y porcentaje) de la prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas del genero Estafilococo Coagulasa Negativo a varios antibióticos. Cepas procedentes de cuartos afectados con mastitis de vacas del Altiplano Norte de Antioquia.	125

CAPITULO 4.

HERD- AND COW-LEVEL RISK FACTORS ASSOCIATED WITH SUBCLINICAL MASTITIS IN DAIRY FARMS FROM THE HIGH PLAINS OF THE NORTHERN ANTIOQUIA, COLOMBIA

Tabla 1	Selected cow-level predictors evaluated as risk factors for both subclinical mastitis (SCC \geq 200,000) and <i>Streptococcus agalactiae</i> infection in 37 herds in Antioquia, Colombia.	146
Tabla 2	Selected herd-level predictors considered as risk factors for both subclinical mastitis (SCC \geq 200,000) and <i>Streptococcus agalactiae</i> infection.	147
Tabla 3	Descriptive summary of the dairy herds (n=37) participating in a study to assess the risk factors associated with subclinical mastitis (SCC \geq 200,000) in the high plains of Antioquia, Colombia.	150
Tabla 4	California Mastitis Test scores for 71,915 quarter milk samples taken from 37 herds participating in the assessment of risk factors associated with subclinical mastitis (SCC \geq 200,000) in the high plains of Antioquia, Colombia.	151
Tabla 5	Pathogens isolated and quarter geometric mean SCC by pathogen from 7,871 culture positive milk samples collected from 1,662 dairy cows participating in the assessment of risk factors associated with subclinical mastitis (SCC \geq 200,000) in the high plains of Antioquia, Colombia. Values are expressed as total number of isolates, and percentage. Eighty three samples yielded contaminated results (3 or more colony types).	153

CAPITULO 4. CONTINUACIÓN....

Tabla 6	Final logistic regression model assessing the effect of selected herd and cow variables on the probability for quarters to have subclinical mastitis (SCC $\geq 200,000$ cells/mL). n=53,030 observations	154
Tabla 7	Final logistic regression model assessing the effect of selected herd and cow variables on the probability of quarters to have <i>Streptococcus agalactiae</i> infection. n=55,411 observations	156

CAPITULO 5.

Association of BoLA-DRB3 and TLR4 alleles with subclinical mastitis in cattle from Colombia

Tabla 1	Production parameters of the studied bovine population (n=996)	178
Tabla 2	Genotypic frequencies for T4CRBR2 among 996 cows sampled	179
Tabla 3	Allelic frequency of BoLA DRB3.2 among 996 cows sampled (only includes alleles with frequencies >2%).	179
Tabla 4	Logistic regression model output determining the probability for quarters to have subclinical mastitis for selected cow variables (n=20,909)	181
Tabla 5	Results of the logistic regression model to determine the association between quarters infected with Coagulase Negative Staphylococci infection and some selected cow variables (n=21,064)	182

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 3.

Prevalence, incidence rate and etiology of mastitis in dairy cattle from Colombia

Figura 1	Prevalencia de mastitis por cuarto (IC 95%) y por mes por todas las causas para 71.915 observaciones en 1.662 vacas de 37 hatos en ganado de leche del Altiplano Norte de Antioquia, Colombia.	119
Figura 2	Prevalencia de mastitis por cuarto (IC 95%) debida a la infección por <i>Streptococcus agalactiae</i> , para 71.915 observaciones en 1.662 vacas de 37 hatos en ganado de leche del Altiplano Norte de Antioquia, Colombia.	121

LISTA DE ABREVIATURAS

BoLA	Antígeno Leucocitario Bovino (del inglés Bovine leukocyte antigen)
BON	Blanco Orejinegro
CAD	Cuarto anterior derecho
CAI	Cuarto anterior izquierdo
CBD	Conteo Bacterial Diferencial
CBT	Conteo Bacterial Total
CE	Conductividad Eléctrica
Cel/ml	Células por Mililitro
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
CLSI	Instituto de Estándares para el Laboratorio Clínico (del inglés Clinical Laboratory Standards Institute)
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Bovino
CMT	California Mastitis Test
CNS	Estafilococo coagulasa negativo (del inglés Coagulase-Negative Staphylococci)
CPD	Cuarto posterior derecho
CPI	Cuarto posterior izquierdo
DCC	Contador de células DeLaval (del inglés DeLaval Cell Counter)
DIM	Días en leche (del inglés Days In Milk)
DNA	Acido Desoxirribonucleico
ECN	Estafilococos Coagulasa Negativo
ECP	Estafilococo Coagulasa Positivo
EE	Error estándar
FAGA	Federación de Asociaciones de Ganaderos de Antioquia
FR	Factores de riesgo
IC	Intervalo de confianza
IMI	Infección intramamaria (del inglés Intra-mammary Infection)

IIM	Infusión Intramamaria
IRCM	Tasa de incidencia de mastitis clínica (del Inglés Incidence Rate for Clinical Mastitis)
MADR	Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural
MC	Mastitis Clínica
MHC	Complejo Mayor de histocompatibilidad (del Inglés Major Histocompatibility Complex)
mRNA	Acido Ribo Nucleico mensajero (del inglés Messenger Ribo Nucleica Acid)
MS	Mastitis subclínica
NMC	Consejo Nacional de la Mastitis (del inglés National Mastitis Council)
OR	Razón de posibilidades (En inglés Odds Ratio)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)
PCR-RFLP	Reacción en Cadena de Polimerasa-Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (del Inglés Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado (del inglés Pulsed Field Gel Electroforesis)
PMN	Polimorfo Nuclear Neutrófilo
PMTD	Desinfección del pezón post ordeño (del inglés Post Milking Teat Dipping)
QTL	Loci de rasgos cuantitativos (del inglés Quantitative Trait Locus)
RCS	Recuento de Células Somáticas
RP	Razón de prevalencias
SCC	Conteo de Células Somáticas (del inglés Somatic Cell Count)
SCS	Calificación de Células Somáticas (del inglés Somatic Cell Score)

SIM	Movilidad en Indol Sulfuro (del inglés Sulfide Indol Movility)
SM	Mastitis Subclínica (del inglés Subclinical mastitis)
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa (del inglés Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)
TIMC	Tasa de Incidencia de Mastitis Clínica
TLR	Receptor Tipo Toll (del inglés Toll Like Receptor)

Lista de publicaciones y participaciones en eventos producto de esta investigación

Artículos publicados en Revista Nacional

Ramírez N., O. Arroyave, M. Cerón, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2011. Factores asociados a mastitis en vacas de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia, Colombia. Rev. Med. Vet. 22 : 31-42

Ramírez N., A. Montoya, M. Cerón, D. Villar, L. G. Palacio. 2014. Association of BoLA-DRB3 and TLR4 alleles with subclinical mastitis in cattle from Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 27:18-28

Artículo aceptado para publicación en Revista Internacional

Ramírez N., G. Keefe, I. Dohoo, J. Sánchez, O. Arroyave, J. Cerón, M. Jaramillo, L. G. Palacio. 2014. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the Northern Antioquia, Colombia. J. Dairy Sci. In press.

Resúmenes, en el “Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias” ENICIP que se realizó en el año 2009

Ramírez N., O. Arroyave, M. Carón, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2009. Caracterización de la mastitis bovina en granjas lecheras de seis municipios del Altiplano norte del Departamento de Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 22:3. pp 416

Ramírez N., M. Olivera, O. Arroyave, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2009. Caracterización de los sistemas de ordeño en granjas lecheras de seis municipios del Altiplano norte del Departamento de Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 22:3. pp 416

Ramírez N., M. Olivera, O. Arroyave, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2009. Mastitis bovina: determinación y control de los factores de riesgo en las condiciones de una región específica en Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 22:3. pp 416

Presentación de los resultados parciales de la investigación en el “**VII Seminario Internacional Competitividad en Carne y Leche de Colanta**” el cual se llevó a cabo los días 21 y 22 de octubre de 2010.

Producción del escrito publicado en las memorias del evento

Ramírez N., J. Cerón, M. Jaramillo, L. G. Palacio, O. Arroyave. 2010. Diagnóstico de mastitis en el norte de Antioquia. VII Seminario Internacional Competitividad en Carne y Leche. 69-78

Presentación de los resultados parciales en eventos internacionales, entre ellos:

“3er International Symposium on Mastitis and Milk Quality” y *“44th Annual Conference of American Association on Bovine Practitioners”* en St. Louis Missouri el cual se llevó a cabo los días 22 y 24 de octubre de 2011.

Producción del escrito publicado en las memorias del evento titulado:

Ramírez N., O. Arroyave, M. Cerón, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2011. Etiology of bovine mastitis on dairy farms in Northern Antioquia, Colombia. 3rd International Symposium on Mastitis and Milk Quality. pp 234

Presentación de poster con resultados parciales de la investigación en la *“2011 Canadian Bovine Mastitis Research Network, CBMRN”* el cual se llevó a cabo en Montreal, Canadá los días 8 y 9 de noviembre de 2011.

Presentación de los resultados parciales en el ENICIP llevado a cabo en el año 2011 cuyos títulos fueron:

Ramírez N., O. Arroyave, M. Cerón, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2011. Etiología de la mastitis en vacas lecheras de seis municipios del Altiplano Norte del Departamento de Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 24:3. pp 412

Ramírez N., O. Arroyave, M. Cerón, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2011. Mastitis bovina en granjas lecheras de seis municipios del Altiplano Norte del Departamento de Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 24:3. pp 415

Presentación de los resultados parciales en el ENICIP llevado a cabo en el año 2013 cuyos títulos fueron:

Ramírez N., A. Montoya, M. Cerón, D. Villar, L. G. Palacio. 2013. Mastitis subclínica y su asociación con algunos marcadores genéticos. Rev Colomb Cienc Pecu. 26: Suplemento. pp 401

Ramírez N., O. Arroyave. L. G. Palacio. 2013. Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* y su susceptibilidad antibiótica en casos de mastitis bovina en una zona lechera del Norte de Antioquia, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. 26: Suplemento. pp 424

Producción de un manual sobre buenas prácticas en producción lechera enfocada al control de la mastitis. Número del primer tiraje 1.100 copias. Número del segundo tiraje 5.000 copias.

Ramírez N., L. G. Palacio, J. Cerón, M. Jaramillo. 2011. Mastitis la enfermedad más costosa en la granja lechera. Prevenir es la clave del éxito. Editorial Biogénesis. ISBN: 978-958-8709-50-5. p 28

DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RIESGO Y ETIOLOGÍA MICROBIANA DE LA MASTITIS BOVINA EN HATOS LECHEROS DE SEIS MUNICIPIOS DEL ALTIPLANO NORTE ANTIOQUEÑO. 2009-2010

1. Introducción general

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria la cual es considerada como la enfermedad infecciosa más común de la vaca especializada en producción de leche. Ni en Colombia, ni en Antioquia se ha establecido la magnitud (prevalencia o incidencia) de la mastitis en las lecherías especializadas, pero de acuerdo a estudios previos efectuados en cortos periodos o estudios locales en algunos municipios y basados en el California Mastitis Test (CMT) y en el examen clínico, la prevalencia de mastitis ha sido reportada en rangos que oscilan entre el 20 y el 51% (Trujillo, 2011; Pinzón et al., 2009). Debido a que las condiciones que conducen a una alta frecuencia de mastitis son numerosas, los programas de prevención deben estar precedidos por un diagnóstico de la etiología y de los factores de riesgo asociados a la enfermedad. Se han efectuado estudios puntuales que han abordado la etiología (Calderón y Rodríguez, 2008; Rodríguez G, 1988; Rodríguez, 2002; Rodríguez G. 2006; Ramírez y cols. 2001), pero se requieren estudios de mayor magnitud que además suministren información sobre la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos.

Los estudios disponibles en la literatura sobre los factores de riesgo de la mastitis bovina son foráneos y han sido efectuados en su mayoría, en hatos con ordeño mecánico y con las condiciones propias de los países de América del Norte y Europa muy diferentes a las condiciones tropicales de un país como Colombia. Por lo anterior, es importante establecer los factores de riesgo asociados a mastitis en hatos bovinos en Colombia, debido al bajo número de estudios enfocados al diagnóstico de sus

factores de riesgo y a que el ordeño manual es el que prevalece aún en muchos hatos de lechería especializada de este país (Ramírez et., al 2009).

El componente genético en términos de la expresión de algunos genes que conllevan a una mayor resistencia o susceptibilidad a las infecciones por algunos patógenos, también debe ser tenido en cuenta como posible factor de riesgo del animal en los estudios sobre mastitis bovina. La información encontrada en la literatura es divergente respecto de las asociaciones entre los genes y la mastitis y los genes y los patógenos asociados a la mastitis. Por lo tanto, debido al hecho que tales asociaciones pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrollan los bovinos, es muy conveniente explorar estos factores en las condiciones de los sistemas de producción de leche especializada colombiana.

En resumen la información sobre la mastitis bovina en Colombia es escasa por lo que la realización de investigaciones que permitan esclarecer la epidemiología de la enfermedad, su etiología infecciosa y la identificación de los factores de riesgo asociados a su presentación, permitirá establecer propuestas de solución efectivas y factibles para su control en hatos lecheros de Colombia.

2. Objetivos

Con base en las anteriores consideraciones, los objetivos planteados en esta investigación fueron los siguientes:

2.1. Objetivo general

Caracterizar los factores de riesgo (agente, huésped, ambiente) y los microorganismos asociados a la mastitis en vacas de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia e incidencia de mastitis en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.
- Determinar los factores de riesgo asociados a la presentación de la mastitis bovina en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.
- Identificar los microorganismos presentes en los casos de mastitis (clínica y subclínica) en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia
- Determinar la sensibilidad a los principales antibióticos de las bacterias aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis.
- Determinar la asociación entre la presentación de mastitis infecciosa y sus patógenos, con los genes DRB3.2 y TLR4 en vacas Lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.

3. Hipótesis

H₀: Los factores de riesgo explorados (medio ambiente, agente, hospedero) no están asociados a la presentación de mastitis en vacas lecheras.

H₁: Los factores de riesgo explorados (medio ambiente, agente, hospedero) están asociados a la presentación de mastitis en vacas lecheras.

4. Metodología

4.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio epidemiológico analítico longitudinal mediante el cual se hizo la evaluación de los factores de riesgo para mastitis bovina en los hatos y la presentación de mastitis bovina.

4.2. Aspectos éticos

Esta investigación contó con el aval del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia, acta número 48 de diciembre de 2008 y fue clasificada de riesgo mínimo con base en la resolución 8430 de 1993.

Para el diagnóstico de la mastitis tanto clínica como subclínica, así como sus patógenos asociados, y para determinar las frecuencias alélicas de los genes estudiados, no existe ningún método alternativo al procedimiento propuesto en la presente investigación. Adicionalmente, el macro y el microambiente de las vacas fue aquel al cual estaban sometidos los animales diariamente en condiciones normales; motivo por el cual no se hizo ninguna intervención adicional para la toma de muestras durante el procedimiento del ordeño. Dado que el California Mastitis Test (CMT) es un procedimiento rutinario en la mayoría de los hatos, el estrés del animal por este procedimiento fue considerado mínimo y no se produjo ningún dolor, sufrimiento o angustia en el animal durante su realización. La muestra de sangre para el estudio genético se extrajo de la vena coccígea del animal, fue efectuado por personal entrenado y tomando las medidas necesarias para evitar cualquier traumatismo o riesgo a los animales.

4.3. Población y muestra

La escogencia de los municipios donde se realizó el proyecto se basó en su ubicación en la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia, zona que posee hatos con unas características muy similares a las demás zonas de lechería especializada de Colombia, como son raza predominante de los animales, tipo de alimentación y sistema de manejo en general. También se basó en la proporción de animales que tuviese cada municipio en relación a la zona. La muestra estuvo conformada por los municipios de Donmatías, Belmira, Entrerriós, San José de la Montaña, San Pedro de los Milagros y Santa Rosa de Osos. Estos municipios poseen el 70% de las vacas en producción y tienen el 75% de la producción total de leche de la Microcuenca Lechera del Altiplano

Norte de Antioquia, la cual está compuesta por un total de 17 municipios, entre los cuales están los seis municipios de la muestra.

Se calculó el tamaño óptimo de muestra según procedimientos descritos por Thrusfield (2007). El número de animales a muestrear se calculó para una población finita con los siguientes criterios:

- a. Probabilidad de encontrar animales con mastitis 34% ($p = 0,34$) (Ramírez et al 2001)
- b. Error permitido o tolerado; es decir, que el porcentaje de mastitis hallada no se aleje, por encima o por debajo del verdadero valor poblacional: $h = \pm 5\%$ ($h = \pm 0,05$)
- c. Confiabilidad en los resultados, 95% ($Z=1,96$), significa que si el trabajo se repitiera 100 veces, en idénticas condiciones, en cuántas de esas veces debe dar resultados similares, mas no iguales; es decir, dentro de unos rangos considerados normales.
- d. El número de animales de la zona a tomar para el cálculo de la muestra fue de 119.222 que corresponde al 50% de las hembras entre 2 y 3 años (arbitrariamente se asumió que la mitad de las hembras entre 2 y 3 años ya habían parido) y al 100% de las hembras mayores de 3 años.

Con base en estos criterios se obtuvo una muestra de 345 animales. Según Thrusfield (2007) cuando el N de la población es conocido, (para este caso 119.222 animales), se recomienda ajustar el tamaño de muestra sólo si n es 5% o más de N. En este caso no se usó la fórmula para el ajustar el tamaño de la muestra dado que n es muy inferior a N (0,29%).

El tamaño de muestra calculado se incrementó en un 25% para compensar las pérdidas por lo que el total de animales a muestrear fué de 431.

$$n = \frac{Z^2 PQ}{h^2}$$

$$n = \frac{3,84 * 0,34 * 0,66}{0,0025} = 345$$

$$345 * 25\% = 86$$

$$345 + 86 = 431$$

De acuerdo al Anuario Estadístico del Sector Agropecuario de la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia (Colombia), 2008, en el Norte del departamento de Antioquia, el número promedio de vacas en producción por hatos, para el momento de inicio del estudio, fue de 15 vacas, por lo que se seleccionaron 29 hatos, y se incrementó el número de hatos en un 10%, para compensar posibles pérdidas en el seguimiento durante la ejecución de la investigación, por lo que la muestra final quedó en 32 hatos. Todos los animales en producción de cada hato fueron muestreados durante la investigación.

Según el número de animales en producción con respecto al total animales en los seis municipios, se calculó proporcionalmente el porcentaje de participación en la muestra de cada uno de ellos, con los siguientes porcentajes por municipio: Donmatías (10,5%), Belmira (8,5%), Entreríos (19%) , San José de la Montaña (5,7%), San Pedro de los Milagros (24%) y Santa Rosa de Osos (31%), que corresponde a: 3 fincas en Donmatías, 3 en Belmira, 6 en Entreríos, 10 en Santa Rosa de Osos, 2 en San José de la Montaña y 8 en San Pedro de los Milagros. La muestra también se estratificó por grupos de producción en hatos con menos de 26 animales (20 hatos), de 26 a 50 (9 hatos) y mayor de 50 (3 hatos) adicionalmente, se estratificó por tipo de ordeño, manual (26 hatos) y mecánico (6 hatos).

La muestra final de los hatos se seleccionó a criterio de los investigadores de un listado de 3.049 granjas en los seis municipios en donde 120 productores se invitaron a participar, 99 aceptaron, 21 declinaron y al final 32 se seleccionaron para el muestreo. Otras condiciones tenidas en cuenta para la selección fueron que las granjas tuviesen facilidades de acceso, tanto por distancia del casco urbano como por la existencia de vías carretables, que almacenaran la leche en tanque de enfriamiento, realizarán identificación adecuada de las vacas y que su propietario o mayordomo facilitara sus animales para la correspondiente toma de muestras y se comprometiera a suministrar la información que se le solicitase.

Cinco hatos tuvieron que ser reemplazados a lo largo del estudio por diferentes razones, algunos hatos fueron trasladados para otras áreas geográficas, condiciones de seguridad inadecuadas para los investigadores, y productores que no estuvieron de acuerdo en cumplir con los protocolos del estudio. Los reemplazos se seleccionaron de la lista de elegibles de granjas con características similares a aquellas que fueron incluidas inicialmente en el estudio. La información del tiempo en el cual participaron los hatos reemplazados también fue analizada, por lo que al final se analizó información procedente de 37 hatos. En cada visita se tomó información de las vacas y de los hatos por medio de encuestas diseñadas para tal fin (Anexos 1-3), luego la información se almacenó en hojas electrónicas para su análisis posterior. Si bien el cálculo de muestra arrojó un número de 431 bovinos, el número final de animales a las que se les tomó muestra para mastitis fue de 1.662 vacas diferentes a lo largo de todo el estudio debido a que se tomó muestra a todas las vacas al momento en producción en cada finca.

5. Referencias

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia. 2008. Anuario Estadístico del Sector Agropecuario.

Calderón A. y Rodríguez V. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. (21): 582-589

Pinzón A, Moreno F, Rodríguez G. 2009. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Rev Med Vet*. (17): 23-5.

Ramírez N., Gaviria G., Arroyave O., Sierra B. y Benjumea J. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 14 (1):76 – 87

Ramírez, N., M. Olivera, O. Arroyave, L. Palacio, M. Jaramillo, and J. Cerón. 2009. Caracterización de los sistemas de ordeño en granjas lecheras de seis municipios del altiplano norte del departamento de Antioquia, Colombia. Page 416 in *Proc. X Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias*.

Rodríguez G., Contreras D. y Ordoñez M. 2002. Caracterización de la mastitis bovina en el Valle de Ubaté. *Revista de Medicina Veterinaria* 2(4):57- 66

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

Thrusfield M. 2007. *Veterinary Epidemiology*. Third edition. Blackwell Science. 610 p.

Trujillo C., Gallego A., Ramírez N. y Palacio L. 2011. Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. (24):11-18

6. Resumen general

En el presente estudio se determinó la prevalencia, la tasa de incidencia y la etiología de mastitis bovina en vacas lecheras y la sensibilidad antibiótica de los patógenos aislados. Además se determinaron los factores de riesgo relacionados a su presentación y se estudió la asociación de los genes del DRB3.2 y del TLR4 con la enfermedad. Para el desarrollo de los objetivos, se colectaron muestras de leche a las vacas en producción cada mes durante 24 meses inicialmente en vacas de 32 hatos, cinco hatos tuvieron que ser reemplazados en el transcurso del proyecto por lo tanto se analizó información procedente de 37 hatos de los seis municipios de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia la cual es considerada la principal zona de lechería especializada del país. El diagnóstico de mastitis se efectuó mediante California Mastitis Test, recuento de células somáticas y signos clínicos. A las muestras positivas a mastitis se les realizó cultivo bacteriológico y prueba de sensibilidad antibiótica de las bacterias aisladas. También se colectaron muestras de sangre de las vacas incluidas en el estudio, para la búsqueda de marcadores moleculares de los genes DRB3.2 y TLR4 y su posterior análisis de asociación a la mastitis. Las encuestas con la información de las vacas y de los hatos se diligenciaron en cada visita y se almacenaron en hojas electrónicas para el análisis posterior de los factores de riesgo.

Los resultados de la línea de base del estudio fueron analizados y se encontró que la prevalencia de mastitis subclínica y clínica por vaca fue del 39,5% y del 1,7% respectivamente. Se efectuaron un total de 648 cultivos de muestras de leche, de las cuales 23,9% fueron negativas, 34% positivas a *Streptococcus agalactiae* y 10,2% a *Estafilococo coagulasa* negativo. El análisis de regresión reveló que las vacas que

tenían más de seis meses en lactancia presentaron más riesgo de presentar mastitis en comparación con las de un mes de lactancia (OR=2,65; $p<0,05$). Se halló un OR de 1,24 para la asociación de la edad y la mastitis ($p<0,05$). Se encontró que el lavado de manos tuvo un efecto protector para la mastitis en comparación con no hacerlo (OR= 0,36; $p<0,05$).

Al analizar los resultados de los 24 meses de seguimiento se determinó que la prevalencia de mastitis subclínica promedio fue del 36,8% para las 1.662 vacas evaluadas en el periodo de estudio. La Tasa de Incidencia de Mastitis Clínica (TIMC) fue de 13,8 casos por 100 vacas-año exposición. Se aislaron 8.785 patógenos totales de casos de mastitis clínica y subclínica, siendo el *Streptococcus agalactiae*, el Estafilococo Coagulasa Negativo y el *Corynebacterium* spp, los más frecuentes con 34,5%, 17,5% y 13,1%, respectivamente. Se halló una alta sensibilidad de las bacterias para los antibióticos cloxacilina y cefoperazone. Las variables que fueron asociadas con el riesgo de mastitis subclínica a nivel de cuarto lechero fueron, la raza Holstein, alto número de partos y aumento en los meses de lactancia. Entre las variables que fueron protectoras contra mastitis se encontraron, los cruces de razas e iniciar el ordeño con una higiene adecuada de la ubre. Las variables asociadas a la infección por *Streptococcus agalactiae* fueron alto número de partos, aumento en los meses de lactancia y ordeño manual. Los factores protectores fueron sellado de los pezones y adecuada limpieza de la ubre. En este estudio los alelos *DRB3,2* más frecuentemente encontrados fueron el *8, *22, *24, *16, *10, *23, *gba, *11, *2, *mbb, *jba, *3 y el *15, que agrupaban el 58.9% del total de alelos de la población. En relación al *T4CRBR2* las frecuencias de los alelos A y B fueron 35,2 y 64,7%, respectivamente. El alelo *DRB3,2*23* se halló asociado a la ocurrencia de mastitis subclínica y a la infección por Estafilococo coagulasa negativo. No se encontraron alelos asociados a la infección por *Streptococcus agalactiae*. El alelo *mbb se asoció a la ocurrencia de infección por Estafilococo coagulasa negativo y los alelos *jba y *15 a resistencia a la infección por

este mismo patógeno. No se observó asociación significativa entre T4CRBR2 y mastitis subclínica.

Conclusiones: Se halló una prevalencia promedio de mastitis subclínica del 36,8% en en el periodo de estudio. El microorganismo aislado más frecuentemente fue el *Streptococcus agalactiae* (34,5%). Se encontró una tasa de incidencia de mastitis clínica de 13,8 casos por 100 vacas-año a riesgo. La prevalencia de mastitis subclínica a nivel de cuarto varió a lo largo del periodo de estudio observándose una disminución al final. Se requiere efectuar más estudios con el fin de comprobar la resistencia de las bacterias a los antibióticos encontrada en esta investigación. Los resultados obtenidos ratifican la importancia de la higiene del ordeño en el control de la mastitis contagiosa en hatos lecheros. Además se encontró que el gen *DRB3.2* *23 puede jugar un papel importante en la ocurrencia de mastitis subclínica y los alelos *jba y *15 pueden conferir resistencia a patógenos específicos responsables de la mastitis bovina como el Estafilococo coagulasa negativo.

7. Abstract

This study determined the prevalence, the incidence rate and the etiology of mastitis in dairy cows and the antibiotic sensitivity of the associated pathogens. The risk factors related with mastitis and the association of DRB3.2 and TLR4 genes with the disease were also determined. To get the objectives, milk samples were collected monthly for 24 months, initially in milking cows from 32 herds, 5 herds were replaced half the way, for that reason, information of 37 herds was analyzed from six municipalities of the High Plains of the Northern Antioquia the main dairy region in the country. The diagnostic of mastitis was done by the Californian Mastitis Test, Somatic Cell Count and clinical signs. Blood samples were also taken from the cows that participated in the study to detect molecular markers of the DRB3.2 and TLR4 genes to study the association of these genes with mastitis. Surveys with the information of the cows and herds was filled each visit and was stored in electronic sheets for posterior analysis of the risk factors.

The results of the base line of the study were analyzed and it was found that the prevalence of subclinical and clinical mastitis per cow was 39,5% and 1,7% respectively. A total of 648 milk samples were cultured from which bacterial growth was not found in 23.9% of the samples, 34% were positive to *Strept. agalactiae* and 10.2% were positive to Coagulase Negative Staphylococci (CNS). Regression analysis revealed that cows that were more than six months in lactation had more risk of mastitis compared with cows of one month of lactation (OR = 2.65, $p < 0.05$). An OR of 1.24 was found for the association of age and mastitis ($p < 0.05$). Hand-washing was found to have a protective effect for mastitis compared to no hand-washing (OR=0.36; $p < 0.05$).

From the analysis of the results for 24 months of follow-up it was determined that the overall average monthly subclinical mastitis prevalence was 36.8% for the 1.662 cows evaluated in the study period. The Incidence Rate of Clinical Mastitis (TIMC) was 13.8 cases per 100 cow-years at risk. A total of 8,785 pathogens from clinical and subclinical cases of mastitis were isolated, being *Strept. agalactiae*, Coagulase Negative

Staphylococci and *Corynebacterium* spp, the most frequent with 34.5%, 17.5% and 13.1%, respectively. High sensitivity of bacteria to antibiotics cloxacillin and cefoperazone was found. Variables that were associated with subclinical mastitis risk at the quarter level included: being a purebred Holstein cow, higher parity and increased months in milk. Variables that were protective for mastitis risk included being crossbreed cow and adequate pre-milking udder hygiene. Variables associated with *Strep. agalactiae* infection were higher parity, increased months in milk and manual milking. Post-milking teat dipping and adequate cleaning of the udder were protective factors. In this study, the most frequently observed alleles for *BoLA-DRB3* were *DRB3.2**8, *22, *24, *16, *10, *23, **gba*, *11, *2, **mbb*, **jba*, *3, and *15, accounting for 58.9% of the total alleles of the population. For T4CRBR2, frequencies for alleles A and B were of 35.2 and 64.7%, respectively. Allele *DRB3.2* *23 was associated with the occurrence of Subclinical Mastitis and Coagulase negative staphylococci infection. No alleles were associated with *Streptococcus agalactiae* infection. Allele **mbb* was associated with the occurrence of Coagulase negative staphylococci infection and alleles **jba* and *15 were associated with resistance. No significant relationship between T4CRBR2 and SM was observed.

Conclusions: The overall average monthly subclinical mastitis prevalence was 36.8% in the study period. The microorganism more frequently isolated was *Strep. agalactiae* (34,5%). The incidence rate of clinical mastitis was 13.8 cases per 100 cows-year at risk. Subclinical mastitis at quarter level varied throughout the study period presenting a decline at the end. More studies are required in order to check the resistance of bacteria to antibiotics found in this investigation. The results confirm the importance of milking hygiene in the control of contagious mastitis in dairy herds. It was found that the gene *DRB3.2* *23 may play an important role in the occurrence of subclinical mastitis and alleles *15 and **jba* may confer resistance to specific pathogen responsible for bovine mastitis like Coagulase negative staphylococci.

CAPITULO 1.

MARCO TEORICO

MASTITIS BOVINA

1. Definición

Según el grupo de expertos A2 de la International Dairy Federation (IDF) la mastitis se define como una reacción inflamatoria del parénquima de la glándula mamaria. Su etiología puede ser infecciosa, traumática o tóxica. La forma clínica se caracteriza por inflamación con calor, dolor, rubor y aumento de tamaño de la glándula mamaria o cambios en la apariencia de la leche, o todos los signos (International Dairy Federation, 1987). Mastitis subclínica es considerada como la forma de presentación de mastitis más frecuente en vacas (Barlow et. Al., 2013) e implica inflamación en la glándula mamaria pero no necesariamente infección, la reacción inflamatoria puede ser identificada por un recuento de células somáticas elevado u otra medida indirecta de inflamación como el California Mastitis Test (CMT) (Dohoo et al. 2011).

2. Ruta de infección y Patogenia

El establecimiento de la infección de la glándula mamaria es el producto de la interacción entre la bacteria patógena y la respuesta inmune del hospedero. Para que la bacteria se establezca, las defensas de la ubre deben estar bajas. Los patógenos usualmente entran por la vía del canal del pezón y una vez alcanzan el canal, los alvéolos son colonizados rápidamente por difusión y la entrada al epitelio ocurre en minutos vía galactogénica; también se puede presentar la diseminación por vía hematogénica (Archbald, 1999). La reacción inicial de la glándula mamaria, luego de la invasión por la ruta galactogénica, se da en los conductos y el tejido conectivo, los cuales presentan edema y fibroplasia; también hay oclusión de los conductos

intralobulares, que lleva a la congestión de la secreción y a involución rápida del epitelio secretor. El incremento de la permeabilidad en el tejido inflamado, resulta en cambios de la concentración de sodio y cloro en la leche, así como de proteínas séricas, células somáticas y otros productos del proceso secretor; por lo que, cuando la inflamación es muy severa, la composición de la secreción es similar al suero sanguíneo (International Dairy Federation, 1987; Morin 2009).

3. Diagnóstico

Para detectar la presencia de mastitis en vacas individuales o en el hato, se pueden usar varias pruebas de campo y de laboratorio, entre ellas: examen físico, despunte, CMT, Recuento de Células Somáticas (RCS), conductividad eléctrica, cultivo de muestras de leche y análisis de muestras de tanque (Radostis et. al., 2007).

3.1 Examen físico

El examen clínico debe incluir la observación de la posición de la vaca, el comportamiento, la condición corporal, la condición general del animal, la frecuencia respiratoria, la motilidad ruminal y la temperatura corporal. La ubre como tal se debe examinar por inspección, palpación y examen de la apariencia de la leche (Sandholm and Pyörälä, 1995a).

3.2 Despunte

Durante la preparación de la ubre para el ordeño se pueden examinar los primeros chorros de leche. Este método permite la detección de leche anormal como consecuencia de mastitis clínica. La leche anormal puede presentar decoloración, flóculos, coágulos y acuosidad. Se recomienda examinar la leche en un plato de fondo oscuro que se debe limpiar y desinfectar después de cada ordeño. No se recomienda efectuar el despunte en la mano dado que esta práctica promueve la diseminación de la infección de pezón a pezón y de vaca a vaca (Philpot and Nickerson, 1991). Cuando el despunte se efectúa como parte de la toma de muestras de leche para cultivo tiene

como objetivo eliminar la flora bacteriana normal del canal del pezón y del orificio del pezón para minimizar la contaminación (Honkanen-Buzalski, 1995).

3.3 California Mastitis Test

El California Mastitis Test (CMT) se ha aceptado como una prueba rápida y simple para predecir el RCS de cuartos individuales o muestras compuestas (Sanford et al., 2006). Fue descrita y usada por primera vez en 1957 (Schalm and Noorlander, 1957). Se define como una medida semicuantitativa del RCS que se obtiene por la formación de una masa fibrosa que se produce al unirse el reactivo lauryl sulfato de sodio al 3% y el DNA de las células contenidas en la leche (Lam et al., 2009). La clasificación se determina como 0, Trazas o sospechosa y 1, 2 o 3 cruces dependiendo de la cantidad de gel formada. En la Tabla 1 se presenta la clasificación de los resultados del CMT, la variación del RCS y los promedios de cada clase según Bhutto et al., 2012.

Pyörälä (2003) encontró la mayor sensibilidad y especificidad del CMT al efectuarlo al tercer día después del parto y usando un límite de reacción mayor a cero (el CMT se clasificó de 0 a 3 donde cero representa un RCS menor a 200.000 cel/mL). Usando este esquema de muestreo se determinó una sensibilidad del 66,7% para detectar infecciones causadas por patógenos mayores y del 49,5% para patógenos menores. La sensibilidad para patógenos ambientales fue del 84% (Pyörälä, 2003).

Tabla 1. Interpretación del California Mastitis Test

Clasificación	Formación de gel
0	Ninguna
T	Leve
1	leve-moderado
2	Moderado
3	Fuerte

Fuente: (Bhutto et. al., 2012)

Tabla 2. Clasificación de los resultados del CMT, variación en el conteo de células y promedios en cada clase.

Clasificación	Rango de conteo celular/ml correspondiente	Media del conteo celular/ml
Negativo	<200.000	100.000
Trazas (sospechoso)	150.000 – 500.000	300.000
1 (+)	400.000 – 1.500.000	900.000
2 (++)	800.000 – 5.000.000	2.700.000
3 (+++)	> 5.000.000	8.100.000

Fuente: (Sandholm et al., 1995)

3.4 Método de conductividad eléctrica

La Conductividad Eléctrica (CE) mide la capacidad para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos y se mide en milliSiemens (mS) (Norberg, 2005). La medición de la CE en la leche para detectar mastitis se basa en los cambios iónicos que ocurren en la inflamación ya que las concentraciones de sodio y cloro aumentan en la leche cuando esta se presenta (Korhonen and Kaartinen, 1995). La medición de la CE puede convertirse en una señal leíble en una computadora y por lo tanto, este método se aplica fácilmente al monitoreo de la salud de la ubre automatizado en línea y puede ser instalado en máquinas de ordeño (Pyörälä, 2003). La conductividad eléctrica es afectada por la edad del animal y el estado de lactancia (Nielen et al., 1992).

3.5 Conteo de Células Somáticas en muestra de leche de cuarto y vaca

El RCS en la leche de una vaca saludable está compuesto principalmente de macrófagos (66-88%), además se encuentran neutrófilos, células epiteliales y

mononucleares (Sandholm, 1995). La proporción de neutrófilos en la leche procedente de una glándula mamaria sana es sólo de 1-11%, pero se incrementan hasta un 90% y más en la leche de un cuarto con mastitis (Sandholm, 1995). El RCS de una vaca que no está infectada con patógenos de la mastitis es usualmente de 200.000 cel/ml (Pitkälä, 2004), mientras que la leche de un cuarto saludable, no infectado tiene menos de 100.000 cel/ml y si el RCS excede 200.000 cel/ml es muy probable que este infectado (Pyörälä, 2003), aunque otros autores mencionan que los cuartos infectados subclínicamente usualmente tienen más de 250.000 cel /ml (Leigh, 1.999). Independientemente del tipo de bacteria, patógeno menor o mayor de la glándula mamaria (Tabla 3). El RCS de una muestra de leche compuesta (cuatro cuartos) no debe exceder los 100.000 células/ml (Pyörälä, 2003). El RCS se puede efectuar por la técnica de tinción directa y su posterior conteo en el microscopio o por métodos automatizados. El RCS directo es una medida más exacta pero más costosa y no siempre está disponible a nivel de campo. Se puede analizar un número alto de muestras de leche con los contadores celulares de alta capacidad los cuales están basados en el principio de la citometría de flujo como el Fossomatic cell counter (Lam et al., 2009). Los equipos portátiles como el Porta SCC y DeLaval Cell Counter (DCC) están disponibles y son métodos de una exactitud aceptable para medir el RCS y se pueden usar a nivel de finca (Barratt et al., 2003). De acuerdo a Gilson et al. (2008) el Delaval DCC[®] es muy efectivo para clasificar apropiadamente RCS altos y bajos en muestras de leche que se conservaron por congelación.

Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de mastitis, basados en los resultados de una muestra de leche de cuarto según International Dairy Federation. 1971

Resultado de la muestra de leche		Diagnóstico
Crecimiento bacterial	Inflamación (RCS mayor de 200.000 cel/ml)	
Si	No	Infección Latente ^a o Presencia de crecimiento bacterial ^b
No	Si	Mastitis no específica ^a o Mastitis ^b
Si	Si	Mastitis

^a Definición de la Federación Internacional de Lechería

^b Definición alternativa (National Veterinary and Food Research Institute, Finlandia)

3.6 Análisis de muestras procedentes de leche de tanque de enfriamiento

El análisis de la leche del tanque es ampliamente aceptado como una herramienta útil para evaluar la calidad de la leche y monitorear el estado de salud de la ubre en el hato (Jayarao and Wolfgang, 2003). La detección de mastitis en el hato se puede efectuar por medio del estudio del RCS, del conteo de bacterias totales (Katholm, et al., 2012) y los aislamientos de bacteria en muestras de leche de tanque (Richard G, et al., 2006). Un RCS en tanque mayor a 200.000 cel/ml sugiere la presencia de mastitis en el hato (Philpot and Nickerson, 1991).

El Conteo Bacterial Diferencial (CBD) y el Conteo Bacterial Total (CBT) se pueden obtener por el cultivo de muestras de leche de tanque. Si el conteo bacterial está elevado, la identificación del patógeno por medio del cultivo puede suministrar pistas del origen u orígenes de éste (Blowey and Edmonson, 2010). El conteo de unidades

formadoras de colonia en tanque < 1.000 UFC/por ml es un indicador de buena higiene de la leche (Jayarao et al., 2003). Cuando los cuartos se infectan y sufren mastitis clínica o subclínica el número de bacterias se incrementa dramáticamente. Por ejemplo, en casos de mastitis clínica y subclínica debidas a *S. agalactiae* y *S. uberis* se eliminan hasta 100.000.000 de bacterias por ml, por lo tanto, se debe sospechar de patógenos provenientes de mastitis si el CBT fluctúa dramáticamente (Blowey and Edmonson, 2010).

3.7 Cultivo de muestras de leche

El cultivo bacteriológico de muestras de leche se puede efectuar a nivel de cuarto, de vaca o de hato (Lam et al., 2009), en este último caso el análisis de las muestras de tanque pueden dar una idea de la situación del hato (Blood and Radostits, 1992). Los patógenos ambientales encontrados en leche de tanque pueden ser debidos a una contaminación proveniente de orígenes diferentes a la vaca y los patógenos contagiosos tales como el *S. agalactiae* y el *S. aureus* generalmente provienen de infección intramamaria, pero la sensibilidad de una sola muestra de leche de tanque para el cultivo generalmente es baja, debido al efecto de la dilución, a las infecciones latentes y aquellas en las que la eliminación es intermitente (Jayarao et al., 2003). A nivel individual se han usado las muestras compuestas que son aquellas que contienen leche de los cuatro cuartos de la vaca, que no presentan alta sensibilidad pero han mostrado una alta especificidad en general (Reyher and Dohoo, 2011).

Se prefieren los cultivos bacteriológicos de cuartos individuales pues los costos de tratamiento requieren que se trate el menor número posible de cuartos en cada ubre y si el índice de infección es bajo el ahorro podría ser considerable (Blood and Radostits, 1992). Varios estudios han reportado los porcentajes de cuartos con aislamiento negativo al cultivo de las muestras de leche procedente de cuartos con mastitis subclínica o clínica. En un estudio efectuado en Suecia el 22% de las muestras de leche procedentes de cuartos con mastitis subclínicas no presentaron aislamiento

(Persson Y, 2011), mientras que en otro estudio realizado en el Reino Unido el 31,4% de las muestras de leche procedentes de cuartos con mastitis clínicas no presentaron aislamiento (Breen et al., 2009). Entre las posibles causas para el no aislamiento de patógenos están: 1) las infecciones crónicas por coliformes, en las cuales el número de bacterias es demasiado bajo para ser detectadas por métodos de rutina, 2) la infección ya pudo haber sido eliminada pero persiste un elevado RCS debido a que aún no ha sanado el cuarto, 3) la presencia de un excretor intermitente como en las infecciones crónicas por *S. aureus* o la presencia de un microorganismo que no crece con los medios de cultivo estándar (*Mycoplasma* spp.), 4) la presencia de antibiótico residual de un tratamiento previo en la muestra de leche, 5) excesiva demora entre la toma de la muestra y el cultivo, 6) un asa para el cultivo demasiado caliente, 7) un volumen de muestra muy escaso y menos probable 8) mastitis traumática o por hipersensibilidad (Blowey and Edmonson, 2010).

4. Etiología de la mastitis

Se han registrado más de 200 microorganismos causantes de la mastitis (Blowey and Edmonson, 2010). De acuerdo con Philpot and Nickerson (1991) los microorganismos más frecuentes asociados a la mastitis se pueden dividir en cuatro grupos:

- Contagiosos.
- Ambientales.
- Oportunistas.
- Otros.

4.1 Patógenos Contagiosos

La mastitis contagiosa se define como una infección intramamaria (IMI) transmitida de vaca a vaca. Los principales patógenos contagiosos son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, otros patógenos que se incluyen dentro de este grupo son

Corynebacterium bovis, *Mycoplasma bovis* (Philpot and Nickerson, 1991) y *Streptococcus dysgalactiae* (Fox and Gay, 1993; Blowey and Edmonson, 2010), según el Consejo Nacional de la Mastitis (NMC, por sus siglas en inglés) este último es el único patógeno que tiene características de contagioso y de ambiental (N.M.C., 1999). En este caso *Streptococcus dysgalactiae* se clasificará en el grupo de patógenos ambientales, a pesar de la falta de consenso de los autores de temas relacionados con la mastitis bovina en este punto específico.

4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Son bacterias Gram-positivas, con forma de pequeñas esferas y crecimiento en grupos, de ahí su nombre Staphylo (grupos) y coccus (esferas). Estas bacterias no se hallan frecuentemente en la piel sana (Philpot and 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 piel bovina. El equipo de ordeño puede transmitir las cepas asociadas a mastitis y las que se encuentran en piel. Los aislamientos de la piel de vacas analizadas con electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) pertenecieron a los mismos tipos de cepas aisladas de la piel de las manos del ordeñador (Zadoks et al., 2002). Las abrasiones de la piel incrementan el riesgo de colonización del pezón por *S. aureus* y el paso subsecuente a la ubre (Sandholm y Pyörälä, 1995a).

Usualmente la infección es crónica y en esos casos la bacteria está en células epiteliales, neutrófilos y macrófagos (Sandholm and Pyörälä, 1995). *S. aureus* produce varios factores de virulencia que pueden contribuir en diferentes formas a su patogenicidad (Sutra and Poutrel, 1994), se incluyen acá hemolisinas, leucocidinas, toxinas exfoliativas, enterotoxinas, toxinas del síndrome del shock tóxico y la habilidad de formar limo y biofilms (Zecconi et al., 2006).

El *S. aureus* tiene una respuesta pobre al tratamiento lo cual se explica por las siguientes razones: i) forman abscesos dentro de la ubre rodeados por una capsula gruesa lo cual evita que el antibiótico alcance la bacteria, ii) algunas cepas de *S. aureus*

pueden vivir dentro de células tales como los macrófagos y muchos antibióticos sólo pueden circular en los líquidos que rodean las células y no pueden penetrar las células mismas, iii) algunas cepas pueden persistir en un estado de inhibición o cese de su multiplicación en el cual no pueden ser eliminadas por los antibióticos, aunque pueden activarse en una etapa posterior, iv) la mayoría de los *S. aureus* que causan infección intramamaria (IMI) producen la enzima β -lactamasa que les confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos y se ha teorizado que el extenso uso de este tipo de antibióticos inducen la producción de las formas L de *S. aureus* (sin pared) por lo que muchos antibióticos no los pueden eliminar (Blowey and Edmonson, 2010).

4.1.2 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae es un patógeno obligado de la glándula mamaria bovina que causa principalmente mastitis subclínica (McDonald, 1977; Keefe, 1997). 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 (Wanger and Dunny, 1984). Estas bacterias forman cadenas de esferas de ahí su nombre strepto (cadenas) y agalactiae (falta de leche o sin leche) (Philpot and Nickerson, 1991). *S. agalactiae* se ha aislado de los genitales y del tracto gastrointestinal del humano (N.M.C., 1999). La transmisión del patógeno en el hato puede ocurrir durante el ordeño a través del uso de trapos para el aseo de la ubre contaminados con leche de vacas infectadas (Dargent-Molina et. al., 1988).

4.1.3 *Mycoplasma bovis*

Aunque existen numerosas especies de *Mycoplasma* el más común es *Mycoplasma bovis*. Son patógenos intermedios en tamaño entre bacterias y virus (Philpot y Nickerson, 1991). En Norte América se han reportado prevalencias que oscilan entre el 1 y el 8% (Richard et al., 2006, Fox, et al., 2003). Son los procariontes más simples y

pequeños que se autorepican, su pequeño genoma no le permite sintetizar moléculas precursoras para una variedad de compuestos biológicos complejos, por lo tanto, funcionan como parásitos en íntimo contacto con las células eucarióticas para obtener esos precursores (Fox and Gay, 1993). Se puede sospechar esta forma de mastitis cuando los cultivos de muestras de leche de vacas con sintomatología clínica no producen resultados positivos. Adicionalmente, la mastitis por *Mycoplasma* se caracteriza por un inicio súbito, formación de secreción purulenta en cuartos afectados, diseminación rápida a través del hato, reducción marcada en la producción de leche y resistencia a la terapia antibiótica. A pesar de reacción local severa de la ubre, las vacas no desarrollan sintomatología clínica (Philpot and Nickerson, 1991).

4.1.4 *Corynebacterium bovis*

El *Corynebacterium bovis* es un bacilo no formador de espora, Gram-positivo, catalasa-positiva (Watts et al., 2000). Es un agente causal común de mastitis con sintomatología moderada (Sandholm et al., 1995), sin embargo, Persson et al. (2011) en un estudio realizado en Suecia, lo reportaron como un agente poco común y raras veces asociado como patógeno de la mastitis bovina. La colonización del ducto del pezón con este microorganismo resulta en una elevación moderada del RCS sin cambios en la producción de leche o en la composición de la leche por lo que debe ser considerado un comensal de la ubre bovina (Brooks and Barnum, 1984) . El *C. bovis* probablemente coloniza solamente la región del canal del pezón (Frost et al., 1977).

4.2 Patógenos Ambientales

Los patógenos ambientales más frecuentemente aislados incluyen *Streptococcus* spp. también conocidos como Estreptococos ambientales (diferentes a *S. agalactiae*) y las bacterias coliformes (Oliver, 1988). El ambiente de la vaca es el principal reservorio de los patógenos causantes de este tipo de mastitis, se asocia usualmente con casos clínicos y es el tipo predominante de mastitis en hatos bien manejados con bajos RCS (Archbald, 1999). Algunas características de los microorganismos que causan mastitis

de origen ambiental son: 1) el ambiente es su principal reservorio 2) las bacterias son transmitidas del reservorio a los pezones entre los ordeños, 3) la penetración del canal del pezón ocurre por propulsión en el contraflujo de la leche, 4) la terapia del periodo seco no es de valor en este tipo de mastitis dado que estas bacterias no persisten subclínicamente y no se portan de una lactancia a la siguiente, 5) la desinfección preordeño es importante para su control y 6) los hatos con alta incidencia de infecciones ambientales tienen RCS bajos pero pueden tener altos Conteos Bacteriales Totales (CBT) (Blowey and Edmonson, 2010).

4.2.1 Estreptococos ambientales

Son cocos Gram-positivos similares al *S. agalactiae*, se encuentran en el ambiente que rodea la vaca y también en su tracto intestinal, las infecciones por estos microorganismos son más frecuentes en el periodo seco (Philpot and Nickerson, 1991). *S. uberis* y *S. dysgalactiae* son las bacterias más comunes dentro de este grupo, seguidas en menor frecuencia por *S. zooepidemicus*, *S. viridans*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae* (Blood and Radostits, 1992).

4.2.1.1 *Streptococcus dysgalactiae*

S. dysgalactiae reside principalmente en la ubre de la vaca y en las lesiones del pezón pero también en otras partes de la vaca (Mantere-Alhonen, 1995). Es considerada un patógeno intermedio entre contagioso y ambiental (Calvinho et al., 1998). El *S. dysgalactiae* está presente en las tonsilas, por lo tanto, el lamido de un animal a otro puede transmitir la infección a los pezones, lo cual puede explicar porque el *S. dysgalactiae* es una causa común de infección en novillas y vacas secas (Blowey and Edmonson, 2010). Adicionalmente, *S. dysgalactiae* está involucrado en el complejo multi-etiológico conocido como mastitis de verano (Mantere-Alhonen, 1995) que afecta a las novillas y a las vacas secas principalmente en los meses de verano en Europa del norte y en Japón (Madsen et al., 1990).

4.2.1.2 *Streptococcus uberis*

Esta bacteria se encuentra en el ambiente que rodea la vaca, en la vaca misma como en la piel, epitelio, heces, rumen, pezones, entre otras partes (Mantere-Alhonen, 1995). La infección por esta bacteria parece provenir del ambiente (Abureema, 2014) aunque puede ocurrir transmisión vaca-vaca en algunos hatos (Zadoks et al., 2001). Se ha observado que la susceptibilidad de los cuartos recuperados de la infección por *S. uberis* es más alta que la infección de los cuartos que nunca han experimentado infección por esta bacteria (Zadoks et al., 2001). La mediana de la duración de la infección se ha reportado de 16 días (McDougall, et al., 2004) y de 28-46 días (Zadoks et al., 2001).

4.2.2 Coliformes

En mastitis, el término “coliformes” incluye bacterias que pertenecen a los géneros *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (Hogan and Smith, 2012). Aunque la glándula mamaria no es considerada un hábitat natural para las bacterias coliformes, muchas cepas son capaces de sobrevivir y multiplicarse en ella (Hogan and Smith, 2003). La bacteria *E. coli* es considerada un patógeno mayor en la mastitis bovina a nivel mundial (Shpigel, et a., 1998), es el agente más comúnmente aislado de casos de mastitis clínicamente severos en fincas de leche bien manejadas (Hogan, et al., 1989). *E. coli* es un habitante normal del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente y tanto *Enterobacter* spp. como *Klebsiella* spp. habitan los suelos, granos, agua y el tracto gastrointestinal de los animales (Hogan and Smith, 2012). *E. coli* y *Klebsiella* contaminan regularmente el orificio del pezón y pueden entrar a la glándula, pero muchos son expulsados con la leche en el ordeño siguiente (Frost et al., 1977). La ubre se infecta por bacterias coliformes vía pezón dado que la materia fecal es empujada mecánicamente a través del canal del pezón a la glándula (Honkanen-Buzalski, 1995).

Las endotoxinas de las bacterias coliformes son el principal factor de virulencia responsables de los daños en la vaca, la endotoxina hace referencia a la porción de

lipopolisacarido de la pared bacterial (Hogan and Smith, 2003). Las mastitis agudas por coliformes son unas de las causas más importantes de pérdidas económicas en lecherías debido a que sus efectos tienden a ser fatales (Eberhart, 1977). Cerca del 50% de infecciones por bacterias coliformes son de corta duración (menos de 10 días) y tienden a la cura espontánea, el 70% persiste por 30 días pero algunas de ellas pueden persistir por más de 100 días y pueden causar brotes de mastitis clínica aguda (Philpot and Nickerson, 1991). Los signos clínicos de las mastitis aguda o peraguda incluyen, fiebre alta (hasta 42°C), anorexia, disminución de la motilidad ruminal, el animal se observa tembloroso, el pulso excede 100 pulsaciones por minuto, los signos locales en la ubre, como son inflamación y dolor, se desarrollan en un estado tardío de la enfermedad (Sandholm y Pyörälä, 1995b).

4.3 Patógenos oportunistas (Estafilococos Coagulasa Negativos - ECN)

Históricamente, los ECN se han clasificado como patógenos menores de la glándula mamaria y su importancia como causantes de mastitis clínica o subclínica ha sido considerada como limitada (Schukken et al., 2009). Las especies más frecuentemente aisladas incluyen *S. hycus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. hominis*, y *S. haemolyticus* (Sandholm et al., 1995). Las especies de ECN, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* y *S. simulans* son causantes comunes de infección intramamaria persistente (Thorberg et al., 2009). La prevalencia de infección intramamaria causada por ECN a nivel de cuarto puede variar entre 5,5 y 27,2% (Djabri et al., 2002). Piessens et al., (2012) encontró gran diversidad genética para el *S. haemolyticus* lo que sugiere la existencia de múltiples fuentes más que una naturaleza contagiosa del patógeno. Thorberg et al., (2009) no encontraron diferencias entre las especies de ECN y la producción diaria de leche, RCS en leche y el mes de lactancia en vacas con mastitis subclínica.

4.4 Otros Patógenos

Hay una gran cantidad de otros microorganismos que pueden causar mastitis, muchos de ellos asociados a procedimientos terapéuticos deficientes en el hato.

4.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Las especies de *Pseudomonas* se encuentran en agua, planta y suelo, siendo *P. aeruginosa* la que contamina la leche y causa mastitis (Mantere-Alhonen, 1995). Son causa poco frecuente de mastitis (Ohnishi et al., 2011). Las infecciones por *P. aeruginosa* son moderadas, de naturaleza subclínica o crónica y raramente ocurren los brotes prolongados (Hogan and Smith, 2003). La respuesta a los antibióticos es pobre debido posiblemente a que el microorganismo puede vivir dentro de las células donde no es accesible a los antibióticos (Blowey and Edmonson, 2010).

4.4.2 *Trueperella pyogenes*

T. pyogenes, es una bacteria recientemente reclasificada dentro del género *Arcanobacterium* (Yassin et al., 2011), es una de las bacterias causantes de lo que se ha llamado el complejo de la mastitis de verano (Blowey and Edmonson, 2010) y se ha aislado e identificado por pruebas moleculares de muestras de mastitis bovina (Oikonomou et. Al., 2012). En un estudio retrospectivo efectuado en Israel fue el cuarto aislamiento encontrado con una prevalencia del 4,9% entre todos los aislamientos (Shpigel et. al., 1998). Ha sido aislada de casos de mastitis clínica y se ha asociado con fuertes efectos en la producción de leche (Gröhn, et al., 2004).

4.5 Otras etiologías microbianas menos frecuentes como causantes de mastitis

Aunque poco comunes también pueden ocurrir infecciones por *Candida sp.* (levaduras), *Serratia sp.*, *Pasteurella/Mannheimia sp.* y *Prototheca sp.* (Blowey and Edmonson, 2010).

Aunque la mayoría de los casos de mastitis son causados por bacterias, las levaduras y los hongos contribuyen al problema (Seker 2010). Las levaduras son organismos unicelulares que están en el ambiente y son considerados patógenos oportunistas de la glándula mamaria que producen la enfermedad cuando los mecanismos de defensa naturales de la están deprimidos. Los organismos más frecuentemente involucrados son levaduras del genero *Candida* varias especies de ella han sido recuperadas de las glándulas mamarias (de Casia dos Santos y Marin, 2005)

Serratia sp, se halla con frecuencia como contaminante de mangueras o tuberías usadas para lavar las ubres (Hogan and Smith, 2003). Las infecciones intramamarias causadas por *Serratia* spp. son frecuentemente crónicas y pueden persistir por múltiples lactancias (Hogan et al., 1989).

Pasteurella es habitante normal del tracto respiratorio de la vaca, pero puede ser introducida a la ubre por terneros en amamantamiento. Las infecciones son comúnmente clínicas y en casos severos puede haber compromiso sistémico llevando a la muerte de la vaca (Philpot and Nickerson, 1991).

4.6 Mastitis causadas por plantas

Las únicas plantas conocidas que causan enfermedades infecciosas en humanos y animales son la *Prototheca zopfii* y la *Prototheca wickerhamii* (Moller et al., 2007) que es una alga incolora que se encuentra en estanques u otras áreas húmedas contaminadas con materia fecal (Philpot and Nickerson, 1991). Mientras que en el pasado sólo se observaban pocos casos de mastitis por *Prototheca*, ahora estos casos ocurren de forma endémica en muchos países del mundo (Moller et al., 2007; Lopes et al., 2008; Osumi et al., 2008). Los casos clínicos de mastitis causados por *Prototheca zopfii* llevan a una marcada disminución en la producción de leche. Estas algas no son afectadas por el tratamiento convencional siendo el mejor método para controlar el problema el diagnóstico temprano y la eliminación de la vaca afectada (Osumi et al., 2008).

5. Epidemiología de la mastitis

5.1 Prevalencia y Tasa de Incidencia de mastitis y de patógenos específicos

Se analizaron los reportes de prevalencia e incidencia de mastitis bovina en varios países en los últimos años. En un estudio de corte efectuado en vacas de varias razas, edades y periodos de lactancia en la ciudad de Pernambuco en Brasil, se obtuvieron prevalencias de 39,3% y 54,8% (CMT), 57,2% y 63,3% (diagnóstico microbiológico), 33,4% y 49,4% (RCS), para ordeño manual y mecánico respectivamente (Ruiz et al., 2008). En otro estudio efectuado en Finlandia, se colectaron 12.261 muestras de leche de 3.282 vacas en 216 fincas. La prevalencia de mastitis bovina (prevalencia de mastitis dentro del hato como media de todos los hatos) fue 30.6% (IC 95%, 28.4 a 33.1) (Pitkälä, 2004). La Tasa de Incidencia de Mastitis Clínica (TIMC) se ha reportado de 14,4 casos por cada 100 vacas-año a riesgo (Giannechini et al., 2002), 41,95 casos por cada 100 vacas-año a riesgo (Bartlett et al., 2001) y 43,3 casos por cada 100 vacas-año a riesgo reportado (Kivaria et al., 2007).

Con respecto a la prevalencia de patógenos específicos, considerando sólo las muestras con cultivo positivo por cuarto, Persson et al. (2011) reportaron 31, 27, 15, 14, 4,8 y 3,1% de positividad a *S. aureus*, ECN, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *E. coli* y *Streptococcus spp.*, respectivamente. En otro estudio transversal efectuado en Irlanda en 15 fincas lecheras se encontró una prevalencia del 21, 19, 9, y 3%, para las bacterias *S. aureus*, *S. uberis*, ECN y *E. coli*, respectivamente (Barret, 2005). Es de anotar que un posible sesgo de selección se presentó en este trabajo dado que los hatos elegidos tenían incremento en la incidencia de mastitis clínica o altos RCS. En otro estudio efectuado en Israel se encontró que los casos clínicos de mastitis estuvieron asociados a bacterias coliformes (60,2%), a Estreptococos ambientales (18,6%) y a ECN (8,7%) (Shpigel et al., 1998). Por otro lado, Persson et al. (2009), con base en los reportes de los tratamientos de mastitis clínicas efectuados por veterinarios encontraron que *S. aureus* y *S. dysgalactiae* fueron las bacterias más prevalentes en

vacas de primer parto. Ruiz et al. (2011) aislaron microorganismos patógenos en el 61% de las muestras, siendo los de mayor prevalencia en ordeño manual para *Corynebacterium* sp. (45,0%), *Staphylococcus* sp. (29,6%) y *Streptococcus* sp. (14,6%); y en ordeño mecánico *Staphylococcus* sp. (36,4%), *Corynebacterium* sp. (27,6%), *Micrococcus* sp. (15,6%) y *Streptococcus* sp. (12,9%). En otro estudio efectuado en Sicilia, Italia, se reportó la prevalencia de infección intramamaria en 18.711 muestras colectadas procedentes de casos de mastitis clínica o subclínica entre octubre 2000 y junio de 2006 en 101 hatos lecheros. La prevalencia cruda de bacterias aisladas en muestras de leche fue ECN 14,6%, *S. aureus* 12.5%, Estreptococos ambientales 6.6%, *S. agalactiae* 1.4%, Bacterias coliformes 1.7% y otras bacterias 3.3% (Ferguson et al., 2007). Es de anotar que este último reporte de prevalencias crudas de bacterias consideró muestras hasta con cuatro aislamientos, mientras que otros autores consideran como contaminadas las muestras con tres o más aislamientos y las descartan de los análisis de acuerdo a los lineamientos de la National Mastitis Council (N.M.C., 1999).

5.2 Factores de riesgo asociados a la mastitis

Los factores de riesgo (FR) para la presentación de la mastitis bovina pueden ser propios del animal, ambientales o del agente patógeno. En general, la contaminación de las manos de los ordeñadores, de los paños de lavado y de las copas de aparatos de ordeño pueden diseminar con rapidez la infección procedente de cuartos infectados (Blood and Radostits, 1992).

Algunos factores asociados a mastitis subclínica han sido reportados en varios estudios. En un estudio efectuado en 1.250 animales se observó por medio de la prueba de Chi cuadrado asociación entre las ubres y las extremidades posteriores sucias y el aislamiento de patógenos mayores de muestras de leche con un OR=1.49 y OR=1.29, respectivamente (Schreiner and Ruegg, 2003). En otro estudio longitudinal efectuado en 152 fincas y 1.907 vacas en Suiza, la edad del bovino estuvo asociado a

mastitis así: de 3.5-5 años OR=1.69, de 5-7 años OR=2.12, >7 años OR=3.01, revelando un mayor riesgo de presentar mastitis a medida que aumenta la edad del animal. En ese mismo estudio las vacas entre 240 y 305 días postparto presentaron un mayor riesgo de mastitis OR=1.74 (Busato et al., 2000).

En un estudio de prevalencia de mastitis subclínica efectuado en 11 hatos lecheros en Suecia, se observó asociación entre la producción alta de leche y las vacas persistentemente infectadas por *Estafilococo coagulasa negativo* ($p < 0.01$) (Thorberg et al., 2009). En otro estudio longitudinal efectuado en el Reino Unido en una muestra de 8 fincas lecheras, se encontró por análisis de regresión logística, que el riesgo de presentar un Recuento de Células Somáticas por cuarto mayor a 199.000 cel/mL estuvo asociado a la condición corporal así: $< 1,5$ OR=2.09 y $> 3,5$ OR=2.20, mientras que el primer y segundo partos de la vaca fueron factores protectores con un OR=0.11 y OR=0.40, respectivamente (Breen et al., 2009). En otro estudio transversal efectuado en Sao Paulo, Brasil en siete hatos se determinó por medio de regresión logística que hubo una asociación directa entre la alta callosidad en la punta del pezón y la presencia de infección intramamaria ($p < 0.001$) y una asociación entre la presencia de suciedad en la ubre y la infección Intramamaria ($p = 0.03$) (De Pinho et al., 2012). En otro estudio efectuado 897 vacas y 2.635 lactancias, se encontró que el peso corporal de la vaca preparto se asoció positivamente a la mastitis clínica OR=1.33 (Berry et al., 2007). En un ensayo clínico efectuado en vacas de cuatro fincas lecheras y utilizando el estadístico t de student se encontró que la tasa de infecciones intramamarias por patógenos mayores se redujo significativamente (54%) en presencia del presellado y de buena preparación de la ubre en comparación con buena preparación de la ubre solamente (Pankey et al., 1987). En un reporte efectuado por Neave et al., (1969), se mostró que en presencia de sellado las infecciones nuevas de la glándula mamaria ocasionadas por estreptococos eran menos frecuentes (2 vs 13 en presencia de no sellado). Por medio de un estudio en el cual se comparó la presencia de mastitis entre casos (hatos con alta tasa de mastitis) y controles (hatos con baja tasa de mastitis) por

medio del estadístico chi cuadrado, se determinó asociación entre la baja tasa de mastitis con la terapia en el periodo seco y el sellado de los pezones (Goodhope and Meek, 1980).

En un estudio longitudinal efectuado en 291 hatos, en el cual se analizaron los factores de riesgo de hato asociados al aislamiento de *S. aureus* en tanque por medio de regresión logística se encontró que el tratamiento en periodo seco de todas las vacas se asoció a protección de la infección OR=0.4 $p<0.05$ (Richard et al., 2010). Mientras que en un estudio transversal efectuado en Nueva York y por medio del estadístico chi cuadrado se encontró que la falta de desinfección de los pezones fue un factor de riesgo para la presentación de *S. aureus* y de *S. agalactiae* con un OR=1.8 y OR=7.1, respectivamente. En ese mismo estudio también se halló que los trapos o esponjas de uso común para la higiene de las ubres en las vacas fue un factor de riesgo para la infección de la glándula mamaria por *S. aureus* y *S. agalactiae* con un OR=1.9 y OR=3.3, respectivamente (Dargent-Molina et al., 1988).

5.3 Estudios sobre prevalencia, etiología y factores de riesgo asociados a la mastitis en Colombia

En Colombia, no se han realizado estudios de carácter nacional sobre los factores de riesgo asociados a mastitis, sólo se han reportado en la literatura estudios regionales de corta duración. Uno de los estudios sobre mastitis bovina fundamentó el diagnóstico en la prueba de CMT y fue realizado en la Sabana de Bogotá en 2.355 vacas; en él, se reportó 58,8% de vacas afectadas con mastitis y 38,39% de cuartos positivos, así mismo se determinó que el ordeño manual presentó asociación significativa ($p<0,05$) con menor porcentaje de vacas con mastitis subclínica (77,9%) con relación al ordeño mecánico (92,4%). En ese mismo estudio las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *S. agalactiae* (35,4%) y *S. aureus* (32,5%) siendo más frecuente *S. agalactiae* en el ordeño manual que en el mecánico (Rodríguez et al., 2002). Ramírez et al., (2001), usando la prueba de χ^2 halló asociación de positividad al CMT con el número

de partos y con el ordeño mecánico y no hubo asociación con los días en lactancia. Otro estudio realizado en la Sabana de Bogotá, halló una correlación entre las tasas de infección de la glándula mamaria con el número de lactancias (Rodríguez, 2006). En un estudio transversal efectuado por Parra et al. (1998), en hatos principalmente doble propósito del departamento del Meta y Cundinamarca, utilizando la prueba de chi cuadrado, determinó asociación de la mastitis con tipo de ordeño $RR=1.56$.

5.4 La genética como factor de riesgo para la mastitis

Se ha descrito una correlación genética positiva entre la producción de leche y el incremento en el conteo de células somáticas y entre la producción de leche y la mastitis, lo cual sugiere que con la selección de vacas por producción de leche las células somáticas y los casos de mastitis se incrementarán (Emanuelsson et al., 1988). La correlación genética entre la producción de leche y la mastitis clínica ha sido en promedio de 0,43 en los países Nórdicos; por lo tanto, si la mastitis es ignorada en los programas de selección se espera que el gran peso que se pone tradicionalmente en la producción de leche afectará la resistencia a mastitis en el ganado (Heringstad et al., 2000). Por otro lado, Strandberg and Shook (1989) mostraron que la selección para el aumento de la producción bajo un programa tradicional de progenie, sin pruebas de selección para mastitis, se traduce en un aumento genético de 0,02 casos de mastitis por vaca por año, asumiendo una correlación genética entre producción de leche y mastitis de 0,30. Estimaciones de la herencia de la incidencia de mastitis en ganado lechero indican que es baja (0,04) como también lo es la herencia del RCS ($0,11 \pm 0,04$) que es la aproximación de la incidencia de mastitis, pero la correlación genética entre la incidencia de mastitis y el Conteo de Células Somáticas es alta 0,70. En Estados Unidos a pesar de la baja heredabilidad de ésta característica, el número de hijas por toro joven es suficientemente grande como para que los valores de cría entendido como la medida del desempeño esperada de un animal con referencia al promedio de la población para el RCS puedan ser determinados con exactitud y así aplicar una selección efectiva por bajos RCS (Morris, 2007).

En el contexto de la hipótesis oligogénica algunos genes con efectos importantes confieren resistencia o susceptibilidad a mastitis; la búsqueda de tales genes se fundamenta en dos técnicas: la técnica de mapeo de enlace y la técnica del gen candidato. En la primera se escanea sistemáticamente el genoma para identificar los QTL (Quantitative Trait Locus), un QTL es frecuentemente una región del DNA que está muy ligada al gen que lleva el rasgo de la enfermedad, mientras que la aproximación por el gen candidato, involucra encontrar la asociación entre el alelo particular o grupo de alelos de un gen y el proceso de enfermedad (Dettelleux, 2009).

Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad bovino (CMH), son buenos candidatos debido al papel que juegan en la respuesta inmune mediada por células contra las infecciones. Los genes clase II del CMH han sido extensamente evaluados debido a que son los más polimórficos, entre ellos el DRB3.2 se ha asociado con la presentación de mastitis. Se ha investigado acerca de otros genes del CMH asociados con mastitis tales como el β -defensin 5, lactoferrin, Lisozima y lisostafina y se ha construido una librería, cDNA, de resistencia a mastitis (Cao et al., 2005).

BoLA-DRB3 es un gen clase II, que codifica la cadena β de una molécula del CMH. El segundo exón del BoLA-DRB3 es altamente polimórfico y codifica el sitio de unión al antígeno (Sitte et al., 2002). Hay pruebas concluyentes de que el polimorfismo es mantenido por alguna forma de selección equilibrada. El papel esencial de las moléculas CMH en el reconocimiento inmunológico de péptidos antigénicos extraños implica que la causa de dicha selección está relacionada con los efectos del polimorfismo de CMH en las defensas del hospedero contra patógenos (Takeshima et al., 2003).

Con respecto a la asociación de algunos genes con las bacterias causantes de mastitis, se ha reportado una heredabilidad del 2% (Weller et al, 1992), 10% (Dettelleux et al., 1995) y 20% (Wanner et al., 1998). Por su parte Sharif et al. (2000) encontraron una asociación significativa con un riesgo relativo de 11, entre la presencia de ácido

glutámico en la posición β 74 que se encuentra en los alelos *22,*23 y *24 del gen *BoLA-DRB3.2*. y la ocurrencia de mastitis causada por el *Staphylococcus* spp.

Los genes que codifican para los receptores tipo Toll (Toll Like Receptor o TLR) podrían jugar un papel importante en la resistencia a mastitis, debido a que el TLR reconoce patrones moleculares asociados a patógeno invariables entre microorganismos de una clase dada (Takeuchi et al., 2000). El gen TLR4 fue descrito en 2003 y se encuentra en el cromosoma 8 (Wang 2007), la mastitis incrementa fuertemente la expresión del mRNA del TLR4, sugiriendo por lo tanto que dicho gen puede estar relacionado con los microorganismos o grupo de m.o. que causan mastitis por ejemplo *E. coli* (Wang et al., 2007). La identificación del TLR-4 en las membranas de los glóbulos grasos sugiere un papel directo para la detección de patógenos a nivel del parénquima mamario (Reinhardt y Lippolis, 2006). También se ha propuesto que el TLR4 está involucrado en la vía de transducción de la señal que media la patogénesis de la mastitis por *E. coli* (De Schepper et al., 2008).

6. Tratamiento

Los programas de control de la mastitis que han resultado económicos y efectivos están soportados en la prevención más que en el tratamiento; sin embargo, la intervención terapéutica es una parte importante del programa de control para la mastitis bovina (Erskine et al., 2003).

La efectividad terapéutica y preventiva de un compuesto farmacológico para la mastitis bovina depende del agente etiológico, el adecuado uso del fármaco, el manejo de la lechería, procedimientos de higiene y la fase de la enfermedad (Huber, 1977). La penetración de las sustancias en la leche, cuando se administran parenteralmente, o la absorción y distribución en la ubre, cuando se aplican por infusión intramamaria (IIM), dependen de sus características farmacocinéticas que son: liposolubilidad, grado de ionización, el grado de unión a proteínas séricas y el tipo de vehículo (Pyörälä, 2009). La farmacodinamia del antibiótico es otro aspecto que debe ser considerado dado que

la leche no debe interferir con la actividad antibiótica. La actividad de macrólidos, tetraciclinas y trimetoprim-sulfa se reduce en presencia de la leche (Louhi et al., 1992). La meta de la terapia antibiótica es lograr concentraciones efectivas del fármaco en el sitio de la infección. En el tratamiento de la mastitis bovina, el método más simple y efectivo es administrar el compuesto vía intramamaria, aunque los mayores inconvenientes de esta ruta son la posible eliminación del fármaco con los ordeños especialmente cuando son más de dos al día y la dificultad en el tratamiento de las infecciones crónicas o muy invasivas (Erskine et al., 2003). Una alternativa a esta ruta de administración es la vía parenteral la cual se puede usar sola o en conjunto con la intramamaria. Se debe seleccionar un antibiótico con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) baja para el patógeno blanco, particularmente cuando el antibiótico se administra sistémicamente. El antibiótico debe tener una acción bactericida más que bacteriostática debido a que en la glándula mamaria con mastitis la fagocitosis es deficiente (Kehrli and Harp, 2001).

En general para que un fármaco sea efectivo se deben lograr concentraciones terapéuticas en el sitio de la infección (biofase). Los patógenos pueden estar libres en la leche (*E. coli*), unidos a la superficie de las membranas (*Streptococcus*), o estar en el compartimiento intracelular (*S. aureus* en los PMN) (Gruet et al., 2001). La tabla 4 clasifica los antibióticos de acuerdo a su distribución potencial en la ubre luego de la aplicación Intramamaria o parenteral.

Tabla 4. Clasificación de los antibióticos de acuerdo a su distribución potencial en la ubre luego de la administración parenteral o intramamaria

Distribución	Parenteral	Intramamaria
Buena	Quinolonas	Quinolonas
	Sulfaniamida	Sulfaniamida

Distribución	Parenteral	Intramamaria
	Eritromicina	Eritromicina
	Tilosina	Tilosina
	Espiramicina	Espiramicina
	Lincomicina	Lincomicina
	Trimetoprim	Trimetoprim
	Penetamato	Ampicilina
		Amoxicilina
		Cefalexina
Moderada	Penicilina G	Penicilina G
	Cloxacilina	Cloxacilina
	Ampicilina	Oxacilina
	Amoxicilina	Cefoxazol
	Cefalosporinas	Cefalonium
	Tetraciclina	Cefapirina
		Cefacetril
		Tetraciclinas
Pobre	Dihidroestreptomicina	Bacitracina
	Neomicina	Dihidroestreptomicina
	Kanamicina	Neomicina
Distribución	Parenteral	Intramamaria
	Gentamicina	Kanamicina
	Polimixina	Gentamicina
		Polimixina

Fuente: modificado de Gruet et al. (2001)

La susceptibilidad antimicrobial determinada *in vitro* ha sido considerada como prerrequisito para el tratamiento, sin embargo, esta no garantiza eficacia *in vivo* (Pyörälä, 2009). Un aspecto importante relacionado al tratamiento de la mastitis es si el antibiótico se acumula en la leche o en el tejido de la ubre. El sitio blanco dependerá del agente causal: los estreptococos permanecen en el compartimiento de la leche, pero el *S. aureus* penetra el tejido de la ubre y causa infección profunda (Erskine et al., 2003). En la Tabla 5 se presentan los puntos donde se puede dirigir el tratamiento antibiótico en casos de mastitis clínica.

La ruta de administración intramamaria es la más común en casos de mastitis, las ventajas de esta ruta son altas concentraciones de la sustancia en la leche y bajo consumo de antibióticos ya que el fármaco es infundido directamente en el cuarto enfermo (Pyörälä, 2009). Sin embargo, en presencia de mastitis los conductos de la leche están ocluidos por lo que la inflamación impide el paso libre del antibiótico hacia la parte superior de la ubre por los conductos (Sandholm et al., 1995). En la mastitis clínica aguda el tratamiento debe iniciarse con base en los datos que se tengan del hato y en la experiencia personal. El diagnóstico bacteriológico rápido efectuado en la granja facilitará la selección del antibiótico más apropiado (Pyörälä, 2009), El desarrollo de programas basados en los cultivos rápidos en granja ha proporcionado una vía que une los resultados de las pruebas bacteriológicas a las decisiones importantes para el tratamiento de la mastitis (Ruegg, 2012). Los protocolos para el tratamiento y la selección del fármaco deben ser efectuados por los veterinarios de la granja. El uso de protocolos escritos para la granja sobre el tratamiento de la mastitis promueve el uso juicioso de los antibióticos (Passantino, 2007).

Tabla 5. Blanco de tratamiento antibiótico en mastitis clínicas ocasionadas por diferentes patógenos. Fuente (Erskine et al., 2003)

Patógenos causantes de mastitis	Leche y Conductos	Parénquima	Vaca
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	---	---
Otros <i>Streptococcus</i>	+++	+	---
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	---
Estafilococo Coagulasa Negativo	+++	---	---
Coliformes	+	---	+++
Mycoplasma, otros Gram negativos ^a	---	---	+++

^a En mastitis clínica severa, la terapia de soporte y la prevención de bacteremia secundaria son las principales preocupaciones.

+++ , blanco preferencial; + , algún beneficio; --- , poco valor

En general para el tratamiento de la mastitis clínica se prefiere el uso de antibióticos de espectro reducido, algunas recomendaciones generales para el tratamiento de la mastitis bovina se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Sugerencias para el tratamiento antibiótico de la mastitis clínica causada por diferentes patógenos.

Bacteria (Grupo/género)	Especie	Fármaco de elección	Alternativa	Comentarios
Estreptococos	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Penicilina G		Preferible tratamiento IMM
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>			
	<i>Streptococcus uberis</i>			
	Enterococcus	De acuerdo a la prueba de sensibilidad		El pronóstico para la cura bacteriológica es pobre
Estafilococos	<i>Staphylococcus aureus</i> ECN B-lactamasa negativo	Penicilina G		Tratamiento combinado en mastitis por <i>S. aureus</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> ECN B-lactamasa positivo	No antibióticos	Cloxacilina, Macrólidos, lincosamidas	El pronóstico para la mastitis por <i>S. aureus</i> es pobre.
Coliformes	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella spp.</i>	No antibióticos	Fluoroquinolonas Cefalosporinas	El tratamiento antibiótico es necesario en casos severos y durante el periodo puerperal

Fuente: (Pyörälä, 2009)

La mastitis subclínica no representa un potencial urgente de pérdida de la función de la glándula mamaria y el tratamiento con antibióticos durante la lactancia generalmente tiene costos altos y eficacia pobre (Pyörälä, 2009). Los patógenos más frecuentemente relacionados con mastitis subclínica son estreptococos y estafilococos (Giannechini et al., 2002) de estos, la infección por *S. agalactiae*, se puede disminuir por el tratamiento “blitz”, en el cual todas las vacas infectadas en un hato son tratadas simultáneamente con antibióticos (Pyörälä, 1995). En relación a la terapia contra la mastitis en el periodo seco, estos tratamientos constan de dos componentes que son: la administración de antibióticos de larga acción en cada cuarto para remover infecciones existentes y prevenir algunas nuevas infecciones y la infusión de un sellante interno en el canal y la base del pezón para prevenir nuevas infecciones (Blowey and Edmoson, 2010).

7. Control y prevención

Un programa aceptable de control y prevención de la mastitis debe tener las siguientes características: ser económico, práctico y efectivo bajo la mayoría de las condiciones y debe reducir la presentación de nuevas infecciones. El programa debe disminuir la duración de las infecciones preexistentes, reducir la incidencia de mastitis clínica y ser fácil de realizar ajustes en su ejecución en la medida que se desarrollan mejores metodologías a través de la investigación (Philpot and Nickerson, 1991). De acuerdo con Schukken et al. (2008) las metas alcanzables en hatos bien manejados son:

- RCS en tanque menor de 150.000 cel/mL.
- Prevalencia de infección crónica menor del 5% (RCS mayor a 200.000 cel/ml en vacas individuales).
- Incidencia de nuevas infecciones intramamarias menor del 5% en una base mensual (vacas por encima del umbral de 200.000 cel/ml).

7.1 Bioseguridad dentro del Hato

La bioseguridad enfocada al control de la mastitis dentro del hato se puede definir como todas aquellas estrategias implementadas para reducir los reservorios de los agentes etiológicos de la mastitis o las vacas infectadas en el hato (prevalencia) y la transmisión desde estas a sus compañeras de hato (incidencia), (Keefe, 2012). Los programas de control de la mastitis, desarrollados hace más de 40, años se enfocaron en los microorganismos Gram- positivos, especialmente *S. agalactiae* y *S. aureus*. Como resultado de esos trabajos, en muchas partes del mundo se ha adoptado el siguiente plan de los cinco puntos para combatir la mastitis en lecherías especializadas. Los cinco puntos son los siguientes: 1) tratamiento de los casos clínicos, 2) desinfección del pezón en cada ordeño, 3) tratamiento de la vaca seca, 4) mantenimiento regular de la máquina de ordeño y 5) descarte de las vacas afectadas crónicamente (Neave et al., 1969). En Norte América este plan se extendió a un esquema de diez puntos así: 1) establecimiento de metas para la salud de la ubre, 2) Mantenimiento de un ambiente limpio, seco y confortable, 3) procedimientos de ordeño adecuados, 4) mantenimiento y uso adecuado del equipo de ordeño, 5) buen manejo de registros, 6) manejo apropiado de las mastitis clínicas durante la lactancia, 7) manejo efectivo del periodo seco de la vaca, 8) mantenimiento de la bioseguridad para los patógenos contagiosos y descarte de las vacas infectadas crónicamente, 9) monitoreo regular del estado de salud de la ubre y 10) revisión periódica del programa de control de la mastitis (N.M.C.) (<http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistNA.pdf>).

El plan de los cinco puntos (mencionado en el párrafo anterior) ha mostrado reducciones significativas en la prevalencia de los patógenos contagiosos (Principalmente *S. aureus* y *S. agalactiae*) (Ruegg, 2012). El mantenimiento de un hato cerrado y la adhesión a protocolos de bioseguridad definidos claramente es crítico para disminuir el riesgo de reintroducción de *S. agalactiae* o la adición de nuevas cepas de *S. aureus* potencialmente más virulentas a un hato endémico (Keefe, 2012).

Según Hogand y Smith 2012, algunas medidas de manejo encaminadas al control y la prevención de los patógenos ambientales son: Remoción frecuente de la materia fecal en los establos, evitar las altas densidades de las vacas, eliminar las aguas contaminadas en los sitios donde se concentran las vacas, y proveer camas secas y de material inorgánico para las vacas en estabulación.

En la Tabla 7 se presenta el efecto preventivo de algunas medidas de manejo del hato para reducir la incidencia de mastitis (Según Sandholm, 1995).

Tabla 7. Efecto preventivo de algunas medidas de manejo del hato para reducir la incidencia de mastitis

Bacteria	Higiene Del Establo	Calidad Del Agua	Máquina de ordeño	Higiene en el ordeño	Desinfección del pezón	Tratamiento en período seco	Descarte
<i>Staphylococcus</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. uberis</i>	+	-	(+)	+	-	(+)	(+)
<i>S. agalactiae</i>	-	-	+	+	+	+	(+)
<i>Coliformes</i>	+	+	(+)	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	+	+	(+)	+	-	-	(+)
<i>A. pyogenes</i>	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+

Adaptado de (Sandholm et al., 1995)

+ = Efecto considerable

(+) = Algún efecto

- = sin efecto significativo

7.2 Vacunas

La vacunación permanece como el santo grial en el control de la mastitis y hoy después de décadas de investigación no hay disponible comercialmente una vacuna verdaderamente efectiva (Bradley, 2002; Talbot and Lacasse, 2005). El desarrollo de vacunas contra la mastitis ha sido difícil debido a que la respuesta inmune contra la infección natural no protege eficientemente contra la infección subsecuente, pero los avances recientes en biología molecular y en la comprensión de la inmunología bovina han proporcionado progresos importantes en la generación de vacunas más eficientes (Talbot and Lacasse, 2005). En los últimos años se ha publicado reportes los cuales describen prototipos de vacunas contra *S. uberis*, *S. agalactiae*, *E. coli*, y *S. aureus*. Estas vacunas se han basado en el uso de extracto bacteriano, que contienen antígenos de los serotipos bacteriales más comunes o de antígenos purificados que pueden estar o no conjugados a transportadores para incrementar su eficiencia inmunológica. Sin embargo, estas vacunas no son aún de uso común debido a problemas asociados a su falta de eficiencia, costos de producción y estabilidad. Adicionalmente, las formas crónicas de mastitis se han asociado con formas intracelulares de la bacteria que son protegidas por algunos mecanismos inmunes que no son afectados por estas vacunas (Talbot and Lacasse, 2005). Una estrategia más reciente es el uso de plásmidos, vectores de expresión de DNA, como vacunas los cuales expresan antígenos asociados a virulencia *in vivo*. Los plásmidos una vez introducidos en el animal llevan a la activación de la respuesta inmune humoral y celular contra el antígeno. El tipo de plásmido, la ruta de inyección y la inclusión de adyuvantes genéticos pueden ser ajustados hasta alcanzar una respuesta deseada (Talbot and Lacasse, 2005).

Las vacunas desarrolladas con el uso del antígeno núcleo J5 de las bacterias coliformes se han usado desde hace aproximadamente 25 años (Gonzalez et al., 1989). Con relación a este tipo de vacuna, Wilson et al., (2007) encontraron que en 302 controles se presentó un número significativamente más alto de pérdidas (10 descartes,

3 muertes; 4.3%) con respecto a las 250 vacunadas (3 descartes, 1 muerte; 1.6%) lo que evidencia el beneficio del uso de antígeno J5 para disminuir el descarte o muerte de las vacas ocasionadas por mastitis.

Se sabe que el *S. aureus* tiene una amplia variedad de factores de virulencia los cuales pueden variar en muestras bacteriales diferentes (Clarke et al., 2006), por lo tanto, el objetivo de las nuevas vacunas de DNA y recombinantes es estimular una respuesta inmune eficiente a las principales proteínas de la adherencia o de invasión bacterial (Pereira et al., 2011).

8. Referencias

- Abureema S. P. Smooker, J. Malmo, M. Deighton. 2014. Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: Evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. 97:285-290.
- Archbald, L. 1999. Reproductive diseases. Pages 563-568 in Current Veterinary Therapy. Food Animal Practice. Vol. 4.
- Barlow, J. R. Zadoks, Y. Schukken. 2013. Effect of lactation therapy on *Staphylococcus aureus* transmission dynamics in two commercial dairy herds. BMC Veterinary Research. 9:28.
- Barratt, K., K. Leslie, and A. Bashiri. 2003. An evaluation of the Porta SCCTM for determining udder health status in dairy cows at drying off. Pages 280-281 in Proc. Proceedings NMC 42nd annual meeting.
- Barret J. A. Healy, F. Leonard, M. Doherty. 2005. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in 15 dairy herds in the Republic of Ireland. Irish Veterinary Journal. 58 (6) 333-337.
- Bartlett, P. C., J. F. Agger, H. Houe, and L. G. Lawson. 2001. Incidence of clinical mastitis in Danish dairy cattle and screening for non-reporting in a passively collected national surveillance system. Preventive veterinary medicine 48(2):73-83.

Berry, D. P., J. M. Lee, K. A. Macdonald, K. Stafford, L. Matthews, and J. R. Roche. 2007. Associations among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. *J Dairy Sci* 90(2):637-648.

Bhutto A. D. Murray, Z. Woldehiwet. 2012. California mastitis Test Scores as indicators of subclinical itra.mamary infections at the end of lactations in dairy cows. *Research in Veterinary Science*. 92: 13-17.

Blood, D. C. and O. M. Radostits. 1992. Mastitis. Pages 539-602 in *Medicina Veterinaria*. Vol. 1. 7 ed, Madrid.

Blowey, R. and P. Edmonson. 2010. Mastitis control in dairy herds. CAB International. Oxfordshire, United Kingdom.

Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Veterinary Journal* 164(2):116-128.

Breen, J. E., A. J. Bradley, and M. J. Green. 2009. Quarter and cow risk factors associated with a somatic cell count greater than 199,000 cells per milliliter in United Kingdom dairy cows. *J Dairy Sci* 92(7):3106-3115.

Breen, J. M. Green, A. Bradley. 2009. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J Dairy Sci* 92:2551-2561.

Brooks, B. W. and D. A. Barnum. 1984. Experimental colonization of the bovine teat duct with *Corynebacterium bovis* and the effect on milk somatic cell counts. *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee* 48(2):141-145.

Busato, A., P. Trachsel, M. Schallibaum, and J. W. Blum. 2000. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Preventive veterinary medicine* 44(3-4):205-220.

Calvinho, L. F., R. A. Almeida, and S. P. Oliver. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol* 61(1-2):93-110.

Cao, S. Z., H. B. Li, A. H. Wang, X. Zhao, and L. X. Du. 2005. Construction of mastitis resistant cDNA library in dairy cows using suppression subtractive hybridization. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 36(6):526-530.

Clarke, S. R., K. J. Brummell, M. J. Horsburgh, P. W. Mcdowell, A. S. Mohamad, M. R. Stapleton, J. Acevedo, R. C. Read, N. P. Day, and S. J. Peacock. 2006. Identification of in vivo expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *J. Infect. Dis.* (8):1098-1108.

de Casia dos Santos, R., and J.M. Marin. 2005. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia.* 159:251-253

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

De Pinho, M., D. Borin, P. Yoshida, T. Zampolli, B. Donizete, and H. Langoni. 2012. Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. *Res Vet Sci* 93:430-434.

De Schepper, S., A. De Ketaleare, D. Bannerman, MJ. Paape, L. Peelman and C. Buvernich. The toll-like receptor-4 pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2008; 39 (1):2-23

Detilleux, J., M. Kehrli Jr., A. Freeman, L. Fox, D. Kelley. 1995. Mastitis of periparturient Holstein Cattle: a phenotypic and genetic study. *J. Dairy Sci.* 78, 2285-2293

Detilleux, J. C. 2009. Genetic factors affecting susceptibility to udder pathogens. *Vet Microbiol* 134(1-2):157-164.

Djabri, B., N. Bareille, F. Beaudeau, and H. Seegers. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Veterinary research* 33(4):335-357.

Dohoo, I., J. Smith, S. Andersen, D.F. Kelton, S. Godden. 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. *J. Dairy Sci.* 98:250-261.

Eberhart, R. J. 1977. Coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 170(10 Pt 2):1160-1163.

Emanuelsson, U., B. Danell, and J. Philipsson. 1988. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J Dairy Sci* 71(2):467-476.

Erskine, R. J., S. Wagner, and F. J. DeGraves. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 19(1):109-138, vi.

Ferguson J. G. Azzaro, M. Gambina, G. Licitra. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J. Dairy Sci.* 90:5798-5813.

Fox, L. K. and J. M. Gay. 1993. Contagious mastitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 9(3):475-487.

Fox, L. D. Hancock, A Mickelson, A Britten. 2003. Bulk Tank milk analysis: Factors associated with appearance of *Mycoplasma* sp. in milk. *J Vet Med B inf Dis Vet Pub Health.*50:235-240.

Frost, A. J., D. D. Wanasinghe, and J. B. Wooleock. 1977. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. *Infect. Immun.* 15(1):245-253.

Gianneechini, R., C. Concha, R. Rivero, I. Delucci, and J. Moreno Lopez. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta veterinaria Scandinavica* 43(4):221-230.

Gilson, W., S. Nickerson, and L. Ely. 2008. NMC Annual Meeting Proceedings. Pages 196-197.

Gonzalez, R., J. Cullor, D. Jasper, T. Farver, R. Bushnell, and M. Oliver. 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can. J. Vet. Res.* (53):301-305.

Goodhope, R. G. and A. H. Meek. 1980. Factors associated with mastitis in Ontario dairy herds: a case control study. *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee* 44(4):351-357.

Gröhn, Y. D. Wilson, R. González, J. Hertl, H. Schulte, G. Bennett, Y. Schukken. Effect of pathogen- Specific clinical mastitis on milk Yield in Dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3358-3374.

Gruet, P., P. Maincent, X. Berthelot, and V. Kaltsatos. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews* 50(3):245-259.

Heringstad, B., G. Klemetsdal, and J. Ruane. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science* (64):95-106.

Hogan, J. and K. Larry Smith. 2003. Coliform mastitis. *Veterinary research* 34(5):507-519.

Hogan, J. and K. Larry Smith. 2012. Managing environmental mastitis. *Vet. Clin Food Anim.* 28:217-224.

Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, P. S. Schoenberger, D. A. Todhunter, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, B. L. Brockett, and et al. 1989. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J Dairy Sci* 72(6):1547-1556.

Honkanen-Buzalski, T. 1995. Sampling technique, transportation and history. Pages 111-114 in: *The bovine udder and mastitis*. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed. Gummerus, Jyväskylä, Finland.

Huber, H. 1977. Antibacterial drug effectiveness against mastitis pathogens. *Journal of the American Veterinary Medical Association* (170):1182-1184.

International Dairy Federation. 1971. A monograph of bovine mastitis.

International Dairy Federation. 1987. *Bovine Mastitis. Definitions and Guidelines for Diagnosis*. Pages 3-8. Vol. 211. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

Jayarao, B., S. Pillai, A. Sawant, D. Wolfgang, and N. Hegde. 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Journal of Dairy Science* (87):3561-3573.

Jayarao, B. M. and D. R. Wolfgang. 2003. Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 19(1):75-92, vi.

Katholm J. T. Bennedsgaard, M. Koskinen, E. Rattenborg. 2012. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 95:5702-5708

Keefe, G. 2012. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice* 28(2):203-216.

Keefe, G. P. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 38(7):429-437.

Kehrli, M. E., Jr. and J. A. Harp. 2001. Immunity in the mammary gland. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 17(3):495-516, vi.

Kivaria, F. M., J. P. Noordhuizen, and H. M. Msami. 2007. Risk factors associated with the incidence rate of clinical mastitis in smallholder dairy cows in the Dar es Salaam region of Tanzania. *Veterinary journal* 173(3):623-629.

Korhonen, H. and L. Kaartinen. 1995. Changes in the composition of milk induced by mastitis. Pages 76-82 in: *The bovine udder and mastitis*. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed, Gummerus, Jyväskylä, Finland.

Lam, T., R. Olde Riekerink, O. Sampimon, and H. Smith. 2009. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Irish Veterinary Journal* 62 Suppl 4:S34-39.

Leigh J. 1999. *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *The veterinary journal.* 157: 225-238.

Lopes, M. M., R. Ribeiro, D. Carvalho, and G. Freitas. 2008. In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitis in a Portugal dairy herd. *Journal de Mycologie Médicale* (18):205-209.

Louhi, M., K. Inkinen, V. Mylly, and M. Sandholm. 1992. Relevance of sensitivity testings (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. Zentralblatt für Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B 39(4):253-262.

McDougall S. T. Parkinson, M. Leyland, F. Anniss, S. Fenwick. 2004. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cow's milk. J. Dairy Sci. 87:2062-2072.

Madsen, M., G. Hoi Sorensen, and B. Aalbaek. 1990. Summer mastitis in heifers: a bacteriological examination of secretions from clinical cases of summer mastitis in Denmark. Vet Microbiol 22(4):319-328.

Mantere-Alhonen, S. 1995. Microbiology of normal milk. Pages 115-120 in The bovine Udder and mastitis. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed. Gummerus, Jyväskylä, Finland.

McDonald, J. S. 1977. Streptococcal and Staphylococcal mastitis. Journal of the American Veterinary Medical Association 170(10 Pt 2):1157-1159.

Moller, A., U. Truyen, and U. Roesler. 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? Vet Microbiol 120(3-4):370-374.

Morin D. Salud y Trastornos de la glándula mamaria. En: Medicina Interna de grandes Animales (ed . Elsevier). 2010. pp 1112-1143

Morris, C. A. 2007. A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle. Veterinary Journal 174(3):481-491.

N.M.C. Recommended Mastitis Control Program. [último acceso junio 15, 2013] URL: <http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistNA.pdf>.

N.M.C. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis Revised Edition. National Mastitis Council, Madison.

Neave, F. K., F. H. Dodd, R. G. Kingwill, and D. R. Westgarth. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J Dairy Sci 52(5):696-707.

Nielen, M. H. Deluyker, Y. Schukken, A. 1992. Brand. Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta-analysis of mastitis detection performance, *J. Dairy Sci.* 75:606-614.

Norberg, E. 2005. Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: A review. *Livestock Production Science* (96):129–139.

Ohnishi, M., T. Sawada, K. Hirose, R. Sato, M. Hayashimoto, E. Hata, C. Yonezawa, and H. Kato. 2011. Antimicrobial susceptibilities and bacteriological characteristics of bovine *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates from mastitis. *Vet Microbiol* 154(1-2):202-207.

Oikonomou, G. V. Machado, C. Santisteban, Y. Schukken, R. Bicalho. 2012. Microbial diversity of bovine mastitic milk as Described by pyrosequencing of metagenomic 16 rDNA. *PLoS ONE* 7 (10): e47671. doi:10.1371/journal.pone.0047671

Oliver, S. P. 1988. Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. *American journal of Veterinary Research* 49(11):1789-1793.

Osumi, T., Y. Kishimoto, R. Kano, H. Maruyama, M. Onozaki, K. Makimura, T. Ito, K. Matsubara, and A. Hasegawa. 2008. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet Microbiol* 131(3-4):419-423.

Pankey, J. W., E. E. Wildman, P. A. Drechsler, and J. S. Hogan. 1987. Field trial evaluation of premilking teat disinfection. *J Dairy Sci* 70(4):867-872.

Parra, J. L., M. Martínez, H. Pardo, and S. Vargas. 1998. Mastitis y la calidad de la leche en el piedemonte del Meta y Cundinamarca. *Boletín de Investigación N°2. Corpoica-PRONATTA.*

Passantino, A. 2007. Ethical aspects for veterinarians regarding antimicrobial drug use in Italy. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29(3):240-244.

Pereira, U. P., D. G. Oliveira, L. R. Mesquita, G. M. Costa, and L. J. Pereira. 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Vet Microbiol* 148(2-4):117-124.

Persson, K., B. Bengtsson, A. Lindberg, A. Nymanb, and U. Ericsson. 2009. Incidence of mastitis and bacterial findings at clinical mastitis in Swedish primiparous cows—Influence of breed and stage of lactation. *Veterinary Microbiology* (134):89-94.

Persson, Y., A. K. Nyman, and U. Gronlund-Andersson. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53:36.

Philpot, N. and S. Nickerson. 1991. *Mastitis: Counter Attack a strategy to combat mastitis*. Babson Bros. Co., Illinois USA.

Piessens, V. S. De Vlieghe, B. Verbist, G. Braem, A. Van Nuffel, L. De Vuyst, M. Heyndrickx, E. Van Coillie. 2012. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*. 155:62-71.

Pitkälä A. M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, T. Honkanen-Buzalki. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-Prevalence, Distribution and bacteria, and Antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.

Pyörälä, S. 1995. Staphylococcal and Streptococcal mastitis. Pages 143-148 in *The bovine Udder and mastitis*. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed. Gummerus, Jyväskylä, Finland.

Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 34(5):565-578.

Pyörälä, S. 2009. Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal* 62 Suppl 4:S40-44.

Radostits O, C. Gay, K. Hinchcliff, P. Constable. 2007. *Veterinary Medicine*. Saunders. 10th Edition. pp. 673-748

Ramírez, N., G. Gaviria, O. Arroyave, and B. Sierra. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu* (14):76-87.

Reinhardt T.A., and J.D. Lippolis. Bovine milk fat globule membrane proteome. 2006. *J Dairy Res.* 73(4):406-416

Reyher, K. K. and I. R. Dohoo. 2011. Diagnosing intramammary infections: evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. *J Dairy Sci* 94(7):3387-3396.

Richard, G. O. Riekerink, H. Barkema, D. Scholl, D. Poole, D. Kelton. 2010. Management practices associated with bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 97:20-28

Richard, G. O. Riekerink, H. Barkema, S. Veenstra, D. Poole, R. Dingwell, G. Keefe. 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J*, 47:567-572

Rodríguez, G. 2006. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Rev Med Vet* (12):35-55.

Rodríguez, G., D. Contreras, and M. Ordoñez. 2002. Caracterización de la mastitis bovina en el Valle de Ubaté. *Rev Med Vet* 2(4):57-66.

Ruegg P. 2012. New perspectives in udder health management. *Vet Clin Food Anim*. 28:149-163

Ruiz, A. K., P. Ponce, G. Gomes, R. A. Mota, E. Sampaio, E. R. Lucena, and S. Benone. 2011. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: Comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Rev. Salud Anim*. 33(1):57- 64.

Sandholm, M. 1995. Detection of inflammatory changes in the milk. Pages 89-104 in *The bovine udder and mastitis*. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed, Gummerus, Jyväskylä, Finland.

Sandholm, M. and S. Pyörälä. 1995a. Clinical examination of a mastitic cow. Pages 83-88 in *The bovine Udder and mastitis*. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed. Gummerus, Jyväskylä, Finland.

Sandholm, M. and S. Pyörälä. 1995b. Coliform mastitis. Pages 149-159 in *The bovine udder and mastitis*. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed. Gummerus, Jyväskylä, Finland.

Sanford, C. J., G. P. Keefe, J. Sanchez, R. T. Dingwell, H. W. Barkema, K. E. Leslie, and I. R. Dohoo. 2006. Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Preventive Veterinary Medicine* 77(1-2):96-108.

Schalm, O. and D. Noorlander. 1957. Experiments and observations leading to the development of California mastitis test. *Journal of Dairy Science* (130):199-204.

Seker E. 2010. Identification of *Candida* Species Isolated from Bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in western Turkey. *Mycopathologia*. 169:303-308

Shpigel, N. M. Winkler, G. Ziv, A. Saran. 1998. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 35: 1-9

Schreiner, D. A. and P. L. Ruegg. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *J Dairy Sci* 86(11):3460-3465.

Schukken, Y. H., H. W. Barkema, T. J. G. M. Lam, R. N. Zadoks, Y. H. Schukken, H. W. Barkema, T. J. G. M. Lam, and R. N. Zadoks. 2008. Improving udder health on well managed farms: mitigating the 'perfect storm'. Pages 21-35. 47 ref. in *Proceedings of International Conference, The Hague, Netherlands 30 September - 2 October 2008*. T. J. G. M. Lam and T. J. G. M. Lam, ed. *Mastitis control*.

Schukken, Y. H., R. N. Gonzalez, L. L. Tikofsky, H. F. Schulte, C. G. Santisteban, F. L. Welcome, G. J. Bennett, M. J. Zurakowski, and R. N. Zadoks. 2009. CNS mastitis: nothing to worry about? *Vet Microbiol* 134(1-2):9-14.

Sharif, S., B. Mallard, and J. Sargeant. 2000. Presence de glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Vetererinary Immunology and Immunopatoly* (76):231-238.

Shpigel, N. Y., M. Winkler, G. Ziv, and A. Saran. 1998. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 35(1):1-9.

Sitte, K., R. Brinkworth, I. J. East, and E. C. Jazwinska. 2002. A single amino acid deletion in the antigen binding site of BoLA-DRB3 is predicted to affect peptide binding. *Vet Immunol Immunopathol* 85(3-4):129-135.

Strandberg, E. and G. Shook. 1989. Genetic and economic responses to breeding programs that consider mastitis. *J. Dairy Sci* (72):2136-2142.

Sutra, L. and B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 40(2):79-89.

Takehima, S., N. Saitou, M. Morita, H. Inoko, and Y. Aida. 2003. The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene* 316:111-118.

Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Immunology* 165(10):5392-5396.

Talbot, B. G. and P. Lacasse. 2005. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock Production Science* (98):101-113.

Thorberg, B. M., M. L. Danielsson-Tham, U. Emanuelson, and K. Persson Waller. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci* 92(10):4962-4970.

Wang, X., S. Xu, X. Gao, H. Ren, and J. Chen. 2007. Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *J Genet Genomics* 34(5):406-412.

Wanger, A. R. and G. M. Dunny. 1984. Specific agglutination of *Streptococcus agalactiae* from bovine mastitis by casein components of bovine milk. *J Dairy Sci* 67(10):2441-2445.

Wanner, J., G. Rogers, M. Kehrl, J. Cooper. 1998. Intramammary infections in primiparous Holsteins: heritabilities and comparisons of bovine leukocyte adhesion deficiency carriers and noncarriers. *J. Dairy Sci.* 81, 3293-3299

Watts J. D. Lowery, J. Teel, S. Rossbach. 2000. Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J Dairy Sci.* 83:2373-2379

Weller, J., A. Saran, Y. Zeliger. 1992. Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 75, 2532-2540

Wilson, D. J., Y. T. Grohn, G. J. Bennett, G. R. N., Y. H. Schukken, and J. Spatz. 2007. Comparison of J5 Vaccinates and Controls for Incidence, Etiologic Agent, Clinical Severity, and Survival in the Herd Following Naturally Occurring Cases of Clinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* (90):4282-4288.

Yassin, A. F., H. Hupfer, C. Siering, and P. Schumann. 2011. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(Pt 6):1265-1274.

Zadoks, R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, Y. T. Grohn, and Y. H. Schukken. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci* 84(3):590-599.

Zadoks, R. N., W. B. van Leeuwen, D. Kreft, L. K. Fox, H. W. Barkema, Y. H. Schukken, and A. van Belkum. 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.

Zecconi, A., L. Cesaris, E. Liandris, V. Dapra, and R. Piccinini. 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis* 40(4):177-183.

CAPITULO 2

FACTORES ASOCIADOS A MASTITIS EN VACAS DE LA MICROCUENCA LECHERA DEL ALTIPLANO NORTE DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

Objetivos de la Tesis a los cuales apunta este artículo:

- Determinar la prevalencia de mastitis en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.
- Determinar los factores de riesgo asociados a su presentación

FACTORES ASOCIADOS CON LA PRESENTACIÓN DE MASTITIS EN VACAS DE LA MICROCUENCA LECHERA DEL ALTIPLANO NORTE DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

Nicolás Ramírez Vásquez^{*} / Ofelia Arroyave Henao^{} / Mario Cerón-Muñoz^{***} / Manuel Jaramillo^{****} / Juan Cerón^{*****} / Luis Guillermo Palacio^{*****}**

Publicado en Revista Medicina Veterinaria N° 22 julio-diciembre del 2011

Categoría A2 de Publindex

^{*}Médico Veterinario. MSc cPhD. Docente de la Escuela de Medicina Veterinaria. Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia, Carrera 75 65-87, Medellín, Colombia. nicoramirez2010@gmail.com

^{**} Bacterióloga. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia.

^{***} Zootecnista. MSc PhD. Docente de la Escuela de Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia.

^{****} Médico Veterinario Cooperativa Lechera de Antioquia, Colanta.

^{*****} Zootecnista MSc Cooperativa Lechera de Antioquia Colanta.

^{*****} Médico Veterinario MSc PhD. Docente de la Escuela de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro.

Proyecto Cofinanciado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, La Universidad de Antioquia, Colanta y la Federación de Asociaciones de Ganaderos, FAGA

Resumen

Se efectuó un estudio de corte sobre la prevalencia de mastitis bovina en una muestra representativa de las granjas lecheras del Altiplano Norte de Antioquia (Colombia). Se evaluaron los resultados del California Mastitis Test (CMT), Recuento de Células Somáticas (RCS), cultivo bacteriológico de leche y se analizaron los factores de riesgo asociados a mastitis bovina. El análisis estadístico de la información se efectuó por medio de estadística descriptiva, análisis de razón de prevalencias y regresión logística multinivel. Se encontró por la prueba de CMT un 20% de cuartos afectados con mastitis, la prevalencia de mastitis subclínica por vaca fue del 39,5% y la de mastitis clínica fue del 1,7%. Se efectuaron 648 cultivos de muestras de leche, de las cuales 23,9% fueron negativas, 34% positivas a *Streptococcus agalactiae* y 10,2% a Estafilococo coagulasa negativo. El análisis de regresión reveló que las vacas que tuvieron más de seis meses en lactancia presentaron una Odds Ratio (OR) de 2,65 (IC 95% 1,30-5,38) en comparación con las de un mes de lactancia ($p < 0,05$). Se halló un OR de 1,24 (IC 95% 1,06-1,46) para la asociación de la edad y la mastitis ($p < 0,05$). Para el lavado de manos se encontró un OR de 0,36 (IC 95% 0,19-0,69) en comparación con no hacerlo ($p < 0,05$). En conclusión, se halló una alta frecuencia de mastitis por vaca. El microorganismo hallado más frecuentemente fue el *Streptococcus agalactiae*. El trauma podría ser una causa importante de mastitis dado que no se observó crecimiento bacteriano en 23,9% de los cultivos de muestras de leche de cuartos con mastitis.

Palabras clave: California mastitis test, calidad de leche, infección, recuento de células somáticas.

Factors associated to mastitis in cows from the dairy production basin in the Northern Highlands of Antioquia, Colombia

Abstract

A study was conducted on the prevalence of bovine mastitis in a representative sample from dairy farms in the northern highlands of Antioquia, Colombia. The results of California Mastitis Test (CMT) were evaluated, as well as the Somatic Cell Counts (SCC) and the bacteriological culture of milk. The risk factors associated with bovine mastitis were also analyzed, and the statistical analysis of the information was made through descriptive statistics, prevalence ratio analysis and multilevel logistic regression. The CMT detected that 20% of the quarters were affected with mastitis, the prevalence of subclinical mastitis per cow was 39.5%, and of clinical mastitis was 1.7%. Six hundred and forty eight (648) cultures were made of milk samples, 23,9% of which came out negative, 34% positive with *Streptococcus agalactiae* and 10.2% with coagulase-negative staphylococci. The regression analysis revealed that cows that had more than six months of lactation showed an Odds Ratio (OR) of 2.65 (IC 95% 1,30-5,38) compared to cows that had one month of lactation ($p < 0.05$). An OR of 1.24 (IC 95% 1,06-1,46) was found in the association between age and mastitis ($p < 0.05$). Finally, an OR of 0.36 (IC 95% 0,19-0,69) was found associated to washing hands compared to not doing it ($p < 0.05$). In conclusion, a high prevalence of mastitis per cow was found. The most frequently found micro-organism was *Streptococcus agalactiae*. Trauma could be a major cause of mastitis since no bacterial growth was observed in 23.9% of the milk sample cultures from cow with mastitis.

Key words: Californian mastitis test, milk quality, infection, Somatic cell count

Fatores associados à mastite em vacas da microbacia leiteira do altiplano norte da Antioquia, Colômbia

Resumo

Realizou-se um estudo de corte sobre a prevalência da mastite bovina em uma mostra representativa das fazendas leiteiras do altiplano norte de Antioquia, Colômbia. Foram avaliados os resultados do exame CMT (*California Mastitis Test*), Recontagem das Células Somáticas (RCS) e cultivo bacteriológico do leite, e analisaram-se os fatores de risco associados a mastite bovina. A análise estatística da informação foi efetuado por meio da estatística descritiva, análise de razão de prevalências e regressão logística multinível. Com o exame CMT detectou-se 20% de quartos afetados com mastite, a prevalência de mastite subclínica por vaca foi de 39,5% e a de mastite clínica foi de 1,7%. Efetuaram-se 648 cultivos de mostras de leite, das quais 23,9% foram negativas, 34% positivas a *Streptococcus agalactiae* e 10,2% a Estafilococo coagulasse negativo. A análise de regressão revelou que as vacas que tiveram mais de seis meses lactação apresentaram uma Odds Ratio (OR) de 2,65 (IC 95% 1,30-5,38 em comparação com as de um mês de lactação ($p < 0,05$). Foi encontrado um OR de 1,24 (IC 95% 1,06-1,46) para associação da idade e mastite ($p < 0,05$). Para a lavagem de mãos encontrou-se um OR de 0,36 (IC 95% 0,19-0,69) em comparação com não faze-lo ($p < 0,05$). Em conclusão, foi encontrada uma alta frequência de mastite por vaca. O micro-organismo encontrado com mais frequência foi o *Streptococcus agalactiae*. O trauma poderia ser uma causa importante de mastite dado que não se observou crescimento bacteriano em 23,9% dos cultivos de mostras de leite de quartos com mastite.

Palavras chave. California Mastitis Test, qualidade do leite, infecção, recontagem de células somáticas.

Introducción

Según la Federación Internacional de Lechería, la mastitis se define como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria (Fox, 2009; Archbald, 1999). La forma clínica se caracteriza por inflamación con calor, dolor, rubor y aumento de tamaño de la ubre o cambios en la apariencia de la leche, o todos los signos. Por el contrario, la mastitis subclínica no conlleva cambios visibles en la leche o en la ubre y se caracteriza por reducción en la producción láctea, alteración en la composición de la leche y presencia de componentes inflamatorios en la misma (International Dairy Federation, 1987). La etiología de la mastitis puede ser infecciosa, traumática o tóxica. Las bacterias causantes pueden ser clasificadas como patógenos mayores y menores de la glándula mamaria, los patógenos mayores incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Actinomyces pyogenes*, los cuales son contagiosos y las enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* y bacterias consideradas ambientales como *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*. Los patógenos menores incluyen *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Nocardia*, *Listeria* y algunos hongos y levaduras (Archbald 1999; International Dairy Federation 1987), aunque cualquier bacteria puede infectar la ubre (Ericsson et al. 2009).

Entre los patógenos más prevalentes asociados con mastitis subclínica en vacas en lactancia están los Estafilococos (Taponen y Pyörälä, 2009), entre ellos los Estafilococos Coagulasa Negativo (ECN) que tienen una prevalencia en infecciones mamarias que puede variar entre 5,5% y 27,1% por cuarto afectado (Thorberg et al. 2009). Otros agentes comprometidos en mastitis son los Estafilococo Coagulasa Positivo (ECP), estreptococos ambientales y bacterias coliformes (Fox, 2009). El ECN ha sido descrito como una bacteria oportunista componente de la flora normal de la piel, pero rara vez ocasiona la forma clínica de la enfermedad, mientras que el ECP más asociado a mastitis es *Staphylococcus aureus* (Taponen y Pyörälä, 2009).

Para el diagnóstico de la mastitis subclínica, el Recuento de Células Somáticas (RCS) ha demostrado ser una excelente herramienta y se ha usado para estimar la reducción en la producción de leche asociada a este tipo de mastitis (Durr et al. 2008).

Los factores de riesgo (FR) para la presentación de la mastitis bovina pueden ser del animal, ambientales o del agente patógeno. Es así como la incidencia de la infección aumenta con la edad, manejo deficiente, alojamiento inadecuado, viabilidad y virulencia del agente y su susceptibilidad frente a los antimicrobianos (Nyman et al. 2007). Entre los factores de riesgo más fuertemente asociados con mastitis se ha encontrado: alta producción de leche, bajo RCS y sellado de los pezones (Suriyasathaporn, 2000, Nyman et al. 2007). Sin embargo; estos estudios se efectuaron en diferentes países con condiciones variadas, lo cual explicaría los resultados diversos (Nyman et al. 2007).

En Colombia se hallaron reportes sobre los factores de riesgo asociados a mastitis entre los cuales están: estudio sobre mastitis bovina diagnosticada mediante CMT, realizado en la Sabana de Bogotá en 2.355 vacas, en el cual se halló 58,8% de vacas afectadas con mastitis y 38,39% de cuartos positivos, así mismo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto al tipo de ordeño, debido a que el sistema de ordeño manual presentó menor porcentaje de vacas con mastitis subclínica (77,9%) que el mecánico (92,47%). Las bacterias más frecuentemente aisladas fueron *Streptococcus agalactiae* (35,4%) y *Staphylococcus aureus* (32,5%) siendo la primera más frecuente en el ordeño manual que en el mecánico (Rodríguez et al. 2002). En otro estudio efectuado en el norte de Antioquia, se halló asociación de positividad al CMT con el número de partos y con el ordeño mecánico y no hubo asociación con los días en lactancia (Ramírez et al. 2001).

Otros autores, en la sabana de Bogotá, hallaron asociación entre las tasas de infección de la glándula mamaria con el número de lactancias (Rodríguez, 2006). Una investigación efectuada en hatos bovinos de los departamentos del Meta y Cundinamarca halló asociación de la mastitis con tipo de ordeño, número de vacas en ordeño y grupo racial (Parra et al. 1998). En otra investigación la infección subclínica de la glándula mamaria por *Staphylococcus aureus* tuvo como factores de riesgo las unidades de producción lechera familiar, el tipo de ordeño, higiene del ordeño y densidad poblacional de las explotaciones (Barajas et al. 1999).

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de mastitis y estudiar los factores asociados a esta enfermedad en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.

Materiales y métodos

Para definir la línea de base, correspondiente al primer muestreo de cada finca, se recolectó muestras y demás información, entre los meses de enero y agosto de 2009 en seis municipios de la Microcuenca lechera del Altiplano Norte de Antioquia, (Don Matías, Belmira, Entrerriós, San José de la Montaña, San Pedro de los Milagros y Santa Rosa de Osos).

Con base en el número de predios por municipio y la cantidad de leche producida se calculó el tamaño óptimo de muestra según procedimientos descritos por otros autores (Martínez, 2003; Martin et ál., 1987) para muestreos por proporciones con estratificación según el número de animales. El número de vacas a muestrear se calculó para una población finita con los siguientes criterios:

- a. Probabilidad de encontrar animales con mastitis 34% ($p = 0,34$) (Ramírez, 2001).
- b. Error permitido o tolerado: $h = \pm 5\%$.
- c. Confiabilidad 95%.
- d. El censo estimado de vacas en la región se estableció en 119.222 animales.

Con base en estos criterios se obtuvo una muestra de 324 animales que se incrementaron en un 30% para compensar las pérdidas (predios que se retiran del proyecto, cambio de uso del predio etc.), para un total de 421 animales inicialmente.

De acuerdo a datos oficiales (Secretaria de Agricultura de Antioquia, 2008) en el Norte del departamento había, en promedio, 15 vacas en producción por hato, por lo que se calculó muestrear 28 hatos, para compensar posibles pérdidas en el seguimiento durante la ejecución de la investigación se incrementó el número de hatos en un 15%. Es de anotar que si bien inicialmente según los datos demográficos la muestra de vacas se había calculado en 421 animales, al seleccionar los hatos, el número real de animales a muestrear quedó en 877 ya que definió efectuar las pruebas a todos los animales en producción de cada hato para obtener una medida más real de la enfermedad.

Colecta de muestras de leche y realización de pruebas

A todas las vacas incluidas en el estudio se les efectuó la prueba de California Mastitis Test (CMT). El CMT se efectuó según la metodología descrita por Blowey y Edmonson (1995). El

resultado se interpretó como negativo (-) cuando no hubo formación visible de gel, sospechosa (S o T) cuando en el fondo de la paleta se formó una película, débilmente positiva (+) cuando en el fondo de la paleta se formaron grumos que desaparecían rápidamente, positiva (++) cuando hubo presencia de grumos reforzantes y muy positiva (+++) cuando se formó un gel que no desapareció al dejar de girar la paleta. Las muestras con un resultado al CMT mayor o igual a trazas se les efectuó Recuento de Células Somáticas (RCS) que se realizó de forma automatizada por medio del Contador De Células Somáticas, DCC, Delaval[®] y el equipo Fossomatic, Foss[®]. Las muestras con un RCS superior a 200.000 cel/mL, se les efectuó cultivo, en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia.

Cuando se presentó un caso de mastitis clínica, un médico veterinario efectuó el examen clínico correspondiente, colectó muestra de leche de los cuartos afectados, la transportó al laboratorio para el cultivo y efectuó las recomendaciones para el tratamiento, control y prevención del problema.

Procedimiento para la colección de la muestra de leche

El personal encargado se lavó y se desinfectó las manos antes del muestreo. Los primeros chorros (aproximadamente 10 ml) se ordeñaron en una copa y se verificó la presencia de cambios en la apariencia de la leche. Estos cambios podrían ser grumos, coágulos o sangre. El propósito de la eliminación de los primeros chorros es extraer la flora bacteriana normal del canal y del orificio del pezón para minimizar la contaminación de la leche. Si la ubre y el pezón estaban sucios se procedió a lavarlos con agua y a secar cada cuarto con una toalla de papel individual. La limpieza y el muestreo de los pezones se realizaron en el sitio de ordeño.

Para la toma de la muestra de leche se procedió de la siguiente manera: se realizó desinfección con alcohol etílico al 70%, a la tercera parte distal de cada pezón, en sentido del ápice a la base, usando un copo de algodón por cuarto. Posteriormente, se secó el exceso de desinfectante con un algodón limpio para evitar el goteo de este dentro del recipiente usado para coleccionar la muestra.

De cada cuarto se extrajeron 5 ml de leche que se depositaron en un recipiente, que se sujetó casi horizontalmente para evitar la entrada de contaminantes (Honkanen-Buzalski, 1995).

Cultivo y aislamiento bacteriano

Las muestras con una reacción de CMT mayor o igual a T (trazas), se cultivaron en el laboratorio con el fin de identificar los microorganismos patógenos de acuerdo con procedimientos estandarizados (National Mastitis Council, 1987)

Se realizaron pruebas para la identificación de los siguientes microorganismos:

Staphylococcus aureus, Estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella spp*, *Pasteurella multocida*, *Nocardia spp*, *Listeria monocitogenes*, *Pseudomona sp* y levaduras como: *Candida spp*, *Geotrichum spp* y *Trichosporum spp*.

Análisis estadístico

Para el recuento de células se estimó la media geométrica con su intervalo de confianza. Se estimó la prevalencia general de mastitis y la razón de prevalencias según factores característicos del animal y factores relacionados con la finca, los cuales fueron incluidos en el modelo final de análisis. Se reportaron los intervalos de confianza del 95%. Se utilizó el criterio de Hosmer-Lemeshow ($p < 0,25$) para seleccionar las variables que entraron al modelo y en estas se evaluó confusión por la comparación entre los Odds Ratio (OR) crudo y ajustado y la interacción se evaluó a partir del cálculo del incremento de la razón de verosimilitud donde se compararon modelos con y sin el término de interacción. Se utilizó un modelo de regresión logística multinivel con los niveles de agregación vaca y finca para determinar los factores relacionados con la presentación de mastitis. Se estimó el coeficiente de correlación intraclase a partir de los dos componentes de varianza. Se calcularon los OR ajustados con sus intervalos de confianza del 95%, se consideró significación estadística si $p < 0,05$. Se utilizó Stata 11.1 para los análisis.

El modelo utilizado puede ser representado como:

$Y_{ij} \sim$ Resultado dicotómico binario (P_{ij})

Logit (P_{ij}) = $\beta_0 + \beta_1$ Tipo de ordeño_j + β_2 dos partos estimado_{ij} + β_3 tres partos estimados_{ij} + β_4 cuatro o más partos_{ij} + β_5 Sellado adecuado_{ij} + β_6 JxH_{ij} + β_7 H_{ij} + β_8 días60_{ij} + β_9 días90_{ij} + β_{10} días120_{ij} + β_{11} días150_{ij} + β_{12} días>180_{ij} + β_{13} lavado de manos_{ij} + e_{ij} .

En donde los sufijos i, j denotan la i-ésima vaca y la j-ésima finca, respectivamente.

Y_{ij} = La variable respuesta en el i-ésima vaca y la j-ésima finca. P_{ij} = la probabilidad ajustada en la respuesta, β_1 a β_{13} = Coeficientes asociados a cada covariable. e_{ij} = Efecto residual aleatorio.

Resultados

Información de hatos y de animales

Se colectaron muestras de leche de n=877 animales en 37 hatos, de estas se registró información de la raza a 832 vacas de las cuales el 83,5% fue Holstein, 9,6% Jersey x Holstein y el porcentaje restante (6,9%) correspondió a otras razas o cruces entre diferentes razas.

El promedio de vacas en producción por hato fue $29,48 \pm 14,1$ la edad promedio de las vacas fue $5,4 \pm 2,4$ años la producción promedio de leche por vaca el día de la visita fue $17,3 \pm 6,3$ litros y el número promedio de partos de las vacas evaluadas fue $3,4 \pm 2,2$.

De los 37 hatos, 70,4% efectuaba ordeño manual, 27% de los ordeñadores era a su vez el propietario del hato, 77,3% de los ordeñadores no se lavaban las manos al iniciar el ordeño y 92,8% no se lavaban las manos antes de ordeñar cada vaca, el presellado lo efectuó el 57% y el sellado el 84,2% de estos el 100% uso yodado para tal efecto.

California Mastitis Test

Se encontró que 20,7% (726) de los 3.508 cuartos evaluados con la prueba tenían algún grado de mastitis subclínica (\geq a una cruz hasta 3 cruces), de estos 8,4% positivos con una cruz, 8,1% y 4,2% con dos y tres cruces respectivamente; 20 cuartos (0,6%) presentaron mastitis clínica. (Tabla 1).

La prevalencia de mastitis subclínica en las 877 vacas evaluadas fue de 39,5% (347 vacas) entendida esta como el RCS ≥ 200.000 cel/mL en al menos un cuarto de la vaca, mientras que la prevalencia de mastitis clínica fue de 1,7%.

Recuento de células somáticas (RCS)

De las 775 muestras de cuartos positivos al CMT, la media geométrica del RCS (cel/mL) para CAI, CPI, CAD y CPD, fueron: 625640 (IC95%, 532289 y 735363) 892110 (IC95%, 762325 y 1043991), 789985 (IC95%, 670811 y 930332) y 747522 (IC95%, 634320 y 880925), respectivamente.

Tabla 1. Resultados del CMT según el grado de reacción de muestras de leche de 877 vacas de 37 hatos bovinos del Altiplano Norte de Antioquia

RESULTADO	CPI		CAI		CPD		CAD		TOTAL	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Negativo	683	77,9	653	74,5	685	78,1	666	75,9	2.687	76,6
Sospecha	7	0,8	14	1,6	11	1,3	11	1,3	43	1,2
+	61	7	82	9,4	76	8,7	76	8,7	295	8,4
++	77	8,8	73	8,3	64	7,3	70	8	284	8,1
+++	39	4,4	36	4,1	32	3,6	40	4,6	147	4,2
Subtotal cuartos positivos*	177	20,2	191	21,8	172	19,6	186	21,2	726	20,7
Clínica	2	0,2	11	1,3	2	0,2	5	0,6	20	0,6
Cuarto perdido	8	0,9	8	0,9	7	0,8	9	1	32	0,9
Total	877	100	877	100	877	100	877	100	3.508	100

*Considerando positivos los cuartos con una o más cruces en CMT

CAD: Cuarto Anterior Derecho.

CAI: Cuarto Anterior Izquierdo

CPD: Cuarto Posterior Derecho

CPI: Cuarto Posterior Izquierdo

Cultivo y aislamiento de microorganismos

Se efectuaron 648 cultivos de muestras de leche procedentes de cuartos individuales de 329 vacas que presentaron un RCS mayor que 200000 cel/mL, de las cuales, no presentaron crecimiento el 23,9% de las muestras. La bacteria más frecuentemente aislada fue *Streptococcus agalactiae* en

34% de los cultivos realizados, seguido por *Estafilococo coagulasa negativo* y *Corynebacterium spp.* con un 10,2 y 8,6% cada uno, (Tabla 2).

Análisis de los factores de riesgo y mastitis

La razón de prevalencias (RP) para raza fue de 1,57 (IC 95% 1.01, 2.44 $p=0,033$), lo que reveló un mayor riesgo de presentar mastitis para vacas de raza Holstein con respecto a vacas de otras razas, que fueron las de comparación. La RP aumentó a medida que aumentaron los meses de lactancia, con relación al primer mes, también aumentó a medida que se incrementó el número de partos. Se encontró una RP=1,14 para mastitis asociada al ordeño manual con respecto al ordeño mecánico.

En relación a la rutina de ordeño y la mastitis se encontró que el lavado de manos y el sellado fueron factores asociados a protección contra la mastitis ya que presentaron una RP de 0,58 y 0,74 respectivamente (Tabla 3).

Tabla 2. Frecuencia de aislamiento de bacterias en leche procedente de cuartos afectados con mastitis

Resultado del cultivo	N	%
<i>Strept. agalactiae</i>	220	34,0
<i>Negativo</i>	154	23,9
<i>Estafilococo coagulasa negativo</i>	87	13,4
<i>Corybenacterium spp.</i>	56	8,6
<i>Strept. Dysgalactiae</i>	47	7,3
<i>Staph.aureus</i>	33	5,1
<i>Strept uberis</i>	18	2,8
<i>Staph intermedius</i>	10	1,5
<i>Otros (Bacterias de baja frecuencia)</i>	8	1,2
<i>Strept. Pyogenes</i>	5	0,8
<i>E. coli</i>	6	0,9
<i>Candida</i>	4	0,6
Total	648	100.0

El modelo que resume los factores de riesgo para la presentación de mastitis se presenta en la Tabla 4. Las vacas que tenían 3 partos presentaron un OR de 2,07 (IC 0.98 – 4.40) cuando fueron comparadas con las vacas de un parto ($p=0,056$). Las vacas que tuvieron más de seis meses en lactancia presentaron un OR de 2,65 (IC 1,30 – 5,38) en comparación con las de un mes de lactancia ($p<0,05$). Para la edad se obtuvo un OR de 1,24 (IC 1,06 – 1,46) ($p<0,05$) y para el lavado de manos de 0,36 (IC 0,19 – 0,69) ($p<0,05$).

Tabla 3. Análisis de razón de prevalencias de mastitis con relación a varios factores relacionados con la vaca y la finca

Factores	Mastitis n (%)	Razón de prevalencias	(IC95%)	P	N (%)
Raza					
Otras razas o cruces	15 (27.3)	1			55 (6.6)
HolsteinxJersey	21 (26.6)	0.97	(0.5 – 1.71)	0.91	79 (9.5)
Holstein	299 (42.9)	1.57	(1.0 – 2.44)	0.033	697 (83.9)
Mes lactancia					
Mes 1	26 (24.3)	1			107 (13.1)
Mes 2	33 (33.0)	1.36	0.87 – 2.1	0.21	100 (12.2)
Mes 3	25 (30.9)	1.27	0.79 – 2.02	0.4	81 (9.9)
Mes 4	31 (38.3)	1.58	1.02 – 2.43	0.056	81 (9.9)
Mes 5	33 (44.6)	1.84	1.20 – 2.8	<0.01	74 (9.0)
Más de 6	177 (47.2)	1.94	1.36 – 2.75	<0.01	375 (45.8)
Número partos					
1	39 (21.7)	1			180 (24.0)
2	40 (31.0)	1.43	0.98 – 2.09	0.08	129 (17.2)
3	58 (42.6)	1.97	1.40 – 2.76	<0.01	136 (18.1)
4 o mas	167 (54.8)	2.53	1.87 – 3.39	<0.01	305 (40.7)
Tipo ordeño					
Ordeño mecánico	98 (37.7)	1			260 (29.6)
Ordeño manual	264 (42.8)	1.14	0.94 – 1.36	0.18	617 (70.4)
Lavado manos					
No	245 (46.5)	1.00			527 (77.3)
Si	42 (27.1)	0.58	0.44 – 0.76	<0.01	155 (22.7)
Sellado					
No se hace	75 (54.0)	1.00			139 (17.0)

Factores	Mastitis n (%)	Razón de prevalencias	(IC95%)	P	N (%)
Inadecuado	31 (28.7)	0.53	0.38– 0.74	<0.01	108 (13.2)
Adecuado	230 (40.1)	0.74	0.61 – 0.89	<0.01	573 (69.9)

El resultado de la RP mayor de uno significa un aumento en el riesgo y el dato menor de 1

significa una disminución en el riesgo de padecer la mastitis

Tabla 4. Análisis de regresión de varios factores asociados a mastitis

n=482

MASTITIS	OR	EE	Valor p	IC 95%
Ordeño manual	0,81	0,336	0,624	[0,36 – 1,83]
Dos partos	1,16	0,441	0,688	[0,55 – 2,44]
Tres partos	2,07	0,797	0,056	[0,98 – 4,40]
Cuatro o más partos	1,66	0,802	0,289	[0,64 – 4,28]
Sellado inadecuado	0,78	0,739	0,798	[0,12 – 4,96]
Sellado adecuado	0,70	0,206	0,227	[0,39 – 1,24]
Jersey x Holstein	1,17	0,714	0,793	[0,35 – 3,87]
Holstein	1,10	0,581	0,855	[0,39 – 3,09]
Mes de lact 2	0,82	0,379	0,679	[0,33 – 2,03]
Mes de lact 3	1,46	0,652	0,394	[0,61 – 3,50]
Mes de lact 4	1,92	0,854	0,141	[0,80 – 4,59]
Mes de lact 5	1,45	0,685	0,430	[0,57 – 3,66]
Mes de lact 6 o más	2,65	0,958	0,007	[1,30 – 5,38]
Edad	1,24	0,103	0,008	[1,06 – 1,46]
Lavado de manos	0,36	0,119	0,002	[0,19 – 0,69]

OR: Odds Ratio

EE: Error estándar

Valor p: nivel de significancia

IC95%: Intervalo de Confianza del 95%

Modelo de los factores de riesgo y mastitis por la bacteria *Streptococcus agalactiae*

El modelo que resume los factores de riesgo para la presentación de mastitis causada por la bacteria *Streptococcus agalactiae* se presenta en la Tabla 5. Como se puede observar sólo el lavado de manos presentó un resultado estadísticamente significativo con un OR de 0,258 (IC 95% 0,071 – 0,934) cuando se comparó lavarse las manos con no lavárselas $p < 0,05$.

Tabla 5. Factores asociados a la presentación de mastitis por *Streptococcus agalactiae* n=240

MASTITIS	OR	EE	Valor p	IC95%
Ordeño manual	3,04	2,50	0,174	[0,611 – 15,208]
Jersey x Holstein	0,312	0,354	0,305	[0,033 – 2,88]
Holstein	0,44	0,444	0,416	[0,060 – 3,18]
Sellado inadecuado	1,40	1,36	0,724	[0,210 – 9,39]
Sellado adecuado	1,74	0,897	0,281	[0,635 – 4,78]
Lavado de manos	0,258	0,169	0,039	[0,071 – 0,934]

OR: Odds Ratio

EE: Error estándar

Valor p: nivel de significancia

IC95%: Intervalo de Confianza del 95%

Discusión

Inicialmente, con el fin de determinar la sensibilidad y la especificidad del CMT para el diagnóstico de mastitis subclínica se realizaron análisis del RCS vs CMT y se determinó que la especificidad del CMT fue del 97% y la sensibilidad fue del 82% (Ramírez et al. 2010).

Los hallazgos al CMT de cuartos positivos a mastitis subclínica con 1, 2 y 3 cruces del 20%, están acordes a lo hallado en otros estudios (Calderon y Rodríguez, 2008; Trujillo, 2011) que reportaron 28,4% y 19,9% en hatos de lechería especializada de la sabana de Bogotá y del Oriente Antioqueño, respectivamente.

El porcentaje relativamente alto de vacas y de cuartos afectados con mastitis hallado en la zona, podría estar relacionado con algunas deficiencias en la rutina de ordeño como la falta de higiene del ordeñador ya que el 77,3% de los ordeñadores no se lavaban las manos al momento del

ordeño, y con deficiencias en la práctica del presellado y el sellado, rutinas importantes en la prevención de la mastitis bovina (Philpot y Nickerson, 1991) realizadas por un 57 y un 84,2%, respectivamente, de ordeñadores en las granjas estudiadas.

De las muestras de leche enviadas para cultivo al laboratorio, el aislamiento más frecuente correspondió al *Streptococcus agalactiae*, similares resultados fueron obtenidos por otros autores (Ramírez et al. 2001; Rodríguez et al. 2002; Rodríguez, 2006). Otros autores reportaron una prevalencia de esa bacteria del 6,84% (Calderón et al. 2008) entre tanto otro estudio halló una mayor frecuencia de *Streptococcus dysgalactiae* (Trujillo et al. 2011).

Es bien conocido que *Streptococcus agalactiae* es altamente contagiosa (Keefe, 1997; Sandholm, 1995) uno de sus reservorios es la leche de ubres infectadas, pero también se puede encontrar en superficies que tienen contacto reciente con leche contaminada, lo cual incluye equipo y utensilios usados en el ordeño y las manos de ordeñador (Calderon y Rodríguez, 2008; Keefe, 1997).

En orden de frecuencia, la segunda bacteria hallada en el presente trabajo, correspondió a las del grupo de Estafilococos Coagulasa Negativos (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. saprofiticus*) con un 13,3% del total, similares resultados han sido obtenidos por otros autores quienes han reportado un 14,6% (Ramírez, 2001). En este estudio no se obtuvo crecimiento en un 23,9% de los cultivos de leche, la frecuencia reportada en otros estudios ha sido de 16,4%, 24,4% y 38,9% (Ramírez, 2001; Calderón, 2008; Trujillo, 2011). Estos resultados podrían indicar la presencia de factores posiblemente traumáticos asociados a la presentación de mastitis en las vacas del estudio, infecciones crónicas por coliformes, presencia de un excretor intermitente, microorganismos que no crecen con los medios de cultivo estándar, entre otras.

Al efectuar el análisis de razón de prevalencias se observó una asociación positiva entre presentar mastitis en las vacas de varios partos cuando se compararon con las de un solo parto, lo cual fue confirmado en el análisis de regresión logística donde se observó una asociación directa de la mastitis al número de partos, resultado similar fue obtenido por Breen et al., (2009). Sin embargo, en el análisis de regresión este hallazgo sólo fue marginalmente significativo para vacas de tres

partos ($p=0.056$). El análisis de razón de prevalencias reveló una asociación positiva entre la mastitis (clínica y subclínica) y los meses de lactancia y el análisis de regresión corroboró esta asociación que fue estadísticamente significativa a partir del sexto mes ($p<0.05$). Este resultado concuerda con Busato et al., (2000) quienes en un estudio efectuado en 1907 vacas de 152 fincas en Suiza determinaron que las vacas entre 240 y 305 días postparto presentaron un mayor riesgo de mastitis (OR=1.74). De otro lado, Ramírez et al., (2001), no halló asociación entre los resultados del CMT con los días en lactancia. Con base en estos hallazgos contradictorios no se pudo establecer conclusiones de la asociación de los días en lactancia con la mastitis y se requieren estudio con mayor poder para determinar este tipo de asociación.

El lavado de manos fue factor protector en ambos análisis (RP= 0,58; OR=0,36; $p<0,05$). Los datos del análisis mostraron al sellado adecuado en ambos análisis como un factor protector para mastitis, sin embargo, la asociación no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). El lavado de manos estuvo asociado a reducción de la mastitis por *Streptococcus agalactiae* (OR=0,25; $p<0,05$). Este último aspecto estaría relacionado con una mejor higiene de las manos que influiría en la disminución de la transmisión.

Conclusiones

Se halló una alta frecuencia de mastitis por vaca en donde el microorganismo hallado más frecuentemente fue el *Streptococcus agalactiae*. Dado que no se observó crecimiento bacteriano en 23,9% de los cultivos de muestras de cuartos con mastitis, se podría pensar en el trauma como una causa importante de mastitis, otras causas posibles son infecciones crónicas por coliformes, la presencia de un excretor intermitente como en las infecciones crónicas por *S. aureus* o la presencia de un microorganismo que no crece con los medios de cultivo estándar (*Mycoplasma* spp.). El lavado de las manos fue un factor protector contra mastitis, mientras que la edad, y el tiempo de la lactancia (seis meses) fueron identificados como factores de riesgo.

Agradecimientos

Esta investigación se desarrolló gracias a la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, MADR, la Universidad de Antioquia, COLANTA y la Federación de Asociaciones de Ganaderos de Antioquia FAGA.

Referencias

Archbald L. Reproductive diseases. Current Veterinary Therapy 3, Food Animal Practice. 1999 pp 563 – 568

Barajas J., Jaramillo J. y Velásquez V. Factores de riesgo asociados a infecciones subclínicas producidas por los biotipos humano y bovino de *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria de vacas en lactancia. Revista Veterinaria y Zootecnia de Caldas. 11 (1999):30–39

Blowey, R. y Edmonson, P. (1995). Mastitis control un dairy herds. UK: Farming Press Books.

Breen J. Green M. y Bradley J. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. Journal of Dairy Science. 92 (2009): 2551-2561

Calderon A. y Rodríguez V. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 21(2008): 582-589

Durr J., Cue R., Monardes H., Moro-Mendez J. y Wade K. Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. Livestock Science. 117 (2008):225-232

Ericsson H., Lindberg A., Persson K., Ekman T., Artursson K., Nilsson-O M. y Bengtsson B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors Veterinary Microbiology. 137 (2009):90–97

Fox L. Prevalence, incidence and risk factor for heifers mastitis. *Veterinary Microbiology*. 134 (2009):82-88

Honkanen-Buzalski T. Sampling technique, transportation and history. In the bovine udder and mastitis. University of Helsinki. Helsinki. 1995 pp 111-112

International Dairy Federation. Bovine mastitis Definitions and guidelines for diagnosis. IDF Bulletin. Brussels, Belgium. 1987 pp 211

Keefe, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.* 38 (1997): 429-437.

Keefe G., Dohoo R. y Spangler E. Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island. *Journal of Dairy Science*. 80 (1997):464-470

Martin, S., Meek, A. y Willeberg, P. (1987). *Veterinary Epidemiology. Principles and Methods*. Ames: Iowa State University Press.

Martínez, J. (2003). Introducción al muestreo (pp 1-17). En *Memorias del Simposio de Medicina Preventiva en Bovinos del trópico*. México: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos.

National Mastitis Council Laboratory and Field Hand book on bovine mastitis (1987). pp. 25-147

Nyman A., Ekman T., Emanuelson U., Gustafsson A., Holtenius K., Persson K. y Hallén Sandgren C. Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. *Preventive Veterinary Medicine*. 78. 2 (2007):142-160

Parra J., Martínez M., Pardo H. y Vargas S. Mastitis y la calidad de la leche en el piedemonte del Meta y Cundinamarca. *Boletín de Investigación N°2*. Corpoica-PRONATTA. 1998. 52 pp

Philpot N. y Nickerson S. Mastitis Prevention by Hygiene In: *Mastitis: Counter Attack a Strategy to combat mastitis*. Babson Bros Co. 1991. pp 53-60

Ramírez N., Gaviria G., Arroyave O., Sierra B. y Benjumea J. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 14.1 (2001):76 – 87

<http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/19>

Ramírez N., Cerón J., Jaramillo M., Arroyave O. y Palacio L. Diagnóstico de mastitis en el norte de Antioquia. *Memorias VII Seminario Internacional competitividad en carne y leche*. Medellín. Octubre 21 y 22 de 2010. 2010 pp 69-78

Rodríguez G., Contreras D. y Ordoñez M. Caracterización de la mastitis bovina en el Valle de Ubaté. *Revista de Medicina Veterinaria* 2. 4 (2002):57- 66

Rodríguez G. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. 12 (2006):35-55

Secretaria de Agricultura de Antioquia 2008. Anuario Estadístico de Antioquia. Último acceso a esta información junio de 2011. <http://www.antioquia.gov.co/antioquia-v1/organismos/agricultura/Anuario%20en%20CD%202009/inventario%20pec%20norte.mht>

Sandholm M., Honkanen-Buzalski T., Kaartinen L. y Pyörälä S. The bovine udder and mastitis. University of Helsinki. 1995. 312 pp

Suriyasathaporn W., Schukken Y., Nielen M. y Brands A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science* 83 (2000):1248-1255

Taponen S. y Pyörälä S. Coagulase-negative Staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology* 134 (2009): 29-36

Thorberg B., Danielsson-Tham M., Emanuelson U. y Persson K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative Staphylococci. *Journal of Dairy Science* 92 (2009):4962-4970

Trujillo C., Gallego A., Ramírez N. y Palacio L. Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 24 (2011):11-18

CAPITULO 3

Prevalencia, Tasa de incidencia y etiología de la mastitis bovina en ganado lechero de Colombia

Objetivos de la Tesis a los que apunta este artículo:

- Determinar la prevalencia e incidencia de mastitis en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.
- Identificar los microorganismos presentes en los casos de mastitis (clínica y subclínica) en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia
- Determinar la sensibilidad a los principales antibióticos de las bacterias aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis.

**Prevalencia, Tasa de incidencia y etiología de la mastitis bovina en
ganado lechero de Colombia**

**Prevalence, incidence rate and etiology of mastitis in dairy cattle
from Colombia**

Nicolás Ramírez V,^{1*} Msc, Ofelia Arroyave H,¹ Bact., Luis Palacio B,¹ Ph.D

¹Línea de Salud Pública y Epidemiología, Grupo de investigación Centauro, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21. Medellín, Colombia.

*Autor para correspondencia. Dirección: Carrera 75 65-87, Medellín, Colombia Tel: +5742199131 celular: 3137917029 Fax: +5742199111 E-mail: nicoramirez2010@gmail.com

RESUMEN

Objetivo. Determinar la prevalencia, la tasa de incidencia y la etiología de mastitis bovina en vacas lecheras y la sensibilidad antibiótica de los patógenos asociados. **Materiales y Métodos.** Se tomaron muestras de leche cada mes por 24 meses en vacas de 37 hatos. El diagnóstico de mastitis se efectuó por la prueba de Californian Mastitis Test (CMT), Recuento de Células Somáticas (RCS) y signos clínicos. Se realizó cultivo bacteriológico de las muestras positivas a mastitis y prueba de sensibilidad antibiótica de las bacterias. El análisis de los datos se efectuó por estadística descriptiva y se utilizó el comando survey de Stata[®] para los cálculos de prevalencia. **Resultados.** La prevalencia de mastitis subclínica a nivel de cuarto varió del 15.6% para el primer mes al 13.1% para el mes 24. La Tasa de Incidencia de Mastitis Clínica (TIMC) fue de 13.8 casos por 100 vacas-año a riesgo. Se aislaron 8.785 patógenos totales de casos de mastitis clínica y subclínica, siendo el *Streptococcus agalactiae*, el Estafilococo Coagulasa Negativo y el *Corynebacterium spp*, los más frecuentes con 34.5%, 17.5% y 13.1%, respectivamente. Se halló una alta sensibilidad de las bacterias para los antibióticos cloxacilina y cefoperazone. **Conclusiones.** En el presente estudio se encontró una tasa de incidencia de mastitis clínica de 13.8 casos por 100 vacas-año a riesgo. La prevalencia de mastitis subclínica varió a lo largo del periodo de estudio observándose una tendencia a la disminución al final del periodo de seguimiento. El patógeno más prevalente tanto en los casos de mastitis clínica como subclínica fue el *S. agalactiae*. Se requiere avanzar en el estudio de la resistencia a los antibióticos de las bacterias causantes de mastitis.

Palabras clave: MASTITIS, BACTERIAS PATOGENAS, ANTIBIÓTICOS, EPIDEMIOLOGIA.

ABSTRACT

Objective. To determine the prevalence, incidence rate, and the etiology of bovine mastitis in dairy cattle and the antibiotic susceptibility of the associated pathogens. **Materials and methods.** 37 farms were visited once per month per 24 months to collect milk samples from cows. Diagnosis of mastitis was done by California Mastitis Test (CMT), Somatic Cell Count (SCC) and clinical signs. Bacteriological culture of milk samples positive to mastitis and antibiotic susceptibility test to the isolates were also done. Descriptive statistics were computed for all variables of interest using standard methods and prevalence was calculated using the survey command of stata. **Results.** Subclinical mastitis prevalence at quarter level varied from 15.6% for the first month to 13.1% for the 24th month. Incidence Rate for Clinical Mastitis (IRCM) was 13.8 cases per 100 cows-year at risk. A total of 8.785 pathogens were isolated from clinical and subclinical mastitis cases with *Streptococcus agalactiae*, Coagulase Negative Staphylococci and *Corynebacterium spp*, as the main microorganisms isolated with 34.5, 17.5 and 13.1%, respectively. It was found a high bacteria sensitivity for the cloxacillin and cefoperazone antibiotics. **Conclusions.** It was found an incidence rate of clinical mastitis of 13.8 cases per 100 cows-years at risk. The prevalence of subclinical mastitis varied throughout the study period with a tendency to decrease at the end of follow up period. The most prevalent mastitis pathogen for clinical and subclinical mastitis was *S. agalactiae*. It is required to advance in the study of antibiotic resistance of bacteria causing mastitis.

Key words: Pathogens, Dairy cattle, antibiotics, epidemiology.

INTRODUCCIÓN

La Mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria, la cual es considerada como la enfermedad infecciosa más común de la vaca especializada en producción de leche (1) y a pesar de los esfuerzos realizados en las décadas pasadas para conocer sus causas y su control, aún es considerada la enfermedad más costosa en la industria lechera en el ámbito global (2). El impacto económico de la mastitis se ha estimado en un 33% del costo total de la salud en hatos lecheros (3) y en Europa, específicamente en Alemania, se han calculado pérdidas de 200 Euros por vaca por año (4).

Al revisar la información publicada sobre mastitis en ganado lechero en Colombia se observó que no es muy abundante o es limitada en su contenido y alcances. Uno de los estudios data de hace más de 20 años (5), mientras que otros trabajos han basado el diagnóstico de mastitis sólo en la prueba cualitativa del California Mastitis Test (CMT) o en signos clínicos (6), (7), (8). Otras investigaciones de años recientes son de corta duración y limitados a algunos hatos o a un municipio en particular (9), (10). Además, sólo se encontraron dos estudios que hubiesen analizado la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos en los cuales el número de muestras analizadas para algunas de las bacterias más importantes fue bajo (*S. agalactiae* n=4) (10), (*S. aureus* n=7) (9). Adicionalmente, no se encontraron datos publicados de la Tasa de Incidencia de Mastitis Clínica (TIMC) en Colombia. Es por eso que se requieren investigaciones de más largo alcance, tendientes a determinar la prevalencia e incidencia así como los patógenos específicos relacionados con la enfermedad y su sensibilidad antibiótica. En

consecuencia, el objetivo de este trabajo fue estimar la prevalencia e incidencia de mastitis subclínica y la TIMC así como los patógenos involucrados en su presentación y su sensibilidad antibiótica, en vacas de hatos lecheros de seis municipios de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones éticas: esta investigación fue avalada por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia, Colombia (Acta número 48, de diciembre de 2008).

Sitio de estudio. La Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia está compuesta por 17 municipios, en seis de ellos, San Pedro de los Milagros (N 06°34.799´- W075°30.134´), Santa Rosa de Osos (N 06°44.473´- W075°29.148´), Donmatias (N 06°29.432´-W075°23.015´), Belmira (N 06°36.265´- W075°40.630´), San José de la Montaña (N 06°52.124´- W075°40.525´), y Entrerrios (N 06°30.414´- W075°33.580´) se produce el 75% de la leche y se encuentra el 70% de las vacas de la zona (11). Por lo tanto, la muestra estuvo compuesta por 37 hatos ubicados en esos seis municipios, que se encuentran ubicados a una altura entre los 2.200 y los 2.581 m.s.n.m. y tienen una temperatura promedio de 14.5 °C.

Selección de los hatos. Los hatos evaluados en el estudio correspondieron a una muestra seleccionada por conveniencia entre 3.042 hatos registrados en los seis municipios. De esos predios, 120 fueron invitados a participar, 99

aceptaron, 21 declinaron la aceptación y por último 32 hatos fueron seleccionados en la muestra. El número de hatos seleccionado en cada municipio fue proporcional al número de hatos que tenía cada uno de ellos así: Belmira 9% (3 hatos), Donmatias 11% (3 hatos), Entreríos 19% (6 hatos), San José 5% (2 hatos), San Pedro de los Milagros 24% (8 hatos) y Santa Rosa 32% (10 hatos). Cinco hatos tuvieron que ser reemplazados a lo largo del estudio por diferentes razones, los reemplazos se seleccionaron de la lista de elegibles de granjas con características similares. La información del tiempo en el cual participaron los hatos reemplazados también fue analizada, por lo que al final se analizó información procedente de 37 hatos. En cada municipio los hatos fueron seleccionados teniendo en cuenta condiciones de manejo típicas en la región como: tamaño del hato, tipo de ordeño, tipo de alimentación y razas. Otras condiciones eran que las granjas tuviesen facilidades de acceso, tanto por distancia del casco urbano como por la existencia de vías carreteables, que almacenaran la leche en tanque de enfriamiento, adecuada identificación de las vacas y que su propietario o mayordomo facilitara sus animales para la correspondiente toma de muestras y se comprometiera a suministrar la información que se le solicitase.

Protocolo de visita. Para coleccionar las muestras, a los hatos seleccionados se les efectuó una visita mensual en las horas de la tarde desde enero de 2009 a diciembre de 2010. En cada visita se efectuó un examen de CMT por cuarto a todas las vacas en producción que tuviesen más de 4 días post parto. El ordeñador efectuó una preparación de la ubre y los pezones siguiendo su rutina normal, posteriormente, se descartaron los primeros chorros de leche antes de la toma de la muestra. El CMT se efectuó siguiendo

las recomendaciones de la empresa fabricante. Una vez efectuada la prueba, se tomaron aproximadamente 5 ml de leche por duplicado de los cuartos con resultado positivo o sospechoso al CMT, posterior a la desinfección de la punta del pezón con algodón empapado en alcohol etílico al 70%. Una de las muestras se envió para un RCS con el DeLaval Cell Counter (DCC) (DeLaval Stockholm, Sweden) y la otra para cultivo. A los cuartos con RCS ≥ 200.000 cells/mL, se les efectuó cultivo bacteriológico. Las pruebas de RCS y del cultivo bacteriológico se efectuaron en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Medicina Veterinaria, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. A partir de la segunda visita de toma de muestras se le efectuaron al productor una serie de recomendaciones para el control y la prevención de la mastitis de acuerdo a los resultados encontrados en cada finca.

Cuando se presentaba un caso de mastitis clínica, el productor informaba y era enviado un veterinario del proyecto quien efectuaba la visita, tomaba la información relacionada con la vaca y la finca, efectuaba el diagnóstico, tomaba las muestras de leche y realizaba las recomendaciones del caso.

Cultivo bacteriológico. Las muestras se cultivaron usando métodos de laboratorio estándar (12, 13). Las muestras fueron inoculadas mediante la técnica de siembra por superficie con asa estéril calibrada (0.01 ml) en los medios agar tripticasa soya, agar chocolate, agar azida suplementado con 5% de sangre de carnero, agar Mac Conkey y agar Sabouraud. Los cultivos se incubaron entre 24 y 48 horas a 37 °C en condiciones aeróbicas, excepto para el agar Sabouraud el cual fue incubado por 5 días. Las pruebas se efectuaron para la identificación de los siguientes microorganismos: *S.*

aureus, Estafilococo Coagulasa Negativo (ECN), *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *Corynebacterium spp.*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.* y levaduras (*Candida spp.*). Las bacterias se identificaron inicialmente por evaluación morfológica y tinción de Gram y posteriormente se efectuaron pruebas confirmatorias. A los cocos Gram positivos se les efectuó la prueba de catalasa para diferenciar los estreptococos de los estafilococos. La prueba de la coagulasa se efectuó para diferenciar *S. aureus* y otros Estafilococos Coagulasa Positivos (ECP) de los ECN. A los cocos positivos a ambas pruebas (catalasa y coagulasa) se les efectuó la prueba de manitol, DNasa y urea para diferenciar *S. aureus* de otros *Staphylococcus* como el *S. intermedius*. Los cocos Gram positivos y catalasa negativos fueron identificados como *Streptococcus spp.* y fueron clasificados por las pruebas de CAMP, hidrolisis de la esculina, bacitracina y crecimiento en NaCl (6.5%). A las colonias Gram negativas se les efectuó la prueba de oxidasa para clasificarlas como bacterias fermentadoras y no fermentadoras y posteriormente tipificadas por pruebas bioquímicas como lisina, triple azúcar, Simons citrato, SIM (Sulfide Indol Movility) y urea. El sistema de identificación BBL[®] Crystal[®] (Bencton, Dickinson. Sparks, MD USA) se utilizó también para identificar algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas como *Crynebacterium spp.*, *Listeria spp.* y bacterias Gram negativas no fermentadoras. Para identificar *Candida albicans* se usó la prueba de tubo germinativo después de identificar la morfología de la levadura en agar Sabouraud y teñirlas con Gram.

La presencia de 3 o más especies de bacterias se consideró como contaminación y las muestras con este resultado fueron descartadas del análisis (14).

Determinación de la sensibilidad bacteriana. Para la realización de estas pruebas se tomó al azar un porcentaje representativo de los aislamientos de cada bacteria y de cada hato para efectuarles la prueba de sensibilidad a los antibióticos. Dicha muestra varió dependiendo de la disponibilidad de los sensidiscos de cada antibiótico. Por lo tanto, el número de evaluaciones de sensibilidad a antibióticos no coincide con el número total de aislamientos.

La determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos se efectuó por la técnica de difusión en gel de agar por disco o prueba de Kirby-Bauer (15), para lo cual, se tomaron los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (C.L.S.I. por sus siglas en inglés) (16). Se emplearon sensidiscos de los siguientes antibióticos: penicilina G (10 UI), ampicilina (10 µg), cefoperazona (75 µg), cloxacilina (5 µg), lincomicina (2 µg), amoxicilina (10 µg), espiramicina (100 µg), cefalexina (30 µg) y trimetoprim sulfametoxazol (25 µg). Los aislamientos fueron clasificados como Sensibles (S), Intermedio (I) y Resistente (R) según la medición del diámetro de la zona de inhibición. Finalmente, se presentan los resultados de sensibilidad de las bacterias más prevalentes.

Definición de caso. Un cuarto con mastitis clínica se definió como aquel que presentaba la leche visiblemente anormal, la glándula mamaria tiene un aspecto inflamado y la vaca puede presentar reducción en la producción y signos generales de enfermedad (17) y una vaca con mastitis clínica se definió como aquella que presentaba al menos un cuarto con mastitis clínica. Mastitis subclínica en un cuarto se definió como un resultado al CMT mayor o igual a trazas y un RCS ≥ 200.000 cells/ml (36). Un animal con mastitis subclínica se definió como aquel que presentó al menos un cuarto con mastitis subclínica.

Para el análisis de prevalencia de la infección, un cuarto se consideró como infectado cuando presentaba Mastitis clínica (MC) o Mastitis Subclínica (MS) y se aislaron uno o dos patógenos de la muestra respectiva. A las muestras que tuvieron un resultado menor a 200.000 cel/ml no se les efectuó cultivo y se clasificaron como no infectadas en el análisis de los datos puesto que el RCS de una vaca que no está infectada con patógenos de la mastitis es usualmente menor de 200.000 cel/ml (36, 37).

Análisis Estadístico. La información se almacenó en hojas de Excel y luego se exportó al Software estadístico Stata[®] 12.0 (18). Los datos se examinaron para detectar entradas erróneas y cuando se detectó algún dato improbable fue removido. El análisis de los datos se efectuó mediante estadística descriptiva usando métodos estándar. El cálculo de la prevalencia de mastitis por cuarto y por vaca se realizó usando el comando survey de stata[®]. Para el cálculo de la TIMC, se definieron los días a riesgo por vaca según lo propuesto por Bartlett et al., (19), en donde un caso de mastitis se definió como un reporte de vaca con mastitis clínica o una serie de reportes separados cada uno por un mínimo de 14 días. Cuando se reportó un caso de mastitis después de transcurridos al menos 14 días de un caso previo, se definió como el inicio de un nuevo caso de mastitis. Las vacas no se consideraron a riesgo de presentar un nuevo caso de mastitis cuando estaban enfermas de mastitis o por 14 días después del último reporte de mastitis. Para el efecto, se empleó la fórmula: ($\#$ eventos nuevos de mastitis/número total de vacas-días a riesgo) \times 365 \times 100 (19). El número de días a riesgo de presentar un nuevo caso de mastitis se calculó para cada animal de manera individual durante el periodo comprendido entre de 1° de julio de 2009 y el 30 de junio de 2010. Los hatos que no reportaron casos de

mastitis clínica durante el periodo fueron retirados de la muestra para el cálculo de la TIMC.

RESULTADOS

En total se efectuaron 72.172 observaciones en cuarto, de las cuales 257 (0.35%) procedían de cuartos con mastitis clínica y 71.915 (99.6%) de mastitis subclínica. El 80% de las vacas de la muestra fueron de la raza Holstein y el 20% de otras razas o cruces. El promedio de edad fue de 5.7 ± 2.3 años la producción de leche promedio fue de 17.8 ± 6.32 L/vaca/día y consumían un promedio de concentrado de 4.93 ± 2.1 kg/día. El 43% de las fincas tenían entre 1 y 25 animales, el 49% entre 26 y 75 y el 8% más de 76 animales. El 26% de las vacas tenían 1 parto, el 19% dos, el 17% tres y el 37% cuatro o más partos. El 30.3% de las vacas estaban en el primer tercio de lactancia (0-100), el 30.5% en el segundo (101-200), el 24.5% en el tercero (201-300) y el 14.7% presentaban más de 300 días en lactancia.

Prevalencia de mastitis subclínica. La prevalencia de MS para 71.915 observaciones en cuarto varió entre el 19.9% en el sexto mes al 12.2% en el mes veintitrés de seguimiento. Los resultados de la prevalencia de mastitis subclínica en vaca por mes y por cuarto se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 1.

Tasa de Incidencia de mastitis clínica. La TIMC entre el 1° de julio de 2009 y el 30 de junio de 2010, fue de 13.8 casos por 100 vacas-año a riesgo.

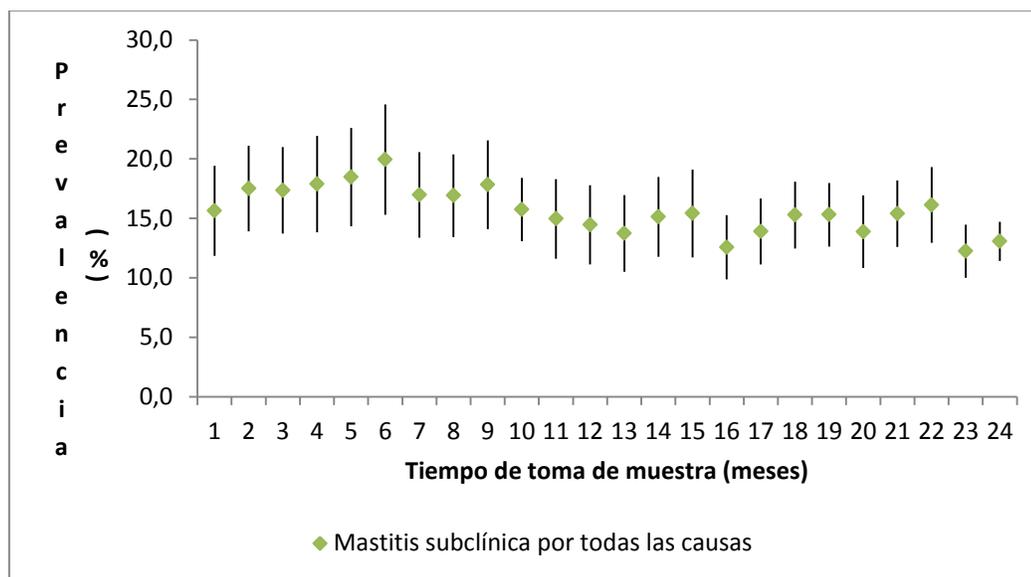
Aislamientos bacterianos. Se obtuvo un total de 11.492 resultados de cultivos procedentes de muestras de cuartos con mastitis clínica y subclínica. 83 casos resultaron contaminados (presencia de 3 o más tipos de colonias) y fueron retirados del análisis. En 784 casos (6.8%) se observó aislamiento mixto. El patógeno más frecuentemente aislado fue el *S. agalactiae* con el 34.5% de los aislamientos seguido por los ECN y el *Corynebacterium spp* con 17.5% y 13.1%, respectivamente. En 3.491 casos de mastitis (30.4%) no hubo aislamiento.

Tabla 1. Variación de la prevalencia de mastitis subclínica basado en el RCS (≥ 200.000) por cuarto y por mes en 71.915 observaciones en 1.662 vacas de 37 hatos en el Altiplano Norte de Antioquia, Colombia.

Mes	% Mastitis	n	IC 95% ¹
1	15.6	1407	[11.8-19.4]
2	17.5	2833	[13.9-21.1]
3	17.3	3486	[13.7-21.0]
4	17.8	2394	[13.8-21.9]
5	18.4	2994	[14.3-22.6]
6	19.9	3595	[15.3-24.6]
7	17.0	3268	[13.4-20.6]
8	16.9	3435	[13.4-20.4]
9	17.8	3343	[14.1-21.6]
10	15.7	3120	[13.0-18.4]
11	15.0	2902	[11.6-18.3]
12	14.4	2630	[11.1-17.7]
13	13.7	1931	[10.5-16.9]
14	15.1	3095	[11.7-18.5]
15	15.4	2945	[11.7-19.1]
16	12.5	2890	[9.8-15.2]
17	13.9	3218	[11.1-16.7]
18	15.3	3645	[12.5-18.1]
19	15.3	3202	[12.6-18.0]
20	13.9	3509	[10.8-16.9]
21	15.4	3294	[12.6-18.2]
22	16.1	3232	[12.9-19.3]
23	12.2	3342	[10.0-14.5]

Mes	% Mastitis	n	IC 95% ¹
24	13.1	2205	[11.4-14.7]

¹95% Confidence interval



Figuras 1. Prevalencia de mastitis por cuarto (IC 95%) y por mes por todas las causas para 71.915 observaciones en 1.662 vacas de 37 hatos en ganado de leche del Altiplano Norte de Antioquia, Colombia.

Con respecto al tipo de mastitis el microorganismo más frecuente tanto para la mastitis clínica como para la subclínica fue el *S. agalactiae* con un 40.6 y un 34.4% respectivamente (datos no mostrados). Los resultados totales de los aislamientos y de acuerdo al tipo de ordeño se muestran en la Tabla 2.

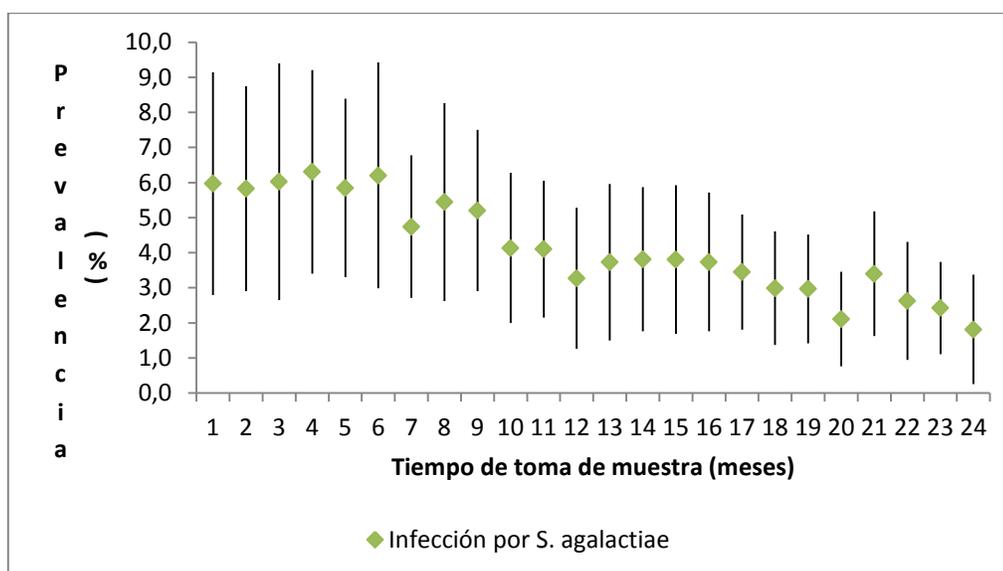
Tabla 2. Microorganismos aislados según tipo de ordeño de 8.001 muestras positivas a cultivo de cuartos con mastitis clínica y subclínica en la investigación de los patógenos asociados a la mastitis en ganado de leche del Altiplano Norte de Antioquia, Colombia

Microorganismo	Tipo de ordeño				Total	%
	Mecánico		Manual			
	#	%	#	%		
<i>S. agalactiae</i>	242	9.0	2.791	45.8	3.033	34.5
ECN	392	14.6	1.141	18.7	1.533	17.5
<i>Corynebacterium spp.</i>	787	29.2	366	6.0	1.153	13.1
<i>S. pyogenes</i>	424	15.7	556	9.1	980	11.2
<i>S. aureus</i>	384	14.3	314	5.2	698	8.0
<i>S. dysgalactiae</i>	150	5.6	311	5.1	461	5.3
<i>S. intermedius</i>	43	1.6	215	3.5	258	2.9
<i>S. Uberis</i>	67	2.5	131	2.2	198	2.3
<i>E. coli</i>	75	2.8	93	1.5	168	1.9
Otros ¹	50	1.9	57	0.9	107	1.2
<i>Klebsiella</i>	34	1.3	70	1.1	104	1.2
<i>Candida spp.</i>	28	1.0	35	0.6	63	0.7
<i>Enterobacter</i>	17	0.6	12	0.2	29	0.3
Total	2.693	100	6.092	100	8.785 ²	100

¹ Este grupo incluye patógenos esporádicos tales como *Geotrichum spp.*, *Trichosporum spp.*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*.

² El total es mayor que el número de muestras debido a que 784 muestras presentaban crecimiento mixto de microorganismos.

Prevalencia de infección por *S. agalactiae*. La prevalencia de la infección por *S. agalactiae* fue de 4.1% y varió entre el 6.3% para el cuarto mes al 1.8% para el mes 24 de toma de muestras Figura 2.



Figuras 2. Prevalencia de mastitis por cuarto (IC 95%) debida a la infección por *Streptococcus agalactiae*, para 71.915 observaciones en 1.662 vacas de 37 hatos en ganado de leche del Altiplano Norte de Antioquia, Colombia.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Dado que no se encontraron en el país datos de la clasificación de la sensibilidad o de la resistencia de las bacterias a los antibióticos, ya sea por porcentaje o frecuencia del hallazgo y a que esto pueden variar según el país y el tipo de bacteria, se definió para este estudio, como un alto porcentaje de sensibilidad, un valor del 80% o más de aislamientos sensibles a un antibiótico y como un alto porcentaje de resistencia, un 30% o más de aislamientos resistentes a un antibiótico.

Tabla 3. Resultados (Número y porcentaje) de la pruebas de sensibilidad antimicrobiana efectuadas a cepas del genero *Streptococcus* procedentes de cuartos afectados con mastitis de vacas del Altiplano Norte de Antioquia.

Bacteria	Resultado	Cloxa	Espir	Penic	Lincom	Ampi	Cefope	Amoxa	Cefale	Tri-Sul	
<i>S. agalactiae</i>	S	840	176	817	138	879	554	921	186	287	
	%	(87.6)	(65.9)	(85.3)	(48.9)	(91.8)	(98.4)	(96.0)	(45.4)	(72.5)	
	I	2	1	0	1	0	0	0	10	2	
	%	(0.2)	(0.4)		(0.4)					(2.4)	(0.5)
	R	117	90	141	143	79	9	38	214	107	
	%	(12.2)	(33.7)	(14.7)	(50.7)	(8.2)	(1.6)	(4.0)	(52.2)	(27.0)	
Total		959	267	958	282	958	563	959	410	396	
<i>S. pyogenes</i>	S	323	38	310	47	324	149	336	154	182	
	%	(91.2)	(88.4)	(87.6)	(45.6)	(91.5)	(98.7)	(94.9)	(74.0)	(89.7)	
	I	0	0	0	1.0	0	0	0	2.0	0	
	%				(0.0)				(1.0)		
	R	31	5	44	55	30	2	18	52	21	
	%	(8.8)	(11.6)	(12.4)	(53.4)	(8.5)	(1.3)	(5.1)	(25)	(10.3)	
Total		354	43	354	103	354	151	354	208	203	
<i>S. dysgalactiae</i>	S	109	49	101	7	107	73	115	25	29	
	%	(93.2)	(81.7)	(87.1)	(41.2)	(92.2)	(97.3)	(98.3)	(61.0)	(70.7)	
	I	0	0	0	0	0	1.0	0	0	0	
	%						(1.3)				
	R	8	11	15	10	9	1,0	2,0	16	12	
	%	(6.8)	(18.3)	(12.9)	(58.8)	(7.8)	(1.3)	(1.7)	(39.0)	(29.3)	
Total		117	60	116	17	116	75	117	41	41	
<i>S. uberis</i>	S	60	23	60	13	72	64	79	11	11	
	%	(74.1)	(71.9)	(74.1)	(36.1)	(90.0)	(94.1)	(97.5)	(78.6)	(84.6)	
	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	R	21	9	21	23	8	4	2	3	2	
	%	(25.9)	(28.1)	(25.9)	(63.9)	(10.0)	(5.9)	(2.5)	(21.4)	(15.4)	
	Total		81	32	81	36	80	68	81	14	13

S= sensible I=Intermedio R=Resistente

Cloxa=Cloxacilina Espir=Espiramicina Penic=Penicilina, Lincom=Lincomicina, Ampi=Ampicilina, Cefope=cefoperazona Amoxa=Amoxicilina, Cefale=cefalexina Tri-sul=Trimetoprim sulfa

Un alto porcentaje de los aislamientos de la bacteria *S. agalactiae* presentó sensibilidad cuando se usó el grupo farmacológico β -lactámico (cloxacilina (87.6%), penicilina (85.3%), ampicilina (91.8%), cefoperazone (98.4%) y

amoxicilina (96%) pero no cuando se empleó la cefalexina (45.4%). En relación a las otras especies de *Streptococcus* se observó un comportamiento similar al observado para el *S. agalactiae* específicamente en lo relacionado con la sensibilidad a los β -lactámicos a excepción del *S. uberis* que mostró una menor sensibilidad a los antibióticos cloxacilina (74.1%) y penicilina (74.1%) y tanto esta bacteria como el *S. pyogenes* mostraron una mayor sensibilidad al trimetoprim-sulfa (84.6%) y (89.7%) respectivamente, en comparación al *S. agalactiae*. Los hallazgos de las pruebas de sensibilidad para los *Streptococcus* se presentan en la Tabla 3.

En el caso de los ECP, las bacterias *S. aureus* y *S. intermedius* presentaron un alto porcentaje de aislamientos sensibles a los antibióticos cloxacilina (95.4 y 96.5%), cefoperazone (98% y 88.6%) y trimetoprim sulfa (98% y 98.6%); adicionalmente, el *S. aureus*, presentó alto porcentaje de sensibilidad a la cefalexina (81.3%). Tabla 4.

En el grupo de las bacterias ECN se encontró alto porcentaje de sensibilidad cuando se usaron los antibióticos cloxacilina (94.1%), cefoperazone (99.2%), amoxicilina (82%), cefalexina (81.2%) y trimetoprim sulfa (92.8%). Por el contrario se observó alto porcentaje de resistencia a los antibióticos penicilina (55.6%), lincomicina (58.1%) y ampicilina (48.3%) (Tabla 5).

Tabla 4. Resultados (Número y porcentaje) de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Estafilococo Coagulasa Positivo* a varios antibióticos en muestras procedentes de cuartos afectados con mastitis de vacas del Altiplano Norte de Antioquia.

Bacteria	Resultado	Cloxa	Espir	Penic	Lincom	Ampi	Cefope	Amoxa	Cefale	Tri-Sul
<i>S. aureus</i>	S	333	60	212	74	225	195	266	126	148
	%	(95.4)	(74.1)	(60.9)	(63.8)	(64.5)	(98.0)	(76.0)	(81.3)	(98.0)
	I	0.0	1	1	2	0.0	3	0.0	0.0	0.0
	%		(1.2)	(0.3)	(1.7)		(1.5)			
	R	16	20	135	40	124	1	84	29	3
%	(4.6)	(24.7)	(38.8)	(34.5)	(35.5)	(0.5)	(24.0)	(18.7)	(2.0)	
	Total	349	81	348	116	349	199	350	155	151
<i>S. intermedius</i>	S	139	17	36	22	35	62	63	55	73
	%	(96.5)	(53.1)	(25.0)	(56.4)	(24.5)	(88.6)	(43.8)	(74.3)	(98.6)
	I	0.0	0.0	1	0.0	0.0	1	0.0	0.0	0.0
	%			(0.7)			(1.4)			
	R	5	15	107	17	108	7	81	19	1
%	(3.5)	(46.9)	(74.3)	(43.6)	(75.5)	(10.0)	(56.3)	(25.7)	(1.4)	
	Total	144	32	144	39	143	70	144	74	74

S= sensible I=Intermedio R=Resistente

Cloxa=Cloxacilina, Espir=Espiramicina, Penic=Penicilina, Lincom=Lincomicina, Ampic=Ampicilina, Cefope= Cefoperazona Amoxa=Amoxacilina, Cefale=cefalexina Tri-sul=Trimetoprim sulfa

Tabla 5. Resultados (Número y porcentaje) de la prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas del genero Estafilococo Coagulasa Negativo en muestras procedentes de cuartos afectados con mastitis de vacas del Altiplano Norte de Antioquia.

Bacteria	Cloxa	Espir	Penic	Lincom	Ampi	Cefoper	Amoxa	Cefalex	Tri-Sul
ECN									
S	193	56	91	18	106	121	168	69	77
%	(94.1)	(72.7)	(44.4)	(41.9)	(51.7)	(99.2)	(82.0)	(81.2)	(92.8)
I	(0.0)	1	(0.0)	(0.0)	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0
%		(1.3)						(1.2)	(2.4)
R	12	20	114	25	99	1,0	37	15.0	4.0
%	(5.9)	(26.0)	(55.6)	(58.1)	(48.3)	(0.8)	(18.0)	(17.6)	(4.8)
Total	205	77	205	43	205	122	205	85	83

S=sensible I=Intermedio R=Resistente

Cloxa=Cloxacilina Espir=Espiramicina Penic=Penicilina, Lincom=Lincomicina, Ampí=Ampicilina, Amoxa=Amoxacilina, Cefalex=cefalexina Tri-sul=Trimetoprim sulfa

En el grupo de las bacterias ECN se encontró alto porcentaje de sensibilidad cuando se usaron los antibióticos cloxacilina (94.1%), cefoperazone (99.2%), amoxacilina (82%), cefalexina (81.2%) y trimetoprim sulfa (92.8%). Por el contrario se observó alto porcentaje de resistencia a los antibióticos penicilina (55.6%), lincomicina (58.1%) y ampicilina (48.3%) (Tabla 5).

DISCUSIÓN

Los resultados revelaron que la prevalencia de mastitis subclínica hallada en el presente estudio, fue más baja que la reportada por Pinzón et al (7) del 48.6% en un primera y del 51.3% en un segunda toma de muestras, esta diferencia en los resultados se pudo deber en parte a la diferencia de

metodologías para el diagnóstico de mastitis, ya que el autor en mención basó el diagnóstico de mastitis subclínica solamente en la prueba del CMT lo cual pudo llevar al diagnóstico de falsos positivos. Por otro lado, la prevalencia de mastitis subclínica hallada en el presente estudio, fue similar al 20% reportado por Trujillo et al (10), quien efectuó la prueba CMT y posteriormente realizó recuento de células somáticas para confirmar el diagnóstico lo que en parte podría explicar la similitud de resultados. Otra posible explicación de esta similitud, sería la cercanía y similaridad de las zonas lecheras donde se efectuaron ambos estudios.

No se encontraron datos de estudios sobre TIMC efectuados en Colombia con los cuales comparar los hallazgos de este trabajo. Al revisar la literatura internacional se encontró que los resultados de TIMC encontrados en este estudio concuerdan con un reporte efectuado en Uruguay en el cual encontraron 14.4 casos por cada 100 vacas-año a riesgo en un año de seguimiento (20) y se consideraron bajos al compararlos con los 41.95 casos por cada 100 vacas-año a riesgo reportado en Dinamarca (19) y con los 43.3 casos por cada 100 vacas-año a riesgo reportado en Tanzania (21). Sin embargo, se debe tomar con precaución la comparación efectuada con estudios efectuados en otras latitudes debido a que la TIMC está asociada a factores tales como el clima, la raza, el nivel de producción y el manejo (20).

El dato de la TIMC hallada en los hatos estudiados requiere ser confirmada por otros estudios similares ya que se este hallazgo se pudo deber en parte a una sub-notificación de los casos debido al temor de los productores a desmejorar el prestigio de sus hatos si revelaban el número real de eventos o a la falta de tiempo o de motivación para tener y actualizar los registros lo cuales no fueron incorporados en algunos hatos o no fueron actualizados

permanentemente en otros. Según Bartlett el reporte incompleto de casos de mastitis por los productores de leche se debe a que algunos de ellos son apáticos a los asuntos relacionados con el control de la enfermedad o les falta tiempo para mantener registros completos (19).

En general se observó un predominio de las bacterias contagiosas sobre las ambientales, siendo el *S. agalactiae* el patógeno más frecuente en general y también el más frecuente en el ordeño manual. Al analizar los patrones de prevalencia de mastitis por cuarto por todas las causas y por la infección por *S. agalactiae* en la Figuras 1 y 2 respectivamente, se puede observar cómo dado que, la mastitis por *S. agalactiae* está incluida en la curva de la mastitis por todas las causas, la infección por *S. agalactiae* podría explicar su variación. El *S. agalactiae* se transmite principalmente durante el ordeño (22), ya que se puede encontrar en superficies que hayan tenido contacto reciente con leche contaminada, como el equipo de ordeño y las manos del ordeñador (23) y las malas condiciones de higiene durante la rutina de ordeño favorecen su presentación (24). Según Rodríguez et al, el *S. agalactiae* fue la bacteria más prevalente en el ordeño manual (25) y presentó el mayor porcentaje de infección con respecto al mecánico con 61.7% y 50%, respectivamente (8). En contraste, Calderón y Rodríguez, encontraron una prevalencia para el *S. agalactiae* sólo del 6.84% (6) y Trujillo y colaboradores del 6.4% (10).

En este estudio en el que hubo un marcado predominio de las mastitis subclínicas sobre las clínicas, las bacterias ECN ocuparon el segundo lugar en orden de frecuencia (17.5%). Este tipo de bacterias están asociadas más frecuentemente a casos de mastitis subclínica que a los de clínica (33). Históricamente, los ECN se han clasificado como patógenos menores y su

importancia como causantes de mastitis clínica o subclínica ha sido considerada como limitada (34). Dadas las características de manejo de los hatos de estudio, los cuales fueron descritos previamente por los autores (11), este hallazgo podría estar asociado a deficiencias en la higiene en el ordeño dado que Las bacterias ECN se hallan en grandes cantidades en la superficie de la ubre y pezones y en las manos del ordeñador y por lo tanto pueden colonizar, a partir de esta fuente, el canal del pezón y penetrar en el tejido de la ubre (23). Los hallazgos con relación a las bacterias ECN concuerdan con lo encontrado por Ramírez y colaboradores quienes reportaron un 14.6% para el ECN (9) y con Calderón y Rodríguez quienes reportaron un 11.8% (6). Los resultados para el *Corynebacterium spp.* de este estudio contrastan con el 1.3% reportado por Trujillo et al (10).

En relación con las bacterias aisladas dependiendo del tipo de mastitis (clínica o subclínica), los resultados de este trabajo, contrastan con lo encontrado por Giannechini, quien reportó la bacteria *S. aureus* como la más prevalente tanto para la mastitis clínica (37.5%) como para la subclínica (62.8%) (20). El hecho de no encontrar crecimiento en un 30.4% de los cultivos de esta investigación, se podría explicar por qué el número de bacterias fue muy bajo para ser detectado por la prueba (35) o que la vaca pudo haber eliminado la infección al momento de la toma de la muestra (26) dado que la muestra se tomó solo con base en el resultado del CMT. Varios estudios han reportado los porcentajes de cuartos con aislamiento negativo al cultivo de las muestras de leche procedente de cuartos con mastitis subclínica o clínica. En un estudio efectuado en Suecia el 22% de las muestras de leche procedentes de cuartos con mastitis subclínicas no presentaron aislamiento (35), mientras que en otro estudio realizado en el

Reino Unido el 31,4% de las muestras de leche procedentes de cuartos con mastitis clínicas no presentaron aislamiento (38).

Para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos, se utilizó la prueba de difusión en gel de agar, debido a su facilidad de ejecución, bajo costo, repetitividad interlaboratorio y a la flexibilidad en el tipo y número de antibióticos que pueden ser analizados (27). Según Saini, 2011, la prueba de difusión en disco presentó moderada a alta exactitud y muy buena concordancia esencial y categórica para la mayoría de combinaciones patógeno-antibiótico cuando se comparó con la prueba de microdilución en caldo (28). En el presente estudio se observó que un 14.7% de las muestras positivas a *S. agalactiae* a las cuales se les efectuó prueba de sensibilidad fueron resistentes a la penicilina, este resultado es menor al 19.4% encontrado en otro estudio efectuado en la zona (9). Contrasta este resultado con el 100% de sensibilidad reportado por Trujillo et al., 2011 (10). Los reportes de cepas de bacterias *S. agalactiae* resistentes a los antibióticos β -lactámicos son escasos, de hecho solo se pudo encontrar un reporte ya prácticamente histórico de Berghash y colaboradores en la década de los 80's, en un estudio efectuado en Nueva York, de cepas de *S. agalactiae* multiresistentes a antibióticos del grupo β -lactámicos (29). También llama la atención el hallazgo de un porcentaje importante de aislamientos de *S. agalactiae* resistentes a antibióticos como espiramicina (33.7%) lincomicina (50.7%) y cefalexina (52.2%) lo cual concuerda con lo informado por Gao y colaboradores (30), quienes reportaron resistencia de aislamientos de *S. agalactiae* aunque a otro tipo de antibióticos (gentamicina, tetraciclina, amikacina y eritromicina). Si bien el porcentaje de aislamientos de *S. agalactiae* resistente a los antibióticos β -lactámicos es

relativamente bajo, no deja de ser preocupante dado que se podría estar perdiendo una molécula muy importante en el control de esta bacteria debido a que la penicilina es el antibiótico de primera elección en casos de mastitis bovina (22). Por lo anterior, sería muy importante efectuar más estudios con el fin de confirmar o descartar esa resistencia.

Ambas bacterias ECP (*S. aureus* y *S. intermedius*) mostraron resistencia a las penicilinas β -lactamasas sensibles (penicilina y ampicilina) aunque el *S. intermedius* también lo hizo a la amoxicilina, lo cual podría explicarse porque la producción de β -lactamasa es el mecanismo de resistencia más común en los Estafilococos (35). Alta frecuencia de resistencia a la penicilina ha sido reportada por otros autores en bacterias procedentes de cuartos con mastitis (31, 32). La alta resistencia de las bacterias ECN a los antibióticos β -lactámicos como la penicilina también ha sido reportada en otros trabajos (9, 10, 32).

Sería recomendable efectuar estudios adicionales basados en la búsqueda de marcadores moleculares asociada a pruebas fenotípicas que confirmen la resistencia de las bacterias a los antibióticos encontrada en este estudio, específicamente para el *S. agalactiae* a los β -lactámicos y a los otros principios activos. Según la legislación de Colombia la venta de antibióticos para uso veterinario es libre, quiere decir que cualquier persona puede acceder a ellos para el tratamiento de las enfermedades del bovino, por ende, la adquisición de resistencia bacteriana a los antibióticos en los hatos de la zona de estudio, podría deberse a la utilización indiscriminada de este tipo de fármacos para el tratamiento de las mastitis y de otras enfermedades

sin un criterio claro por parte de los productores y sin la asesoría de un Médico Veterinario.

Es de anotar que los resultados de interpretación de la susceptibilidad a los antibióticos usados por el método de difusión en gel de agar tienen como parámetros de referencia datos de farmacocinética plasmática en humanos la cual es extrapolada a los animales domésticos. Si bien estos datos sirven de referencia para el trabajo en medicina veterinaria se pueden presentar variaciones entre las especies humana y bovina. En resumen, para el caso específico de la interpretación de estos resultados es importante que el médico veterinario tenga consideraciones específicas de la farmacocinética de los antibióticos en los vacunos y más aún en el compartimiento específico de la glándula mamaria.

Conclusiones. En el presente estudio se encontró una tasa de incidencia de mastitis clínica de 13.8 casos por 100 vacas-año a riesgo. La prevalencia de mastitis subclínica varió a lo largo del periodo de estudio observándose una tendencia a la disminución al final del periodo de seguimiento. El patógeno más prevalente tanto en los casos de mastitis clínica como subclínica fue el *S. agalactiae*. Se requiere efectuar más estudios con el fin de comprobar la resistencia de las bacterias a los antibióticos encontrada en esta investigación.

Agradecimientos

Esta investigación se desarrolló gracias a la cofinanciación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, MADR, la Universidad de

Antioquia, COLANTA y la Federación de Asociaciones de Ganaderos de Antioquia FAGA.

REFERENCIAS

1. de Pinho M, Borin D, Yoshida P, Zampolli M, Donizete B, Langoni H. Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. *Res Vet Sci.* 2012; (93): 430-4.
2. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 2003; 34(5): 475-91.
3. Fourichon C, Seegers H, Beaudeau F, Verfaille L, Bareille N. Health-control costs in dairy farming systems in western France. *Livest Prod Sci.* 2001; (68): 141-56.
4. Kramer E, Cavero D, Stamer E, Krieter J. Mastitis and lameness detection in dairy cows by application of fuzzy logic. *Livest Sci.* 2009; 125(1): 92-6.
5. Rodríguez G. Mastitis bovina y el potencial para su control en la sabana de Bogotá, Colombia. 103. Corpoica, 1988.
6. Calderon A, Rodríguez V. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008; (21): 582-9.
7. Pinzon A, Moreno F, Rodríguez G. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Rev Med Vet.* 2009; (17): 23-5.
8. Rodríguez G, Contreras D, Ordoñez M. Caracterización de la mastitis bovina en el Valle de Ubaté. *Rev Med Vet.* 2002; 2(4): 57-66.
9. Ramírez N, Gaviria G, Arroyave O, Sierra B. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2001; (14): 76-87.

10. Trujillo C, Gallego A, Ramírez N, Palacio L. Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2011; (24): 11-8.
11. Ramírez N, Cerón J, Jaramillo M, Palacio L, Arroyave O. Diagnóstico de mastitis en el Norte de Antioquia. In: VII Seminario Internacional Competitividad en carne y leche (ed Colanta): 2010.
12. MacFaddin J. *Biochemical Tests for Identification of Bacteria.* Williams & Wilkins, 2000.
13. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schrenckenberger P, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
14. N.M.C. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis Revised Edition.* National Mastitis Council, 1999.
15. Bauer AW. Current status of antibiotic susceptibility testing with single high potency discs. *The American journal of medical technology.* 1966; 32(2): 97-102.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. (C.L.S.I.) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.* 2006.
17. Morin D. Salud y Trastornos de la glándula mamaria. En: *Medicina Interna de grandes Animales* (ed . Elsevier). 2010. pp 1112-1113
18. StataCorp. *StataCorp.* 2011. *Stata: Release 12. Statistical Software* StataCorp LP., 2011.
19. Bartlett PC, Agger JF, Houe H, Lawson LG. Incidence of clinical mastitis in Danish dairy cattle and screening for non-reporting in a passively collected national surveillance system. *Prev Vet Med.* 2001; 48(2): 73-83.
20. Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno Lopez J. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand.* 2002; 43(4): 221-30.

21. Kivaria FM, Noordhuizen JP, Msami HM. Risk factors associated with the incidence rate of clinical mastitis in smallholder dairy cows in the Dar es Salaam region of Tanzania. *Veterinary Journal*. 2007; 173(3): 623-9.
22. Pyörälä S. Staphylococcal and Streptococcal mastitis. In: *The bovine udder and mastitis* (ed TH-B Satu Pyörälä Markus Sandholm, Liisa Kaartinen): 143-8, 1995.
23. Philpot N, Nickerson S. *Mastitis: Counter Attack*. Babson Bros. Co., 1991.
24. Blowey R, Edmonson P. *Mastitis control in dairy herds*. Farming press books, 1995.
25. Rodríguez G. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Rev Med Vet*. 2006; (12): 35-55.
26. Sandholm M. Inflammation in mastitis. In: *The Bovine udder and mastitis* (ed TH-B Satu Pyörälä Markus Sandholm, Liisa Kaartinen): 59-75, 1995.
27. Walker RD. Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* (ed JFP S. Giguere, J. D. Baggot, R. D. Walker and P. M. Dowling): 11-25. Iowa State University Press, 2006.
28. Saini V, Riekerink RG, McClure JT, Barkema HW. Diagnostic accuracy assessment of Sensititre and agar disk diffusion for determining antimicrobial resistance profiles of bovine clinical mastitis pathogens. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(4): 1568-77.
29. Berghash SR, Davidson JN, Armstrong JC, Dunny GM. Effects of antibiotic treatment of nonlactating dairy cows on antibiotic resistance patterns of bovine mastitis pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1983; 24(5): 771-6.
30. Gao J, Yu FQ, Luo LP, He JZ, Hou RG, Zhang HQ, et al. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *Veterinary Journal*. 2012; 194(3): 423-4.

31. Gao J, Ferreri M, Yu F, Liu X, Chen L, Su J, et al. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. *Veterinary Journal*. 2012; 192(3): 550-2.
32. Ruiz D, Ramírez N, Arroyave O. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2001; 14(2): 143-54.
33. Waller K, Aspan A, Nyman A, Persson Y, Grönlund U. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 2011; 152: 112-116
34. Schukken, Y. H., H. W. Barkema, T. J. G. M. Lam, R. N. Zadoks, Y. H. Schukken, H. W. Barkema, T. J. G. M. Lam, and R. N. Zadoks. Improving udder health on well managed farms: mitigating the 'perfect storm'. Pages 21-35. 47 ref. in *Proceedings of International Conference, The Hague, Netherlands 30 September - 2 October 2008*. T. J. G. M. Lam and T. J. G. M. Lam, ed. Mastitis control.
- (35). Persson Y, Nyman A, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011; 53:36.
- (36). Pitkälä A. M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, T. Honkanen-Buzalki. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-Prevalence, Distribution and bacteria, and Antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci*. 87:2433-2441.
- (37). Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary research* 34(5):565-578.
- (38). Breen, J. E., A. J. Bradley, and M. J. Green. 2009. Quarter and cow risk factors associated with a somatic cell count greater than 199,000 cells per milliliter in United Kingdom dairy cows. *J Dairy Sci* 92(7):3106-3115.

CAPITULO 4

Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the Northern Antioquia, Colombia

Objetivos de la Tesis a los cuales apunta este artículo:

- Determinar la prevalencia de mastitis en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.
- Determinar los factores de riesgo asociados a la presentación de la mastitis bovina en vacas lecheras de la Microcuenca Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.

RISK FACTORS RELATED TO SUBCLINICAL MASTITIS

Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the Northern Antioquia, Colombia

N.F. Ramírez*, **G. Keefe†**, **I. Dohoo†**, **J. Sánchez†**, **O. Arroyave***, **J. Cerón‡**, **M. Jaramillo‡**
and L.G. Palacio*

* Epidemiology and Public Health line, Centauro Research Group, Faculty of Agricultural Sciences, University of Antioquia, Calle 70 No. 52-21. Medellín, Colombia.

†Centre for Veterinary Epidemiological Research, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada C1A 4P3.

‡ Cooperativa COLANTA. Cra. 64C 72-160 Medellín Colombia.

Corresponding author: Nicolas Ramirez

Mailing address: Carrera 76 #53-89 Torre 2 Apto 506. Medellin Colombia.

Phone number: (057) 4 2199131

Fax number: (057) 4 2199111

e-mail address: nicoramirez2010@gmail.com

The majority of contents of this chapter are published as: N.F. Ramírez, G. Keefe, I. Dohoo, J. Sánchez, O. Arroyave, J. Cerón, M. Jaramillo, L. G. Palacio. 2014. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the Northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.* In press.

Categoría A1 Pubindex

ABSTRACT

Mastitis is the main disease entity affecting dairy farms in the Colombian high plains of northern Antioquia. However, no previous epidemiologic studies have determined the characteristics that increase the risk of infection in this region, where manual milking is still the prevailing system of milking. A two year longitudinal study was designed to identify the predominant mastitis pathogens and associated herd- and cow-level risk factors. Monthly visits were performed on 37 commercial dairy farms to collect herd- and cow-level data and milk samples. Herd size varied from 6 - 136 cows (mean 37.0). Herd-level factors included type of milking system (manual or mechanical), and a range of management practices recommended by the National Mastitis Council to prevent mastitis. Individual cow level risk factors included parity, stage of lactation, breed, udder hygiene and lameness. A logistic regression analysis was used to investigate associations between herd and cows risk factors with the presence of subclinical mastitis and infection caused by *Streptococcus agalactiae* at the quarter level.

A quarter was considered to have subclinical mastitis if it had a positive California mastitis test and was subsequently confirmed to have a somatic cell count of $\geq 200,000$ cells/mL. Any cow with one or more quarters with subclinical mastitis was considered to have subclinical mastitis at the cow-level. Using 17,622 cow observations, the prevalence of subclinical mastitis at the cow level was 37.2% (95% CI 31.2, 43.3) for the first month and 33.1% (95% CI 30.1, 36.1) for the 24th month. The predominant microorganisms that were isolated from quarters meeting the subclinical mastitis definition were contagious pathogens, including *Streptococcus agalactiae* (34.4%), *Corynebacterium spp.* (13.2 %) and *Staphylococcus aureus* (8.0 %). Significant

variables that were associated with subclinical mastitis risk at the quarter level included: being a purebred Holstein cow, higher parity and increased months in milk. Variables that were protective for mastitis risk included being crossbred cow and adequate pre-milking udder hygiene. Significant variables associated with *Strep. agalactiae* infection were higher parity, increased months in milk and manual milking. Variables that were protective were post-milking teat dipping and adequate cleaning of the udder. The results highlight the importance of hygiene practices in contagious mastitis control in manual milking herds.

Key words: mastitis prevalence, manual milking, dairy cow.

INTRODUCTION

Mastitis is globally considered to be the most costly infectious disease in the dairy industry (Fetrow et al., 1991). In the United States calculated economic losses were approximately 2 billion dollars per year during the 1990s (Harmon, 1994). In Germany a study estimated losses of 200 Euro per cow per year (Kramer et al., 2009). Economic data for Colombia is not available. However, studies using the California Mastitis Test (**CMT**) and SCC as tools to diagnose subclinical mastitis (**SM**) have reported prevalence range (19.9% - 51.3%) (Calderon and Rodríguez, 2008, Pinzon et al., 2009, Trujillo et al., 2011). Other authors have recently reported that contagious mastitis caused by *Strep. agalactiae* was associated with a 70% increase in herd SCC. (Keefe et al., 2011).

The factors associated with the prevention of subclinical mastitis, including the importance of post-milking teat disinfection, have been established for many years. However, prevention of the spread of pathogens from cow to cow implies that the teats must be kept free of pathogens. To this end, methods have been investigated including the use of disinfectants, paper towels, or boiled cloths for washing each individual teat, wearing rubber gloves by the milker, and pasteurization of teat cup clusters before each cow is milked, together with post-milking disinfectant teat dips aimed at destroying any pathogens remaining on the teats after milking (Neave et al., 1969). One of the techniques used to monitor the level or occurrence of subclinical mastitis in herds or individual cows or quarters is to determine the SCC (Dohoo and Meek, 1982). Most management practices having consistent associations with SCC were related to milking procedures: using automatic take-offs, using post-milking teat dipping (**PMTD**),

milking problem cows last, yearly inspection of the milking system, and use of a method to keep cows standing following milking; all were consistently associated with lower herd SCC (Dufour et al., 2011). Because of conditions leading to a high prevalence of mastitis are numerous, mastitis prevention programs should ideally be preceded by an assessment of the risk factors most relevant to the local industry. In the northern plains of Antioquia, approximately 90% of producers still use manual milking, which is carried out directly on the pasture (Ramírez et al., 2009). Locally reported studies and anecdotal evidence suggests that bovine mastitis is undoubtedly the main disease affecting dairy cows in this area (Ramírez et al., 2001, Rodríguez et al., 2002). However, there is a lack of studies design to identify primary risk factors associated with subclinical mastitis in Colombia. In some of the few cross-sectional studies conducted in Antioquia and the sabana de Bogota, a positive association was observed between subclinical mastitis (as determined by positive CMT), parity and mechanical milking systems. In addition, no relationship was found with days in milk (Ramírez et al., 2001). Other studies reported that main bacterial species isolated from culture positive cows were *Strep. agalactiae* and *Staphylococcus aureus*, which accounted for 35-45% and 14-33% of infections, respectively (Rodríguez et al., 2002, Rodríguez, 2006). Because manual milking is the most common system in many areas of Colombia, it was of special interest to establish the important risk factors associated with the prevalence of subclinical mastitis and infection by contagious pathogens in these herds but mechanical herds were also included in this study.

The two objectives of this study were to calculate overall and bacterial pathogen specific prevalence estimates of SM, and to evaluate the major risk factors for SM in a representative sample of herds in the high plains region of Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Ethical considerations

This research was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Antioquia, Colombia (Act number 48, from December 12, 2008).

Herd Selection

A convenience sample of n=37 herds were selected from the 3,049 registered dairy farms in the six municipalities that make up the main dairy specialized area of the high plains of the northern Antioquia, Colombia (Entrerrios, Belmira, Santa Rosa de Osos, San Jose de la Montaña, San Pedro de los Milagros, and Donmatias). 120 herds were invited to participate, 99 accepted, 21 declined and 37 were selected for sampling. The number of herds selected in each municipality was proportional to the size of that area's dairy industry: Belmira 9% (n=3 herds), Donmatias 11% (n=3 herds), Entrerrios 19% (n=6 herds), San Jose 5% (n=2 herds), San Pedro de los Milagros 24% (n=8 herds) and Santa Rosa 32% (n=10 herds). Within each municipality, herds were selected based on the following typical management conditions in the region, including herd size, type of milking system, nutrition program and breed. Others aspects taken in to account to select the herds were easy road access, on-farm cooling bulk tanks, proper cow identification, and if the owner was willing to collaborate for the collection of samples. When it was necessary to

replace one of the herds, investigators selected another herd from the list of the eligible herds in that region that met the inclusion criteria. All the cows in each herd selected were included in the study.

Visit protocol

All farms were visited once per month for a period of 2 years (January 2009 to December 2010) to collect milk samples during the evening milking. At each herd visit, a CMT evaluation was performed on all milking cows greater than four days postpartum. The udder and teats were prepared by the farmer using the normal pre-milking routine. Subsequently, the first streams of milk were discarded before sample collection. CMT was performed as instructed by the manufacturer. Subsequently, for all quarters which had a positive or suspect CMT result, teat ends were disinfected with cotton swabs drenched in 70% alcohol and duplicate milk samples (approximately 5 ml) were taken. One of the samples was tested for SCC using the DeLaval Cell Counter (**DCC**) (DeLaval Stockholm, Sweden).

Bacteriological culture

Any quarter which had a positive or suspect CMT result and was confirmed to have a SCC $\geq 200,000$ cells/mL, was submitted for bacterial culture. Both the SCC test and the bacterial culture of the samples were performed at the Laboratory of Microbiology, School of Veterinary Medicine, University of Antioquia. Samples were cultured using standard laboratory methods as outlined in (MacFaddin, 2000, Winn et al., 2006) Briefly, using a sterile calibrated loop (0.01 mL) milk samples were streaked on tripticase soy, chocolate, azida supplemented with 5% sheep

blood, MacConkey and Sabouraud agar plates. Plates were incubated at 37 °C and examined for bacterial growth at 24 and 48 h, except for Sabouraud agar, which was incubated for 5 days. Tests were performed for the identification of the following microorganisms: *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci (CNS), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.* and yeast (*Candida spp.*). Bacteria were identified tentatively by gross colony morphology and Gram stain, and further confirmatory tests were used as necessary. Gram-positive cocci were tested for the presence of catalase to differentiate streptococci from staphylococci. The tube coagulase test was used to identify *Staph. aureus* and other coagulase-positive staphylococci from CNS. Positive cocci on both tests (catalase and coagulase) were tested with manitol, DNase and urea to differentiate *Staph. aureus* from other *Staphylococcus* like *Staph. intermedius*. Gram-positive and catalase-negative cocci were identified as *Strep. spp.* and were classified by CAMP, aesculin hydrolysis, bacitracin and growth in NaCl (6.5%) tests. Gram-negative compatible colonies were tested with oxidase to classify them as fermenting and non-fermenting bacteria and then typed by biochemical methods, such as lysine, triple sugar, Simons citrate, SIM (Sulfide Indole Movility) and urea. Where primary biochemical methods were inadequate, BBL™ Crystal™ Identification System (Bencton, Dickinson. Sparks, MD USA) was also used to identify bacteria, such as *Corynebacterium spp.*, *Listeria spp.* and non-fermenting Gram negative organisms. After morphological categorization on Sabouraud agar and gram staining, the germ tube test was used to identify *Candida albicans*.

The presence of 3 or more colony types was considered contamination and discarded from the analysis according to the National Mastitis Council (NMC) guidelines (N.M.C., 1999).

Case Definition

A quarter was considered to have SM at a regular monthly visit if it had a CMT score of trace or higher and the subsequent SCC was $\geq 200,000$ cells/mL. A cow was classified as having subclinical mastitis if she had subclinical mastitis in one or more quarters (N.M.C. 1999).

For pathogen prevalence, a quarter was considered infected if it was diagnosed as having SM and either one or two pathogens were isolated from the milk sample (N.M.C. 1999). Quarters that did not have a CMT score of trace or higher were not sampled and hence were classified as non-infected in the analysis of the data (Pitkälä et al., 2004). A cow was classified as infected if she had one or more quarters infected. Infection with *Strep. agalactiae* was the only type of infection analysed in detail.

Risk Factors

The risk factors selected in this investigation were focused mainly in the milking routine process. Selected herd- and cow-level risk factors evaluated for relationship to mastitis susceptibility are shown in Tables 1 and 2, respectively. Information was collected through questionnaires administered directly to the farmers on every visit and by direct observation of the milking and husbandry practices. Questionnaires were administered by one of four technicians on a monthly basis. Technicians were trained prior to project initiation at the University of Antioquia farm, to insure that recording was consistent. Only variables which were consistently recorded (few

missing values) are shown. Variables like herd size were not significant in the unconditional analysis. Other variables like dry cow therapy were not analysed because almost all of the herds reported that they were following this recommendation (only one not). Season was not analysed because, due to Colombia's proximity to the Equator, temperature patterns are not related to calendar month. Housing was not measured as a variable because all the cows were kept in pasture.

Table 1. Selected cow-level predictors evaluated as risk factors for both subclinical mastitis (SCC \geq 200,000 cells/mL) and *Streptococcus agalactiae* infection in 37 herds in Antioquia, Colombia.

Variable	Units/Categories	Distribution (%)	Description	Producer reported	Technician observed
Month of lactation	Calving to 1	8.2			
	>1 to 2	9.5			
	>2 to 3	9.4		x	
	>3 to 4	9.2			
	>4 to 5	9.2			
	>5 months	54.5			
Parity	1	26.0			
	2	19.0			
	3	17.3		x	
	4 or more	37.7			
Lameness	Absent	98.7			
	Present	1.3			x
BCS ¹		39.4	< 3		
		60.4	3 to 4		x
		0.6	> 4		

¹ Body Condition Score according with the scale by (Edmonson A.J., 1989).

Table 2. Selected herd-level predictors considered as risk factors for both subclinical mastitis (SCC \geq 200,000 cells/mL) and *Streptococcus agalactiae* infection¹.

Variable*	Units/Categories	Distribution (%)	Description
Type of milking	Manual	81	
	Machine	19	
Breed	Holstein	79.5	Other Breeds and cross breeds included Ayrshire, Swedish Red, Swiss Brown, Jersey and several crosses of Holstein with other breeds such as Jersey, Ayrshire, Angus, Blanco Orejinegro (BON), Brahman and Gir.
	Other breeds and cross breeds	20.5	
Adequate cleaning of udder	Adequate	50.7	No litter, mud or other dirt was present prior to milking and after preparation of the udder
	Inadequate	49.3	
Teat washing	Not washing	90.0	
	Washing and drying	9.0	The milkers wash teats with water and dry it with a piece of paper or cloth
	Washing and not drying	1.0	The milkers wash teats with water but without drying it
Hand pre-washing	No	85.0	
	Yes	15.0	The milkers washed their hands at the beginning to milk the herd
Hands washes between cows	No	90.0	
	Yes	10.0	The milkers washed their hands before beginning to milk each cow
Number of people milking	1	23.0	
	2	53.0	
	3	22.2	
	4	1.8	
Milking by the owner	No	70.0	
	Yes	30.0	
Milker changed in the last month	No	87.6	
	Yes	12.4	

Variable*	Units/Categories	Distribution (%)	Description
Premilking teat dipping	None	22.5	Not recommended chemical type, a concentration different than manufacturer recommendation or not enough contact time on the teat (less than 30 seconds) Defined as using a recommended chemical type at a concentration recommended by the manufacturer with at least of 30 seconds contact time.
	Inadequate	77.2	
	Adequate	0.3	
Postmilking teat dipping	None or inadequate	10.1	Inadequate: Not recommended chemical type or at a concentration different than manufacturer recommendation
	Adequate	89.9	Recommended chemical type and at a concentration recommended by the manufacturer
PostDip Chemical	Hypochlorite	0.5	The milker make dilutions according to the label or manufacturer's recommendations
	Iodophors	99.5	
Dip Chemical Concentration	Recommended	97.7	The milker did not follow label or manufacturer's recommendations (operator mixed the product differently)
	diluted	2.3	

¹All risk factors were verified by the technician except for "milker changed in the last month" and "dip chemical concentration" which were producer reported

Statistical Analysis

All data were entered into Excel worksheets and then exported to Stata[®] 12.0 (StataCorp., 2011) for analysis. The data was examined for biologically implausible entries and any erroneous entries were removed or corrected. Descriptive statistics were computed for all variables of interest. Variables with more than 30% missing values were dropped off. Pearson and Spearman correlation analysis was executed for continuous and categorical variables, respectively. When a correlation coefficient greater than 0.30 between a pair of variables was found, only one of them

was selected for inclusion in the model based on the following criteria: biological plausibility, fewer missing observations, reliability of measurement.

Observations were stratified by municipality and sampling weights were computed as the inverse of the probability of the herd being selected in the municipality (i.e. # of herds in municipality divided by # of herds selected in municipality). The clustering and repeated measures structure of the collected data (multiple observations from quarters which were clustered within cows which were clustered within herds) were taken into account by using variance linearization estimation procedures with herds identified as the primary clustering unit (this is equivalent to using robust standard errors which are allowed to vary across clusters herds).

Unconditional associations between each risk factor and the outcomes of interest, SM and *Strep. agalactiae* infection, were computed and associations with $P \leq 0.15$ were retained for consideration in multivariable models. Multivariable logistic regression models were constructed with cow-level variables remaining in the model if they had a Wald test $P \leq 0.05$, while herd-level variables were retained if $P \leq 0.10$. Biologically plausible two way interactions between pairs of predictors were evaluated using a Wald test to compare models with, and without, interactions term included. In the SM model, interaction analysis was performed between breed and days in milk (DIM) and for the *Strep. agalactiae* model, between adequate cleaning of the udder and PMTD. The potential confounding effect of breed was evaluated by refitting the final models with breed omitted to see if the coefficients for other predictors changed substantially. Results from the final models are presented as odds ratios (**OR**) along with their 95% confidence intervals. Model fit was assessed using the Hosmer-Lemeshow goodness of fit test.

RESULTS

Herd characteristics and practices

The study started with 32 herds that met the inclusion criteria. However, 5 had to be replaced part-way through the study so data was obtained from 37 different herds whose characteristics are summarized in Table 3. Herds left the study for the following reasons: discontinued dairying in represented region (2), researchers unable to access safely (2) and non-compliance with the study protocol (1). On average, each herd in the study had 20 monthly visits. Thirty herds (81%) used manual milking (n=27 directly on the pasture and n=3 in milking parlour) and n=7 used mechanical milking in the parlour, which is consistent with the type of milking in the represented zone. CMT evaluation was made on 1,662 unique cows with 17,622 cow samplings and 71,915 quarter samples. On average, each cow in the study was sampled 10.6 times for the CMT test.

Table 3. Descriptive summary of the dairy herds (n=37) participating in a study to assess the risk factors associated with subclinical mastitis (SCC \geq 200,000 cells/mL) in the high plains of Antioquia, Colombia.

Variable	Mean \pm S.D	Minimum	Maximum
Herd size ¹	37.0 \pm 28.3	6	136
Milk production (L/day) ²	17.8 \pm 6.3	4	50
Parity	3.2 \pm 2.1	1	15
Days in lactation	181.0 \pm 124.2	4	966
Number of operators	2.0 \pm 0.7	1	4
Body condition score (1 - 5) ³	3.0 \pm 0.4	1	5
Dairy concentrate (kg/day) ⁴	4.9 \pm 2.1	1	13

¹ Cows present at each routine sampling during the study.

² Milk produced per cow per day.

³ Body condition score according to Edmonson, A.J., et al., (1989).

⁴ Concentrate per cow (kg/day). The amount of concentrate was determined by herdsman's container volume and converted to weight after validation by the technician.

California Mastitis Test and quarter level subclinical mastitis

Out of 71,915 total quarter samples examined, there were 11,842 (16.5%) with CMT trace or greater. That data includes repeated measures of the same quarter. Table 4 details the CMT scores by category and quarter. On a scale of trace to +++, the distribution of quarters were 1.8, 6.0, 5.3 and 3.4%, respectively. Position of the quarter in the udder was not a significant predictor of CMT score ($p>0.05$). Of the 11,842 samples that screened positive with CMT, 11,312 sample had $SCC \geq 200,000$ cells/mL, giving an apparent prevalence of SM at the quarter level of 15.7 with a monthly range from 12.2 to 19.9.

Table 4. California Mastitis Test scores for 71,915 quarter milk samples taken from 37 herds participating in the assessment of risk factors associated with subclinical mastitis ($SCC \geq 200,000$ cells/mL) in the high plains of Antioquia, Colombia.

CMT Score	LRQ ¹		LFQ ²		RRQ ³		RFQ ⁴		TOTAL	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Negative	14,964	83.2	14,956	83.5	14,965	83.1	15,188	84.4	60,073	83.5
Trace	305	1.7	311	1.7	327	1.8	339	1.9	1,282	1.8
+	1,075	6.0	1,083	6.0	1,108	6.2	1,046	5.8	4,312	6.0
++	992	5.5	902	5.0	994	5.5	908	5.0	3,796	5.3
+++	660	3.7	659	3.7	613	3.4	520	2.9	2,452	3.4
Sum of positive quarters	3,032	16.8	2,955	16.5	3,042	16.9	2,813	15.6	11,842	16.5
Total	17,996	100	17,911	100.0	18,007	100	18,001	100	71,915	100

¹ LRQ: Left Rear Quarter

² LFQ: Left Front Quarter

³ RRQ: Right Rear Quarter

⁴ RFQ: Right Front Quarter

Bacterial cultures

Culture results were obtained from 11,312 samples with positive CMT and $SCC \geq 200,000$ cells/mL from 1,662 cows on 37 dairy farms. Eighty-three quarter milk samples were considered contaminated and discarded from the analysis because they had growth of three or more colony types. A diagnosis of mixed aetiology was made in 776 cases (6.9%) when 2 pathogens were identified in the milk sample. The overall results for all the microorganisms identified are shown in Table 5. The most prevalent SM pathogen isolated was *Strep. agalactiae* (34.4% of isolates), followed by CNS and *Corynebacterium spp.* in 17.6 % and 13.2% of the isolates, respectively. No growth occurred in 3,441 (30.4 %) of the SM samples.

Geometric mean of quarter SCC by pathogen

Geometric mean and confidence interval of quarter SCC by pathogen are shown in Table 5. *Strep. agalactiae*, *Strep. pyogenes*, *Strep. dysgalactiae* and *Strep. uberis* raised the quarter SCC to 1.122, 1.323, 1.235, and 1.366 times 10^3 cell/ml, respectively.

Table 5. Pathogens isolated and quarter geometric mean SCC by pathogen from 7,871 culture positive milk samples collected from 1,662 dairy cows participating in the assessment of risk factors associated with subclinical mastitis (SCC \geq 200,000 cells/mL) in the high plains of Antioquia, Colombia. Values are expressed as total number of isolates, and percentage. Eighty three samples yielded contaminated results (3 or more colony types).

Pathogen	Number	%	Geometric Mean SCC	95% CI ³
<i>Streptococcus. agalactiae</i>	2,977	34.4	1,122	[1,086-1,159]
Coagulase negative staphylococci	1,525	17.6	609	[584-636]
<i>Corynebacterium spp.</i>	1,142	13.2	584	[558-611]
<i>Streptococcus pyogenes</i>	958	11.1	1,323	[1,245-1,406]
<i>Staphylococcus aureus</i>	691	8.0	810	[763-861]
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	453	5.2	1,235	[1,130-1,349]
<i>Staphylococcus intermedius</i>	250	2.9	882	[792-982]
<i>Streptococcus uberis</i>	192	2.2	1,366	[1,187-1,573]
<i>Escherichia coli</i>	160	1.9	675	[565-805]
Others ¹	104	1.2	1,003	[830-1,214]
<i>Klebsiella</i>	104	1.2	967	[732-1,278]
<i>Candida spp.</i>	62	0.7	1,067	[743-1,531]
<i>Enterobacter</i>	29	0.3	965	[649-1,434]
Total	8,647 ²	100.0		

¹ This group includes sporadic rare pathogens such as *Geotrichum spp.*, *Trichosporum spp.*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*.

²Total is greater than sample numbers because 776 samples yielded two bacterial species

³ 95% CI: 95% Confidence interval

Cow-level subclinical mastitis

The overall average monthly SM prevalence was 36.8% (range 31.1, 41.1).

Risk factors for subclinical mastitis at the quarter level

Table 6 outlines significant predictors of quarter level infection using logistic regression. The odds of having a quarter case of mastitis were significantly lower OR = 0.7 (95% CI: 0.56, 0.013) in crossbreed cows and other breeds versus Holsteins (p=0.02). Two cow-level factors that showed strong associations with the presence of SM quarters were parity and lactation month OR>1 for all of the categories (p<0.01). As cows aged, there was a continuous increase in risk of SM. For example, the odds of a cow with four or more parities having SM was 3.4 (95% CI: 2.61, 4.44) p<0.01. Similarly, as month of lactation progressed, cows had increased odds to have cases of SM at the quarter level. Biologically plausible interactions of predictor variables were assessed and found to be non-significant. From these analysis, the interaction between breed and lactation month was strongest (p=0.11) (Data not shown), but it did not meet criteria to be retained in the final model. The Hosmer-Lemeshow goodness of fit test suggested that the model fit the data (p=0.7)

Table 6. Final logistic regression model assessing the effect of selected herd and cow variables on the probability for quarters to have subclinical mastitis (SCC \geq 200,000 cells/mL). n=53,030 observations

Variable	OR ¹	SEM	P value	95% CI ²
Breed			0.02 ³	
Holstein	Referent			
Other Breeds and Cross-breed	0.73	0.09	0.02	[0.56 – 0.95]

Variable	OR ¹	SEM	P value	95% CI ²
Lactation month			<0.01 ³	
1	Referent			
2	1.25	0.08	<0.01	[1.09 – 1.44]
3	1.74	0.14	<0.01	[1.47 – 2.05]
4	2.01	0.18	<0.01	[1.67 – 2.42]
5	2.48	0.24	<0.01	[2.0– 3.02]
≥ 6	3.51	0.25	<0.01	[3.03 – 4.07]
Parity			<0.01 ³	
1	Referent			
2	1.57	0.17	<0.01	[1.25 – 1.98]
3	2.41	0.25	<0.01	[1.95 – 2.97]
4 or more	3.40	0.44	<0.01	[2.61 – 4.44]
Adequate cleaning of udder				
No	Referent			
Yes	0.78	0.06	0.01	[0.66– 0.94]

¹OR: odds ratio compared to referent

²95% CI: 95% Confidence interval

³Overall P-value for categorical variable

Risk factors for Streptococcus agalactiae infection at the quarter level

Table 7 summarizes the final model with only those risk factors that were statistically significant for the presentation of *Strep. agalactiae* at the quarter level. Some of the factors that showed an association with the presence of SM at the quarter level, also showed a similar tendency with respect to *Strep. agalactiae* infection. The odds that an infection was present increased with parity (p<0.01). For parity 2 OR=1.72 (95% CI 1.11, 2.65), for parity 3 OR=2.32 (95% CI 1.54, 3.49) and for parity 4 or more OR=2.91 (95% CI 2.02, 4.18). The odds that an infection was present increased also with month of lactation. For month 2 OR=1.98 (95% CI, 1.44, 2.73), for month 3 OR= 3.23 (95% CI 2.23, 4.68) for month 4 OR= 3.85 (95% CI 2.72, 5.44), for month 5 OR=4.14 (95% CI 3.01, 5.68) and month 6 and above OR= 5.74 (95% CI 4.15, 7.92). Parity had

a similar OR pattern for *Strep. agalactiae* as for SM. However, stage of lactation (≥ 6 months) appeared to have a stronger impact OR= 5.7 (95% CI 4.15, 7.92) ($p < 0.01$), for *Strep. agalactiae*, compared to SM OR= 3.5 (95% CI 3.03, 4.07) ($p < 0.01$). Manual milking was a significant risk for *Strep. agalactiae* OR = 5.4 (95% CI 2.45, 11.8) ($p < 0.01$).

Breed showed no association with *Strep. agalactiae* infection OR=0.59 (95% IC, 0.31, 1.11) ($p=0.1$). However, the role of breed as a confounder was investigated by fitting models for *Strep. agalactiae* infection with and without breed included. None of the coefficients for other variables changed substantially when breed was excluded so we concluded that any confounding effect of breed was minimal. Biologically plausible interactions of predictor variables were assessed and found to be non-significant. For example, the interaction between the proper teat disinfection and good teat cleanliness prior to milking was also examined, but we didn't find any interaction $p=0.69$ (Data not shown). Similar as before, the Hosmer-Lemeshow test indicated a good fit of the model ($p=0.3$).

Table 7. Final logistic regression model assessing the effect of selected herd and cow variables on the probability of quarters to have *Streptococcus agalactiae* infection. n=55,411 observations

Variable	OR ¹	SE	P value	95% CI ²
Month in lactation			<0.01 ³	
Month 1	Referent			
Month 2	1.98	0.31	<0.01	[1.44 – 2.73]
Month 3	3.23	0.58	<0.01	[2.23 – 4.68]
Month 4	3.85	0.65	<0.01	[2.72 – 5.44]
Month 5	4.14	0.64	<0.01	[3.01– 5.68]
Month 6 and above	5.74	0.90	<0.01	[4.15 – 7.92]

Variable	OR ¹	SE	P value	95% CI ²
Parity			<0.01 ³	
1	Referent			
2	1.72	0.36	0.01	[1.11 – 2.65]
3	2.32	0.46	<0.01	[1.54 – 3.49]
4 or more	2.91	0.51	<0.01	[2.02 – 4.18]
Type of milking			<0.01 ³	
Mechanical	Referent			
Manual	5.37	2.06	<0.01	[2.45 – 11.8]
Post dipping			0.025 ³	
Yes	Referent			
No or inadequate	2.23	0.51	<0.01	[1.39– 3.59]
Adequate cleaning of udder				
No	Referent			
Yes	0.71	0.08	<0.01	[0.55– 0.91]

¹OR: Odds Ratio

²95% CI: 95% confidence interval

³Overall P-value for categorical variable

DISCUSSION

This study had a number of strengths and limitations. Because of the extensive nature of the sampling in each of the participating herds, we used a convenience sample stratified on geographic and management representativeness criteria. Herd management practices and regional distributions from census data were used as benchmarks to ensure that the participant herds were representative of dairy herds in the high plains region of Colombia. However, extrapolation of the results, particularly prevalence estimates, beyond this region should not be recommended. Survey command in Stata version 12 was used in the analysis of the data for several reasons. First, the variance linearization procedure used allows for the simultaneous evaluation of both cow-level and herd-level risk factors (while accounting for the repeated samplings within a cow), with

appropriate standard error estimates. Second, it allows of incorporation of sampling weights into all analyses to correctly account for the probability of a herd being sampled within a municipality.

This study was designed to identify major risk factors associated with SM in one of the main milk production areas of Colombia where manual milking still prevails over mechanical milking. In four of the six selected municipalities in the study sample, more than 90% of the herds practice manual milking. In the remaining two municipalities, manual milking is used in 78% and 69% of herds, respectively (Ramírez et al., 2009). In this study, 81% of herds were manual milked. However, only 66% of all quarter-level observations were from cows milked manually because the average herd size is larger for machine milked herds.

Access to automated SCC is limited in the region and the authors have previously determined that CMT had a sensitivity of 82% and a specificity of 97% for determining if a quarter had SM ($\text{SCC} \geq 200,000$ cells/mL) (Ramírez et al., 2010).

In recent years veterinarian extensionists have made big efforts to lead information about bovine mastitis and its prevention to the zone of this study. By doing this work it was noted that still some basic hygienic measures in milking routine are not fully accomplished by the producers and milkers. Some procedures considered important components of preventing bovine mastitis like hand pre-washing, hand washes between cows and premilking teat dipping were made only by 15, 10 and less than 1%, of the producers respectively. However, the percentage of quarters with $\text{CMT} \geq 1+$ found in this study (14.7%) was considered low when compared with the 19.9% found

in another study in Antioquia (Trujillo et al., 2011) and both of these values were much lower than the 34.4% and 48.9% CMT \geq 1+ values observed in studies in Altiplano Cundi-Boyacense the Sabana de Bogota, respectively (Calderon and Rodríguez, 2008, Pinzon et al., 2009). These results were also less than the 45.2% CMT \geq 1+ values observed in a study conducted in Pernambuco state in Brasil in cows of several breeds, ages and lactation periods (Ruiz et al., 2011).

The major types of pathogens isolated in this study were contagious, with *Strep. agalactiae* accounting for 34.4% of all positive milk sample isolates. Similar results were found previously in Antioquia (47%) in San Pedro de los Milagros municipality, and in the Savannah of Bogota (44.9%) (Ramírez et al., 2001), Rodríguez (2006). At the herd level, high prevalence (42%) of *Strep. agalactiae* was also reported in a stratified random sample of bulk tanks from various regions of Colombia (Keefe et al., 2011). The quarter level geometric-mean SCC reported by Djabri et al. (2002) was 357,000 and 857,000 for quarters infected with *Staph. aureus* and *Strep. agalactiae*, respectively. Results in the current study are markedly higher. This may reflect the study design where only quarters with elevated CMT were sampled, or a greater chronicity of infection within our study population. The relatively high proportion of major mastitis pathogens (like *Staph. aureus* and *Strep. agalactiae*) over more minor pathogens such as CNS is also reflective of the study design. Because quarters were pre-screened with CMT, it is likely that infections with mild to moderate SCC response are underrepresented in the prevalence data. However, CNS was the second most frequent group of pathogens in this study further studies are needed to know the impact of this group of bacteria in milking cows of this region.

The relatively high percentage of quarters and cows affected with SM, together with the predominance of contagious bacteria like *Strep. agalactiae*, *Corynebacterium spp* and *Staph. aureus*, could be related to some shortcomings in important aspects of the milking routine. Manual milking was observed as a risk for infection with *Strep. agalactiae* OR=5.4 (95% CI 2.45, 11.8) ($p<0.01$) compared to mechanical milking. The udder is a well-documented reservoir of infection for others cows (Pyörälä, 1995) and infection could be transmitted by the milker's hands in an improper milking routine. CNS was the second most common group of bacteria in order of frequency found in this study. Similar results were obtained in others studies made in Colombia (Ramírez et al., 2001, Rodríguez, 2006) and in Finland (Taponen et al., 2007). Pre-screening with CMT would select higher SCC quarters for SCC and bacteriologic testing. It is likely that that some of the CMT negative samples that were not analyzed at the laboratory could have been infected with CNS and other pathogens, resulting in a lower apparent prevalence of these low to moderate SCC producers. In this study, there was no growth in 30.4% of the milk cultures performed on samples from quarters with SM, which was slightly higher than the 24.1% reported by Calderon and Rodríguez (2008), and the 16.4% reported by Ramírez et al. (2001). This could indicate that the number of bacteria was too low to be detected or that the cow had been removed the infection already (Sandholm, 1995). A few cases could have a possible traumatic etiology associated with the onset of mastitis due the fact that SM implies inflammation within the udder, but not necessarily infection (Dohoo et al., 2011).

Because most management practices are at herd level, with just 37 herds in the logistic regression analysis, only the most important factors influencing the prevalence of SM and *Strep. agalactiae*

(ie. factors with substantial between-herd variation and with a large impact) would be detected by this study. Some variables, which we hypothesized to be important risks for SM and with *Strep. agalactiae* infection, were not significant in the final model. For example, hand pre-washing and hand washing between cows that were done at only 15% and 10% of the observations at milking, respectively. Neither variable was significant in the model. Similarly, adequate PMTD was practiced by 90% of herds and was significant protective factor for *Strep. agalactiae*, but not SM. Lack of variability between herds would lead to very limited power of this study to detect these herd-level risk factors. Some others factors we thought could influence the SM or the *Strep. agalactiae* infection due to its impact in the daily milking process, were number of people milking, milking by the owner and milker changed in the last month, but they were not significant.

Other breeds and Cross-breed cows had a lower prevalence of SM compared to Holstein cows. However, for mastitis due to *Strep. agalactiae*, breed did not have a significant affect in the final model. The prevalence of SM and *Strep. agalactiae* increased with both increasing parity and stage of lactation. The number of calvings and the stage of lactation have also previously been shown to be associated with mastitis (Breen et al., 2009). The milking process has been reported as a risk to transfer of contagious pathogens (Neave et al., 1969). As the number of lactations and months since calving within lactation increases, the number of times cows are exposed to the milking process also increases. This creates a higher cumulative probability of exposure to contagious agents.

Although the proportion of cows with adequate pre-milking teat dip use was very low, starting the milking process with a properly cleaned udder (by other means) was a protective factor against SM and against *Strep. agalactiae* infection. The effectiveness of PMTD in controlling major contagious intramammary pathogens has been well demonstrated (Neave et al., 1969). In this study, when producers did not use PMTD or used it in an inadequate way (not recommended chemical type, improper concentration or not enough time of action in the teat), the risk of *Strep. agalactiae* infection increased OR = 2.2 (95% CI 1.39, 3.59) ($p < 0.01$). This same effect was not observed with respect to SM. The lack of significance of this variable in SM protection could be due to the low power given a small herd-level sample size and widespread use of PMTD. Because SM was defined by CMT and SCC, infections in this category may be associated with other bacteria (such as CNS or environmental pathogens) that are less impacted by PMTD in addition to the major contagious organisms. Although PMTD appeared to be correctly done in most dairy herds, it has no effect on existing infections (i.e. persistence of existing subclinical infections), and unless it is part of a complete contagious mastitis control plan, the disinfectants are unlikely to fully protect against contagious organisms.

CONCLUSIONS

There was a high prevalence of SM at both the cow and quarter levels. The most common group of microorganisms isolated were contagious bacteria and the highest frequency was for *Strep. agalactiae*. Factors associated with SM were Holstein breed, higher parity, later stage of

lactation, and an unclean udder at the start of milking. Factors associated with subclinical mastitis caused by *Strep. agalactiae* were similar: Holstein breed, higher parity, greater month of lactation and an unclean udder at the start of milking. Additionally, subclinical mastitis caused by *Strep. agalactiae* was associated with manual milking and inadequate PMTD. The results highlight the importance of poor hygiene practices in maintaining a high prevalence of udder infection by contagious organisms, particularly in manual milking herds.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, Universidad de Antioquia, Cooperativa COLANTA, and Federación de Asociaciones de Ganaderos, FAGA. The authors thanks the Sustainability Project 2013-2014 (Estrategia de sostenibilidad CODI 2013-2014, University of Antioquia). We finally thanks to Dr. David Villar for his help in the translation of the manuscript.

REFERENCES

- Breen, J. E., M. J. Green, and A. J. Bradley. 2009. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J. Dairy Sci.* 92(6):2551-2561.
- Calderon, A. and V. Rodríguez. 2008. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Rev Colomb Cienc Pecu* (21):582-589.

- Djabri, B., N. Bareille, F. Beaudeau, and H. Seegers. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet. Res.* 33(4):335-357.
- Dohoo, I. R. and A. H. Meek. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. *Can. Vet. J.* 23(4):119-125.
- Dohoo, I., S. Andersen, R. Dingwell, K. Hand, D. Kelton, K. Leslie, Y. Schukken, and S. Godden. 2011. Diagnosing intramammary infections: comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 94(11):5515-5522.
- Dufour, S., A. Frechette, H. W. Barkema, A. Mussell, and D. T. Scholl. 2011. Invited review: effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 94(2):563-579.
- Edmonson A.J., L. I. J., Weaver L.D., Farver T. and Webster G. 1989. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* (72):68-78.
- Fetrow, J., D. Mann, K. Butcher, and B. McDaniel. 1991. Production losses from mastitis: carry-over from the previous lactation. *J. Dairy Sci.* 74(3):833-839.
- Harmon, R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77(7):2103-2112.
- Keefe, G., A. Ceballos, M. Jaramillo, M. Londoño, M. Chaffer, and T. M. 2011. Effects of *Streptococcus agalactiae* on the Columbian Dairy Industry. Pages 155-159 in Proc. 3rd International Symposium on Mastitis and Milk Quality, St. Louis, Missouri USA.
- Kramer, E., D. Cavero, E. Stamer, and J. Krieter. 2009. Mastitis and lameness detection in dairy cows by application of fuzzy logic. *Livest Sci* 125(1):92-96.

- MacFaddin, J. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Bacteria*. 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- N.M.C. 1999. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis Revised Edition*. National Mastitis Council, Madison.
- Neave, F. K., F. H. Dodd, R. G. Kingwill, and D. R. Westgarth. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy Sci.* 52(5):696-707.
- Pinzon, A., F. Moreno, and G. Rodriguez. 2009. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Rev Med Vet* (17):23-25.
- Pitkälä A. M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, T. Honkanen-Buzalki. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001-Prevalence, Distribution and bacteria, and Antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.
- Pyörälä, S. 1995. Staphylococcal and Streptococcal mastitis. Pages 143-148 in *The bovine Udder and mastitis*. M. Sandholm, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, and S. Pyörälä, ed. Gummerus, Jyväskylä, Finland.
- Ramírez, N., J. Cerón, M. Jaramillo, L. Palacio, and O. Arroyave. 2010. Diagnóstico de mastitis en el Norte de Antioquia. in *Proc. VII Seminario Internacional Competitividad en carne y leche*.
- Ramírez, N., G. Gaviria, O. Arroyave, and B. Sierra. 2001. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu* (14):76-87.

- Ramírez N., M. Olivera, O. Arroyave, M. Jaramillo, J. Cerón, L. G. Palacio. 2009. Caracterización de los sistemas de ordeño en granjas lecheras de seis municipios del Altiplano norte del Departamento de Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 22:3. pp 416
- Rodríguez, G. 2006. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Rev Med Vet* (12):35-55.
- Rodríguez, G., D. Contreras, and M. Ordoñez. 2002. Caracterización de la mastitis bovina en el Valle de Ubaté. *Rev Med Vet* 2(4):57-66.
- Ruiz, A., P. Ponce, G. Gomes, R. Mota, E. Sampaio, E. Lucena, S. Benone. 2011 Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en PERNANBUCO, BRASIL. *Rev. Salud Anim.* 33 (1):57-64
- Sandholm, M. 1995. Inflammation in mastitis. Pages 59-75 in *The Bovine udder and mastitis*. T. H.-B. Satu Pyörälä Markus Sandholm, Liisa Kaartinen, ed, Helsinki.
- StataCorp. 2011. StataCorp. 2011. Stata: Release 12. Statistical Software Release 12. ed. StataCorp LP., College Station, Texas.
- Taponen, S., J. Koort, J. Bjorkroth, H. Saloniemi, and S. Pyorala. 2007. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *J. Dairy Sci.* 90(7):3301-3307.
- Trujillo, C., A. Gallego, N. Ramírez, and L. Palacio. 2011. Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu* (24):11-18.
- Winn, W., S. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schrenckenberger, and G. Woods. 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD (USA).

CAPITULO 5

Objetivo de la Tesis a los cuales apunta este artículo

- Determinar la asociación entre la presentación de mastitis infecciosa y sus patógenos, con los genes DRB3.2 y TLR4 en vacas Lecheras de la Microcuencia Lechera del Altiplano Norte de Antioquia.

Association of BoLA-DRB3 and TLR4 alleles with subclinical mastitis in cattle from Colombia

Asociación de los alelos BoLA-DRB3 y TLR4 con mastitis subclínica en vacas de Colombia

Associação de BOLA-DRB3 alelos e TLR4 com mastite subclínica em vacas da Colômbia

Nicolás F Ramírez^{1*}, DVM, MSc; Alba Montoya², Biol, MSc; Mario F Cerón², Zoot, PhD; David Villar³, DVM, PhD; Luis G Palacio¹ DVM, PhD.

¹ *Epidemiology and Public Health line, Centauro Research Group, School of Veterinary Medicine, Faculty of Agricultural Sciences, University of Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.*

² *GaMMa Research Group, Faculty of Agricultural Sciences, University of Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.*

³ *Biogenesis Research Group, Faculty of Agricultural Sciences, University of Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.*

The contents of this chapter are published as: N.F. Ramírez, A. Montoya, M. Cerón-Muñoz, D. Villar, L. G. Palacio. 2014. Association of BoLA-DRB3 and TLR4 alleles with subclinical mastitis in cattle from Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2014; 27:18-28

Categoría A1 Publindex

Summary

Background: molecular markers for genetic resistance can be used to control mastitis in dairy cattle. The Major Histocompatibility Complex and Toll like receptor 4 (*TLR4*) are two promising genes candidates that warrant investigation. **Objective:** to identify associations between the genotypes of BoLA-DRB3 locus and fragment T4CRBR2 with the occurrence of subclinical mastitis (SM). **Methods:** 996 lactating cows from 32 herds comprising Holstein (80%), Holstein x Jersey cross (12.5%) and other cross breeds (7.5%), were evaluated monthly during two years, diagnosed for SM and genotyped for the second exon of the BoLA DRB3 and the *TLR4* coreceptor-binding region 2 (T4CRBR2) using a Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism technique (PCR-RFLP). The association between candidate alleles and subclinical mastitis was measured by logistic regression. **Results:** The most frequently observed alleles for BoLA-DRB3 were *DRB3.2* *8, *22, *24, *16, *10, *23, **gba*, *11, *2, **mbb*, **jba*, *3, and *15, accounting for 58.9% of the population. Frequencies for T4CRBR2 alleles A and B were of 0.352 and 0.647, respectively. Based on 57,408 observations during the period, the mean SM prevalence of was 16.2% (95% CI 13.0, 19.4) per udder quarter and 37.6% (95% CI 32.1, 43.2) per cow. The predominant microorganisms isolated from SM quarters were *Streptococcus agalactiae* and Coagulase-Negative Staphylococci (CNS). Allele *DRB3.2* *23 was associated with SM occurrence and CNS infection. No alleles were associated with *Streptococcus agalactiae* infection. Allele **mbb* was associated with the occurrence of CNS infection and alleles **jba* and *15 were associated with resistance to CNS infection. No significant relationship between T4CRBR2 and SM was observed. **Conclusion:** *DRB3.2* gen may play an important role in the occurrence of SM and certain alleles may confer resistance to specific pathogens.

Key words: *genetic markers, mammary gland, marker-assisted selection.*

Resumen

Antecedentes: Los marcadores moleculares genéticos de resistencia para mastitis bovina son una herramienta para el control de la enfermedad en rebaños lecheros. Los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y el Toll Like Receptor 4 (*TLR4*) son dos genes candidatos promisorios que justifica investigar. **Objetivo:** Identificar asociaciones entre los genotipos del locus BoLA-DRB3 y del fragmento T4CRBR2 con la ocurrencia de mastitis subclínica. **Métodos:** 996 vacas lactantes de 32 hatos de las razas Holstein (80%), Holstein x Jersey (12.5%) y otros cruces (7.5%), fueron visitadas mensualmente por dos años, diagnosticadas para mastitis subclínica y genotipificadas para el segundo exón del DRB3 y para la región 2 de unión al correceptor del TLR4 (T4CRBR2) por medio de las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa y de Longitud del Polimorfismo del Fragmento de Restricción (PCR-RFLP). La asociación entre los alelos candidatos y la mastitis subclínica se midió por regresión logística. **Resultados:** Los alelos más frecuentes para el DRB3.2 fueron *8, *22, *24, *16, *10, *23, *gba, *11, *2, *mbb, *jba, *3 y *15, que suman el 58.9% del total en la población. Las frecuencias para los alelos A y B del T4CRBR2 fueron de 0.352 y 0.647, respectivamente. Basados en 57,408 observaciones, la prevalencia de MS a nivel de cuarto fue 16.2% (95% IC 13.0, 19.4) y a nivel individual fue de 37.6% (95% IC 32.1, 43.2). Los microorganismos más frecuentes fueron *Streptococcus agalactiae* y Estafilococo Coagulasa Negativo (ECN). El alelo DRB3.2 *23 fue el más asociado con la ocurrencia de MS y con la infección por ECN. No se hallaron alelos asociados a infección con mastitis por *Streptococcus agalactiae*. Con respecto a la infección por ECN, el *mbb se asoció con la ocurrencia y los alelos *jba y *15 se asociaron con resistencia. No se observó asociación entre T4CRBR2 y MS. **Conclusión:** El gen DRB3.2 puede jugar un papel importante en la presencia de MS y ciertos alelos como pueden conferir resistencia a patógenos específicos.

Palabras clave: glándula mamaria, marcadores genéticos, selección asistida por marcadores.

Resumo

Antecedentes: O uso de marcadores moleculares de resistência para mastites permitem controlar esta doença em rebanhos leiteiros. Os genes Toll Like Receptor 4 (TLR4) e o Complexo Mayor de Histocompatibilidade são dois genes candidatos promissórios que justifica pesquisar. **Objetivo:** Identificar associações entre genótipos do locus BoLA-DRB3 e do fragmento T4CRBR2 com a ocorrência de mastite subclínica. **Método:** 996 vacas em lactação de 32 rebanhos da raça Holandesa (80%), Holandês x Jersey (12.5%) e outros cruces (7.5%) foram visitadas mensalmente por dois anos, diagnosticadas para mastites subclínica e foram genotipados para o exon segunda BoLA DRB3 e região 2 da ligação co-receptor TLR4 (T4CRBR2) através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase e do Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). A associação entre alelos candidatos e mastite subclínica foi realizada por meio de regressão logística. **Resultados:** Os alelos mais frequentes *8, *22, *24, *16, *10, *23, *gba, *11, *2, *mbb, *jba, *3 e *15, com um 58.9% do total da população. As frequências dos alelos A e B do T4CRBR2 foram 0.352 e 0.647, respectivamente. Com base em 57,408 observações, a prevalência da SM em quartos mamários foi de 16.2% (IC 95% 13.0, 19.4) e ao nível de vaca foi de 37.6% (IC 95% 32.1, 43.2). Os microrganismos mais comuns foram: *Streptococcus agalactiae* e Estafilococos Coagulase-negativo, ECN. O alelo DRB3.2 *23 foi o mais associado com a ocorrência de SM e com a infecção por ECN. Não foram encontrados alelos associados à infecção por *Streptococcus agalactiae*. Em relação à infecção por ECN, o *mbb esteve associado com ocorrência e os alelos *jba e *15 estiveram associados com resistência. Não existiu associação entre MS e os alelos do T4CRBR2. **Conclusão:** O gene DRB3.2 bovino pode desempenhar um papel importante na presença de MS e algunos alelos como *jba and *15 podem conferir resistência à patógenos específicos.

Palavras-chave: glândula mamaria, marcadores genéticos, seleção assistida por marcadores.

Introduction

Despite efforts to control and prevent mastitis through udder health programs, mastitis remains the dairy industry's costliest disease (Francoz *et al.*, 2012). Reducing bovine mastitis losses is necessary to keep milk producers economically competitive and maintain costs of dairy products within a reasonable limits. Current methods to reduce mastitis incidence, such as therapeutic and prophylactic measures, are not totally effective. One alternative approach could be to improve cows' natural genetic-resistance to udder pathogens (Detilleux, 2002).

Interest in genetic markers for disease resistance has increased. Of particular importance genes of the Major Histocompatibility Complex (MHC) also known as bovine leukocyte antigen (BoLA), which has been widely studied. This complex has been mapped to chromosome 23 and consists of three classes, I, II and III, which span about 2.5 Mbp (Andersson and Davies, 1994). Most studies associating the occurrence of infectious diseases in cattle with gene candidates have focused on the gene DRB3 of the BoLA IIa region which encodes for the antigen binding groove of the molecule and is highly polymorphic (Xu *et al.*, 1993; Dietz *et al.*, 1997a; Dietz *et al.*, 1997b; Duangjinda *et al.*, 2009). Although breeding programs would benefit from selecting for alleles associated with disease resistance (or host defense mechanisms) to multiple pathogens, conflicting results have been reported on whether specific alleles offer protection or susceptibility to mastitis. Consequently, further studies are warranted to clarify the role of DRB3 alleles on SM.

Other candidate genes that play key roles in immune cells belong to the Toll-like receptor (TLR) family, which mediate recognition of numerous microbial components (Taro and Akira, 2005). Multiple TLRs detect several features of a microbe simultaneously in particular the TLR4 has been characterized for detecting the structure of the Gram-negative bacterial lipopolysaccharide (Underhill and Ozinsky, 2002). The TLR4 gene encodes for a protein of 841 amino acids, of which two domains are for the putative co-receptor-binding regions 1 and 2 (T4CRBR1 and T4CRBR2). The genetic polymorphism of these regions has been characterized by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism and PCR-RFLP (Wang *et al.*, 2007). Interestingly, mastitis

in cows strongly increases mRNA expression of TRL4 (Goldammer *et al.*, 2004), but whether or not, it improves pathogen perception and signaling still remains to be elucidated.

The objective of this study was to identify associations between the most frequent genotypes of BoLA-DRB3 locus and fragment T4CRBR2 in cows with the occurrence of subclinical mastitis.

Materials and methods

Ethical considerations

This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the University of Antioquia (Act number 48, December 12, 2008).

Herd Selection

A convenience sample of 32 herds were selected from the 3,049 registered dairy farms from the six municipalities that comprise the specialized dairy production in the high plains of the northern Antioquia, Colombia (Entrerrios, Belmira, Santa Rosa de Osos, San Jose de la Montaña, San Pedro de los Milagros, and Donmatias). Within each municipality, herds were selected based on the following typical management conditions in the region, including herd size, type of milking system, nutrition program and breed. Others aspects taken in to account when selecting the herds were easy road access, on-farm cooling tanks, proper cow identification, owner's willingness to collaborate with sample collection. All the cows in each herd selected were included in the study.

Visit protocol and sample collection

Farms were visited each month for 2 years (January 2009 to December 2010) for collection of milk samples during the evening milking. A California Mastitis Test (CMT) was performed on all milking cows that were more than 4 days postpartum. Udder and teats were prepared by the farmer using the normal routine. Subsequently, the first streams of milk were discarded before collection. CMT was performed as instructed by the manufacturer. When a positive or suspect CMT resulted, the teat ends were disinfected with cotton swabs drenched in 70% alcohol, and duplicate samples (approximately 5 ml each) were collected from every quarter and later

submitted for a somatic cell count (SCC) using the DeLaval Cell Counter (DCC) (DeLaval Sweden, Stockholm). Any sample containing $SCC \geq 200,000$ cells/mL was submitted for bacterial culture. The SCC test and bacterial cultures were performed at the Microbiology Laboratory of the Veterinary Medicine School of the University of Antioquia.

Bacteriological culture

Samples were analysed using standard laboratory methods for microbiological analysis (MacFaddin, 2000; Winn et al., 2006). Growth of three or more bacterial species was considered contaminated and discarded from the analysis (Parker *et al.*, 2008). Performed tests were intended to identify the following microorganisms: *Staphylococcus aureus*, Coagulase-negative *Staphylococci* (CNS), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, and yeast (*Candida spp.*).

Case Definition

An udder quarter was considered affected by SM if it had a trace CMT score or higher and a subsequent $SCC \geq 200,000$ cells/mL. A cow was classified as having SM if one or more quarters were affected by SM. For pathogen prevalence, a quarter was considered infected if it was diagnosed as having SM and either one or two pathogens were isolated from the milk sample. Quarters with negative CMT score were not sampled and hence were classified as non-infected in the analysis. A cow was considered infected if one or more quarters was infected. Only *Streptococcus agalactiae* and CNS infections were analyzed in detail.

Blood collection and DNA extraction

EDTA vacutainer tubes were filled with 10 mL blood collected from the tail veins. Genomic DNA was isolated from the white blood cells using the “Salting-out” method as previously described (Miller *et al.*, 1988).

Amplification of gen DRB3.2 (GenBank accession No. 282530)

Amplification of gen RB3.2 was performed by nested Polymerase Chain Reaction (PCR) with two sequential reactions, the first round using primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') and HL031 (5'-TTT AAA TTC GCG CTC ACC TCG CCG CT 3'), followed by a second reaction that used primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') and HLO32 (5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3'), as suggested by Gilliespie *et al.* (1999).

The first reaction was carried out in 10µL total volume containing 50 ng genomic DNA, 1x PCR buffer (10mM Tris-HCL pH 9.0; 50 mM KCl; 0.1% Triton[®] X-100), MgCl₂ (2.5 mM), dNTPs (0.2 mM), 0.5 mM of each primer and 1.5 units of *Taq* DNA polymerase (Fermentas[®]). For the second reaction, the composition in a total of 40 µL was: 4 X buffer (10 mM Tris-HCL pH 9.0; 50mM KCl; 0.1 % Triton[®] X-100), MgCl₂ (1.75 mM), dNTPs (0.25 mM), 0.5 mM for each primer and 2.0 units of *Taq* DNA Polymerase (Fermentas[®]), and 2µl of the first reaction product. The reactions were performed in a thermal cycler (Bio-Rad C-1000[®]) using the following cycling profile: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of 94 °C for 45 s, 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 7 min. The final product was a 284 bp segment, that was digested separately with 3 restriction endonucleases: *RsaI*, *HaeIII*, y *BstyI* as described by Van Eijk *et al.*, (1992). Digestions were performed as prescribed by the manufacturer (FastDigest[®], Fermentas[®]). The resulting fragments were resolved on a 8% denaturing polyacrylamide gel by running at 1600/1900 V, 25/60 mA, for 2.5 hours and then stained with nitric acid as described by Budowle *et al.*, (1991). The designation into different alleles was made using a reference ladder (Low Range DNA Ladder, O'gene ruler[™], Fermentas[®]) according to the allelic nomenclature described by Van Eijk *et al.* (1992).

Amplification of gen TLR4 (GenBank accession No. DQ839566)

The co-receptor-binding region 2 of the gen was amplified using the following primers: forward 5'-AGACAGCATTTCCTCCCTC-3' and reverse -5'-ACCACCGACACACTGATGAT-3'. The PCR reactions were carried out in a total volume of 20 µL containing 50 ng of genomic DNA, 1 x buffer (10mM Tris-HCL pH 9.0; 50 mM KCl; 0.1 % Triton[®] X-100), MgCl₂ (2.0 mM), dNTPs

(0.2 mM), each of the primers (0.25 μ M) and 0.5 U *Taq* DNA Polymerase (Fermentas[®]). The reactions were conducted in a thermal cycler (Bio-Rad C-1000[®]) using the following protocol: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 61.5 °C for 30 s, 72° C for 50 s; and a final extension of 72 °C for 6 min. The final product was a 382 pb amplicon that was digested with enzyme *AluI* FastDigest[®], as prescribed by the manufacturer (Fermentas[®]). The sample was then electrophoresed in agarose gel and DNA bands patterns were observed under a transilluminator (UV Transilluminator UVP) and genotypes identified based on an allelic ladder (Low Range DNA Ladder, O'gene ruler[™], Fermentas[®]).

Statistical Analysis

Analysis of allele frequencies: The frequencies of each restriction products from enzymes, *RsaI*, *HaeIII* y *BstYI* (*PsuI*), were calculated using PopGen32 (Yeh *et al.*, 2000). Due to the highly polymorphic nature of BoLA-DRB3.2, only alleles with >2% frequency of were used for the analysis and considered as independent variables. The dependent variables were the disease state: SM, infection by *Streptococcus agalactiae* and CNS infection. The polymorphism for the T4CRBR2 region of TLR4 gene was assessed by calculating the frequencies for A and B alleles.

Logistic regression Analysis: data was examined for biologically implausible entries and any erroneous entries were removed. Descriptive statistics were computed for all variables of interest using standard methods. Observations were stratified by municipality and sampling weights were computed as the inverse of the probability of the herd being selected in the municipality (i.e. # of herds in municipality divided by # of herds selected in municipality). The clustering and repeated measures structure of the collected data (multiple observations from quarters which were clustered within cows which were clustered within herds) using the survey package of Stata[™] (svy). The model response variables were SM, *Streptococcus agalactiae*, and CNS infection (presence or absense). The effect of cluster was at random and each one of the risk factors (breed, month in lactation, parity, and the DRB3.2 and TLR4 alleles) were fixed effects.

The survey logistic model took the general form

$$(Y) \sim \text{binary outcome (probability } \pi),$$

$$\text{Logit}(\pi) = \text{intercept} + \beta_1 b + \beta_2 \text{-14DRB3.2} + \beta_5 \text{TLR4} + \beta_6 \text{lm} + \beta_7 p + e$$

Y is the outcome variable; π is the fitted probability of the outcome; β_1 to β_7 are the coefficients associated with each covariate: b is the covariate “breed”, DRB3.2 is the covariate DRB3.2 alleles (*8, *24, *22, *15, *3, *jba, *mbb, *11, *2, *gba, *23, *10, *16), TLR4 is the covariate TLR4 allele (*T4CRBR2), p is the covariate “parity”, lm is the covariate “lactation month”, e is the random residual effect.

Unconditional logistic analyses between each risk factor and the outcomes were computed, and associations with $p < 0.15$ were retained for consideration in multivariable models. Multivariable logistic regression models were constructed with variables remaining in the model if they had a Wald test $p < 0.05$. The potential confounding effect of breed was evaluated by refitting the final models with breed omitted to see if the coefficients for other predictors changed substantially. Results from the final models are presented as odds ratios (ORs) along with their 95% confidence intervals. If OR was greater than 1, the factor was considered as a risk factor for causation of the disease. When OR was less than 1, the factor should be viewed as a sparing or a resistant factor (Martin et al., 1987). Model adequacy was assessed by the Hosmer-Lemeshow goodness of fit test (Hosmer and Lemeshow, 2000) for regression analysis (Vittinghoff et al., 2012). It should be highlighted that the Hosmer Lemeshow goodness of fit test was performed for all regression models, observing a proper adjustment for each. Analysis was done using the Stata’s survey command of Stata® (StataCorp, 2011).

Results

A total of 57,408 observations were made at the quarter level, accounting for 996 cows in 32 herds, 80.0% of which were Holsteins, 12.5% Holstein x Jersey, and 7.5% other crossbreds. The mean (\pm SD) of the population data and production parameters is shown in table 1. Mastitis prevalence at the quarter and cow levels were 16.2% (95% CI 13.0 and 19.4) and 37.6% (95%

CI, 32.1 and 43.2), respectively. The most frequently isolated bacteria were *Streptococcus agalactiae* and CNS in 32.4% and 17.3% of the cases, respectively (data not shown).

Table 1. Production parameters of the studied bovine population (n=996).

Variable	Mean (\pm SD)	Minimum	Maximum
Days in lactation	187.3 \pm 127	4	966
Parity	3.4 \pm 2.1	1	15
Animals per herd	34.3 \pm 23.7	6	136
Production (Liters/day)	18.1 \pm 6.3	4	50
Concentrate (Kg/day)	4.92 \pm 2.1	1	13

Allele frequencies of BoLA DRB3.2 genes digested with RsaI, HaeIII and BstYI

The PCR product of the DRB3.2 locus was a 284 bp amplicon. Digestion with RsaI resulted in 92 genotypes and 19 alleles identified as a-o, r, s, u, and w, with frequencies ranging from 0.0005 for allele r, to 0.1898 for allele f. The effective allele number was 7.9 and the heterozygosity value was 0.8243.

Enzyme *HaeIII* resulted in 26 genotypes and 8 alleles identified as a-f, h and i. Frequencies varied from very low for allele c (0.0040), to high for allele a (0.5371), with 2.74 effective number of alleles and 0.6345 heterozygosity value.

Restriction enzyme *BstYI* (*PsuI*) yielded 8 genotypes, with 4 of the 5 alleles (a, b, d and e). The lowest frequent was allele d (0.0040) and the most frequent was allele b (0.6662). The effective number of alleles was 1.95 and the value of heterozygosity was 0.4679.

Allele Frequencies of the TLR4 (T4CRBR2 region)

By digestion with the enzyme *AluI* a segment of 382 bp was amplified from locus *T4CRBR2* by PCR. Two alleles, *A y *B were obtained with frequencies of 0.3522 and 0.6478 respectively. The effective number of alleles was 1.83 and heterozygosity of 0.5515. Genotypic frequencies of the *T4CRBR2* locus for each breed examined are shown in Table 2.

Table 2. Genotypic frequencies for T4CRBR2 among 996 cows sampled

Locus	Breed	Genotypic frequency						Total	%
		AA		AB		BB			
		n	%	n	%	n	%		
T4CRBR2	Holstein	60	7.5	446	55.6	296	36.9	802	80.5
	Holstein x Jersey	8	6.9	64	55.2	44	37.9	116	11.6
	Crossbreed	9	11.5	37	47.4	32	41.0	78	7.8
	Total	77	7.7	547	54.9	372	37.3	996	100.0

Allele Frequencies of the BoLA DRB3.2

A total of 149 alleles were found from 996 cows sampled; those with frequencies below 0.02 are not reported. When alleles with frequencies below 2% were removed from the analysis of association with SM, only 381 cows remained in the regression analysis model. The distribution of those alleles with frequencies > 2% in 996 cows ranged from 0.048 to 0.123 (Table 3). In order of decreasing frequencies, the most common alleles were *8 (0.123), *22 (0.095), and *24 (0.070).

Table 3. Allelic frequency of BoLA *DRB3.2* among 996 cows sampled (only includes alleles with frequencies >2%).

Frequency range	DRB3.2 Allele (individual frequency)
>0.10	*8 (0.123)
>0.05 a 0.10	*24 (0.070), *22 (0.095).
> 0.02 a 0.05	*15 (0.022), *3 (0.025), *jba (0.027), *mbb (0.028), *11 (0.028), *2 (0.028), *gba (0.031), *23 (0.031), *10 (0.033), *16 (0.048)
<0.02	Others (136 possible alleles)

Logistic regression analysis

An initial logistic regression analysis of DRB3.2 and TLR4 (T4CRBR2) alleles and some factors that included data from all 381 cows (without the breed variable) showed no changes in OR or standard errors for genetic variables. No association between SM and breed in the final model was observed ($p>0.05$). Regarding months in lactation, a significant ($p<0.01$) association occurred between time in lactation and SM risk, which was significant at the third month and beyond. For month three OR=1.54 (95% CI 1.17, 2.04) ($p<0.01$) for month four OR=1.75 (95% CI 1.41, 2.16) ($p<0.01$) for month five OR=2.08 (95% CI 1.57, 2.74) ($p<0.01$), for month six or more OR=2.94 (95% CI 2.34, 3.69). Similarly, number of calvings was significantly ($p<0.01$) associated with increased risk of having SM from third calving and beyond ($p<0.01$). Regarding T4CRBR2 alleles, no association was found with SM, *St. agalactiae*, or CNS infection. For the DRB3.2 alleles, only allele *23 behaved as a risk factor for SM and showed significant ($p<0.05$) OR=1.46 (95% CI 1.01, 2.09 $p<0.05$) (Table 4).

No association was found between DRB3.2 alleles and *Streptococcus agalactiae* infection. The analysis of DRB3.2 alleles and some cow factors associated to the infection by CNS in the mammary gland are shown in table 5. Breed was not a significant risk factor for the occurrence of such infection ($p>0.05$). A significantly high infection risk was observed for calvings 3th OR=2.07 (95% CI 1.00, 4.27 $p=0.049$), 5th OR=2.66 (95% CI 1.47, 4.81 $p=0.01$), and 6th OR=2.76 (95% CI 1.05, 7.26 $p=0.04$). Months of lactation, when referenced with time between birth and first month of lactation, presented an increased risk of CNS infection at 5th OR=2.19 (95% CI 1.06, 4.51 $p<0.05$) and 6th or more months OR= 2.79 (95% CI 1.71, 4.52 $p<0.01$). For CNS infection the DRB3.2 genes, alleles *jba and *15 behaved as protective factors with OR=0.32 (95% CI 0.11, 0.93 $p=0.04$) and 0.48 (95% CI 0.30, 0.79 $p<0.01$), respectively, and alleles *23 and *mbb behaved as a risk factor with 2.17 (95% CI 1.19, 3.95 $p=0.013$) and 2.43 (95% CI 1.19, 4.96 $p=0.016$), respectively.

Table 4. Logistic regression model output determining the probability for quarters to have subclinical mastitis for selected cow variables (n=20,909)

Variable	OR	SE	P value	95% CI
Month in lactation			0.01 ^a	
1	Referent			
2	1.15	0.11	0.16	[0.94 – 1.42]
3	1.54	0.21	0.01	[1.17 – 2.04]
4	1.75	0.18	0.01	[1.41 – 2.16]
5	2.08	0.28	0.01	[1.57 – 2.74]
≥ 6	2.94	0.32	0.01	[2.34 – 3.69]
Parity			0.01 ^a	
1	Referent			
2	1.36	0.28	0.14	[0.89 – 2.08]
3	2.11	0.56	0.01	[1.23 – 3.63]
4	2.67	0.58	0.01	[1.70 – 4.18]
5	3.94	0.82	0.01	[2.57 – 6.04]
6	3.68	0.92	0.01	[2.20 – 6.16]
7	3.53	0.90	0.01	[2.10 – 5.96]
≥ 8	3.30	1.07	0.01	[1.69 – 6.43]
Allele				
*23	1.46	0.25	0.04	[1.01 – 2.09]
_cons	0.035	0.06	0.01	[0.02 - 0.05]

OR: odds ratio compared to referent

SE: Standard error

P value: level of significance

95% CI: 95% Confidence interval

Cons: Intercept

^a*Overall P-value for categorical variable*

Discussion

This study analyzed the potential association of TLR4 (T4CRBR2) gene and DRB3.2 alleles with the occurrence of SM, *Streptococcus agalactiae*, and CNS related infections. In terms of allelic

frequencies, the results of digestion with 3 restriction endonucleases showed that DRB3.2 locus was highly polymorphic.

Table 5. Results of the logistic regression model to determine the association between quarters infected with Coagulase Negative Staphylococci infection and some selected cow variables (n=21,064)

Variable	OR	SE	P value	95% CI
Month in lactation			<0.01 ^a	
1	Referent			
2	0.97	0.27	0.92	[0.54 – 1.75]
3	1.69	0.63	0.18	[0.77 – 3.67]
4	1.29	0.47	0.49	[0.61 – 2.73]
5	2.19	0.77	0.034	[1.06 – 4.51]
≥6	2.79	0.66	<0.01	[1.71 – 4.52]
Parity			<0.05 ^a	
1	Referent			
2	1.01	0.36	0.97	[0.48 – 2.12]
3	2.07	0.73	0.049	[1.00 – 4.27]
4	1.76	0.56	0.08	[0.91 – 3.37]
5	2.66	0.76	<0.01	[1.47 – 4.81]
6	2.76	1.29	0.04	[1.05 – 7.26]
7	1.82	1.06	0.30	[0.55 – 6.04]
8 or more	2.68	1.80	0.15	[0.67 – 10.7]
Allele				
*23	2.17	0.63	0.013	[1.19 – 3.95]
*mbb	2.43	0.84	0.016	[1.19 – 4.96]
*jba	0.32	0.16	0.037	[0.11 – 0.93]
*15	0.48	0.11	<0.01	[0.30 – 0.79]
_cons	0.00	0.00	<0.01	[0.00 - 0.01]

OR: odds ratio compared to referent

SE: Standard error

P value: level of significance

95% CI: 95% Confidence interval

Cons: Intercept

^a*Overall P-value for categorical variable*

Results of digestion with *RsaI* endonuclease coincided with those previously assigned to letters *a*–*o*, *r*, *s*, (Van Eijk et al., 1992), *u* (Gelhaus et al., 1995) and *w* (Maillard et al., 1999). Digestion with *HaeIII* enzyme coincided with pattern *a* to *f* described by Van Eijk et al. (1992), *h* (Gelhaus et al., 1995), and *i* (Roslin, 2002). Similar to the fragments attained with *RsaI*, *HaeIII* enzyme showed high heterozygosity value, implying a high degree of genetic variation in this locus. The alleles resulting from digestion with *BstY* (*PsuI*) endonuclease coincided with those reported by Van Eijk et al. (1992).

This study found 149 distinct DRB3.2 alleles, though frequencies below 2% were considered irrelevant for the analysis of association with SM, *S. agalactiae* and CNS infection, and therefore excluded to avoid confounding results. Demonstration of the existence of new DRB3.2 alleles should be accompanied by proper sequencing, which was beyond the scope of this study.

The number of alleles was high, but according to Lewin and Van Eijk, (1994), when all restriction fragment patterns for each enzyme (*RsaI*, *BstY1*, *HaeIII*) are considered, a total of 2048 combination of sites are possible, and twice that number of alleles is possible if a 3 base pair deletion is included as a source of variation (Lewin and Van Eijk, 1994). The high polymorphism of DRB3.2 found was probably accentuated by the large number of animals in the sample ($n = 996$) and also by the different breeds and crosses represented. The sample was mainly composed by Holstein and Holstein x Jersey crossbreds; the category “other breeds or crosses”, despite being the group with the lowest number of animals, was represented by a great diversity that included Ayrshire, Swedish Red, Swiss Brown, Jersey, and several crosses of Holstein with other breeds such as Ayrshire, Angus, Blanco Orejinegro (BON), Zebu Brahman and Gir.

High polymorphisms in DRB3.2 from cattle in other Colombian studies were reported by Zambrano *et al.* (2011), who identified 23 and 18 alleles in 66 pure Holstein and 25 BON cows, respectively. Martinez *et al.* (2005) found 35 and 11 alleles in 140 BON and 22 Brahman cows, respectively. Hernandez, (2010) reported 41 alleles in 360 cows from different breeds, mostly creole Colombian cattle; Giovambattista *et al.* (2013) reported 24 (22 reported and two new) in

Hartón del Valle breed. In Mexico, high polymorphism was also reported by Fernandez *et al.* (2008) who identified 52 *DRB3.2* alleles in 98 cattle, and in Thailand Duangjinda *et al.* (2009) reported 40 different alleles in 409 Holstein x Zebu cows. In particular, the high frequency observed for allele *23 was also reported by Zambrano *et al.* (2011) in Holstein and BON x Holstein cows from Colombia. In this study, the high frequencies of alleles *DRB3.2* *8, *22 and *24 in Holstein cows was similar to that reported by other authors (Dietz *et al.*, 1997a; Sharif *et al.*, 1998; Rupp *et al.*, 2007) and by Starkenburg *et al.* (1997) who reported that alleles *8, *22, *23, *24 and *27 accounted for 66.8% of all alleles. Van Eijk *et al.* (1992) and Gelhaus *et al.* (1995) reported high frequencies for alleles *8 and *11 in Holstein cows. With regards to *T4CRBR2*, the predominant allele was B in the three cattle populations, genotypic frequency for AB was the highest in both loci, with AA being the lowest, in agreement with the findings by Wang *et al.* (2007).

Relationship between bovine subclinical mastitis, S. agalactiae and CNS infection and the polymorphisms of the gens TLR4 (T4CRBR2) and DRB3.2

In the logistic regression analysis, breed was not associated with SM, *S. agalactiae* or CNS infection. An increased risk for SM was observed as the number of months in lactation increased, month three OR=1.54 (95% CI 1.17, 2.04) ($p<0.01$), month four OR=1.75 (95% CI 1.41, 2.16) ($p<0.01$), month five OR=2.08 (95% CI 1.57, 2.74) ($p<0.01$), month six or more OR=2.94 (95% CI 2.34, 3.69). Also an increased risk for SM was observed as the number of calvings increased this tendency was linear until the calve six. For calve three OR=2.11 (95% CI 1.23, 3.63) ($p<0.01$), calve four OR=2.67 (95% CI 1.70, 4.18) ($p<0.01$), calve five OR=3.94 (95% CI 2.57, 6.04) ($p<0.01$) and calve six OR=3.68 (95% CI 2.20, 6.16) ($p<0.01$). Number of calvings and stage of lactation have also been previously associated with SM, and is likely attributed to the normal tissue deterioration from manipulation and aging (Breen *et al.*, 2009). No association was observed between genotypes of *T4CRBR2* and SM, *Streptococcus agalactiae*, or CNS infection in the logistic regression model. This results agree with those of Wang *et al.* (2007), who found no significant association between genotypes of locus *T4CRBR2* and Somatic Cell Score, as an index for mastitis. No literature reports could be found on possible associations between

T4CRBR2 and *Streptococcus agalactiae* or CNS infection. However, the identification of TLR-4 in milk fat globule membranes suggest a direct role for the mammary gland parenchyma in pathogen detection (Reinhardt and Lippolis, 2006). It has also been proposed that TLR4 is likely involved in the signal transduction pathway that mediates the pathogenesis of *E. coli* mastitis (De Schepper *et al.*, 2008).

In this study, allele *23 was linked to SM susceptibility, which agrees with other researches that reported the association of this allele to increased prevalence of SM caused by *Streptococcus dysgalactiae* (Hameed *et al.*, 2008), higher SCC in cows with more than three calvings (Dietz *et al.*, 1997a) and the occurrence of severe mastitis (Sharif *et al.*, 1998). By contrast, Baltian *et al.* (2012) found this allele to have a protective effect against mastitis diagnosed by SCC. The diverging results in the literature linking different DRB3.2 alleles to resistance or susceptibility towards SM may be attributed to multiple reasons such as: differences in pathogens, genetic background, environmental factors, interactions between the former variables, and/or criteria established to diagnose mastitis (Sharif *et al.*, 1998).

When regression analysis was restricted to cows infected with CNS, alleles *jba and *15 were linked to resistance from CNS; yet, no literature reports linking these alleles to either pathogen could be found. However, Duangjinda *et al.* (2009) reported allele *15 is associated to mastitis resistance in Holstein x Zebu dairy cows. Alleles *23 and *mbb were associated with susceptibility to CNS infection in the mammary gland. There is molecular evidence regarding the potential association between allele *23 and the occurrence of CNS-induced clinical mastitis. A significant association between the presence of glutamic acid at position β 74 and occurrence of mastitis caused by *Staphylococcus* spp. with a relative risk of RR=11 was detected. (Sharif *et al.*, 2000). No literature reports could be found linking the *mbb allele to any mastitis causing pathogen.

We found an association between allele DRB3.2 *23 and the risk of suffering SM. Alleles DRB3.2 *23 and *mbb were related to susceptibility to infection caused by CNS, and *jba and

*15 were related to resistance. DRB3.2 gen may play an important role in the occurrence of SM and certain alleles may confer resistance to specific pathogens.

Acknowledgements

The authors want to express their gratitude to the Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, Universidad de Antioquia, Cooperativa Lechera de Antioquia, Colanta, and Federación de Asociaciones de Ganaderos de Antioquia, FAGA, for financing the present study. The authors thanks the Sustainability Project 2013-2014 (Estrategia de sostenibilidad CODI 2013-2014, University of Antioquia).

References

- Andersson L, Davies C. The major histocompatibility complex. In: B. M. L. G. W. I. Morrison, ed. *Cell-Mediated Immunity in Ruminants*. Boca Ratón FL: CRC Press; 1994. p.37-57
- Baltian LR, Ripoli MV, Sanfilippo S, Takeshima SN, Aida Y, and Giovambattista G. Association between BoLA-DRB3 and somatic cell count in Holstein cattle from Argentina. *Mol Biol Rep* 2012; 39(7):7215-7220.
- Breen JE, Green MJ, Bradley AJ. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J Dairy Sci*. 2009; 92 (6): 2551-61.
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ and Allen RC. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48(1):137-144.
- De Schepper S, De Ketelaere A, Bannerman DD, Paape MJ, Peelman L and Burvenich C. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2008; 39(1):2-23
- Detilleux JC. Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 88(3-4):103-110.
- Dietz AB, Cohen ND, Timms L and Kehrl ME. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1997a; 80(2):406-412.

Dietz AB, Detilleux JC, Freeman AE, Kelley DH, Stabel JR and Kehrl ME. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1997b; 80(2):400-405.

Duangjinda M, Buayai D, Pattarajinda V, Phasuk Y, Katawatin S, Vongpralub T and Chaiyotvittayakul A. Detection of bovine leukocyte antigen DRB3 alleles as candidate markers for clinical mastitis resistance in Holstein x Zebu. *J Anim Sci* 2009; 87(2):469-476.

Fernandez I, Rios J and Gayosso V. Polymorphism of locus DRB3.2 in populations of Creole Cattle from Northern Mexico. *Genet Mol BioL* 2008; 31(4):880-886.

Francoz D, Bergeron L, Nadeau M and Beauchamp G. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Quebec. *Can Vet J.* 2012; 53(10):1071-1078.

Gelhaus A, Schnittger L, Mehlitz D, R. Horstmann D and C. Meyer G. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. *Anim Genet* 1995; 26(3):147-153.

Gilliespie BE, Jayarao BM, Dowlen HH and Oliver SP. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles in Jersey cows. *J Dairy Sci* 1999; 82(9):2049-2053.

Giovambattista G, Takeshima SN, Ripoli MV, Matsumoto Y, Franco LA, Saito H, Onuma M and Aida Y. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene* 2013; 519(1):150-158.

Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schuberth HJ, Brunner RM, Kata SR and Seyfert HM. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(1):174-185.

Hameed K, Sender G and Korwin-Kossakowska A. An association of BoLA alleles DRB3.2*16 and DRB3.2*23 with occurrence of mastitis caused by different bacterial species in two herds of dairy cows. *Anim Sci Pap Rep* 2008; 26(1):37-48.

Hernandez D. Asociación del locus BoLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis Bovina en razas criollas y colombianas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 2010; [access date June 15, 2011] URL: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2137/1/740803.2010.pdf>

Hosmer DW and Lemeshow S. *Applied logistic Regression*. John Wiley & Sons, New York, Cisester; 2000.

Lewin, H. and M. Van Eijk, inventors. Methods for testing bovine for resistance or susceptibility to persistent lymphocytosis by detecting polymorphism in BoLA-DR3 exon 2. United States Pat.

No. 5,582,987. 1994; [access date august 14, 2013] URL: <http://www.google.com/patents/US5582987>

MacFaddin J. *Biochemical Tests for Identification of Bacteria*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000.

Maillard JC, Renard C, Chardon P, Chantal I and Bensaid A. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Anim Genet* 1999; 30(3):200-203.

Martin S W, Meek A H, Willeberg P. *Veterinary Epidemiology (Principles and Methods)*. Ames (IA): Iowa State University Press; 1987.

Martinez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobón J, Gallego J and Ariza F.. Caracterización del locus BoLA_DRB3.2 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. *Arch Zootec* 2005; (54):349-356.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A Simple Salting out procedure for extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic. Nucleic Acids Res* 1988; 16(3):1215.

Parker KI, Compton CW, Annis FM, Heuer C and McDougall S. Quarter-level analysis of subclinical and clinical mastitis in primiparous heifers following the use of a teat sealant or an injectable antibiotic, or both, precalving. *J Dairy Sci* 2008; 91(1):169-181.

Reinhardt TA and Lippolis JD. Bovine milk fat globule membrane proteome. *J Dairy Res* 2006; 73(4):406-416.

Roslin. DRB3 PCR-RFLP analysis in BoLA Nomenclature, International Society for Animal Genetics 2002. [access date january 24, 2011] URL: <http://www.projects.roslin.ac.uk>

Rupp R, Hernandez A and Mallard BA. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci* 2007; 90(2):1029-1038.

Sharif S, Mallard B, W B, Sargeant J, Scott H, Dekkers J and Leslie E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim Genet* 1998; 29:185-193.

Sharif S, Mallard B and Sargeant J. Presence de glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Vet Immunol Immunopatol* 2000; (76):231-238.

Starckenburg RJ, Hansen LB, Kehrli ME and Chester-Jones H. Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins in milk selection and control lines. *J Dairy Sci* 1997; 80(12):3411-3419.

StataCorp. Stata: Release 12. Statistical Software. StataCorp LP., 2011.

Taro K and Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005; (17):338–344.

Underhill DM and Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(1):103-110.

Van Eijk M, Stewart-Haynes J and Lewin H. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet* 1992; 23:483-496.

Vittinghoff E, Glidden D, Shiboski S and McCulloch C. *Regression Methods in Biostatistics*. Second edition ed. New York. Springer; 2012.

Wang X, Xu S, Gao X, Ren H and Chen J. Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *J Genet Genomics* 2007; 34(5):406-412.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schrenkenberger P and Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Baltimore (USA): Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

Xu A, van Eijk MJ, Park C and Lewin HA. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol* 1993; 151(12):6977-6985.

Yeh F, Yang R, Boyle T and Ye Z. *Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis Version 1.32* ed. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta, Edmonton. 2000.

Zambrano J, Echeverry J and Lopez A. Alleles of the BoLA DRB3.2 gene are associated with mastitis in dairy cows. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2011; 24(2):145-156.

CONSIDERACIONES FINALES

Los estudios reportados en la literatura sobre los factores de riesgo relacionados con mastitis bovina son foráneos, efectuados en hatos con ordeño mecánico y en las condiciones propias de los países de latitud norte, muy diferentes a las de un país del trópico como Colombia en donde, por ejemplo, aún prevalece el ordeño manual sobre el mecánico. En tal sentido, los esfuerzos encaminados a generar conocimiento sobre los factores de riesgo asociados con la mastitis bovina, así como sobre los microorganismos involucrados en su presentación y su sensibilidad a los antibióticos, son de gran importancia para la ganadería de leche colombiana. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia y la incidencia de mastitis bovina así como estudiar los factores de riesgo asociados a su presentación y establecer los microorganismos involucrados y su sensibilidad antibiótica.

En esta investigación, debido al periodo de seguimiento de 24 meses en cada uno de los hatos participantes, se utilizó una muestra de 37 hatos seleccionada por conveniencia, con criterios de representación geográficos y de manejo. La distribución regional de los datos de los animales en la zona, se utilizó como criterio a tener en cuenta para asegurar que las granjas participantes fueran ejemplos de los hatos de la región del Altiplano Norte de Antioquia.

Durante 24 meses se hizo evaluación mensual de la presencia de mastitis bovina (clínica y subclínica) en las granjas, inicialmente se determinó su prevalencia, etiología y factores de riesgo asociados como línea de base del estudio. El análisis de esta información arrojó que el 39,5% de vacas estaba afectada con mastitis, en donde *Strep. agalactiae* fue el patógeno más prevalente. Estos hallazgos podrían estar relacionados con algunas deficiencias en la rutina de ordeño, tales como la falta de higiene del ordeñador (el 77,3% no se lavaban las manos al momento iniciar el ordeño) y con deficiencias en la práctica del pre-sellado y el sellado, aspectos importantes en la prevención de la mastitis bovina que en las granjas estudiadas sólo efectuaban un 57%

y un 84,2% de los ordeñadores, respectivamente. Sin embargo, al efectuar el análisis de regresión logística, sólo el lavado de manos estuvo asociado como factor protector contra mastitis por cualquier causa y como factor protector contra la infección por *Strep. agalactiae*, aspecto que estaría relacionado con una mejor higiene de las manos que influiría en la disminución de la transmisión de la bacteria.

Debido al poder limitado que tenía el estudio para evaluar los factores de riesgo de hato y a que estos factores son más fáciles de modificar, los factores de riesgo seleccionados en esta investigación se enfocaron principalmente en los aspectos relacionados a la rutina de ordeño. Es posible que otros factores pudiesen haber jugado un papel como factores de confusión o haber tenido algún efecto de interacción para nuestros factores de interés, pero el estudio no habría tenido el poder para evaluar esas otras posibilidades.

El análisis de los factores de riesgo asociados a mastitis subclínica, en todo el periodo de estudio, permitió concluir que el porcentaje relativamente alto de cuartos y vacas afectadas, junto con el predominio de bacterias contagiosas como *Strep. agalactiae*, *Corynebacterium spp* y *S. aureus*, podría estar relacionado con algunas deficiencias en aspectos importantes de la rutina de ordeño. Esto se aplica especialmente para el ordeño manual en el que el riesgo de infección con *Strep. agalactiae* fue 5,4 veces mayor en comparación con el ordeño mecánico. Algunas de las variables que se midieron por su importancia en la rutina de ordeño y que se pensó serían importantes en el modelo final, resultaron no serlo; por ejemplo, el lavado de manos antes del ordeño y el lavado de manos del ordeñador antes de ordeñar la siguiente vaca. La falta de asociación de la mastitis subclínica con estas variables pudo deberse al pequeño número de hatos estudiados, o a que el número de productores que efectuaron estas prácticas fue bajo.

Otro hallazgo para resaltar fue que la mayoría de los ordeñadores no hizo desinfección pre-ordeño (pre-sellado) o lo hizo de una manera inadecuada y que los ordeñadores

efectuaron mejor el sellado que el pre-sellado. Hay varias razones que pueden explicar este fenómeno como razones de tipo económico, porque el pre-sellado eleva los costos de producción o porque los productores no están convencidos todavía que este paso de la rutina es bueno para la prevención de la mastitis y además demanda tiempo y esfuerzo adicional para efectuarlo.

Así mismo se observó un aumento del riesgo de tener mastitis subclínica e infección por *Strep. agalactiae* con el aumento de los partos y cuando el tiempo en lactancia aumentó. El proceso de ordeño es un riesgo para la transferencia de patógenos contagiosos y a medida que el número de lactancias aumentan, el número de veces que las vacas están expuestas a los procesos de ordeño aumentan. Del mismo modo, dentro de cada lactancia, hay una mayor probabilidad de exposición a los agentes contagiosos que causan la mastitis, cuando el número de meses en periodo de lactancia aumenta.

También se encontró que iniciar el proceso de ordeño con ubres limpias es un factor protector contra la mastitis subclínica y contra la infección por *Strep. agalactiae* y que cuando los productores no utilizan el sellado o lo utilizan de una manera inadecuada, se aumenta el riesgo de infección por *Strep. agalactiae* en más de 1,2 veces. Es de anotar que aunque el sellado se efectuó correctamente en la mayoría de los hatos lecheros, su limitación principal es que no tiene ningún efecto sobre las infecciones existentes (es decir, la persistencia de infecciones subclínicas) y, a menos que haga parte de un plan de control de la mastitis contagiosa, es poco probable que los desinfectantes protejan completamente contra organismos contagiosos.

En relación a los genes como un factor de riesgo o de protección contra la mastitis bovina, en el análisis de regresión, no se encontró asociación entre el genotipo T4CRBR2 y la mastitis o la infección por *Strep. agalactiae*. Entre los alelos del gen DRB3.2 el alelo *23 se asoció a susceptibilidad a mastitis subclínica. No se encontró asociación entre el *DRB3.2* y la infección por *Strep. agalactiae* y en relación a la

infección por ECN, los alelos *23 y *mbb se encontraron relacionados con la susceptibilidad a la infección. El alelo *15 y el *jba se asociaron a la resistencia a la infección por ECN en la glándula.

La TIMC hallada en el periodo de estudio se consideró baja, sobre lo cual se presume una sub-notificación de los casos debido a la prevención de los productores a desmejorar el prestigio de sus hatos si revelaban el número real de eventos a lo largo del tiempo, comportamiento que ha sido narrado por otros autores en estudios similares efectuados en otros países.

En este estudio se observó un predominio de las bacterias contagiosas sobre las ambientales, siendo el *Strep. agalactiae* el patógeno más frecuente. *Strep. agalactiae* se transmite principalmente durante el ordeño, se puede encontrar en superficies que hayan tenido contacto reciente con leche contaminada, como las camas, el equipo de ordeño y las manos del ordeñador; las malas condiciones de higiene durante la rutina de ordeño favorecen su presentación. Por lo tanto, se requieren medidas enfocadas a la mejora de la higiene en el sitio de ordeño y durante el ordeño tendientes a controlar patógenos contagiosos como el *Strep. agalactiae*.

Un hallazgo importante fue encontrar un 14,7% de los aislamientos de *Strep. agalactiae* resistentes a la penicilina y llamó la atención el hallazgo de multiresistencia a antibióticos como espiramicina, lincomicina, cefalexina y trimetoprim sulfá. Si bien el porcentaje de aislamientos de *Strep. agalactiae* resistente a los antibióticos β -lactámicos es relativamente bajo, no deja de ser preocupante dado que se podría estar perdiendo un antibiótico muy importante en el control de esta bacteria ya que la penicilina es de primera elección en casos de mastitis bovina por *Strep. agalactiae*. Sería recomendable efectuar estudios adicionales basados en la búsqueda de marcadores moleculares asociados a pruebas fenotípicas que confirmen la resistencia de las bacterias a los antibióticos encontrada en este estudio, específicamente para el *Strep. agalactiae* a los β -lactámicos y a los otros principios activos.

Limitaciones del estudio

Este estudio tuvo limitaciones para la evaluación de los factores de riesgo a nivel de hato. Con 37 hatos en la regresión logística sólo los factores más importantes involucrados en la prevalencia de mastitis subclínica y en la infección por *Strep. agalactiae* serían detectados. Se pudo haber tenido más poder para evaluar los efectos a nivel de hato si se hubiese efectuado un estudio transversal involucrando más hatos. Sin embargo, la dinámica de la mastitis en esta zona lechera no era bien conocida antes del estudio lo que generó incertidumbre acerca de si un estudio transversal (con un sólo muestreo por cada hato) reflejaría adecuadamente la situación de la mastitis en los hatos. Consecuentemente, se usó una muestra de conveniencia de 37 hatos los cuales fueron considerados como ejemplos de las granjas de lechería especializada en la región.

Otra limitación del trabajo fue que si bien en cada visita mensual se efectuaron recomendaciones sobre el control y la prevención de la mastitis a los productores de las granjas pertenecientes al estudio, la implementación de las recomendaciones estuvo fuera del control de los investigadores. Se observó que no todos los productores siguieron estrictamente las recomendaciones, por ejemplo, las relacionadas con el lavado de manos al inicio del ordeño y antes de comenzar a ordeñar cada vaca, el pre-sellado el cual fue efectuado por casi todos los ordeñadores al finalizar el seguimiento, pero de una forma inadecuada. En algunos hatos los ordeñadores fueron cambiados frecuentemente durante los meses de muestreo (debido a que conseguían mejores empleos, o debido a problemas sociales o nuevas oportunidades, entre otras razones). Por esto el conocimiento que el ordeñador había obtenido con el estudio hasta el momento de su retiro se perdía y en muchos casos los ordeñadores fueron reemplazados por una persona con un conocimiento pobre en lo concerniente a mastitis, por lo que los avances logrados en su control mostraron discontinuidad.

Componente social

Como proyecto epidemiológico, este estudio tenía inherente un componente social, que se abordó a través de la educación de los productores de la zona de influencia de estudio, de los estudiantes de medicina veterinaria de las universidades y de los técnicos que ejercen su profesión en la zona. Algunos de los trabajos enfocados a la capacitación en el control y la prevención de la mastitis y otros productos enmarcados dentro del impacto social de este proyecto fueron:

- Capacitación de 757 productores.
- Capacitación de 500 estudiantes de los programas de pregrado de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.
- Capacitación de 20 estudiantes de prácticas profesionales.
- Se publicó el manual titulado *“Mastitis la enfermedad más costosa en la granja lechera. Prevenir la clave del éxito”* de los autores Ramírez N., Palacio L., Cerón J., y Jaramillo M., Editorial Biogenesis. Año 2011.
- Se realizaron diez presentaciones en conferencias magistrales, eventos científicos y tecnológicos nacionales e internacionales: tres en el Encuentro Nacional e Internacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias (ENICIP), Colombia, 2009; dos en el ENICIP 2011; dos en el ENICIP 2013, uno en el VII Seminario Internacional Competitividad en Carne y Leche, Colombia, 2010; uno en el 44th Annual AABP Conference, USA, 2011 y uno en el Anual Scientific Meeting, Canadá, 2011.

Finalmente, en las zonas de lechería especializada de Colombia como lo es el Altiplano Norte de Antioquia, se observa un gran interés en mejorar la calidad de la leche y uno de los componentes importantes para lograrlo es la prevención y el control de la mastitis bovina. La mastitis bovina es un problema controlable y existen las herramientas y el conocimiento que pueden conducir a mejorar la situación en los hatos, pero al parecer, lo que está faltando es la aplicación de ese conocimiento y esas herramientas en el trabajo día a día en las granjas. Por consiguiente se requiere aumentar la cobertura

educativa alrededor del tema de la mastitis bovina y garantizar la aplicación de ese conocimiento por parte de los productores y ordeñadores, con el fin de lograr las metas establecidas para el control de la enfermedad. También se requiere estudiar los factores que influyen la toma de decisiones y la motivación de los trabajadores relacionados con la producción de leche en las granjas. Por lo tanto, se deben proponer investigaciones relacionadas con estos aspectos que permitan lograr las metas establecidas para el control de la mastitis bovina en los hatos.

ANEXO 1
INFORMACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ORDEÑO EN FINCA

Código de Finca: _____ Fecha de visita: _____ Muestreo #: _____

Municipio: _____ Vereda _____

Número de ordeñadores: _____ Ordeñador propietario: Si ___ No ___

Cambios de ordeñador en el último mes: Si ___ No _____

Relación ordeñadores/vacas en ordeño _____

(Para ordeño manual). Se lavan las manos los ordeñadores antes del ordeño?
_____ y entre vaca y vaca? _____

PROCEDIMIENTO DEL ORDEÑO

Lavan la ubre ___ Pezones _____ Seca? _____ Seca individualmente? _____

Seca con? Papel periódico ___ Trapo ___ Toallas ___ Otros ___ Cual? _____

Limpieza adecuada? _____ si no por qué? _____

Se efectúa presellado de los pezones? _____

Producto: Clorado ___ Yodado ___ Concentración: Recomendada ___ Diluido _____

Tiempo de contacto del presellado con los pezones _____

Recipiente de aplicación adecuado: Si ___ No ___ si no, por qué? _____

Seca el presellado? _____ Secado individual? _____

Seca con? Papel periódico ___ Trapo ___ Toallas ___ Otros _____ Cuál? _____

Usan los ordeñadores recipientes para los primeros chorros o despunte? _____

Es la técnica de manipulación del pezón adecuada? (Ordeño manual) _____

En caso negativo ¿Porqué? _____

Se usa el sellado de los pezones? _____

Producto para el sellado de los pezones: Clorado ___ Yodado ___ Otro ___ Cuál? _____

Concentración del producto: Recomendada _____ Diluido _____

Recipiente de aplicación adecuado: Si ___ No ___ si no, por qué? _____

Se efectúa mantenimiento del equipo de ordeño? _____ cada cuánto? _____

ANEXO 2

FORMATO POR ANIMAL (caso clínico)

Nombre de la finca: _____

Fecha de la visita: _____ Hora de toma de la muestra: _____

Identificación del animal: _____ Código: _____

Edad: _____ Años Raza: _____

Número de partos: _____ Fecha del parto: _____

Producción último mes: _____ litros

Examen clínico: Interpretación de la palpación del parénquima glandular

Compromiso general del animal: Si _____ No _____

T°= _____ Frecuencia cardiaca = _____ Frecuencia respiratoria = _____

Tipo de secreción _____

Observaciones:

ANEXO 3

FORMATO COLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN EN GRANJA

Finca: _____ Muestreo #: _____
 Fecha: _____ Responsable: _____

# ANIMAL							
NOMBRE							
FECHA NTO							
RAZA							
FECHA PARTO							
# PARTOS							
PRODUCCION							
CMT	PI						
	PD						
	AI						
	AD						
UBRE LIMPIA	SI						
	NO						
PATAS LIMPIAS	SI						
	NO						
CLAUDICACION							
CONDICIÓN CORPORAL							
CONCENTRADO							
RCS	PI						
	PD						
	AI						
	AD						