

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Aplicación de la PCR convencional para la detección de patógenos en muestras de mastitis bovina con cultivos sin crecimiento en las técnicas convencionales.

“por”

**BELTRAME MIRANDA, Pablo
VÁZQUEZ MARTÍNEZ, Nicolás**

**TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal**

MODALIDAD Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2024**

PAGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

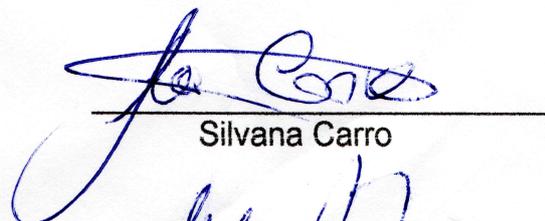
Presidente de mesa:


Edgardo Giannechini

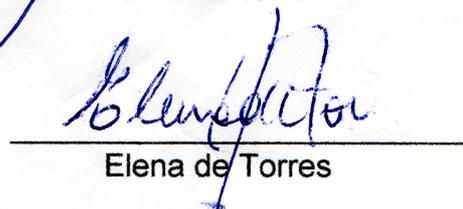
Segundo miembro (Tutor):


Leticia Diana

Tercer miembro:


Silvana Carro

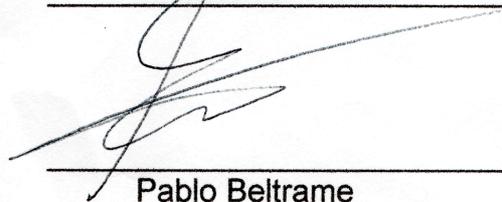
Cuarto miembro:

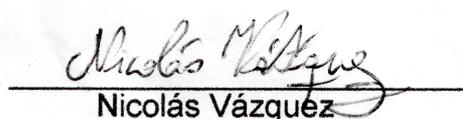

Elena de Torres

Fecha:

19 de setiembre de 2024

Autores:


Pablo Beltrame


Nicolás Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora Dra. Leticia Diana por guiarnos, apoyarnos, comprometerse, por las enseñanzas y los buenos momentos compartidos durante todo este proceso.

A nuestra Co-tutora Dra. Elena de Torres por todo el conocimiento brindado en este trabajo y por su compromiso con nosotros.

Al Dr. Andrés López y su personal a cargo, por su colaboración en la extracción de muestras.

A nuestras familias por su apoyo incondicional desde el inicio.

A nuestras novias Paula y Deborah que siempre estuvieron acompañándonos.

A nuestros amigos de la vida.

A los amigos y compañeros que nos regaló la facultad.

Al personal de biblioteca por su ayuda.

A Facultad de Veterinaria y a los profesores que nos acompañaron durante toda la carrera.

Tabla de contenido

AGRADECIMIENTOS.....	2
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.1 Definición de Mastitis.....	11
4.2 Clasificación de mastitis.....	11
4.3 Patogénesis.....	11
4.4 Clasificación de microorganismos causantes de Mastitis.....	12
4.4.1 Microorganismos contagiosos.....	13
4.4.2 Microorganismos Ambientales.....	15
4.4.3 Microorganismos oportunistas.....	16
4.4.4 Otros microorganismos.....	16
4.5 Microorganismos causantes de Mastitis en Uruguay.....	17
4.6 Diagnóstico de Mastitis.....	17
4.6.1 Recuento células somáticas (RCS).....	17
4.6.2 California Mastitis Test (CMT).....	18
4.6.3 Cultivo Bacteriano.....	18
4.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
4.7 Prevención y control de mastitis.....	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVOS.....	22
6.1 Objetivo General:.....	22
6.2 Objetivos Específicos:.....	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1 Muestras a analizar.....	22
7.2 Extracción de ADN de las muestras de leche.....	23
7.3 Detección de <i>S. aureus</i> , <i>S. dysgalactiae</i> y <i>S. uberis</i> en las muestras de leche.....	23
7.4 Análisis de datos.....	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1 Extracción de ADN.....	25
8.2 Detección de <i>S. aureus</i> , <i>S. dysgalactiae</i> y <i>S. uberis</i> por PCR.....	25
8.2.1 Muestras positivas a <i>Staphylococcus aureus</i>	28
8.2.2 Muestras positivas a <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	28
8.2.3 Muestras positivas a <i>Streptococcus uberis</i>	29
8.3 Patógenos detectados relacionado a número lactancia y días en leche.....	30
8.4 Evolución clínica de las vacas con cultivo sin crecimiento.....	33
9. DISCUSIÓN.....	36

9.1 Diagnostico por cultivo bacteriano y por PCR	36
9.2 Frecuencia de los diferentes agentes causantes de mastitis clínica	37
9.3 Presentación de mastitis de acuerdo al número de lactancia de la vaca	37
9.4 Presentación de mastitis de acuerdo a la etapa de lactancia	38
9.5 Relación entre el agente causante de mastitis y la evolución clínica a las 72 hs.....	39
10. CONCLUSIÓN.....	39
11. BIBLIOGRAFIA.....	40

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Tablas:

TABLA 1. Primers utilizados para la identificación de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* mediante PCR.

Página 24

Figuras:

FIGURA 1. Corrida en gel de electroforesis para PCR de *Staphylococcus aureus*

Página 26

FIGURA 2. Corrida en gel de electroforesis para PCR de *Streptococcus dysgalactiae*.

Página 26

FIGURA 3. Corrida en gel de electroforesis para PCR de *Streptococcus uberis*

Página 27

FIGURA 4. Porcentaje de muestras negativas y positivas por técnica de PCR.

Página 27

FIGURA 5. Cantidad de muestras positivas para cada patógeno de forma aislada o asociados.

Página 28

FIGURA 6. Muestras positivas a *Staphylococcus aureus* en las que se detecta como único patógeno o asociado a otro patógeno.

Página 29

FIGURA 7. Muestras positivas a *Streptococcus dysgalactiae* en las que se detecta como único patógeno o asociado a otro patógeno.

Página 29

FIGURA 8. Muestras positivas a *Streptococcus uberis* en las que se detecta como único patógeno o asociado a otro patógeno.

Página 30

FIGURA 9. Porcentaje de aparición de cada agente según el número de lactancia, sin considerar si el patógeno aparece solo o en combinación con otros.

Página 31

FIGURA 10. Porcentaje de detección de los patógenos durante primera lactancia.

Página 32

FIGURA 11. Porcentaje de detección de los patógenos durante segunda lactancia.

FIGURA 12. Porcentaje de detección de los patógenos durante tercera lactancia. Página 32

Página 33

FIGURA 13. Porcentaje de detección de los agentes según el tercio de lactancia al momento de la toma de muestra, incluyendo casos simples y coinfecciones.

Página 34

FIGURA 14. Porcentaje de vacas tratadas y no tratadas luego de las 72 hs.

Página 36

FIGURA 15. Porcentaje de los agentes detectados en muestras de vacas con mastitis clínica que requirieron tratamiento luego de las 72 hs.

Página 35

FIGURA 16. Porcentaje de los agentes detectados en muestras que no requirieron tratamiento luego de 72 hs.

Página 36

1. RESUMEN

La mastitis es una de las enfermedades más importante a nivel de predios lecheros por su impacto a nivel económico, ocasionando pérdidas por disminución en la producción, disminución en la calidad de la leche, gastos en tratamientos y descarte de animales. Es importante un diagnóstico preciso y temprano de la enfermedad, con el objetivo de instaurar un tratamiento rápido y prevenir el contagio del resto de los animales a través de un plan de control.

El siguiente estudio fue diseñado con el objetivo de demostrar que para el diagnóstico de mastitis no existe un método que por sí solo sea cien por ciento confiable, por lo que, se evaluó el uso de PCR para el diagnóstico de muestras de leche con mastitis clínica que presentaron cultivo sin crecimiento mediante técnicas tradicionales en tambo, y buscamos identificar si existe algún tipo de correlación entre la incidencia de mastitis con los días en leche de las vacas y con el número de lactancia de cada animal; también determinar cuál es el microorganismo que mayor prevalencia tiene en los episodios de infección.

En nuestro estudio partimos de muestras de vacas con mastitis clínica y con cultivo bacteriano en tambo negativo, se realizó PCR tiempo final, se detectaron por esta técnica molecular tres bacterias, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*, ya que investigaciones nacionales indican que son los patógenos más prevalentes en Uruguay. Trabajamos con muestras de leche de 153 vacas, que fueron tomadas en un muestreo de un predio particular por el veterinario del establecimiento en el mes de diciembre de 2022, en un único muestreo, las mismas fueron identificadas con el número de caravana de cada animal y remitidas al laboratorio de la Unidad de Microbiología de Facultad de Veterinaria, donde se conservaron a -80° , para su posterior análisis.

Se extrajo ADN de cada una de las muestras para luego realizar la técnica de PCR en tiempo final de cada patógeno y los resultados obtenidos se registraron en una hoja de cálculo Excel. Se calculó el porcentaje de muestras positivas por lo menos a uno de los tres agentes y luego la proporción de muestras positivas a cada uno de ellos de forma individual. Se encontró un alto porcentaje de muestras positivas (61,2%) por lo menos a una de estas bacterias, siendo el principal patógeno detectado *Staphylococcus aureus* (39,2%) seguido por *Streptococcus dysgalactiae* (35,3%).

Quedó demostrado con el resultado de nuestro trabajo, sumado a antecedentes de trabajos anteriores, que el cultivo bacteriano da lugar a resultados falsos negativos y por tanto no sería recomendable usar solo este método diagnóstico para evaluar problemas de mastitis en un establecimiento.

También se observó que animales con más lactancias presentan una mayor incidencia de mastitis, y con respecto a los días en leche obtuvimos resultados que arrojan una mayor incidencia de mastitis en el primer y último tercio de lactancia.

Consideramos que el diagnóstico por cultivo debe ser complementado con otras técnicas para un adecuado diagnóstico de los agentes causales de mastitis.

2. SUMMARY

Mastitis is one of the most important diseases at the dairy farm level due to its economic impact, causing losses from reduced production, decreased milk quality, treatment costs, and culling of animals, among others. Therefore, precise and early diagnosis of the disease is important, to initiate rapid treatment and prevent the spread of the disease to other animals through a control plan.

The following study was designed to demonstrate that no single method is one hundred percent reliable for the diagnosis of mastitis, therefore, the use of PCR was evaluated for the diagnosis of milk samples with clinical mastitis that showed no growth in traditional culture techniques in the dairy farm, and, we aim to identify if there is any correlation between the incidence of mastitis with the days in milk of the cows and the number of lactations of each animal; also, to determine which microorganism has the highest incidence in infection episodes.

Starting from samples of cows with clinical mastitis and negative bacterial cultures in dairy, endpoint PCR was performed, and three bacteria were detected by this molecular technique: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis*, as national research, indicates that they are the most prevalent pathogens in Uruguay. We worked with milk samples from 153 cows, which were taken at a particular farm by the farm's veterinarian in December 2022, in a single sampling. The samples were identified with the ear tag number of each animal and sent to the laboratory of the Microbiology Unit of the Faculty of Veterinary Medicine, where they were preserved at -80°C for later analysis.

DNA was extracted from each of the samples to then perform the endpoint PCR technique for each named pathogen, and the obtained results were recorded in an Excel spreadsheet. The percentage of animals positive for at least one of the three agents was calculated, and then the proportion of samples positive for each one individually. A high percentage of positive results (61.2%) was found for at least one of these bacteria, with *Staphylococcus aureus* being the main detected pathogen (39.2%) followed by *Streptococcus dysgalactiae* (35.3%). It was shown by the results of our work, along with previous studies, that bacterial culture results in false negatives. Therefore, it is not advisable to use this diagnostic method alone to assess mastitis problems in an establishment.

It was also observed that animals with more lactations have a higher incidence of mastitis, and with respect to days in milk we obtained results that show a higher incidence of mastitis in the first and last third of lactation.

We consider that culture diagnosis should be complemented with other techniques for an adequate diagnosis of the causative agents of mastitis.

3. INTRODUCCIÓN

La ganadería lechera en nuestro país ha aumentado más de un 30 % su producción total en la última década; este sector juega un importante papel dentro de nuestra economía ya que representa el 7,7 % de los ingresos de las exportaciones nacionales con 737 millones de dólares. Nuestro país es un importante exportador de productos lácteos en la región y el noveno a nivel mundial (Instituto Nacional de la Leche, INALE 2024). Los datos más recientes indican que la producción anual de leche comercial es de 2,201 millones de litros/año en el período 2021-2022 (año agrícola). Contamos con 3,094 establecimientos lecheros que abarcan una superficie de 649,000 hectáreas, y con un total de 682,000 vacas lecheras (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, MGAP, 2023).

El 73% de la leche producida es enviada a industria para su procesamiento y comercialización, mientras que el 27 % restante se procesa en el propio establecimiento produciendo quesos artesanales (INALE, 2024).

De la leche que llega a la industria, la gran mayoría (70%) es exportada, mientras que el 30% restante es destinado al consumo interno. En promedio, en Uruguay se consumen 232 litros anuales per cápita, más del doble del consumo a nivel mundial (INALE, 2024).

Las exportaciones se realizan principalmente a Brasil, Argelia y China, siendo el principal producto comercializado la leche en polvo entera, la cual representa el 60% de los ingresos por productos lácteos (INALE, 2022).

En Uruguay existe lechería comercial en todos los departamentos, pero hay una marcada concentración del rubro en el suroeste, en lo que se denomina “Cuenca Lechera”. La misma está conformada por los departamentos de Canelones, Flores, Colonia, Florida, San José y Soriano, los cuales engloban alrededor del 80% de los tambos del país, con una superficie aproximada de 552.194 hectáreas, lo que representa el 73% de la superficie total destinada a lechería (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, MGAP, 2021).

Considerando el gran % de leche que se destina a la exportación y considerando el consumo interno, existen reglamentaciones a nivel nacional que aseguran la calidad e inocuidad de la leche.

En la década de los 90 por decreto del poder ejecutivo N° 90/995 se creó el Sistema Nacional de Calidad de Leche, para el mejoramiento de la calidad higiénico-sanitaria de la leche remitida a planta y procesado en los establecimientos. En 1999, mediante el decreto N°57/999, se actualizó la clasificación para el pago por calidad de la leche, manteniendo los rangos de recuento microbiano (RB) y el recuento de células somáticas (RCS). Las exigencias establecidas en este sistema eran las mínimas obligatorias para recibir o procesar leche, pudiendo las empresas procesadoras establecer exigencias adicionales si así lo entienden, con las correspondientes bonificaciones suplementarias (Uruguay, 1999). Desde el 2016, los valores que rigen a nivel de tanque, son menos de 100,000 UFC/ml y 400,000 células/ml como límites de recibo y/o procesamiento de la leche de acuerdo con el decreto N° 359/2013 (Uruguay, 2013). Para lograr una producción óptima en términos de cantidad y calidad y poder ofrecer al mercado un producto

confiable para consumo, es fundamental considerar el recuento bacteriano (RB) que nos permite conocer la calidad higiénica de la leche y, por otra parte, el recuento de células somáticas (RCS), que permite conocer la calidad sanitaria de la misma, este último está determinado principalmente por la cantidad de leucocitos polimorfonucleares y por tanto con la presencia de mastitis.

La mastitis es una de las enfermedades más prevalentes en el rodeo lechero en nuestro país y genera un gran impacto económico.

En un estudio realizado por Azambuya, Giani y González 2022, obtuvieron que los costos totales ocasionados por la mastitis en los establecimientos evaluados, varían de 2,6% a 13,9% de la producción de cada establecimiento, atribuyendo dicha variabilidad entre establecimientos a las medidas de prevención realizadas y la frecuencia de aparición de casos clínicos. También observaron que existía una menor incidencia de casos en los establecimientos que tenían mayores costos de prevención, lo que resultaba en menores costos totales ocasionados por la mastitis (Azambuya et al., 2022).

Esta enfermedad no solo va a generar pérdidas económicas por una disminución en la producción, sino también debido a los costos que ésta implica ya sea por gastos de atención veterinaria, uso de drogas para el tratamiento, baja en la calidad de la leche, leche que no será comercializada, descarte de animales, horas de trabajo y predisposición a otras enfermedades. Es decir que a la hora de evaluar el impacto económico de la mastitis no sólo se debe tener en cuenta las pérdidas productivas, sino que se debe tener presente los costos de control y prevención de la enfermedad (Vissio, Agüero, Raspanti, Odierno y Larriestra 2015).

La mastitis subclínica va a ocasionar una pérdida económica por una disminución de producción principalmente, valores de RCS por encima de 100.000 cel/ml genera una pérdida de 0.4 y 0.6 kg leche/día para vacas primíparas y multíparas respectivamente (Huijps, Lam y Hogeveen 2008).

En los casos de mastitis clínica (Pérez-Cabal, Yaici y Alenda, 2008) indicaron que del costo total de un caso de mastitis el 74% corresponde al descarte de la leche. También observaron que la mastitis clínica genera mayores pérdidas económicas en vacas multíparas que en primíparas.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Definición de Mastitis

La mastitis es una de las enfermedades más importantes a nivel de predios lecheros por su impacto a nivel económico (Halasa, Huijps, Østerås y Hogeveen, 2007), ocasionando pérdidas por disminución en la producción, disminución en la calidad de la leche, gastos en tratamientos y descarte de animales, entre otros (Hogeveen y Østerås, 2005).

Por definición “La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, que se caracteriza por cambios físicos, químicos y microbiológicos, además de generar un aumento de células somáticas en leche y cambios patológicos en el tejido mamario” (International Dairy Federation, 1987). Esta puede ser de origen multifactorial, siendo la principal causa bacteriana, aunque puede eventualmente presentarse por lesiones traumáticas o irritantes químicos.

4.2 Clasificación de mastitis

Desde el punto de vista clínico, la podemos clasificar en mastitis clínica y mastitis subclínica. En la mastitis subclínica, existe una infección sin síntomas aparentes de inflamación local o afectación sistémica, no se observan alteraciones de la glándula mamaria ni en la leche, pero genera una reducción en la producción láctea y altera su composición, con aumento de células somáticas (Hortet y Seegers, 1998; Koldeweij et al., 1999).

La mastitis clínica por su parte es aquella en la que, si vemos alguna alteración, ya sea en la vaca o en la leche y la podemos clasificar en tres grados según la gravedad de ésta (Schukken et al., 2011). Grado uno, cuando se observan cambios en la leche; la misma puede presentar coágulos o sangre, pero no se observan signos a nivel local en la glándula o a nivel sistémico. Grado dos, cuando tenemos leche con los signos antes descritos, pero además hay hinchazón o dolor en la glándula mamaria afectada; mientras que un grado tres es cuando la leche se observa marcadamente anormal, hay hinchazón o dolor a nivel local y hay signos sistémicos de la enfermedad como, por ejemplo: temperatura $\geq 39,5$ °C, depresión marcada con inapetencia o incapacidad para pararse y signos de deshidratación (Schukken et al., 2011).

4.3 Patogénesis

La mastitis infecciosa se produce cuando las bacterias invaden el canal del pezón y la glándula mamaria. Una vez que logran dicho proceso empiezan a multiplicarse y en algunos casos a producir toxinas, que generan un daño en el tejido secretor de la leche.

Este daño genera un proceso inflamatorio que lleva a un aumento en la cantidad de leucocitos o células somáticas, lo que provoca una disminución en la calidad y cantidad de leche producida.

El esfínter del pezón es la primera línea de defensa contra las infecciones, el canal del pezón está rodeado por un esfínter de músculo liso que tiene como

función mantener el canal cerrado impidiendo que ingresen bacterias desde el exterior.

En su interior el canal del pezón está revestido con queratina y puede ser dañado por traumatismos produciendo una mayor susceptibilidad a la invasión y multiplicación bacteriana.

Luego del ordeño el esfínter del canal del pezón puede permanecer parcialmente abierto durante una a dos horas, permitiendo así el ingreso de patógenos hacia el canal del pezón. Los microorganismos que ingresan se multiplican, liberan sus toxinas, generando daño y provocando la liberación de mediadores inflamatorios por parte de las células inflamatorias (Harmon, 1994). La gravedad de la respuesta inflamatoria depende de factores asociados al huésped y al patógeno. En cuanto al patógeno los factores determinantes son la especie bacteriana, la virulencia, la cepa y el tamaño del inóculo de la bacteria. En relación a factores del huésped: la etapa de lactancia, la edad y el estado inmunológico del animal son claves (Green et al., 2002; Oliver y Sordillo, 1988).

Las células inflamatorias presentes en la leche de cuartos sanos son principalmente los macrófagos, estos secretan quimiocinas para reclutar gran cantidad de células polimorfonucleares (neutrófilos principalmente) cuando hay una infección, por lo tanto, son de gran importancia para hacer frente a la enfermedad (Bradley, 2002).

Hablamos de que existe un proceso inflamatorio en la glándula mamaria cuando por vaca o cuarto el RCS supera las 200.000 células/ml en animales múltiparas y 100.000 células/ml en primíparas, siendo estos valores bastante inferiores a los exigidos por la normativa de nuestro país para recibir leche en industria (400.000 células /ml), lo cual indica que remitir leche a industria no significa de por sí que tengamos un rodeo sano. Es por esto que se considera que los RCS superiores a los antes mencionados son indicativos de animales enfermos (infectados) (Harmon, 1994; Schepers et al., 1997).

Cuando existe infección de la glándula mamaria por bacterias patógenas se produce una merma en la producción de leche, además de cambios en la composición que varían de acuerdo a la intensidad y duración de la infección (Harmon, 1994; Jones y Bailey, 2009).

Muchas veces el proceso infeccioso en la glándula lleva a la acumulación de leucocitos en grandes cantidades generando la formación de coágulos (agregados leucocitarios) y el tejido glandular puede sustituirse por tejido cicatrizal, lo que lleva a una pérdida de la función de esa porción de la glándula. En otros casos la inflamación es menor y puede producirse la reparación del tejido, recuperando la función durante esa o en la próxima lactancia (Harmon, 1994).

4.4 Clasificación de microorganismos causantes de Mastitis

Dentro de las clasificaciones que podemos encontrar para los agentes causantes de mastitis tenemos, patógenos mayores o menores; también se pueden clasificar según sus características epidemiológicas como; contagiosos, ambientales, oportunistas y otros (Philpot y Nickerson, 1992). Sin embargo, se ha visto que agentes clasificados como contagiosos, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), también puede tener un reservorio

ambiental, aunque de menor relevancia epidemiológica (Roberson, 1999). Otros autores también han indicado que esta clasificación epidemiológica no es tan estricta ya que hay cepas con comportamiento diferencial dentro de mismas especies de patógenos (Zadoks y Fitzpatrick, 2009). La mastitis causada por los patógenos mayores tiene un impacto mucho más marcado tanto en la alteración de la composición de la leche (aumento de RCS), así como también un mayor impacto económico (Schepers et al., 1997).

Se consideran patógenos mayores: *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, coliformes, levaduras, *Proteus spp.*, *Pseudomona spp.*, *Prothoteca spp.*, *Bacillus cereus*, *Nocardia spp.*, Gram negativos no coliformes, *Trueperella pyogenes* y *Klebsiella spp.* Mientras que dentro de patógenos menores se encuentran *Staphylococcus no aureus* y *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*), siendo la infección por estos microorganismos más leve causando muchas veces una inflamación moderada, con aumentos de RCS de dos a tres veces más que una ubre sana. Los casos de mastitis dados por patógenos menores son en general menos asociados a mastitis clínicas (Harmon, 1994).

4.4.1 Microorganismos contagiosos

Los patógenos contagiosos habitan y se multiplican en la glándula mamaria y la piel del pezón, su transmisión es de animal a animal principalmente durante el ordeño. Dentro de ellos se destacan *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*, *C. bovis* y *Mycoplasma spp.* (Saran y Chaffer, 2000).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es un microorganismo Gram positivo clasificado como un agente contagioso y suele ser el microorganismo más prevalente en los sistemas de producción de leche (Barkema et al., 1998). La transmisión se produce principalmente a través de la máquina de ordeñar o las manos del ordeñador y provocando principalmente infecciones subclínicas e infecciones que a menudo se convierten en crónicas (Middleton, 2013; Zadoks, 2011). Esta bacteria se agrupa en comunidades estructuradas, rodeadas y protegidas por una matriz extracelular compuesta por un polisacárido (poli-N-acetil-B-(1,6) glucosamina) formando los biofilms, esto facilita la colonización y proliferación de estas bacterias sobre diferentes superficies (Hulsen, Lam y Schukken 2013).

La ubre de la vaca en producción es el principal reservorio de *S. aureus*, su transmisión es principalmente de vaca a vaca a través de la máquina de ordeño, pero también se puede diseminar a través de las manos del ordeñador y materiales que se utilizan para limpiar pezones, si son empleados en más de una vaca (Capurro et al., 2009).

Por otro lado, las moscas pueden funcionar como vectores del *S. aureus*, transportándolo de un animal a otro (Owens, Oliver, Gillespie, Ray y Nickerson 1998).

En cuanto al tratamiento y las probabilidades de éxito del mismo juega un rol fundamental la duración de la infección, para incrementar las posibilidades de éxito es indispensable la detección temprana de animales que requieren tratamiento. A mayor edad de la vaca, mayor número de cuartos infectados y

duración de la infección, o mayor sea el nivel de RCS antes del tratamiento, menor es la probabilidad de cura (Barkema, 2006). Cuando existe formación de microabscesos, formación de tejido cicatrizal en el tejido secretor y producción de biofilms, la tasa de respuesta a la antibioticoterapia y por tanto la curación disminuye considerablemente (National Mastitis Council 2019).

Para la prevención de nuevas infecciones por *S.aureus* es muy importante, la eliminación de animales crónicos y la implementación de medidas profilácticas durante el ordeño (Almeida, 2014).

Streptococcus agalactiae

S. agalactiae es un coco Gram positivo y es una bacteria obligada de la glándula mamaria, puede sobrevivir poco tiempo en el ambiente y en las manos del ordeñador por lo que el momento del ordeño es el de mayor riesgo para el contagio (Keefe, 2012; Saran y Chaffer, 2000). Las mastitis causadas por este agente en general son resueltas a través de programas de higiene y tratamiento del rodeo (Zadoks, 2011).

Una vez establecida la infección por *S. agalactiae*, el objetivo es su erradicación para la cual el tratamiento con antimicrobianos suele ser exitoso ya que presenta alta susceptibilidad a los mismos (Keefe, 2012).

Una rigurosa higiene en el ordeño y la terapia de vaca seca, sumado a una correcta bioseguridad para limitar la reintroducción del agente, permiten reducir o eliminar las infecciones en unos pocos años, mientras que las vacas que son refractarias al tratamiento deben ser eliminadas (Keefe, 2012).

Esta bacteria produce reducción en la producción ya que genera destrucción del tejido secretor. En muchos establecimientos con presencia de *S. agalactiae* se evidencia recuentos celulares de tanque elevados con pocos casos clínicos (United States Department of Agriculture, 2008).

Se debe sospechar de mastitis causada por *S. agalactiae* cuando en el establecimiento o en la vaca el RCS comienza aumentar y se mantiene alto en niveles de 1.000.000 cél/ml o mayores (NMC, 2011).

Corynebacterium bovis

C. bovis es considerado como patógeno menor contagioso; causa inflamación y RCS elevados entre 2 a 3 veces por encima de los valores de un animal sin infección. Su principal reservorio es la glándula mamaria o el canal del pezón, y su transmisión es principalmente de vaca a vaca. Los cuartos infectados con este patógeno serían más resistentes a infecciones naturales posteriores por patógenos mayores, como estreptococos y *S. aureus* (Rainard y Poutrel, 1988). Esta bacteria no es frecuentemente la causa de elevados recuentos de células somáticas en el tanque, tampoco de marcados cambios en la composición de la leche o gran disminución en la producción láctea y es altamente prevalente cuando existe un deficiente sellado post ordeño. (Harmon, 1994).

Mycoplasma spp.

Los *Mycoplasmas* son bacterias que carecen de pared celular, por lo que los cuadros de mastitis causados por esta bacteria no responden muchas veces al

tratamiento con antibióticos que bloquean la síntesis de la pared celular (ejemplo los betalactámicos). Pueden presentarse como casos clínicos agudos, afectando más de un cuarto mamario, pero también pueden darse casos subclínicos y crónicos (Calvinho y Neder, 2013).

Mycoplasma spp reside comúnmente en el tracto respiratorio y urogenital del individuo, es por esto que las vías de transmisión entre animales son muy amplias. Los animales afectados y que no responden al tratamiento deben ser separados de los sanos, para evitar su propagación y mantenimiento en el establecimiento (United States Department of Agriculture, 2008).

No existe un antibiótico intramamario aprobado que sea eficaz contra esta bacteria (Janus, 2009).

4.4.2 Microorganismos Ambientales

Dentro de los patógenos de origen ambiental que causan mastitis tenemos bacterias Gram negativas, las más frecuentes son *Escherichia coli* (*E.coli*), *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomona spp* y *Proteus spp.*, y bacterias Gram positivas como, *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) y *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) principalmente, siendo que estos últimos se puede comportar como ambientales o contagiosos (Philpot y Nickerson 1992; Saran y Chaffer, 2000; Smith y Hogan, 1995).

La fuente de infección para estos agentes son las camas, estiércol, agua estancada restos de fardos y silos (Saran y Chaffer, 2000).

El control de mastitis causadas por patógenos ambientales se logra mediante una higiene durante el ordeño y eliminación/control de reservorios en el medio ambiente donde habita la vaca con el objetivo de reducir la exposición de las vacas a estos agentes (Almeida, 2014).

Escherichia coli

Escherichia coli es un patógeno ambiental causante de mastitis, clínicamente la enfermedad puede presentar distintos grados de severidad, pudiendo ser fatal, hiperaguda, aguda, recurrente clínica y hasta llegar a ser subclínica. La presentación más común es en las primeras etapas de la lactación, la infección por microorganismos como *E. coli* se contrae principalmente entre los ordeños, es decir que a diferencia de los patógenos contagiosos, se adquiere fuera de la sala de ordeño (Chaffer, 1999). La cama, humedad, barro y estiércol, son reservorios comunes de *E.coli* (Ruegg, 2012). La mastitis ambiental es controlada reduciendo la exposición de las puntas de los pezones a patógenos (higiene ambiental) o al maximizar la resistencia de las vacas para una nueva infección (Smith y Hogan, 1995).

Streptococcus uberis

Esta bacteria es frecuentemente tomada del ambiente, pero después puede ser transmitida entre vacas. Varios factores de virulencia como factores anti fagocíticos permiten infectar y multiplicarse en la glándula mamaria, adherirse e invadir el tejido mamario, este agente tiene gran importancia tanto en sistemas estabulados como semipastoriles con plazas de alimentación (Saran y Chaffer,

2000). La tasa de nuevas infecciones es superior durante las 2 semanas posteriores al período seco y las dos anteriores al parto; también se ha visto un incremento en las infecciones en vacas más viejas en relación a las vaquillonas (Radostitis, 2002).

Streptococcus dysgalactiae

Es una bacteria que se la considera contagiosa, habita en la glándula mamaria, pero también sobrevive en el medio ambiente, por lo tanto, se la incluye en la clasificación de los agentes causantes de mastitis en ambos grupos (contagiosos y ambientales) (Chaffer, 1999).

Las vacas en lactancia temprana y durante el periodo de secado temprano son las que tienen mayor riesgo de infección, producto del estrés y la inmunosupresión. Sin embargo, las vacas de alta producción parecen no tener mayores riesgos que las de baja producción (Petersson-Wolf y Currin, 2012).

4.4.3 Microorganismos oportunistas

Dentro de este grupo se incluye más de 20 especies de estafilococos diferentes al *Staphylococcus aureus*, que se conocen como *Staphylococcus* no aureus, son también llamados patógenos menores (Philpot y Nickerson, 1992).

Estos agentes se encuentran en la piel de ubre, pezones y en las manos de los ordeñadores, siendo una fuente de infección constante, dicha ubicación permite colonizar el canal del pezón y penetrar en los tejidos de la ubre (Philpot y Nickerson, 1992; Saran y Chaffer, 2000).

La prevalencia es mayor en vacas de primera lactancia en relación a vacas más viejas, y también se da más frecuentemente inmediatamente después del parto (NMC, 1998).

Las infecciones por *Staphylococcus* no aureus, en general son subclínicas o clínicas leves, y en comparación con los patógenos mayores, producen una leve o moderada elevación del recuento de células somáticas individuales (Philpot y Nickerson, 1992). Mientras que solamente de existir una gran proporción de cuartos infectados frecuentemente con *Staphylococcus* no aureus puede constituir un importante factor en el alto recuento celular en el tanque (Dufour, 2012).

4.4.4 Otros microorganismos

Son microorganismos causantes de mastitis menos frecuentes, y normalmente actúan debido a inadecuados procedimientos de tratamientos y/o características del ambiente donde se encuentran las vacas. Ejemplos de este grupo son; *Pseudomona aeruginosa*, *Trueperella (Actinomyces) pyogenes*, *Nocardia Spp*, *levaduras (Candida spp.)*, *Bacillus spp.*, *Serratia spp.*, *Pasteurella spp* y *Prototheca spp.* (Philpot y Nickerson, 1992).

4.5 Microorganismos causantes de Mastitis en Uruguay

La etiología de la mastitis puede ser variable entre países de una región, pero también dentro de una misma nación; ya que influyen factores como raza o biotipo lechero, nivel productivo del sistema, sistema de producción (estabulado o pastoril), manejo y factores medioambientales como, por ejemplo: temperatura y humedad (Olde Riekerink, Barkema, Kelton y Scholl, 2007).

Los agentes causantes de mastitis pueden ser distintos tipos de microorganismos, pero los patógenos más comunes en Uruguay son bacterias dentro de las cuales se destacan *S. aureus*, *coliformes*, *estreptococos* y *enterococos* de origen ambiental. En todos los estudios realizados hasta el momento en nuestro país el agente más prevalente es *S. aureus*, provocando infecciones con gran tendencia a la cronicidad y baja tasa de curación (De Torres et al., 2014; Gianneecchini et al., 2002; Gianneecchini et al., 2014, Larumbe y Vidart, 2016). En un estudio realizado en la región Litoral Oeste de Uruguay por Gianneecchini et al., 2002, se determinó una prevalencia de mastitis subclínica del 54,2%; donde *S. aureus* fue el patógeno más prevalente, seguido por *Staphylococcus* no aureus, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, *Str. agalactiae* y *Enterococcus* sp. También *S.aureus* fue el patógeno más frecuentemente encontrado en casos de mastitis clínica en un 27,8 %, seguido por *S. dysgalactiae* con 18,1% (Gianneecchini et al., 2014). Si bien existen otros agentes como: *Pseudomonas spp.*, *Trueperella pyogenes*, *Serratia spp.*, *Levduras*, *Prototheca spp*, etc, estos no son tan frecuentemente encontrados y generalmente se trata de casos individuales (Larumbe y Vidart, 2016).

4.6 Diagnóstico de Mastitis

El diagnóstico de la mastitis cuenta con dos etapas, la primera es conocer si existe la enfermedad presente en la ubre de los animales y en segundo lugar reconocer cual es el agente causante (Ashraf e Imran 2018).

Dependiendo de la presentación de la enfermedad, se puede presentar una mastitis clínica en la que vamos a observar síntomas con alteración principalmente a nivel de la ubre y de la leche, mientras que en la mastitis subclínica no se harán presentes estas alteraciones.

El diagnóstico temprano de la mastitis subclínica y cuáles son los microorganismos que la están causando son de gran importancia para evitar el contagio y tomar decisiones en cuanto a medidas de control y tratamientos (Cantekin, Ergün, Doğruer, Saribay y Solmaz 2015).

Para el correcto diagnóstico de esta enfermedad contamos con diferentes técnicas las cuales nos van a permitir realizar un correcto tratamiento y control de la misma.

4.6.1 Recuento células somáticas (RCS)

Es el método de referencia a nivel mundial para evaluar la calidad sanitaria de la leche, tiene buena sensibilidad y especificidad para detectar mastitis

subclínicas (Schalm, Carroll y Jain 1971). Esta técnica se realiza mediante la extracción de leche, del tanque (del rodeo) de una muestra compuesta de los 4 cuartos de la vaca o por cuarto. Un rodeo sano es aquel que tiene no más del 15% de las vacas con RCS por encima de 200 mil cels/ml (Ruegg, 2010). Para el caso de una vaca, así como para una muestra por cuarto, recuentos de células somáticas por encima de 200.000 cels/ml nos estará indicando una inflamación de la ubre. Las células somáticas consisten principalmente de células epiteliales, macrófagos, linfocitos y neutrófilos. En animales sanos existe una mayor proporción de macrófagos, mientras que en cuartos infectados aumentan marcadamente la proporción de neutrófilos (Khan y Khan 2006), siendo el principal factor que provoca estas variaciones la inflamación del tejido mamario (Reneau, 1986).

Para realizar el recuento se utilizan diferentes métodos como recuento microscópico directo mediante tinción con azul de metileno, contador de Coulter y recuento de células electrónico fluoro-óptico por citometría de disco o de flujo. Este último es el más utilizado a nivel comercial y nos permite realizarlo tanto en leche fresca como en leche conservada (Ashraf e Imran 2018).

4.6.2 California Mastitis Test (CMT)

Esta es una prueba indirecta muy utilizada que nos ayuda a nivel de campo a diagnosticar la mastitis subclínica, contando con la ventaja de ser de bajo costo y resultado inmediato (Gómez, Santivañez, Arauco, Espezua y Manrique 2014). Para esta técnica, previo al ordeño, se colocan 2 ml de leche aproximadamente de cada uno de los cuartos de la ubre, dentro de la paleta para CMT, la cual cuenta con cuatro pocillos, uno para cada cuarto. Luego se agrega un reactivo, el cual contiene un detergente y un indicador de pH, este va a lisar las células somáticas presentes en la leche, generando así se libere el material genético y produciéndose la gelificación de la muestra. En base a esta gelificación es que se va a puntuar la muestra, utilizando una escala de cinco puntos, en la cual el 0 equivale a un recuento de células somáticas menor a 200.000 cels/ml. Los otros puntos de la escala son trazas, 1, 2 y 3 en el que cada punto corresponde a un mayor recuento de células somáticas.

4.6.3 Cultivo Bacteriano

El cultivo microbiológico de la leche, asociado con técnicas bioquímicas es el método de referencia actual para la identificación de microorganismos causantes de mastitis. Sin embargo, es un método que tiene diferentes dificultades en cuanto a logística y al tiempo necesario para obtener un diagnóstico, pudiendo variar de 3 a 5 días (Lago, Godden, Bey, Ruegg, y Leslie 2011).

Si bien el cultivo de leche clásico es la prueba estándar para el diagnóstico de mastitis, este tiene varias desventajas, una de ellas es que el crecimiento de microorganismos in vitro puede verse afectado por presencia de residuos de antibióticos, además de que, si la carga microbiana es baja, por ejemplo, en casos de mastitis subclínicas, hay grandes posibilidades de obtener un resultado falso negativo (Cantekin et al., 2015).

Aproximadamente el 30% de los casos de mastitis no se pueden diagnosticar mediante cultivo porque solo se pueden detectar los patógenos viables que crecen en los medios de cultivo convencionales; por lo tanto, existe una alta tasa de resultados que no arrojan crecimiento en el cultivo, pero esto no indica que no haya presencia de bacterias (Ashraf e Imran, 2018).

Gianeechini et al., 2002 colectaron muestras de leche de 40 casos clínicos de mastitis en un mes de un total de 3351 vacas secas, en ordeño y vaquillonas a parir, donde obtuvieron para los casos de mastitis clínica un 32,5% de los cultivos bacteriológicos sin crecimiento. Este resultado no es diferente al obtenido por Giovannini, Piccinini y Zecconi (2000) y Miltenburg et al. (1996) con un 38% y 27% respectivamente de muestras sin crecimiento. Estos resultados pueden ser explicados por varias razones: 1) una curación bacteriológica espontánea, 2) la presencia de muy pocas bacterias viables, 3) la inhibición de las bacterias por los antimicrobianos, 4) que las bacterias mueran antes del cultivo y 5) presencia de leucocitos en leche (Gillespie y Oliver, 2005).

En este sentido ya ha sido reportado que *S. aureus* es liberado de la glándula mamaria de manera intermitente, comenzando la infección con una alta carga y variando a muy baja durante toda la enfermedad. Esto lleva a que la sensibilidad del cultivo de una sola muestra de cuarto de leche para determinar el estado infeccioso de un cuarto en cualquier momento de las infecciones sea del 75%, además, la congelación de las muestras de leche influye en la capacidad de aislar bacterias específicas (Sears, Smith, English, Herer y Gonzalez 1990).

El cultivo nos permite identificar al agente que se encuentra causando la mastitis, lo cual es una gran ventaja a la hora de tomar decisiones sobre el tratamiento, prevención del contagio de los animales y en cuanto a descarte de animales (Ashraf e Imran 2018).

Una alternativa al cultivo bacteriano convencional, con el fin de reducir los tiempos necesarios para obtener un diagnóstico y así lograr tomar decisiones en cuanto a prevención y control de la enfermedad es el Cultivo en Tambo. Esta técnica permite a los operarios de los tambos extraer las muestras de leche a vacas con mastitis clínica para luego sembrarlas en un medio de cultivo determinado. Esta técnica permite minimizar al extremo los tiempos requeridos para el envío de muestras y evitar el congelado de las misma ya que se siembran en el propio tambo. Un ejemplo de esta herramienta es la Biplaca de Minnesota la cual es una placa de Petri dividida en dos, en la cual una mitad tiene como medio de cultivo el agar p, y la otra mitad agar McConkey, esto se basa en el uso de medios de cultivos que favorezcan de un lado el crecimiento de bacterias Gram positivas (agar p), y en la otra mitad de la placa el crecimiento de bacterias Gram negativas (agar McConkey) (Bouman 2021).

Luego de realizado el cultivo de la muestra de leche, la placa es incubada en una estufa a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano y luego realizar la lectura de la placa. Con esta información que nos brinda la placa es que se toma la decisión sobre el tratamiento, los animales que presenten cultivos con crecimiento de bacterias gram positivas deberán ser tratados, mientras que los que únicamente presentan crecimiento de bacterias gram negativas no serán tratados ya que normalmente en un plazo de uno a

cinco días los síntomas de mastitis tienden a desaparecer (García, Fidelis, Freu, Granja y Veiga 2021).

Otra opción interesante para utilizar en el cultivo en tambo, es el medio de cultivo cromogénico, el cual nos permite en base al color de las colonias diferenciar entre diferentes bacterias, sin la necesidad de pruebas bioquímicas y de una manera rápida como lo permite también el cultivo en tambo. Este medio de cultivo obtiene mejores resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad y precisión con respecto a otros métodos de cultivo bacteriano rápido como el de Biplaca de Minnesota mencionado anteriormente (García et al., 2021).

Según Ganda, Bisinotto, Decter y Bicalho (2016), los medios cromogénicos presentaron 100% de sensibilidad y 99,8% de especificidad para la identificación de *S. aureus* en muestras de leche con mastitis clínica.

Mientras que García et al. (2021) obtuvieron una sensibilidad de 89,1% y especificidad 96,3% para *S. agalactiae* / *dysgalactiae* en muestras de leche con mastitis subclínica, y una sensibilidad de 90,5% con especificidad de 92,5% para *S. uberis*.

Hay que destacar dentro de las limitaciones del cultivo on-farm que la lectura visual de las colonias y la identificación presuntiva de los patógenos requieren de una capacitación previa y además es recomendable que sea realizada siempre por la misma persona (García et al., 2021).

4.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica molecular permite detectar la presencia de material genético del patógeno de una forma rápida y confiable, ya que, partiendo de muestras de leche, se realiza la extracción de ADN bacteriano el cual posteriormente se va a amplificar para obtener un resultado positivo o negativo a la presencia del patógeno (Britten, 2012). La PCR, como técnica de diagnóstico, permite el reconocimiento de los patógenos presentes con mayor rapidez, sensibilidad y especificidad en comparación con el cultivo bacteriano, convirtiéndose en una excelente herramienta para el diagnóstico de grandes cantidades de muestras de leche (Cantekin et al., 2015).

4.7 Prevención y control de mastitis

Para un control efectivo y prevención de la mastitis, es crucial seguir la rutina de ordeño adecuada, prestando especial atención al sellado post ordeño. Además, se recomienda realizar chequeos regulares de la máquina ordeñadora. Es fundamental detectar y tratar de manera inmediata la mastitis clínica en las vacas, así como descartar aquellas con mastitis crónicas. Finalmente, se debe aplicar terapia intramamaria con antibióticos a las vacas al momento del secado. Estas medidas, conocidas como el plan de 5 puntos de Neave et al., (1969), son clave para el manejo óptimo de la mastitis en ganado lechero. Estos puntos alcanzan el control de patógenos contagiosos, siendo ineficiente a la hora de la prevención de la mastitis por patógenos ambientales (Cheng y Han 2020), por lo que fue necesario extender este plan a 10 puntos con el fin de lograr medidas que prevengan y controlen el contagio por patógenos ambientales (Azambuya et al., 2022). La higiene durante el ordeño y

entre un ordeño y el siguiente es uno de los factores de mayor relevancia para la prevención de mastitis. Se observó que correctas estrategias de higiene, sobre todo al finalizar el ordeño logran disminuir la aparición de nuevas infecciones aproximadamente a la mitad (Neave, Dodd, Kingwill y Westgarth 1969).

El reconocimiento de los patógenos es de suma importancia para saber si es necesario tratar o no, así como también tener conocimiento de la epidemiología del predio y contar con protocolos establecidos ya que la mastitis es la causa más frecuente para el uso de antibióticos en los predios lecheros, donde un 80% de los antibióticos utilizados fueron para el tratamiento o prevención de la mastitis, lo cual genera gran preocupación en cuanto a residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal y al desarrollo de resistencia a estos por parte de las bacterias (Lago et al., 2011).

Con respecto a los protocolos para el tratamiento, la aplicación de éstos de forma práctica y sencilla para que puedan ser fácilmente implementados por los operarios en los predios lecheros, llevaría a una mejor elección del antibiótico a utilizar, su dosis y el tiempo necesario que debe ser administrado, lo cual ayudaría a reducir la selección de bacterias resistentes (Raymond, Wohrle, y Call 2006).

Para el tratamiento de mastitis clínica durante la lactancia, es preferible el uso de antibióticos de espectro reducido, que sean lo más específicos posible para los patógenos presentes. Las vías de administración pueden ser vía sistémica, intramamaria o una combinación de éstas, deberán tener una duración de al menos 3 días y se recomienda extenderlos en los casos de mastitis causadas por *S. aureus* y *S. uberis*, lo cual mejora las tasas de cura. En cambio, no es recomendable tratar la mastitis subclínica durante la lactancia ya que tiene muy poca eficacia y no existe una diferencia importante en la cura cuando se decide tratar o no este tipo de mastitis (Pyörälä, S. 2009).

El mejor momento para el tratamiento de la mastitis subclínica es cuando se realiza el secado de las vacas, donde vamos a observar una mejor tasa de curación, además ayuda a la regeneración del tejido dañado de la ubre, previene nuevas infecciones intramamarias durante este periodo y reduce la incidencia de mastitis clínica inmediata al parto, sin dejar de lado que al tratar la vaca en este periodo no vamos a tener descarte de leche (Philpot, 1979).

Al secar la ubre se pueden tratar todos los cuartos o seleccionar algunos de estos a tratar, para realizar un tratamiento selectivo es necesario un diagnóstico de mastitis subclínica de cada cuarto, por lo que suele utilizarse generalmente el tratamiento de todos los cuartos, este último es una buena elección ya que es eficaz en la prevención de nuevas infecciones intramamarias (Philpot, 1979). El tratamiento al iniciar el periodo seco no solo es eficaz en la prevención de nuevas infecciones, sino que también puede eliminar el 70% de las infecciones por streptococcus ambientales (Khan y Khan 2006).

5. HIPÓTESIS

Muestras de leche de vacas con mastitis clínica que no tuvieron crecimiento en el cultivo mediante técnicas tradicionales en tambo pueden resultar positivas si se utiliza otra técnica diagnóstica.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Evaluar el uso de PCR tiempo final para el diagnóstico de muestras de leche con mastitis clínica que presentaron cultivo sin crecimiento mediante técnicas tradicionales en tambo.

6.2 Objetivos Específicos:

1. Protocolizar la extracción y cuantificar ADN bacteriano a partir de muestras de leche sin crecimiento en el cultivo.
2. Establecer un diagnóstico mediante PCR tiempo final de las muestras de leche sin crecimiento y determinar la frecuencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* o infección mixta en las mismas.
3. Estudiar las características en cuanto a número y etapa de lactancia de las vacas cuyas muestras no presentan crecimiento, pero son positivas a la PCR tiempo final.
4. Estudiar la evolución clínica de las vacas cuyas muestras no presentan crecimiento en el cultivo y son positivas al diagnóstico por PCR.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Muestras a analizar

Se analizaron un total de 153 muestras de leche procedentes de cuartos individuales de 153 vacas diagnosticadas con mastitis clínicas y sin crecimiento en el diagnóstico por cultivo clásico en el tambo. Estas muestras fueron obtenidas de un predio comercial que cuenta con un rodeo aproximado de 6000 animales y se extrajeron durante el ordeño por los tamberos correspondientes, quienes previamente fueron capacitados por el veterinario del establecimiento para dicha actividad.

Los casos de mastitis clínica fueron determinados mediante “despunte” de cada pezón observando las características de esa leche (grumos, sangre) y signos de inflamación de la ubre (temperatura, dolor, tumefacción, rubor,

edema). Las muestras de leche obtenidas a lo largo del mes de noviembre 2022, se remitieron congeladas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Veterinaria en el mes de diciembre de 2022, junto con datos sobre los animales que incluían: días en leche, número de lactancia y si habían sido tratados a las 72hs de realizado el cultivo. También se incluyeron en el estudio 20 muestras de leche de vacas clínicamente sanas del mismo lote que las que tenían cultivo negativo.

7.2 Extracción de ADN de las muestras de leche

La extracción de ADN bacteriano se realizó utilizando el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits Sigma-Aldrich siguiendo las especificaciones del fabricante con el agregado de lisozima para una buena degradación de la pared bacteriana. Previo a la extracción se colocaron 2 mL de leche en un microtubo, el cual se centrifugó a 13.300 rpm por 5 minutos para descartar la grasa y el suero. El pellet obtenido fue lavado con 1000 µL de suero fisiológico las veces necesarias hasta observar un sobrenadante claro, asegurando que toda la grasa fue retirada. El pellet obtenido se resuspendió en 200µl de solución Buffer para Gram (+) y luego se le agregó solución de lisozima. Luego de realizado este paso se incubó durante 60 minutos a 37°C, agitando cada 15 minutos, con el objetivo que se produzca la lisis de la pared bacteriana. Transcurrido este tiempo, y verificando se haya producido una correcta lisis, se procedió a agregar 20µL de RNasa A, e incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, esta enzima hidroliza el ARN lo que nos permitió obtener un ADN más puro. Con este mismo objetivo es que posteriormente se agregó 20µL de proteinasa K, utilizada para la escisión de proteínas de la muestra, además en este paso se agregó 100µL de solución de lisis C para luego incubar a 55°C durante 10 minutos, en esta instancia debía de formarse una mezcla homogénea para una correcta lisis. A este lisado se le agregó 100µL de etanol (95-100%) helado para precipitar el ADN. Luego el lisado se transfirió a la columna de extracción y se centrifugó a 6500g durante 1 minuto, posteriormente se descartó el microtubo quedándonos con la columna que contiene el filtro, colocándola en uno nuevo.

Posteriormente se realizaron los lavados y centrifugados correspondientes según las indicaciones del fabricante.

Para eluir el ADN se agregaron 50µL de agua ultrapura libre de ADN asa y RNAsas directamente en el centro de la columna, luego se incubó a 37°C durante 15 minutos para luego centrifugar a 6500g por 1 minuto, obteniendo así el ADN extraído.

La pureza y concentración del ADN obtenido fueron evaluadas mediante NanoDrop™ One (Thermo Scientific™) y los extractos se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

7.3 Detección de *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* en las muestras de leche.

Para la detección de los tres patógenos en las muestras de leche se utilizó la técnica de PCR tiempo final. En la Tabla 1 se observan los primers utilizados para la detección de *S. aureus*, los que han sido publicados por Gillespie y

Oliver. (2005) y para la detección de *S. uberis* y *S. dysgalactiae* los publicados por Diana et al. (2024). Para todas las reacciones de PCR, se prepararon mezclas con un volumen total de 25 µL, que incluyeron 12.5 µL de master mix (NZYTaQ II 2× Green Master Mix), 1 µL de cada primer a 10 mM, 9.5 µL de agua sin DNasa ni Rnasa y 50 ng de ADN. Las reacciones de PCR se ejecutaron en un termociclador Corbett CG-1 Palma con el siguiente programa: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, y 30 segundos a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. La verificación del fragmento amplificado se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE, cargando 5 µL del marcador de peso molecular GeneRuler 100bp de Thermo Scientific en el gel. La electroforesis se efectuó a 100V por 45 minutos y los fragmentos de ADN se visualizaron tras la tinción con SYBR Green Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz ultravioleta (UV)

Tabla 1: *Primers* utilizados para la identificación de *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* mediante PCR.

Especie	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón(pb)
<i>S. aureus</i>	Sa-F	TCAACGATATTCTTCACGACTAA	160
	Sa-R	CCAGCTTCGGTACTACTAAAG	
<i>S. dysgalactiae</i>	Sd. hyp_F	CCAGCGACAACCCTAGGACC	161
	Sd. Hyp_R	GAGATCGGCGTCTACTTGACTCAG	
<i>S. uberis</i>	Su. mutS_F	CATTGAACCTCGTGCCTT	158
	Su. mutS_R	CTAGATGTCCCAAAGCCAT	

7.4 Análisis de datos

El registro de datos obtenidos se realizó en una hoja de cálculo Excel, donde a cada muestra obtenida del tambo se le asignó un número del 1 al 153 y se indicó si cada una fue positiva o negativa a cada uno de los agentes estudiados. También se registró si esos animales tuvieron que ser tratados con antimicrobianos luego 72 hs porque continuaban con los signos clínicos o si curaron clínicamente. Por otro lado, se evaluó si cada especie estaba sobrerrepresentada en muestras donde se identificaba de manera exclusiva, con respecto a las muestras en las que se detectaba junto a los otros grupos analizados. Para determinar la significancia del enriquecimiento, se aplicó el Test de Fisher, estableciendo un valor umbral de $p < 0,05$. Posteriormente se comparó la distribución de cada grupo detectado en las muestras de vacas que resolvieron la infección antes de las 72 hs y las que no la resolvieron mediante el Test de Fisher, a su vez también se evaluó mediante X^2 la distribución de los diferentes patógenos en relación a los días en leche y número de lactancia en

el que se encontraban los animales al momento de obtener la muestra, considerando solo aquellas muestras en las que la identificación fue exclusiva de un agente.

8. RESULTADOS

8.1 Extracción de ADN

Al realizar la extracción de ADN bacteriano de las muestras de leche fue posible obtener grandes cantidades de ADN con un promedio de 250 ng/ul y una pureza medida en la relación 260/280 entre 1,6 y 2,0. Se pudo protocolizar el método de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de leche.

8.2 Detección de *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* por PCR

La técnica de PCR utilizada ya se encontraba puesta a punto para los agentes estudiados, para el caso de *S. dysgalactiae* y *S. uberis* fue puesta a punto por Diana et al., (2024), y para *S. aureus* por Gillespie y Oliver. (2005) Todos los resultados obtenidos tuvieron controles tanto negativos como positivos que arrojaron los resultados esperados, también se obtuvieron los tamaños de banda esperados para cada agente. (*S. aureus* 160 Pb, *S. dysgalactiae* 161 Pb y *S. uberis* 158 Pb).

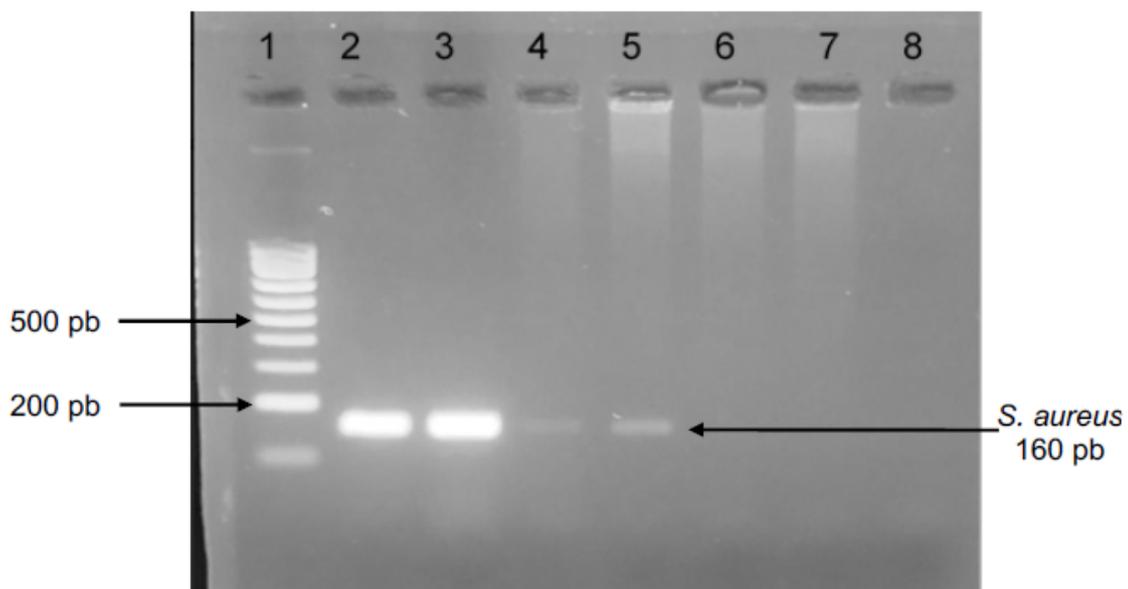


Figura 1. Corrida en gel de electroforesis para PCR de *S. aureus*. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: control positivo (ATCC 6538 *S. aureus*), confirmando la eficacia del ensayo. Carriles 3, 4 y 5: muestras positivas para la presencia de *S. aureus*. Carril 6 y 7: muestras con resultado negativo para la presencia de la bacteria. Carril 8: control negativo, que asegura la ausencia de contaminación en el proceso.

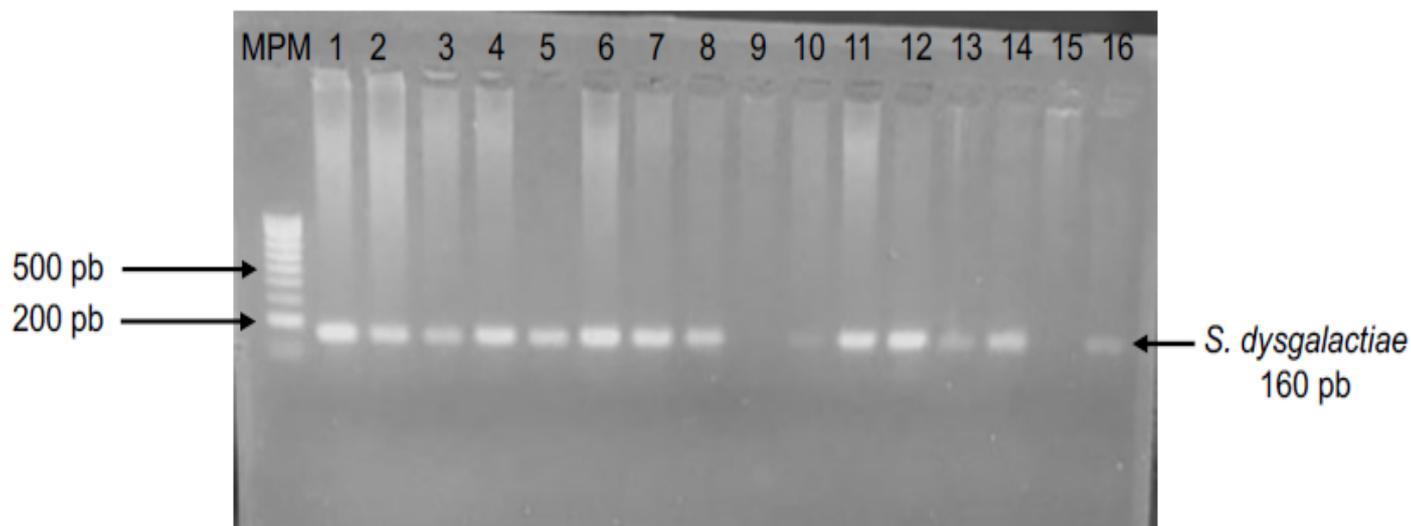


Figura 2. Corrida en gel de electroforesis para PCR de *S. dysgalactiae*: Carril MPM: corresponde al marcador de peso molecular. Carril 1 a 8 y 10 a 14: muestras que arrojaron resultado positivo a la presencia de *S. dysgalactiae*. Carril 9: muestra con resultado negativo para la presencia de *S. dysgalactiae*. Carril 15: control negativo con agua DEPC. Carril 16: control positivo (ATCC 12394 *Str. dysgalactiae*).

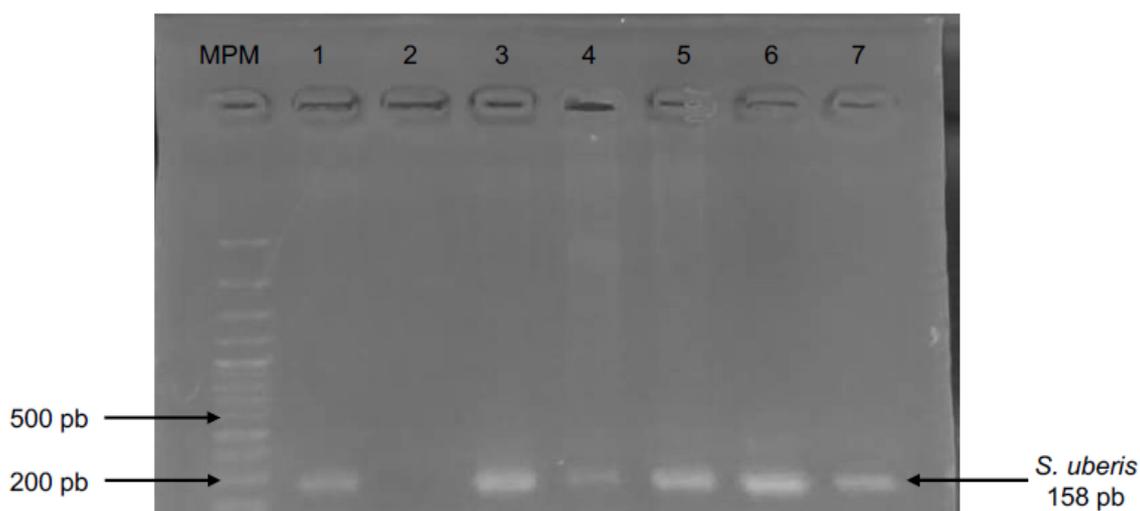


Figura 3. Corrida en gel de electroforesis para PCR de *S. uberis*. MPM: marcador de peso molecular. Carril 1: corresponde al control positivo (ATCC 9927 *S. uberis*). Carril 2: control negativo. Carril 3 a 7: muestras que dieron positivo para la presencia de *S. uberis*.

De las 153 muestras de leche analizadas el 62.1% (95), dieron positivas a la presencia de alguno de los agentes infecciosos estudiados en este trabajo mientras que el 37.9% (58) mostraron resultados negativos (Figura 4).

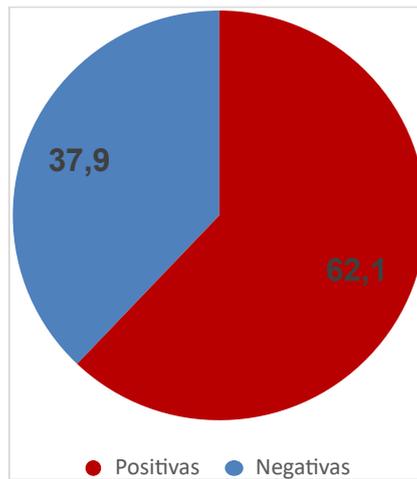


Figura 4: Porcentaje de muestras negativas y positivas a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* por técnica de PCR.

Staphylococcus aureus (Sa) se detectó en 59 de las 153 muestras analizadas, siendo el agente que se presentó con mayor frecuencia (38.6 %). En 30 de estas muestras se encontraba como único agente y en las restantes 29 acompañado de alguno de los otros agentes estudiados. Para *Streptococcus dysgalactiae* (Sd) se obtuvieron 54 muestras positivas (35.3%), en 25 de ellas se encontró como único agente, en las restantes 29 muestras se encontró asociado con otro patógeno. Por su parte *Streptococcus uberis* (Su) fue detectado en 15 muestras (9.8%), de las cuales en 8 se encontró de forma aislada y en 7 en conjunto con otro de los patógenos estudiados.

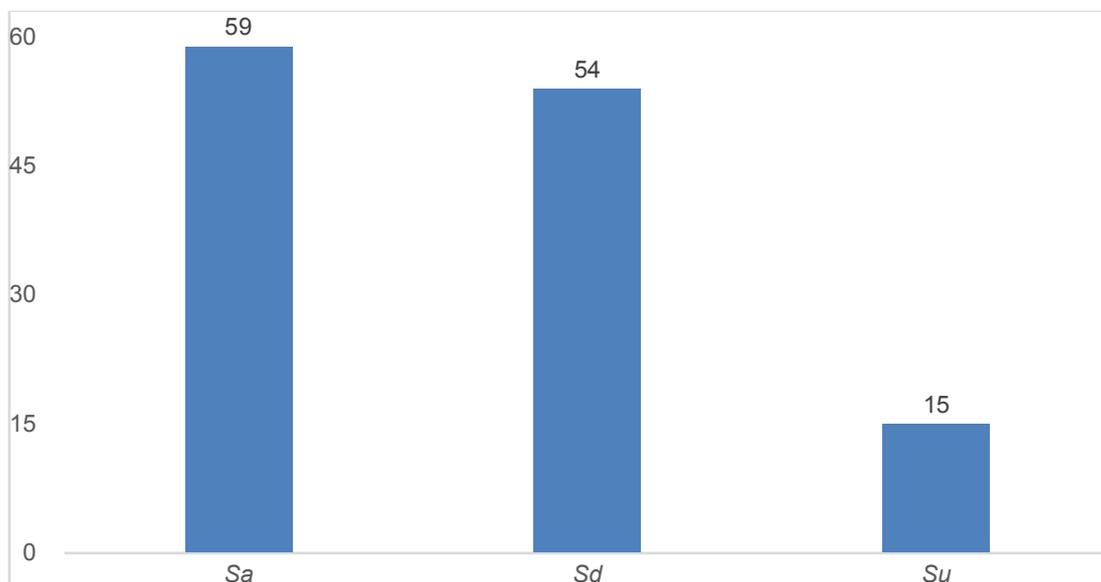


Figura 5: Cantidad de muestras positivas para cada patógeno, *Staphylococcus aureus* (Sa), *Streptococcus dysgalactiae* (Sd), *Streptococcus uberis* (Su), sin distinguir si se encuentra de forma aislada o asociados a otros agentes.

8.2.1 Muestras positivas a *Staphylococcus aureus*

De las 59 muestras que arrojaron resultado positivo a *Staphylococcus aureus*, 30 de ellas fueron detectadas de forma exclusiva, 25 se presentaron junto a *Streptococcus dysgalactiae*, 3 junto a *Streptococcus uberis*, y solo 1 de las muestras se detectó junto a ambos (Figura 6).

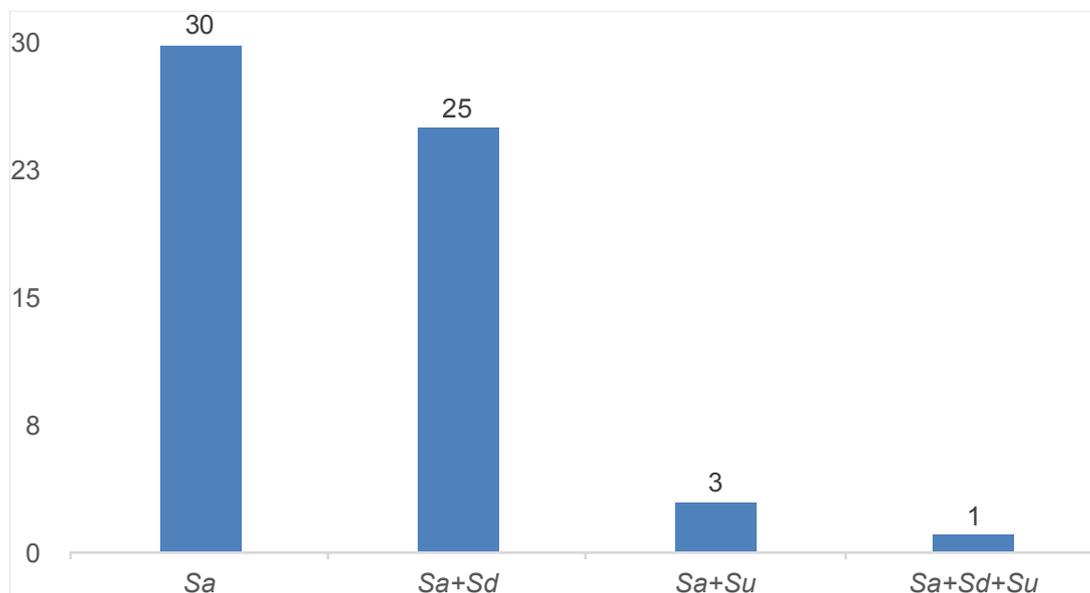


Figura 6. Muestras positivas a *S. aureus* en las que se detecta como único patógeno o asociado a otro patógeno.

8.2.2 Muestras positivas a *Streptococcus dysgalactiae*.

Por su parte de las 54 muestras positivas a *S. dysgalactiae*, 25 de estas presentaron únicamente este patógeno, en igual número (25) se obtuvo la presencia de *S. dysgalactiae* junto a *S. aureus*, por su parte 3 muestras revelaron la presencia conjunta de *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, mientras que solo 1 muestra arrojó la presencia de forma conjunta de *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* (Figura 7).

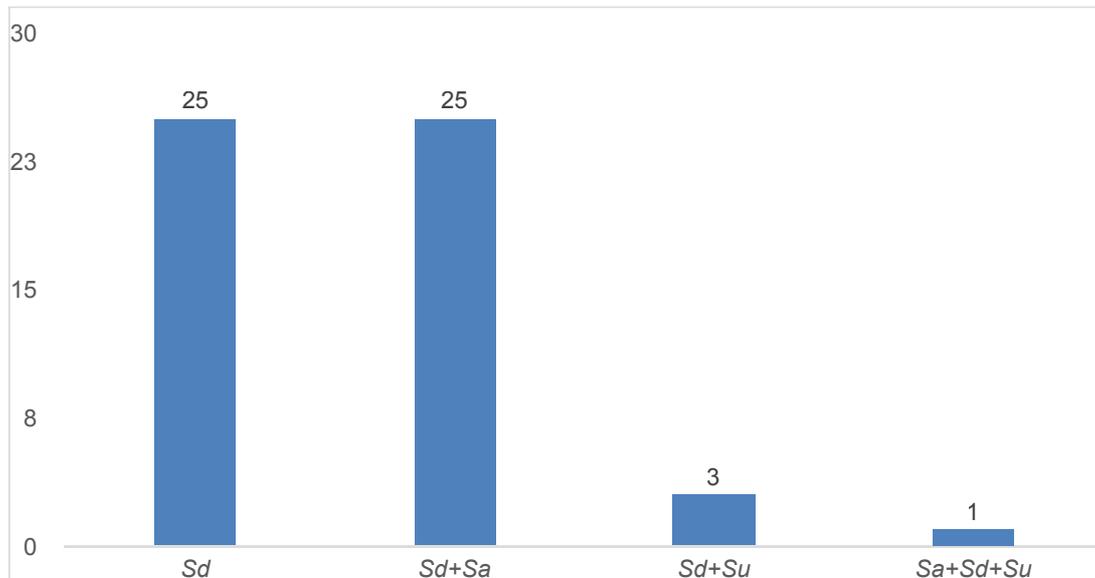


Figura 7. Cantidad de muestras positivas a *S. dysgalactiae* en las que se presenta como único patógeno y en las que se encuentra asociado a uno o más patógenos.

8.2.3 Muestras positivas a *Streptococcus uberis*.

En relación con las muestras positivas a *S. uberis*, 8 mostraron exclusivamente la presencia de *S. uberis*, 3 presentaron la presencia tanto de *S. uberis* como de *S. aureus*, otras 3 evidenciaron la presencia conjunta de *S. uberis* y *S. dysgalactiae*, por último, se obtuvo 1 muestra que presentó las tres especies bacterianas de forma conjunta (Figura 8).

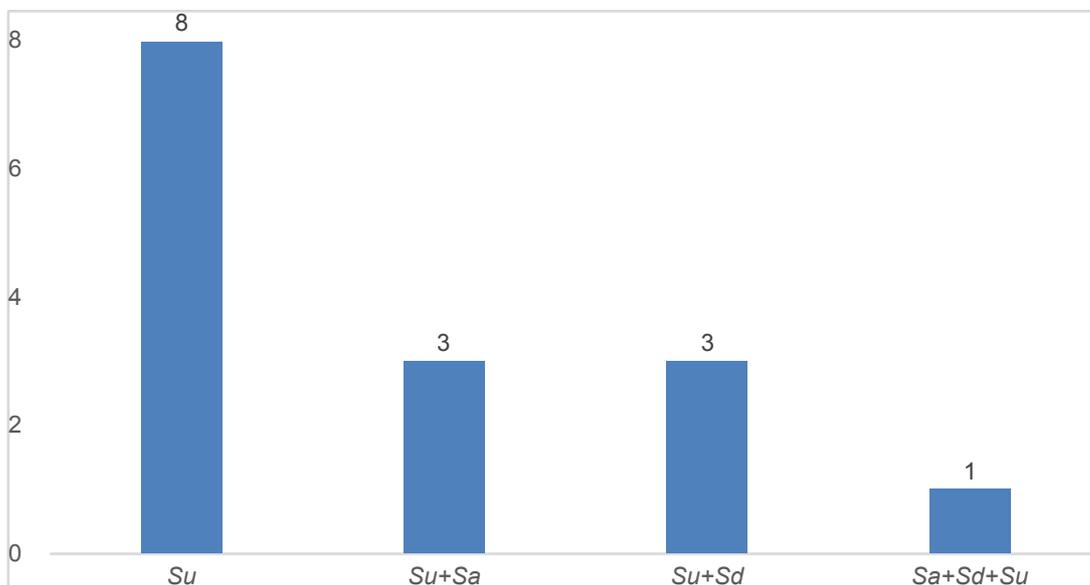


Figura 8. Número de muestras positivas a *S. uberis* en las que se presenta como único patógeno y en las que se encuentra asociado a uno o más patógenos.

8.3 Patógenos detectados relacionado a número lactancia y días en leche

De los animales muestreados, 32 (20.9%) de ellos estaban en su primera lactancia, 40 (26.1%) en su segunda y 81 (53%) estaban en una tercera lactancia o más. En cuanto a los agentes, de los animales que resultaron positivos a *S. aureus* (59) en nuestro estudio el 22% (13) se encontraban en primera lactancia, el 27,1% (16) en segunda lactancia y el 50,8% (30) en tercera o más lactancias. Por su parte el *Str. dysgalactiae* con un total de 54 muestras positivas, se detectó en un 24% (13) en animales de primera lactancia, un 27,7% (15) en animales de segunda lactancia y el 48,1% (26) se encontraban en tercera o más lactancias.

En el caso de *Str. uberis* para el cuál se obtuvieron 15 muestras positivas, el 26,7% (4) de los positivos resultaron ser animales en primera lactancia, el 20% (3) en segunda lactancia y el 53,3% (8) en tercera o más lactancias (Figura 9).

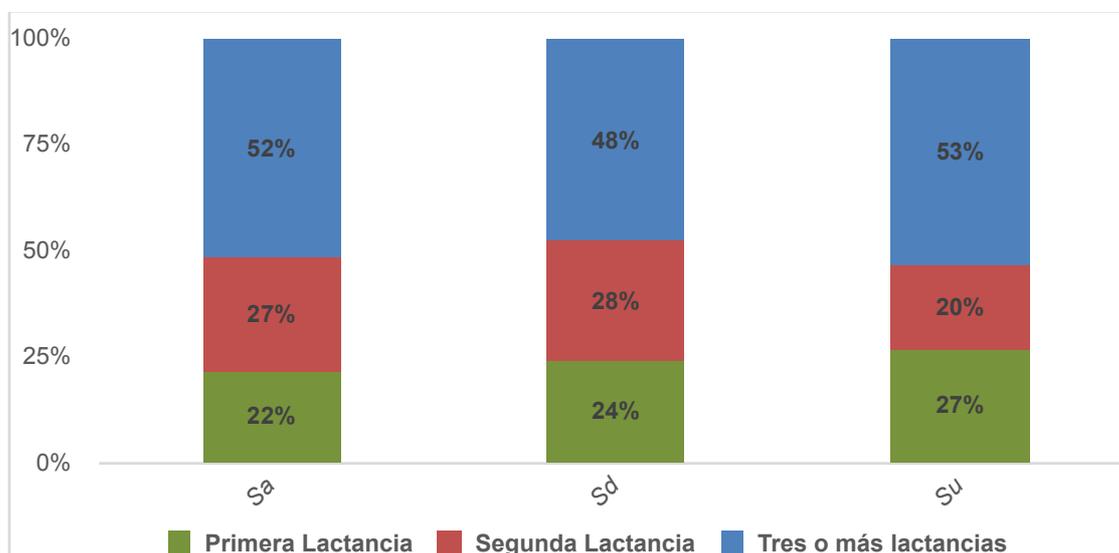


Figura 9: Porcentaje de aparición de cada agente según el número de lactancia, sin considerar si el patógeno aparece solo o en combinación con otros.

En cuanto al número de lactancia, se analizó la presencia de los agentes en tres categorías: primera lactancia, segunda lactancia y tres o más lactancias. El resultado del test de chi-cuadrado fue de 0,4846, lo que sugiere que no existe una relación significativa entre el número de lactancia y la presencia de los patógenos, con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

De los que se encontraban en primera lactancia, 23 muestras fueron positivas para alguno de los patógenos, repartiéndose de la siguiente manera: 30.4% positivos solamente para *S. aureus*, 26.1% para *S. dysgalactiae*, 13% para *S. uberis*, 26.1% animales fueron positivos para *S. aureus* + *S. dysgalactiae* y 4.3% para *S. dysgalactiae* + *S. uberis* (Figura 10).

Para las vacas de segunda lactancia los resultados positivos fueron 27, observándose de esas muestras que el 37% fue positiva a *S. aureus* de forma individual, el 29.6% para *S. dysgalactiae*, 7.4% para *S. uberis*, 22.2% de los

resultados positivos para *S. aureus* + *S. dysgalactiae*, mientras que para *S. dysgalactiae* + *S. uberis* se obtuvo 3.7% de muestras positivas (Figura 11). Por último, los animales de tercera lactancia arrojaron 45 resultados positivos, en los cuales para *S. aureus* hubieron 28.9% casos positivos cuando este se presentaba como único agente, 24.4% para *S. dysgalactiae*, 6.7% para *S. uberis*, 28.9% *S. aureus* + *S. dysgalactiae*, 6.7% *S. aureus* + *S. uberis*, 2.2% *S. dysgalactiae* + *S. uberis*, 2.2% *S. aureus* + *S. dysgalactiae* + *S. uberis* (Figura 12).

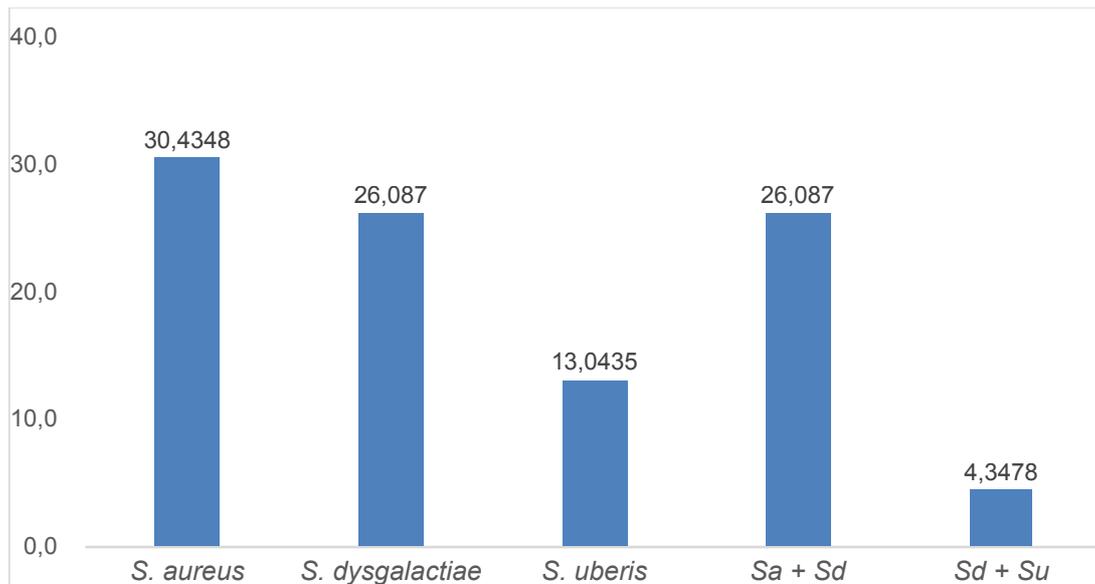


Figura 10: Detección de patógenos en primera lactancia (%).

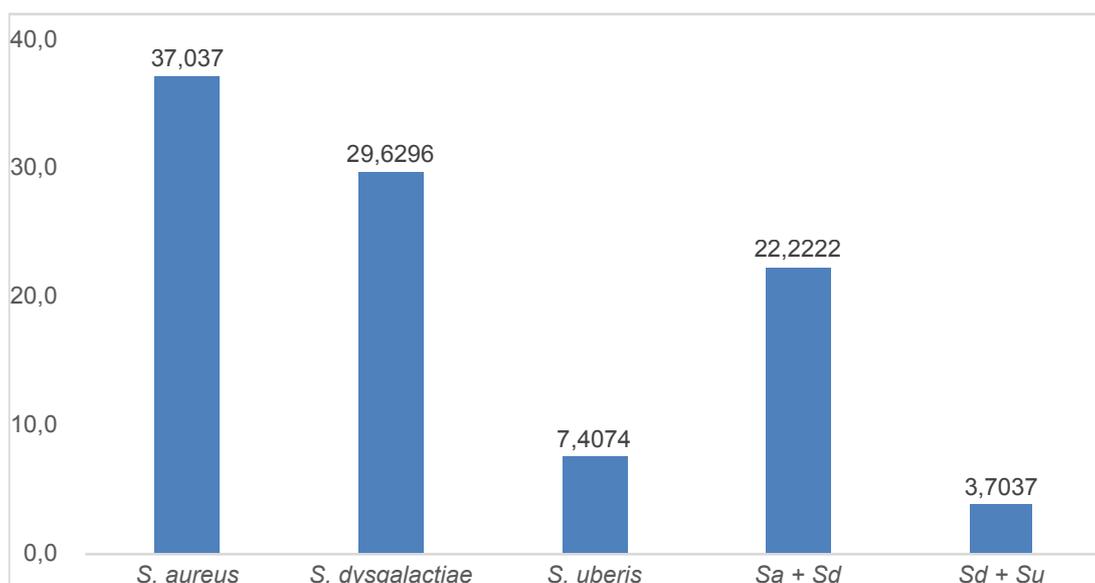


Figura 11: Detección de patógenos en segunda lactancia (%).

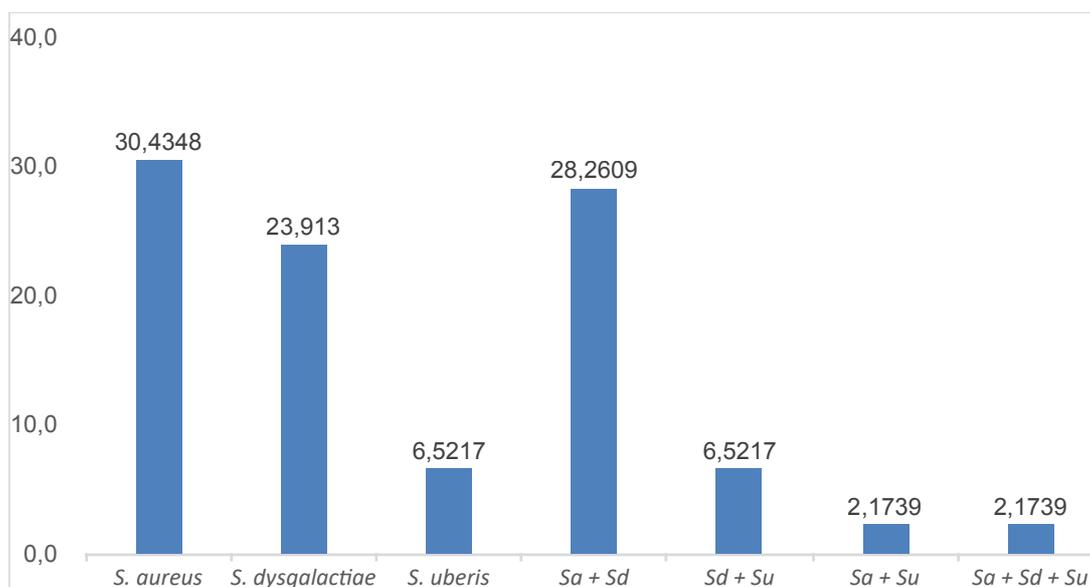


Figura 12: Detección de patógenos en tercera lactancia (%).

Al dividir las 153 muestras obtenidas según su etapa de lactancia, encontramos que 59 pertenecían a animales en el primer tercio de lactancia, unas 42 provenían de animales en el segundo tercio de lactancia, y, por último, 52 muestras se obtuvieron de animales del tercer tercio de lactación.

Al evaluar la distribución de las infecciones según la etapa de la lactancia en la cual se encontraba la vaca al momento de la infección, hallamos que para *S. aureus* el 37,3 % de las infecciones se dieron en el primer tercio de lactancia, el 25,4% en el segundo tercio y el restante 37,3% en el tercer tercio de lactancia.

Para *S. dysgalactiae*, su detección fue de 38,9% en primer tercio, 24,1% en segundo tercio y 37% en tercer tercio.

Por su parte *S. uberis* presentó un porcentaje de detección 26,7 % en primer tercio de lactancia, 40 % en lactancia media, y 33,3% en tercer tercio de lactancia (Figura 13).

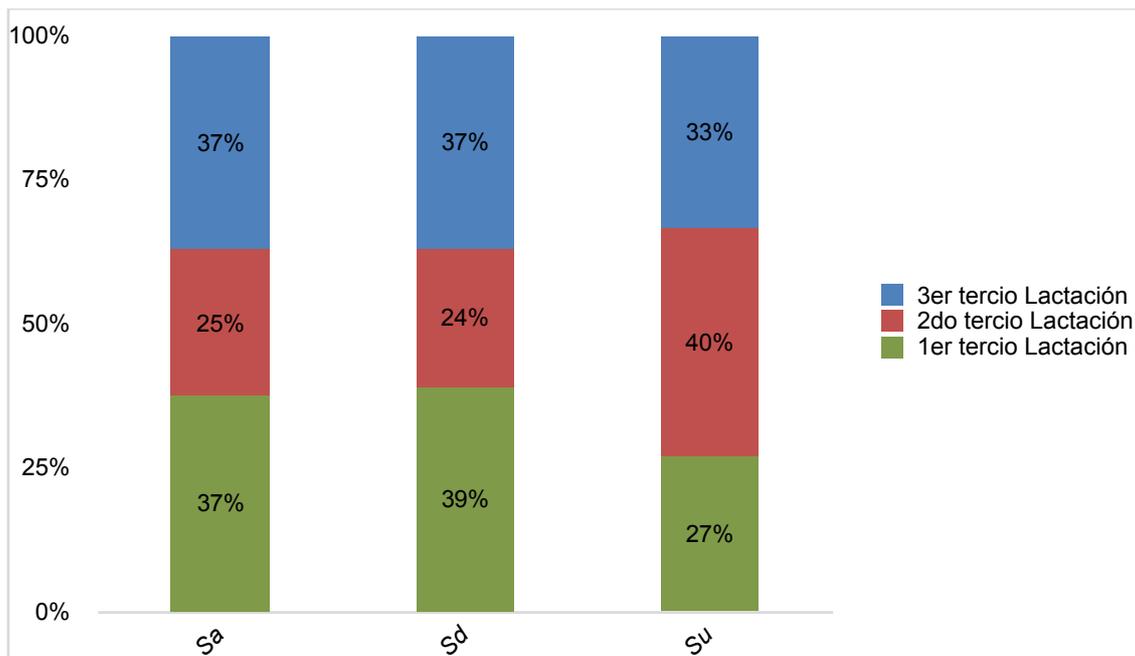


Figura 13: Porcentaje de detección de los agentes según el tercio de lactancia al momento de la toma de muestra, incluyendo casos simples y co-infecciones.

El resultado del test de chi-cuadrado fue de 1,7151, lo que indica que no hay una asociación significativa entre los días en leche y la presencia de los patógenos, con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

8.4 Evolución clínica de las vacas con cultivo sin crecimiento

De las 153 vacas con mastitis clínicas estudiadas que habían presentado cultivo negativo, el 35,3 % continuaban con síntomas clínicos luego de las 72 hs y por tanto se trataron, el resto de las vacas (64,7%), presentó desaparición de los signos clínicos antes de las 72 hs y por tanto no requirieron tratamiento (Figura 14).

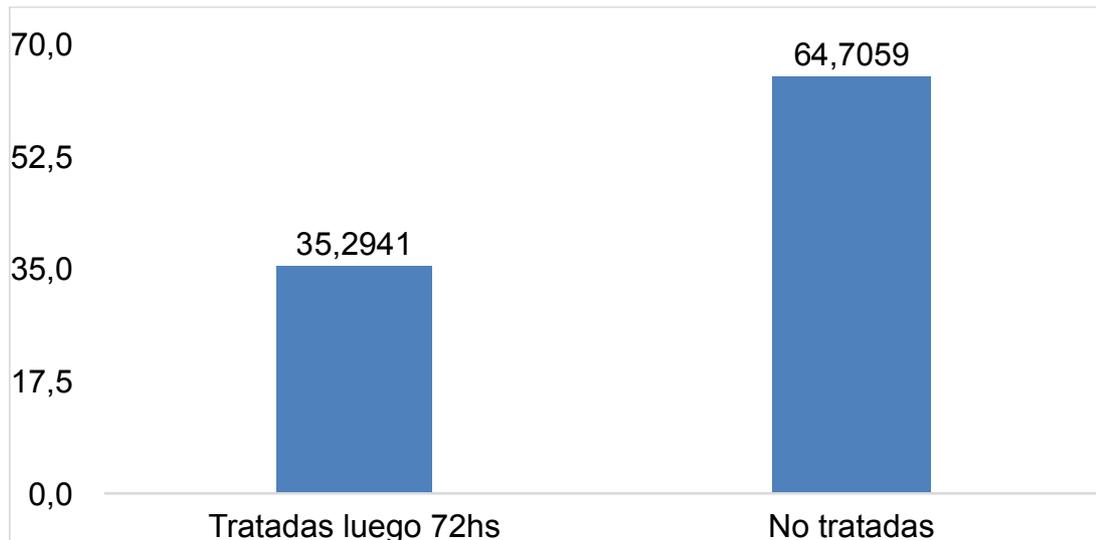


Figura 14: porcentaje de vacas tratadas y no tratadas luego de las 72 hs.

Entre las vacas diagnosticadas con mastitis clínica que necesitaron tratamiento, se observó la siguiente distribución de patógenos detectados: en el 14,8% de los casos se detectó *S. aureus*, en el 13,0% *S. dysgalactiae*, en el 5,6% *S. uberis*, y en el 16,7% una combinación de *S. aureus* y *S. dysgalactiae*. Además, el 50,0% de las muestras de los animales que necesitaron tratamiento no arrojaron la presencia de ninguno de estos patógenos, lo que indica un resultado negativo en el análisis (Figura 15).

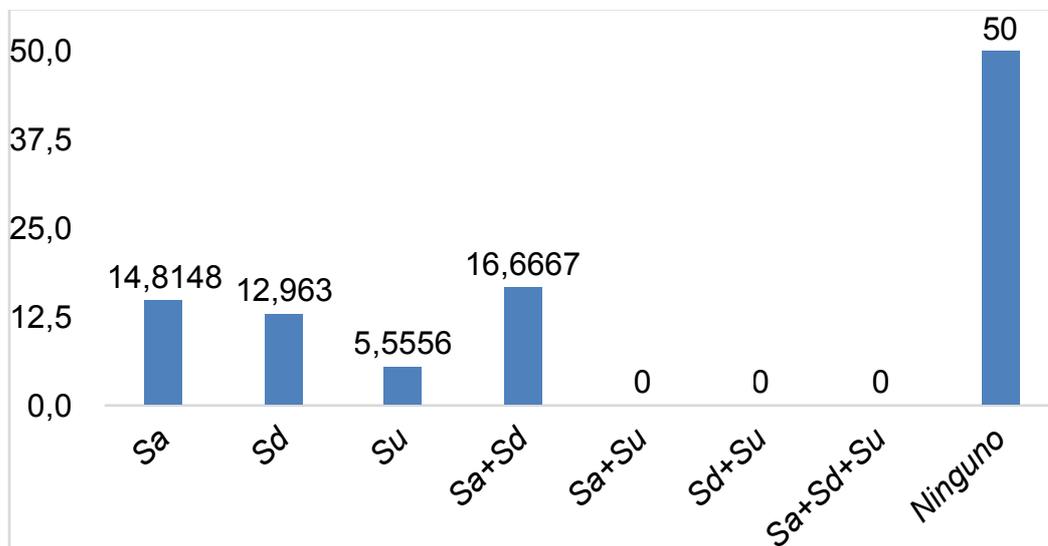


Figura 15: Porcentaje de los agentes detectados en muestras de vacas con mastitis clínica que requirieron tratamiento luego de las 72 hs.

De las muestras de vacas con mastitis clínica que se recuperaron espontáneamente en menos de 72 horas sin necesidad de tratamiento, se observó la siguiente distribución de agentes detectados: el 22,2% *S. aureus*, el

18,2% *S. dysgalactiae*, el 5,1% *S. uberis*, el 16,2% una combinación de *S. aureus* y *S. dysgalactiae*, el 3,0% una combinación de *S. aureus* y *S. uberis*, el 3,0% una combinación de *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, el 1,0% una combinación de *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, mientras que el 31,3% de las muestras no mostraron la presencia de ninguno de estos patógenos (Figura 16).

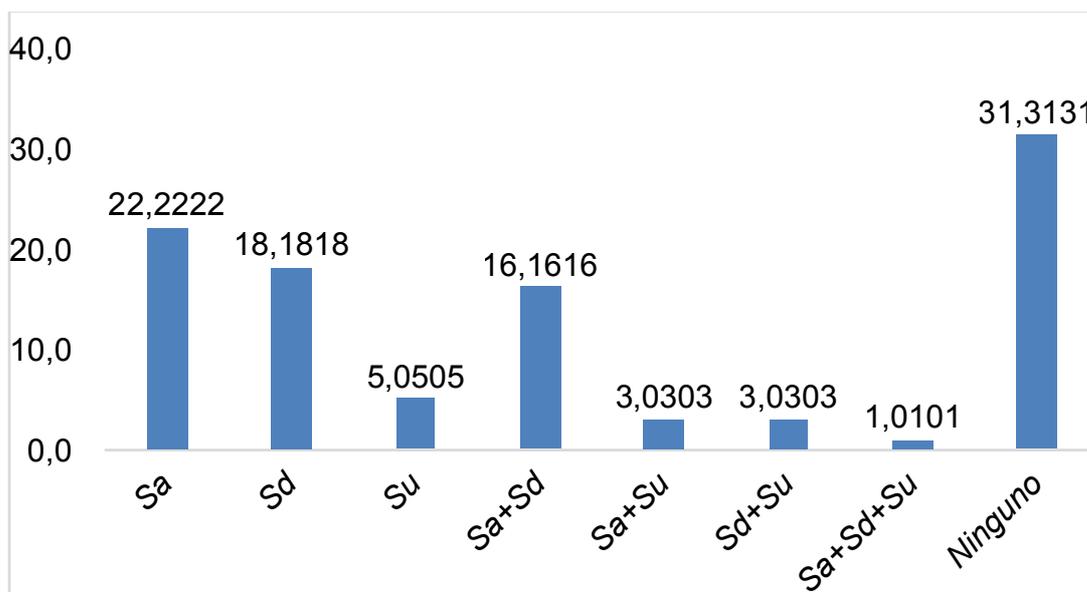


Figura 16: Porcentaje de los agentes detectados en muestras que no requirieron tratamiento luego de 72 hs.

Se realizó un análisis para determinar si había diferencias significativas en la presencia de los agentes estudiados entre animales tratados y no tratados después de las 72 horas, utilizando el Test de Fisher con un umbral de significancia establecido en $p < 0,05$. Para *S. aureus*, el valor obtenido fue de 0,2247, lo que sugiere que no hubo una diferencia significativa en la presencia de este agente, ya sea solo o acompañado por otro patógeno, entre los animales tratados y no tratados. En el caso de *S. dysgalactiae*, se obtuvo un valor de 0,2947, lo que indica que tampoco hubo diferencias significativas en la presencia de este agente, ya sea solo o asociado con otros patógenos, entre los animales que recibieron tratamiento y los que no. Por último, para *S. uberis*, se obtuvo un valor de 0,2598, lo que sugiere que la presencia de este agente, tanto solo como asociado con otros patógenos, tampoco mostró diferencias significativas entre los animales tratados y los no tratados. Los resultados obtenidos sugieren que la necesidad de tratamiento para la mastitis no está determinada por la presencia de un agente específico, ya sea *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* o una combinación de ellos. La presencia del patógeno no sería el único factor a tener en cuenta al momento de instaurar un tratamiento.

9. DISCUSIÓN

9.1 Diagnóstico por cultivo bacteriano y por PCR

El diagnóstico preciso y rápido de mastitis es sumamente importante y necesario por la importancia económica que tiene esta enfermedad. Es por este motivo que nos parece necesario analizar el uso del cultivo bacteriano, una de las técnicas más utilizadas para el diagnóstico de esta enfermedad y compararla con técnicas más sensibles a modo de poder identificar si es un método preciso a la hora del diagnóstico.

Uno de nuestros objetivos era definir si esas muestras que habían arrojado un resultado sin crecimiento bacteriano en el cultivo podían presentar algún patógeno no detectado mediante este método, para eso decidimos utilizar una técnica más sensible como la PCR. De las muestras de leche que no tuvieron crecimiento en el cultivo un 61,2% si presentó presencia de algún patógeno por PCR.

Koskinen et al., 2010, compara los resultados obtenidos para la detección de patógenos por cultivo bacteriano (77% muestras positivas) y la PCR (89% muestras positivas) indicando que existían diferencias importantes entre uno y otro método de diagnóstico, lo cual genera una cierta preocupación tanto para productores como para veterinarios y un desafío a la hora de determinar con certeza el diagnóstico de la patología, pero a su vez abre una puerta para mejorar la precisión del diagnóstico.

Al evaluar el por qué existen cultivos sin crecimiento, una de las principales explicaciones es posiblemente que la carga bacteriana de esas muestras negativas al cultivo era baja, siendo ese el motivo por el cual no hubo crecimiento en placa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Riffon et al., 2001, y Taponen et al., 2009, donde afirman que la baja concentración de bacterias en la leche es de las principales razones por las que no hay crecimiento en el cultivo bacteriano, siendo que éste utiliza solamente 0,1 ml de leche y el mínimo de bacterias presentes para ser detectadas es de 100 ufc/ml (por debajo de este valor no hay crecimiento en placa) (Taponen, Salmikivi, Simojoki, Koskinen y Pyörälä 2009). Otras razones planteadas incluyen que la muestra de leche con cultivo negativo puede contener bacterias que no crecen en medios convencionales, como anaerobios, o una escasa viabilidad o la muerte de las bacterias debido a factores antibacterianos de la leche como lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa (Rainard y Riollet, 2006), los cuales se encuentran en un nivel bajo en cuartos sanos, pero aumentan de forma exponencial durante la mastitis. Estas sustancias junto con los leucocitos de la leche, podrían contribuir a la muerte de las bacterias de la leche mastítica (Taponen et al., 2009). Como la prueba de PCR se basa en la identificación del ADN bacteriano, no depende de la viabilidad de las bacterias pudiendo detectar también bacterias muertas o con crecimiento inhibido (Koskinen et al., 2010).

Además de este problema (falsos negativos) la técnica de cultivo en placa tiene como desventaja que es una prueba lenta, la incubación requiere 48 -72 h y las pruebas de confirmación adicionales también requieren mucho tiempo (National Mastitis Council, 1999). La PCR no requiere un paso de cultivo y el tiempo total de análisis es de 3 a 4 hs, esto es de gran importancia en el caso

de mastitis clínicas para acortar la duración total del tratamiento y mejorar el resultado terapéutico, además de disminuir el uso de antimicrobianos (Koskinen et al., 2008).

9.2 Frecuencia de los diferentes agentes causantes de mastitis clínica

En cuanto a la presentación de los diferentes agentes evaluados los resultados obtenidos se asemejan a otros trabajos realizados a nivel nacional.

Giannechini et al., 2014 observaron que los principales patógenos aislados de casos de mastitis clínica fueron *S. aureus* (27,8%) y *S. dysgalactiae* (18,1%).

Otros trabajos exponen que *S. aureus* es el microorganismo con mayor frecuencia de aislamiento en muestras de mastitis clínica en Uruguay (De Torres et al., 2014; Giannechini et al., 2002). Estos resultados coinciden con otros trabajos nacionales donde *S. aureus* tuvo una incidencia de 27,5 % en 2014 y 28,8 % en 2015, destacándose como el patógeno mayormente encontrado. Por su parte como segundo agente en este estudio se encontró en 2014 *S. dysgalactiae* con un 15,4% y en 2015 *E. coli* en segundo lugar con 21,7% desplazando a *S. dysgalactiae* al tercer lugar con 14,3% (Larumbe y Vidart 2016), resultados similares a los obtenidos por De Torres et al., (2014) para los años 2012 y 2013. En cuanto a la incidencia de *S. uberis* estos autores indican que para el año 2014 fue de 12,6 % y en 2015 de 7,1% encontrándose también dentro del rango (4 a 12%) que habían establecido estudios previos; y similares a los obtenidos por De Torres et al., (2014) en 2012 (4,6%) y 2013 (9,1%).

Que *S. aureus* sea el principal microorganismo causante de mastitis clínica en Uruguay se debe a que es una bacteria que causa infecciones crónicas (Harmon, 1994), pero además tiene la capacidad de sobrevivir dentro de polimorfonucleares, donde se protege de la acción de los antibióticos (Owens, Nickerson y Ray 1999), a esto se le suma que forma biofilms (Hulsen et al., 2013). El control de este agente radica en la prevención de nuevas infecciones a través de la eliminación de animales crónicos e implementación de medidas profilácticas durante el ordeño (Almeida, 2014).

En cuanto a la presentación de infecciones mixtas, es decir muestras en las que existen dos o más de los agentes evaluados, los porcentajes obtenidos fueron de 20,9 % en nuestro estudio, siendo superiores a los reportados por Bradley et al., (2007) y Olde Riekerink et al., (2008), quienes obtuvieron 4,2 % y 2,7 % respectivamente. También fueron superiores a los reportados por Larumbe Curbelo, Ramiro y Vidart Damián, Mariana en el año 2016 donde en su estudio las infecciones mixtas fueron de 1,5% en 2014 y 1,8 % para el año 2015, sobre el total de muestras estudiadas.

9.3 Presentación de mastitis de acuerdo al número de lactancia de la vaca

En nuestro estudio, observamos que el 15% de las vacas presentaron mastitis durante su primera lactancia, mientras que esta incidencia aumentó al 17.6% en la segunda lactancia y al 30% en la tercera lactancia. Estos hallazgos respaldan la tendencia de que los animales con más lactancias tienen una

mayor incidencia de mastitis, como han señalado otros estudios previos, que también informaron que las vacas multíparas tienen una mayor probabilidad de desarrollar mastitis clínica, es lógico también pensar en una alta prevalencia de *S. aureus* relacionado al n° de lactancia, ya que es un microorganismo predominantemente contagioso que se transmite sobretodo aunque no exclusivamente de vaca a vaca (Moosavi, Mirzaei, Ghavami, Tamadón, 2014).

Estudios realizados reportaron la asociación entre mastitis clínica y vacas con al menos ocho partos, ellos indican que el riesgo de tener mastitis clínica está altamente influenciado por el número de partos de la vaca, animales con partos múltiples tuvieron una mayor incidencia de mastitis clínica al compararlas con las vaquillonas en todas las etapas del período de lactancia (Mungube, Tenhagen y Kassa, 2004).

Es evidente que el mayor porcentaje de infección se observa desde la tercera lactancia en adelante, sin embargo, en nuestro estudio al realizar el análisis estadístico no encontramos una diferencia significativa entre los grupos.

Aunque nuestros datos sugieren una asociación entre el número de lactancias y la incidencia de mastitis, la falta de significancia estadística podría deberse a varias razones, dónde podemos sospechar principalmente a que el tamaño de la muestra podría no haber sido lo suficientemente grande como para detectar diferencias significativas entre los grupos. Además, la variabilidad en los datos y la presencia de factores no controlados podrían haber influido en los resultados del análisis estadístico.

Es fundamental reconocer estas limitaciones y considerarlas al interpretar nuestros hallazgos. Futuras investigaciones podrían abordar estas limitaciones mediante el uso de muestras más grandes.

9.4 Presentación de mastitis de acuerdo a la etapa de lactancia

Con respecto a la etapa de lactancia en que se encontraban los animales, los resultados obtenidos muestran que los casos de mastitis se distribuyen de la siguiente manera: un 38.6% en el primer tercio de lactancia, un 27.5% en el segundo tercio de lactancia, y un 34.0% en el último tercio de lactancia. Esto también fue observado por Penev et al., 2014 donde revela una mayor incidencia de mastitis en el primer y último tercio de lactancia. Se atribuye esta mayor incidencia al estrés del parto y al rápido incremento en la producción de leche durante el primer tercio de lactancia (Lund, Jensen y Peterson, 1999), así como al daño causado por el ordeño de los pezones durante el último tercio de lactancia, lo cual predispone a las vacas a contraer mastitis (Negussie, Strandén y Mäntysaari, 2006).

Suriyasathaporn, Schukken, Nielen y Brand (2000) indican también en su investigación que las vacas en el período de lactancia temprano o en el primer mes de lactancia presentaron un aumento en la incidencia de mastitis clínica en relación al resto de las etapas de lactancia, atribuyéndolo en gran parte al estrés del parto, aumento del cortisol y la inmunosupresión de las vacas.

Bradley y Green (2004) en su trabajo de investigación también coinciden con el resto de la bibliografía y con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que dicen que la mastitis clínica ocurre con mayor frecuencia alrededor del parto.

Oliver y Sordillo (1988), por su parte analizan que la salud de la glándula mamaria está altamente expuesta en el periparto, debido a los cambios hormonales; que incluyen el aumento de la concentración de cortisol en sangre y de los niveles de 17 β -estradiol que se producen el día del parto (Weber et al., 2004) lo cual provoca la supresión del sistema inmunológico de esas vacas lecheras.

Aunque en los resultados obtenidos hay una tendencia clara hacia una mayor incidencia de mastitis en ciertos tercios de lactancia, esta asociación no alcanza la significancia estadística en nuestro estudio, por lo tanto, es importante considerar posibles factores que puedan influir en esta discrepancia, siendo el tamaño de la muestra el principal factor a considerar.

En resumen, mientras que nuestros resultados respaldan las observaciones de otros estudios sobre la distribución de la incidencia de mastitis en relación al número de lactancia y a los días en leche, la falta de significancia estadística en el análisis de chi cuadrado indica la necesidad de una evaluación más detallada y consideración de posibles variables adicionales.

9.5 Relación entre el agente causante de mastitis y la evolución clínica a las 72 hs.

En nuestro estudio observamos que desde el punto de vista estadístico no existen diferencias significativas en la evolución de la infección en los animales en relación al agente diagnosticado, es decir independientemente de cual agente esté involucrado en la infección, la necesidad de tratar luego de las 72 hs fue similar para los 3 agentes. De los 59 animales que dieron positivo a *S. aureus*, 17 (28,8%) requirieron tratamiento posterior a las 72 hs, para el caso de *S. dysgalactiae* de los 54 animales positivos, a 16 (29,6 %) de ellos se les instauró terapia medica luego de las 72 hs por permanecer con sintomatología. Por su parte para *S. uberis* 3 de los 15 animales (20%) diagnosticados positivos por PCR requirieron ser tratados luego de 72 hs.

Desde el punto de vista epidemiológico una infección por *S. aureus* puede llegar a ser más importante de controlar debido a su gran capacidad de contagio, así como también por la tendencia a la cronicidad de dichas infecciones, a modo de preservar los animales sanos, sin embargo, tanto *S. dysgalactiae* como *S. uberis* pueden tener capacidad de contagio, aunque son agentes que se toman del ambiente, por lo que se debe estar atento y actuar rápido también frente a estas infecciones.

10. CONCLUSIÓN

Podemos afirmar que el diagnóstico de mastitis no es sencillo, ninguna técnica es cien por ciento segura, el cultivo bacteriano que es muy utilizado como herramienta diagnóstica presenta como desventaja la posibilidad de que existan muchos falsos negativos, por lo que, las técnicas moleculares como PCR en tiempo final podrían proporcionar un diagnóstico bacteriológico para la mayoría de los casos donde los resultados del cultivo son negativos.

El agente que más incidencia tiene en los episodios de mastitis clínica en nuestro trabajo es *Staphylococcus aureus*, coincidiendo con trabajos previos.

A pesar de que se observó una mayor tendencia a presentar mastitis a medida que aumenta el número de lactancias y durante el primer y último tercio de la misma, en el análisis estadístico no se observó una diferencia significativa, lo que puede estar explicado principalmente por el tamaño de la muestra. Esto mismo puede darse para el análisis estadístico de la evolución clínica.

11. BIBLIOGRAFIA

- Almeida, R.A. (2014). Patogénesis de la mastitis bovina. En *Actas del II congreso Red Latinoamericana de Investigación en Mastitis*, Costa Rica.
- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 1193–1202. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>
- Azambuya, A. L., S.M., y Giani, S. M., & González, L. (2022). *Evaluación del impacto económico de la mastitis bovina en establecimientos lecheros del Uruguay* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Barkema, H., Schukken, Y., Lam, T., Beiboer, M., Benedictus, G., & Brand, A. (1998). Management practices associated with low, medium, and high somatic cell counts in bulk milk. *Journal of Dairy Science*, 81(7), 1917-1927.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877-1895.
- Bouman, M. (2021). Cultivo en tambo: una herramienta para reducir el uso de antibióticos en vacas lecheras. *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XLVIII, pp. 113-115). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Envolving Disease. *The Veterinary Journal*, 163, 1-13.
- Bradley, A.J., & Green, M.J. (2004). The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 20(3 Spec. Iss.), 547-568.
- Bradley, A.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E., & Green, M.J. (2007). Survey of the incidence and etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160, 253-258.

- Britten, A. M. (2012). The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 28(2), 187-202. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.006>
- Calvinho L.F., & Neder, V. (2013). Infecciones resistentes en el tambo. Mycoplasmas en el rodeo lechero. *Medicina Veterinaria*, 21(263),18-22.
- Cantekin, Z., Ergün, Y., Doğruer, G., Saribay, M. K., & Solmaz, H. (2015). Comparison of PCR and culture methods for diagnosis of subclinical mastitis in dairy cattle. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 21 (2), 277-282. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.12309>
- Capurro, A., Aspan, A., Unnerstad, E.H., Waller, P.K., & Artusson, K. (2009). Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *Journal of Dairy Science*, 93, 180-191.
- Chaffer, M. (1999). Aspectos epidemiológicos de la mastitis. En *Jornadas de salud de ubre* (p. 35). Nueva Helvecia, Uruguay.
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments. *Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699–1713.
- De Torres E., Giannechini E., Sierra G., Zorrilla F., Lanza A., & Diana V. (2014). Epidemiología de las infecciones intramamaria en Uruguay y líneas de investigación. En *Actas del II congreso Red Latinoamericana de Investigación en Mastitis* (pp. 34-37). Costa Rica.
- Diana Sánchez, L. (2024.). Estrategias para el diagnóstico molecular de mastitis bovina: detección ampliada de patógenos y su aplicación práctica. Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.
- Dufour, S., Dohoo, I. R., Barkema, W., DesCoteaux, L., DeVries, T. J., Reyher, K. K., ... Scholl, D. T. (2012). Epidemiology of coagulase negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. *Journal of Dairy Science*, 95, 3110–3124.
- Ganda, EK., Bisinotto RS., Decter DH., & Bicalho RC. (2016). Evaluation of an onfarm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. *PLoS ONE*, 11, 1–16.
- García, B.L.N., Fidelis, C.E., Freu, G., Granja, B.D., & Veiga, M. (2021). Evaluation of Chromogenic Culture Media for Rapid Identification of

Gram-Positive Bacteria Causing Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 3-9.

Gianneechini, R.E., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., & Moreno - López J. (2002). Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herd in the west litoral region of Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(4), 221 - 230.

Gianneechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil, J., Salvarrey, L., & Rivero, R. (2014). Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *Revista Sociedad Medicina Veterinaria del Uruguay*, 50(196), 4-32.

Gillespie, B.E., & Oliver, S.P. (2005). Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3510-3518.

Giovannini, G., Piccinini, R., & Zecconi, A. (2000). Epidemiology of clinical mastitis in Italy. En *39th Annual Meeting, National Mastitis Council* (pp. 176-178.). Madison, U.S.A.

Gómez, O.E., Santivañez, C.S., Arauco, F., Espezua, O.H., & Manrique, J. (2014). Criterios de interpretación para California mastitis test en el diagnóstico de mastitis subclínica en bovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 86-95.

Green, M., Green, L., Medley, G., Schukken, Y., & Bradley, A. (2002). Influence of Dry Period Bacterial Intramammary Infection on Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2589-2599.

Greiner, M., & Baumann, M.P.O. (2004). Risk factors for dairy cow mastitis in the Central Highlands of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, 36(5), 463-472.

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29(1), 18-31.

Harmon, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77, 2103-2112.

Hogeveen, H., & Østerås, O. (2005). Mastitis is an economic problem. En *Proceedings of the British Mastitis Conference* (pp. 1-13). Stoneleigh, United Kingdom.

- Hortet, P., & Seegers, H. (1998). Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 37(1-4), 1-20.
- Huijps, K., Lam, T. J., & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *The Journal of Dairy Research*, 75(1), 113–120.
- Hulsen, J., Lam, T., & Schukken, Y. H. (2013). *Cow Signals, a practical guide for dairy farm management*. Zutphen: RoodBond Publishers.
- Instituto Nacional de la Leche. (2023). *Situación y perspectivas de la lechería uruguaya 2023*. Recuperado de <https://www.inale.org/wp-content/uploads/2024/02/Informe-comercio-de-lacteos-1.pdf>
- Instituto Nacional de la Leche. (s.f.). *Uruguay Lechero*. Recuperado de <https://www.inale.org/uruguay-lechero/>
- International Dairy Federation. (1987). Bovine mastitis: definitions and guidelines for diagnosis. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 211(8).
- Janus, A. (2009). Emerging mastitis pathogens. *Veterinary World*, 2, 38–39.
- Jones, G. M., & Bailey, T. L. (2009). *Understanding the Basics of Mastitis*. Recuperado de <https://vtechworks.lib.vt.edu/server/api/core/bitstreams/21447d06-36f4-448f-90df-18aebf51ea2a/content>
- Keefe, G.P. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 203–216.
- Khan, M.Z., & Khan, A. (2006). Basic facts of mastitis on dairy animals: a review. *Pakistan Veterinary Journal*, 26(4), 204–208.
- Koldewej, E., Emmanuelson, U., & Janson, L. (1999). Relation of milk production loss to milk somatic cell count. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(1), 47–56.
- Koskinen, M. T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H. W., ... Salmikivi, L. (2008). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 952–959.
- Koskinen, M. T., Wellenberg, G. J., Sampimon, O. C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., ... Pyörälä, S. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5707–5715.

- Lago, A., Godden, S. M., Bey, R., Ruegg, P. L., & Leslie, K. (2011). The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4441–4456.
- Larumbe, R., & Vidart, D. (2016). *Agentes patógenos causantes de mastitis clínica en vacas lecheras en Uruguay años 2014 y 2015* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Lund, M.S., Jensen, J., & Peterson, P.H. (1999). Estimation of genetic and phenotypic parameters for clinical mastitis, somatic cell production deviance and protein yield in dairy cattle using Gibbs sampling. *Journal of Dairy Science*, 82, 1045-1051.
- Middleton, J.R. (2013). *Staphylococcus aureus Mastitis: have we learned anything in the last 50 years?* Recuperado de <http://www.nmconline.org/articles/staphaureus50.pdf>
- Miltenburg, J. D., De Lange, D., Crauwels, A. P. P., Bongers, J. H., Tielen, M. J. M., Schukken, Y. H., & Elbers, A. R. W. (1996). Incidence of clinical mastitis in a random sample of dairy herds in the southern Netherlands. *The Veterinary Record*, 139(9), 204–207.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2021). *Estadísticas del sector lácteo 2020*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2021-11/Estad%C3%ADsticas%20L%C3%A1cteas%202021.pdf>
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2023). *Anuario Estadístico Agropecuario 2023*. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2023/ANUARIO2023WEB.pdf>
- Moosavi, M., Mirzaei, A., Ghavami, M., & Tamadon, A. (2014). Relationship between season, lactation number and incidence of clinical mastitis in different stages of lactation in a Holstein dairy farm. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, 5(1), 13–19.
- Mungube, E.O., Tenhagen, B.A., & Kassa, T. (2004). Risk factors for dairy cow mastitis in the central highlands of Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production* 2004, 36(5), 463–472.
- National Mastitis Council. (1998). *Coagulase-negative Staphylococci infections. National*. Recuperado de <http://www.nmconline.org/coagneg.htm>
- National Mastitis Council. (1999). *Laboratory handbook on bovine mastitis*. Madison: National Mastitis Council.

- National Mastitis Council. (2011). *Preguntas sobre calidad de la leche*. Recuperado de <http://www.nmconline.org/transl/elLecheroContEnv.pdf>
- National Mastitis Council. (2019). *Una práctica mirada a la Mastitis Contagiosa*. Recuperado de <https://dairy-cattle.extension.org/una-mirada-practica-a-la-mastitis-contagiosa/>
- Neave, F. K., Dodd, F. H., Kingwill, R. G., & Westgarth, D. R. (1969). Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *Journal of Dairy Science*, 52(5), 696–707.
- Negussie, E., Strandén, I., & Mäntysaari, E (2006). Genetic analysis of clinical mastitis in different risk periods by linear and threshold models. *Suomen Maataloustieteellisen Seuran Tiedote*, 21, 1–8.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., Kelton, D.F., & Scholl, D.T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian Dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91, 1366–1372.
- Olde Riekerink, R.G.M., Barkema, H.W., & Stryhn, H. (2007). The effect of season on Somatic Cell Count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1704–1715.
- Oliver, S., & Sordillo, L. (1988). Udder health in the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 71(9), 2584–2606.
- Owens, W.E., Nickerson, S.C., & Ray, C.H. (1999). Efficacy of parenterally or intramammarily administered tilmicosin or ceftiofur against *Staphylococcus aureus* mastitis during lactation. *Journal of Dairy Science*, 82, 645–647.
- Owens, W.E., Oliver, S.P., Gillespie, B.E., Ray, C.H., & Nickerson, S.C. (1998). Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, 59(9), 1122–1124.
- Penev, T., Gergovska, Zh., Marinov, I., Kirov, V., Stankov, K., Mitev, Y., & Miteva, Ch. (2014). Effect of season, lactation period and number of lactation on mastitis incidence and milk yields in dairy cows. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 6 (2), 231–238.
- Pérez-Cabal, M.A., Yaici, S., & Alenda, R. (2008). Clinical mastitis in Spanish dairy cows: incidence and costs. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(4), 615–622.

- Petersson-Wolf, C.S., & Currin, J. (2012). *Streptococcus dysgalactiae: A Practical Summary for Controlling Mastitis*. Recuperado de https://pubs.ext.vt.edu/DASC/DASC-5P/DASC-5P_pdf.pdf
- Philpot, W.N. (1979). Control of mastitis by hygiene and therapy. *Journal of Dairy Science*, 62(1), 168–176.
- Philpot, W., & Nickerson, S. (1992). *Mastitis: contra ataque, una estrategia para combatir la mastitis* (pp. 15-20). Naperville: Ed. Surge International Babson Brothers Co.
- Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*, 62, 40–44.
- Radostitis, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., & Hinchcliff, K.W. (2002). *Medicina Veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino* (9ª ed., Vol.1., pp. 768-770). Madrid: Interamericana.
- Raymond, M.J., Wohrle, R.D., & Call, D.R. (2006). Assessment and promotion of judicious antibiotic use on dairy farms in Washington State. *Journal of Dairy Science*, 89(8), 3228–3240.
- Rainard, P., & Poutrel, B. (1988). Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 49(3), 327–329.
- Rainard, P., & Riollet, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37, 369–400.
- Reneau, J. (1986). Effective use of Dairy improvement somatic cell counts in mastitis control. *Journal of Dairy Science*, 69, 1708–1720.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., & Lagacé, J. (2001). Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2584–2589.
- Ruegg, P. L. (2010). Managing Mastitis in Dairy Herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(1), 25-38.
- Ruegg, P. (2012). New perspectives in udder health management. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28, 149-163.
- Saran, A., & Chaffer, M. (2000). Agentes causantes de Mastitis En *Mastitis y calidad de la leche* (pp. 11-26). Buenos Aires: Ed. Intermédica.

- Schalm, O.W., Carroll, E.J., & Jain, N.C. (1971). *Bovine mastitis*. Philadelphia: Ed. Lea & Febiger.
- Schepers, A.J., Lam, T.J.G.M., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B.M., & Hanekamp, W.J.A. (1997). Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *Journal of Dairy Science*, 80, 1833–1840.
- Schukken, H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., & Seyfert, H.M. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 270–289.
- Sears, P. M., Smith, B. S., English, P. B., Herer, P. S., & Gonzalez, R. N. (1990). Shedding Pattern of Staphylococcus aureus from Bovine Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2785–2789.
- Selsted, M.E., & Ouellette, A.J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology*, 6(6), 551-557.
- Smith, K. & Hogan, J. (1995). Epidemiology of mastitis. En *Proceedings of the 3rd International Mastitis Seminar* (session 6, pp. 3–10). Tel Aviv, Israel.
- Suriyasathaporn, W., Schukken, Y.H., Nielen, M., & Brand, A. (2000). Low Somatic Cell Count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1251–1254.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., & Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2610–2617.
- United States Department of Agriculture. (2008). Prevalence of Contagious Mastitis Pathogens on U.S. Dairy Operations, 2007. *Aphis Info Sheet*, (Oct). Recuperado de https://www.aphis.usda.gov/sites/default/files/dairy07_is_contmastitis.pdf
- Uruguay. (1995, Febrero 21). Decreto N° 90/995: Aprobación del Sistema Nacional de Calidad de la Leche. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/90-1995>
- Uruguay. (1999, Febrero 25). Decreto N° 57/999: Actualización del Sistema Nacional de Calidad de Leche. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/57-1999/1>
- Uruguay. (2013, Noviembre 06). Decreto N° 359/013: Determinación de un Sistema Nacional de Calidad de la Leche a los efectos de su posterior

procesamiento. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/359-2013>

- Vissio, C., Agüero, D. A., Raspanti, C. G., Odierno, L. M., & Larriestra, A. J. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), 7–14.
- Weber, P.S.D., Toelboell, T., Chang, L.C., Tirrell, J.D., Saama, P.M., Smith, G.W., & Burton, J.L. (2004). Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(5), 815-827
- Zadoks, R., & Fitzpatrick, J. (2009). Changing trends in mastitis. *Irish Veterinary Journal*, 62 (4).
- Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., & Schukken, Y.H. (2011). Molecular Epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to Humans. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16, 357-372.