



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO COMPARADO DEL
COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE
LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS
AISLADOS DE MAMITIS BOVINA EN GALICIA.**

M^a Luisa Barreal López

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
LUGO 2015



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO COMPARADO DEL
COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE
LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS
AISLADOS DE MAMITIS BOVINA EN GALICIA.**

Fdo. : M^a Luisa Barreal López

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
LUGO 2015

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR

D. Gonzalo Fernández Rodríguez

Profesor del Departamento de Patología Animal

D. Pablo Díez - Baños

Profesor del Departamento de Patología Animal

Como Directores de la Tesis de Doctoral titulada

«Estudio comparado del comportamiento epidemiológico de los principales microorganismos aislados de mamitis bovina en Galicia.»

Presentada por Dña. María Luisa Barreal López

Alumno del Programa de Doctoramiento 2167-08-1 Introducción a la Investigación En Medicina Y Sanidad Veterinaria

Autoriza la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctoramiento, y que como Director de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Fdo.: D. Gonzalo Fernández Rodríguez

Fdo.: D. Pablo Díez - Baños

PUBLICACIONES

Revistas internacionales:

Fernández, G., Barreal, M.L., Pombo, M.B., Ginzo-Villamayor, M.J., González-Manteiga, W., Prieto, A., Lago, N., González-Palencia, J. 2013. Comparison of the epidemiological behavior of mastitis pathogens by applying time-series analysis in results of milk samples submitted for microbiological examination. *Veterinary Research Communications*. 37, 259-267.

Revistas nacionales:

Barreal López, M.L., González-Palencia Lagunilla, J. 2010. O LIGAL, un modelo de integración de servizos para a explotación de vacún de leite. *Afriga*. 87, 44-54.

Barreal López, M.L., Díaz, J.M., Prieto, A., Pombo, M.B., Alonso, J.M., Fernández, G. 2014. Que microorganismos causantes de mamitis bovinas se asocian con mayor recuento de células somáticas. *Afriga*. 110, 66-68.

Fernández, G., Lago, N., Barreal, M.L., Pombo, M.B., González-Palencia, J. 2012. Mastite bovina. Antibiograma e resistencias. *Albéitar - Portugal*. 5, 18-20.

Fernández, G., Lago, N., Barreal, M.L., Pombo, M.B., Prieto, A., González-Palencia, J. 2012. As mamites bovinas: unha patoloxía en constante evolución. *Afriga*. 98, 14-15.

Fernández, G., Barreal, M.L., Pombo, M.B., Ginzo-Villamayor, M.J., González-Manteiga, W., Prieto, A., Díaz, J.M., Lago, N., González-Palencia, J. 2013. Evolución da etiología das mamitis bovinas en Galicia. *Afriga*. 104, 46-52.

Congresos:

Comparación del recuento de células somáticas entre microorganismos aislados de mamitis subclínicas en bovino. Barreal, M.L., Díaz, J.M.; Prieto, A., Pombo, M.B., Fernández, G. Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. Oviedo, España.

Categories of mammary pathogens in dairy cattle according to the somatic cell count in milk samples submitted to laboratory diagnosis. Barreal, M.L., Díaz, J.M., Prieto, A., Pombo, M.B., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G. XXI International Congress of the Mediterranean Federation for Health and production of ruminants. Cartagena, España.

Comparison of somatic cell counts induced by different microorganisms isolated from subclinical mastitis in cattle, 2014. Barreal, M.L., Díaz, J.M., Prieto, A., Pombo, M.B., Fernández, G. XIX Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. Oviedo, España.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de la presente tesis doctoral, y de una manera especial:

Al codirector de esta tesis, Dr. Gonzalo Fernández Rodríguez por sus conocimientos, por su infatigable ayuda, esfuerzo, dedicación y paciencia durante todos estos años, en los que además me ha demostrado que es un gran profesional, con una amplia experiencia y responsabilidad y sobre todo una excelente persona llena de generosidad. Gracias también, por transmitirme tanta ilusión y brindarme su amistad. Sin su apoyo no hubiera sido posible todo esto.

Al codirector, Dr. Pablo Díez-Baños por su amistad, por la paciencia demostrada durante todo el tiempo y por sus grandes aportaciones en la supervisión de todo este trabajo, así como por su tiempo y buena disposición en todo momento. Y en general, a todo el Departamento de Patología Animal por toda su colaboración, así como por la confianza en mí depositada.

A Wenceslao González, María Guinzo, Alberto Prieto y J. Manuel Díaz por su ayuda en alguna parte importante del control estadístico de esta tesis y que fue de gran valor para la misma.

A Roberto Lorenzana por sus sugerencias, apoyo y motivación, y en especial por su amistad y confianza siendo un excelente gerente y compañero que en poco tiempo ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración.

A Marta Rodríguez, Miguel Valdivieso y M^a José Criado porque, además de ser muy buenos compañeros y responsables en su trabajo, han colaborado, sobre todo en los últimos momentos y de mayor tensión de esta tesis, de una manera incondicional y animándome en todo momento. Gracias por su ayuda y tiempo dedicado así como por los ratos compartidos a lo largo de estos 25 años en el Ligal.

A Belén Pombo por su experiencia como Veterinaria y por ser parte activa en la realización de este trabajo, junto con los veterinarios de campo y demás personas que enviaron muestras de mamitis al Ligal.

A los Técnicos del Laboratorio de Microbiología por su buen hacer en tantos y tantos ensayos de identificación de patógenos como llevan realizando a lo largo de todos estos años.

A Javier González-Palencia por su apoyo personal y humano, así como por haber sido él quien me ha empujado y animado a que realizara esta larga tarea, de no ser por él y por Gonzalo, esto no hubiera sido posible. Así como al Ligal por haberme permitido disponer de toda la información necesaria para ello.

A todos mis compañeros de trabajo y a todos mis amigos por su compañerismo y afecto.

A mi familia, sobre todo a Pepe, Diego y Cristina, un agradecimiento muy especial por su apoyo siempre incondicional, por la comprensión, paciencia y ánimo recibido.

A todos, muchas gracias.



LISTADO GENERAL DE ABREVIATURAS

ACFS	Funciones de Autocorrelación
ARIMA	Modelos Autorregresivos Integrados de Medias Móviles
CEP	Control Estadístico de Proceso
CMT	California Mastitis Test
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
IDF	International Dairy Federation
IIM	Infección Intramamaria
LS	Linear Score
PACFS	Funciones de Autocorrelación Parcial
PAM	Partitioning Around Medoids
RCS	Recuento de Células Somáticas

LISTADO DE ABREVIATURAS MICROORGANISMOS

<i>A. viridans</i>	<i>Aerococcus viridans</i>
<i>C. freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>C. koseri</i>	<i>Citrobacter koseri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. garviae</i>	<i>Lactococcus garviae</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. raffinolactis</i>	<i>Lactococcus raffinolactis</i>

<i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>S. liquefaciens</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Staph</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Strept.</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>T. pyogenes</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
ECN	Estafilococos Coagulasa Negativos
SLE	Estreptococo, Lactococo, Enterococo



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de aislamientos sobre el total de cultivos positivos de mamitis subclínicas en España (Marco y col., 1998).....	13
Tabla 2. Número y porcentaje de muestras incluidas en el estudio según su resultado de cultivo microbiológico y de recuento de células somáticas (Galicia 2005-2011)...	77
Tabla 3. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en muestras de leche de cuarterón (Galicia 2005-2011).....	86
Tabla 4. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en cultivos positivos de muestras de leche clínicas y subclínicas (Galicia 2005-2011).....	90
Tabla 5. Porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de muestras, para cada grupo microbiano (Galicia 2005-2011).....	95
Tabla 6. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada microorganismo; (Galicia 2005-2011).	96
Tabla 7. Agrupación de microorganismos sin diferencias en el porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de muestras para cada microorganismo; Galicia 2005-2011.	98
Tabla 8. Porcentaje de aislamiento de grupos de microorganismos en muestras de leche con RCS < 100.000 cel/ml (Galicia 2005-2011).....	102
Tabla 9. Porcentaje de aislamiento de microorganismos en muestras de leche con RCS < 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	103
Tabla 10. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada grupo de microorganismos; Galicia 2005-2011.	104
Tabla 11. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada microorganismo (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	105
Tabla 12. Agrupación de microorganismos sin diferencias significativas en el porcentaje de aislamiento en muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total de muestras (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011.....	107
Tabla 13. Recuento de células somáticas (RCS x 10^3) para cada grupo de microorganismo, en muestras de leche con RCS ≥ 100.000 cel/ml; Galicia 2005-2011.	109
Tabla 14. Recuento de células somáticas (RCS x 10^3) según el microorganismo aislado, en muestras de leche con RCS ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	111
Tabla 15. Linear Score para cada grupo de microorganismos, en muestras de leche con RCS ≥ 100.000 cel/ml; Galicia 2005-2011.....	115

Tabla 16. Linear Score de microorganismos aislados en muestras de leche con RCS \geq 100.000 cel/ml (aislamientos \geq 0,1%); Galicia 2005-2011.....	117
Tabla 17. Modelos de tendencia ARIMA y porcentajes de aislamientos sobre el total de muestras de leche de cuarterón. Meses con mayor y menor frecuencia de aislamiento de patógenos con tendencia estacional (aislamientos \geq 0,3%); Galicia 2005-2011.....	125

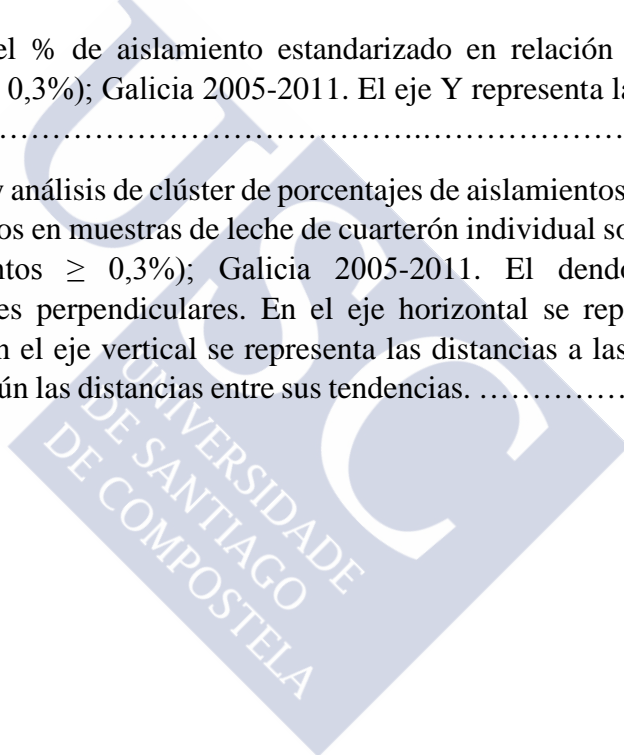


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que influyen en la mamitis bovina.....	9
Figura 2. Comportamiento epidemiológico de los principales patógenos en mamitis bovina.	18
Figura 3. Vías de trasmisión oro-fecal de <i>Klebsiella</i> spp. en rebaños de vacuno de leche. (1) Transmisión directa, (2) transmisión indirecta mediante agua o alimentos contaminados sin implicación del ambiente, (3) transmisión indirecta por medio de alimentos contaminados en el ambiente. (Zadoks y col., 2011).	52
Figura 4. Aislamientos en medio Agar-sangre de <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Trueperella pyogenes</i>	64
Figura 5. Equipo de incubación y lectura del sistema VITEK 2.	65
Figura 6. Equipo FOSSOMATIC-FC empleado para el recuento de células somáticas.	66
Figura 7. Esquema funcionamiento de equipo Fossomatic de recuento de células somáticas.	67
Figura 8. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).	86
Figura 9. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estafilococos en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).....	87
Figura 10. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estreptococos en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).	87
Figura 11. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de enterobacterias en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).	88
Figura 12. Frecuencia de aislamientos de microorganismos en cultivos positivos de muestras de leche (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011.....	88
Figura 13. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011).....	91
Figura 14. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estafilococos en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011).	91
Figura 15. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estreptococos en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011)	91
Figura 16. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de enterobacterias en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011).....	91

Figura 17. Frecuencia de aislamiento de microorganismos en muestras de mamitis subclínicas (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011.....	92
Figura 18. Frecuencia de aislamiento de microorganismos en muestras de mamitis clínicas (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011.....	92
Figura 19. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada grupo de microorganismo (Galicia 2005-2011).	95
Figura 20. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada microorganismo (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011.....	96
Figura 21. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada microorganismo (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.	97
Figura 22. Dendograma de los patógenos mamarios aislados según el % de mamitis clínicas sobre el total de muestras (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	99
Figura 23. Frecuencias de aislamiento de grupos de microorganismos en muestras de leche con RCS < 100.000 cel/ml (Galicia 2005-2011).....	102
Figura 24. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada grupo de microorganismos; Galicia 2005-2011.	104
Figura 25. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada microorganismo (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	106
Figura 26. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas (RCS $\times 10^3$) de cada grupo de microorganismos (muestras con RCS ≥ 100.000 cel/ml); Galicia 2005-2011.	110
Figura 27. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas (RCS $\times 10^3$) de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	112
Figura 28. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas (RCS $\times 10^3$) de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	113
Figura 29. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas (RCS $\times 10^3$) de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011	114
Figura 30. Distribución de frecuencias de Linear Score en cada grupo de microorganismos en muestras con RCS ≥ 100.000 cel/ml; Galicia 2005-2011.	116
Figura 31. Distribución de frecuencias de Linear Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011	118

Figura 32. Distribución de frecuencias de Linear Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.....	119
Figura 33. Distribución de frecuencias de Linear Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011	120
Figura 34. Mediana de Lineal Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.	121
Figura 35. a) Dendograma y análisis de las medianas de LS. b) Diagrama de cajas de la distribución de los LS en los grupos de microorganismos formados a partir del análisis clúster.	122
Figura 36. Tendencia del % de aislamiento estandarizado en relación al total de muestras (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011. El eje Y representa la tendencia de las series temporales.	126
Figura 37. Dendograma y análisis de clúster de porcentajes de aislamientos mensuales de los patógenos mamarios en muestras de leche de cuarterón individual sobre el total de muestras (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011. El dendograma es representado por dos ejes perpendiculares. En el eje horizontal se representa los elementos a clasificar, en el eje vertical se representa las distancias a las cuales los clúster son asociados según las distancias entre sus tendencias.	127



ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
II. REVISIÓN	9
2.1. Definición, clasificación e importancia económica de las mastitis bovinas	9
2.2. Etiología de las mastitis bovinas. Clasificación de patógenos mamarios. Influencia de los programas de control sobre los diferentes patógenos	12
2.3. Aspectos epidemiológicos y patológicos relacionados con los principales patógenos mamarios	20
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.3.2. Estafilococos coagulasa negativos.....	24
2.3.3. <i>Streptococcus agalactiae</i>	32
2.3.4. <i>Streptococcus uberis</i>	34
2.3.5. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	45
2.3.6. Otros estreptococos, aerococos, enterococos y lactococos.	46
2.3.7. <i>Escherichia coli</i>	47
2.3.8. <i>Klebsiella spp.</i>	50
2.3.9. Otros microorganismos Gram negativos.....	52
2.3.10. <i>Corynebacterium spp.</i>	54
2.3.11. <i>Trueperella pyogenes</i>	56
2.3.12. <i>Prototheca spp.</i>	57
2.3.13. Levaduras.....	58
2.3.14. Otros microorganismos.....	59
III. MATERIALES Y MÉTODOS	63
3.1. Área de estudio y toma de muestras	63
3.2. Análisis microbiológico	64
3.3. Recuento de células somáticas	65
3.4. Análisis estadístico	69
3.4.1. Análisis de series temporales de frecuencia de aislamiento.	70

3.4.2.	Análisis de RCS.	72
3.4.3.	Otros análisis estadísticos.	73
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1.	Muestras incluidas en el estudio y metodología utilizada.	77
4.2.	Resultados de los cultivos microbiológicos.	81
4.2.1.	Aislamientos de los patógenos en el total de muestras.	81
4.2.2.	Aislamiento de patógenos en muestras de mamitis clínica o subclínica.....	89
4.2.3.	Porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de muestras en que se aisló cada microorganismo	93
4.3.	Resultados de recuento de células somáticas para cada patógeno.	100
4.3.1.	Porcentaje de aislamiento de los distintos patógenos en muestras con RCS inferior a 100.000 cel/ml.	101
4.3.1.1.	<i>Porcentaje de muestras con RCS menor de 100.000 cel/ml sobre el total de muestras en las que fueron aislados cada patógeno ml</i>	104
4.3.2.	Resultados microbiológicos en muestras con RCS igual o superior a 100.000 cel/ml.....	107
4.3.2.1.	<i>Recuento de células somáticas según los microorganismos aislados de muestras con $RCS \geq 100.000$ cel/ml.</i>	108
4.3.2.2.	<i>Análisis de los Lineal Score según microorganismo aislado en muestras con $RCS \geq 100.000$ cel/ml.</i>	115
4.4.	Análisis de las series temporales de las frecuencias de aislamiento mensuales.	124
4.5.	Comportamiento epidemiológico y patológico de los diferentes microorganismos.	134
4.5.1.	<i>Staphylococcus aureus.</i>	135
4.5.2.	ECN.....	138
4.5.3.	<i>Streptococcus galactiae.</i>	146
4.5.4.	<i>Streptococcus uberis.</i>	148
4.5.5.	<i>Streptococcus dysgalactiae.</i>	151
4.5.6.	Otros estreptococos, enterococos y lactococos.....	152
4.5.7.	Enterobacterias.....	154

4.5.8. Otros microorganismos Gram negativos con baja proporción de aislamiento.....	155
4.5.9. <i>Corynebacterium spp.</i>	155
4.5.10. <i>Trueperella pyogenes</i>	156
4.5.11. Otros microorganismos Gram positivos con baja proporción de aislamiento	157
4.5.12. <i>Prototheca spp.</i>	157
4.5.13. Levaduras.....	158
V. CONCLUSIONES	163
VI. RESUMEN	169
VII. BIBLIOGRAFÍA	177





I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



Es bien sabido que un buen conocimiento de la epidemiología de los distintos patógenos mamarios es de gran utilidad para mejorar la producción de leche ya que posibilita la prevención de las infecciones mediante la adopción de medidas de control específicas (Piessens et al., 2011).

Este conocimiento se ha basado principalmente en la realización de estudios sobre evolución de las infecciones en relación a diferentes factores de riesgo o de control en un número limitado de rebaños. Sin embargo, las limitaciones metodológicas de este tipo de estudios han llevado a que son mucho más frecuentes los resultados referidos a ciertos patógenos con alta prevalencia, frente a la casi inexistente la información sobre el comportamiento epidemiológico o patológico de muchos otros microorganismos implicados en las infecciones intramamarias (IIM) que, aunque tienen escasa prevalencia individual, en su conjunto representan una importante proporción respecto de los patógenos implicados en las mastitis bovinas.

Otra fuente de información son los resultados obtenidos en los laboratorios de diagnóstico de rutina de mastitis bovinas. Tienen la ventaja de que suelen realizarse un número elevado de muestras en zonas con poblaciones importantes de vacuno de leche donde el coste lo asumen los ganaderos, y cuyos resultados sirven de base para el tratamiento, control y prevención de la enfermedad. Sin embargo, conllevan varias limitaciones metodológicas. La primera es que, dado el coste económico que implica la identificación de microorganismos a nivel de especie, muchos patógenos solo se identifican hasta el nivel de género o grupo, como por ejemplo: estreptococos ambientales, estafilococos coagulasa negativos (ECN), enterobacterias, levaduras, etc. La segunda desventaja es que los resultados obtenidos no equivalen exactamente a la prevalencia ya que las muestras no son representativas de la población. Sin embargo, sí serían de utilidad cuando se establecen comparaciones entre los microorganismos menos estudiados y los de otros patógenos cuyo comportamiento epidemiológico y patológico es más conocido. No obstante, esta información puede ser relevante, puesto que es muy difícil de obtener a partir de otro tipo de estudios.

Además, hasta la fecha los estudios epidemiológicos basados en el análisis de los resultados de las muestras remitidas para el diagnóstico de mastitis han utilizado métodos estadísticos que asumen que los datos observados son realizaciones (valor que es asignado a una variable aleatoria) de una variable aleatoria independiente (Makovec y Ruegg, 2003). Sin embargo,

cualquier variable medida en periodos de tiempo, como sucede con la frecuencia de aislamientos observados de un microorganismo, realmente no es independiente ya que puede estar influida por las observaciones previas (autocorrelación) y, por tanto, la aplicación de un tipo de análisis como por ejemplo la regresión podrían no ser acertado ya que considera las observaciones como independientes (Box and Jenkins, 1976). Desde los años setenta, en campos como la industria, la economía y la epidemiología, se han utilizado con frecuencia métodos de análisis temporales, en particular los modelos autoregresivos integrados de media móvil (ARIMA), que ofrecen la ventaja de evitar la dependencia estocástica de los datos consecutivos (Zeger et al., 2006).

En este sentido y siguiendo la importante labor realizada por el LIGAL en relación con el diagnóstico de las mamitis bovina en Galicia, donde se han procesado 240.232 muestras en el período de junio de 2005 a septiembre de 2011, en las que mayoritariamente se hizo la identificación específica de los patógenos aislados. Asimismo, tomando como base este material, se llevó a cabo este estudio en el que nos planteamos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Estudiar la etiología de las mamitis bovinas en Galicia, así como sus variaciones a lo largo del período de junio de 2005 a septiembre de 2011.
2. Valorar la utilización en el análisis de resultados de laboratorios de diagnóstico con el fin de investigar la capacidad patógena y el comportamiento epidemiológico de los microorganismos causantes de mamitis bovina de:
 - a. la utilización la metodología ARIMA y la aplicación de métodos estadísticas multivariantes, como el análisis de clusters, en el estudio de las variaciones de la frecuencia de aislamiento en el tiempo.
 - b. la comparación relativa entre patógenos del porcentaje de mamitis clínicas y del recuento de células somáticas.
3. Estudiar de forma comparada los principales patógenos aislados en relación con:
 - a. La proporción de aislamiento de los diferentes patógenos en muestras de leche con recuentos de células somáticas inferiores a 100.000 cel/ml.
 - b. El comportamiento epidemiológico, tomando como base las tendencias estacionales de aislamiento y las similitudes entre las tendencias de las series de frecuencia mensual de aislamiento.

- c. La gravedad de las mamicis a las que se asocian, teniendo en cuenta el porcentaje de mamicis clínicas y el recuento de células somáticas en casos de mamicis subclínicas.







II. REVISIÓN



2.1. Definición, clasificación e importancia económica de las mamitis bovinas.

La Federación Internacional de lechería (International Dairy Federation; IDF) **definió la mamitis** como una reacción inflamatoria de la glándula mamaria (IDF, 1987a). Esta inflamación produce cambios notables en el tejido glandular que a su vez determinan un incremento en la permeabilidad de este tejido inflamado, lo que se traduce en variaciones en la composición bioquímica de la leche. Cuanto mayor sea la severidad de la inflamación más se asemejará la composición de la secreción láctea a la del suero sanguíneo (IDF, 1987a).

Dada la gran importancia que representa la etiología microbiológica en la mamitis bovina, la propia IDF la define como una enfermedad infecciosa causada por microorganismos con diferentes características patológicas y que afecta a diversos hospedadores cuya resistencia a la infección varía notablemente (IDF, 1987b). Considera la exposición al microorganismo como un requisito para que se desarrolle la infección y la mamitis como el resultado del desequilibrio entre los mecanismos de defensa naturales del pezón y de la glándula mamaria con la concentración y capacidad patógena de los microorganismos que se han introducido por el canal del pezón. Se sabe que hay factores externos o ambientales tales como la mala higiene, deficiencias en el funcionamiento de la máquina de ordeño, el tipo de estabulación, el clima, la alimentación y el manejo, que pueden romper este equilibrio y por tanto que predisponen o contribuyen a la aparición de mamitis bovina. Se puede concluir, por consiguiente, que la mamitis es una enfermedad infecciosa multifactorial, ya que el establecimiento de la infección está influido por características del agente infeccioso, del ambiente y del hospedador (Poutrel, 1985) como se esquematiza en la Fig. 1.

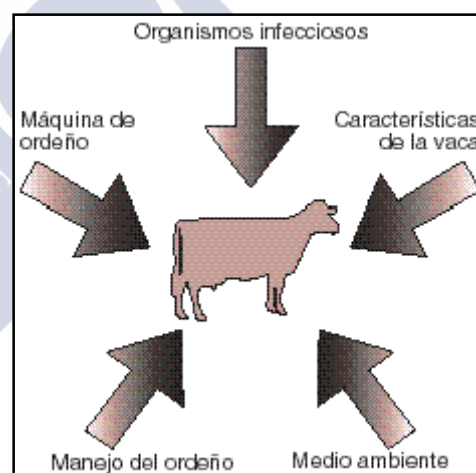


Figura 1. Factores que influyen en la mamitis bovina.

La IDF define la ubre normal, en contraposición a la definición de mamitis, como aquella que no muestra alteraciones patológicas y en cuya leche, que presenta propiedades organolépticas normales, no se aíslan microorganismos patógenos ni presenta un recuento de células somáticas (RCS) elevado (IDF, 1987a). Por el contrario, se ha indicado que en la definición de las mamitis bovinas se debe considerar la existencia de síntomas y lesiones, la

presencia de microorganismos patógenos y de alteraciones bioquímicas en la composición de la leche. Estos hechos se deben tener presentes a la hora de clasificar los diferentes tipos de mamitis.

No obstante, se puede recurrir a distintos criterios para la correcta **clasificación de las mamitis bovinas**. El más común, y de mayor utilidad práctica, es el que se basa en la intensidad de la inflamación (IDF, 1987a) ya que las mamitis bovinas pueden dar lugar a diversas alteraciones patológicas que pueden ser localizadas o generalizadas (Giesecke, 1974):

- Se considera que hay mamitis clínica cuando existe alguna alteración macroscópica en la leche o signos de inflamación en la ubre. Este tipo de mamitis puede ser detectada mediante la simple exploración clínica.
- En las mamitis subclínicas, a pesar de que no se observan cambios macroscópicos en la secreción láctea ni signos clínicos en la ubre, sí hay un aumento del RCS acompañado de alteraciones en las propiedades bioquímicas de la leche que son detectables por pruebas de laboratorio o de campo como el California Mastitis Test (CMT).

Las células somáticas son, en gran medida, células del sistema inmunitario (80% en el caso de cuarterones no infectados y el 99% en el caso cuarterones con infección) y en mucha menor proporción células de descamación (Sordillo y col., 1997). Estas células forman parte de los mecanismos de defensa natural e incluyen linfocitos, macrófagos polimorfonucleares neutrófilos y algunas células epiteliales (Pillai y col., 2001). El aumento de células somáticas es, por tanto, un reflejo de la respuesta inflamatoria a una IIM. Por esta razón la IDF estableció el RCS como el mejor indicador de la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria (IDF, 1987a). Se ha observado que el RCS de cuarterones individuales es aproximadamente de 70.000 cel/ml, sin embargo este valor varía mucho con la edad del animal, producción y fase de lactación (Schepers y col., 1997). Para clasificar los cuarterones infectados o no infectados se han propuesto diferentes puntos de corte, así utilizando el valor de 200-250.000 cel/ml se ha calculado una sensibilidad y especificidad de aproximadamente un 75% y 90%, respectivamente (Schepers y col., 1997).

A su vez, dentro de las mamitis clínicas existen gran variedad de clasificaciones, de las destacamos las siguientes (Faull y Hughes, 1983; IDF, 1978a):

- Mamitis sobreaguda o hiperaguda: Son mamitis de curso rápido, que se desarrollan en pocas horas. En ellas, se observan alteraciones importantes en la secreción láctea y signos evidentes de inflamación del cuarterón afectado. Asimismo, el animal presenta síntomas generales como fiebre, cojera, anorexia, apatía, etc.
- Mamitis aguda: Su curso se desarrolla en pocos días. El cuarterón presenta signos de inflamación y la secreción láctea está alterada macroscópicamente, pero el animal no presenta síntomas generales.
- Mamitis subaguda: La evolución abarca, por lo menos, varios días. No aparecen alteraciones en el cuarterón ni el animal presenta síntomas generales. Se observan, sin embargo, cambios visibles en la secreción láctea, sobre todo en el inicio del ordeño.
- Mamitis crónica: El curso es mucho más lento, llegando a prolongarse semanas o meses. No se observan signos de inflamación, pero si puede existir induración, atrofia o disfunción del cuarterón. En este tipo de mamitis generalmente existe una progresiva sustitución de tejido glandular por tejido conectivo. El animal no presenta síntomas generales pero en la secreción láctea pueden observarse alteraciones, sobre todo en los primeros chorros.

La mamitis se considera la enfermedad **económicamente** más importante en el vacuno de leche, representando el 38% de las pérdidas de producción producidas por enfermedades (Kossaibati y Esslemont, 1997). Las pérdidas asociadas con las mamitis clínicas incluyen los costes referidos a tratamientos, asistencia veterinaria, sacrificio y muerte prematura de animales, disminución de la producción, menor valor de los animales y eliminación de leche alterada o con residuos de antibióticos. Además se ha asociado a las mamitis más graves, como las colibacilares, con problemas reproductivos tales como ciclos astrales anormales, niveles séricos bajos de progesterona y abortos (Cullor, 1991). Se han estimado los costes asociados a un caso de mamitis clínicas en unos 210 euros (Kossaibati, 2000). En el caso de Galicia, asumiendo una incidencia media de 40casos/100 vacas y un censo integrado por 350.000 reproductoras el coste debido a las mamitis clínicas superaría los 29 millones de euros anuales. En Galicia se ha atribuido a la mamitis como la causa del 15.6% de las bajas de los animales de cualquier edad, oscilando desde un 2,4% en animales no paridos hasta el 9,7% en novillas de primer parto (Africor Lugo, 2011).

Se considera que las mamitis subclínicas constituyen la causa principal de pérdidas económicas en los rebaños lecheros, como consecuencia de que impiden que se alcance el potencial de producción de los animales, pues al mismo tiempo que disminuye la cantidad y calidad de la leche, obligan a hacer frente a penalizaciones en el pago de calidad (Huijps y col., 2008). El cálculo de las pérdidas debidas a mamitis subclínicas es más complejo que en caso de las clínicas. Philpott (1984) demostró una relación inversamente proporcional entre el RCS superior a 200.000 cel/ml y la producción de leche, disminuyendo un 2,5% de producción por cada aumento en 100.000 cel/ml. Además se ha observado que tanto las mamitis clínicas como subclínicas tiene un efecto adverso sobre la fertilidad (Schrick y col., 2001).

Como el RCS se ha asociado a la calidad de la leche (dado que la leche debe proceder de animales sanos), este parámetro, según la normativa vigente, se convierte en la referencia para considerar si la leche puede ser comercializada para el consumo humano. En las mamitis se aprecia un incremento de la concentración de elementos sanguíneos en la leche, al tiempo que disminuyen las concentraciones de componentes específicos de origen mamario. Así, leches con altas tasas de RCS presentan menor contenido en grasa, lactosa y extracto seco magro, mayores niveles de sodio y cloruros y una variación de la composición proteínica (aumento de inmunoglobulinas y seroalbúmina y disminución de caseína), en comparación con aquellas que presentan bajos RCS (Sandholm y col., 1995). Estas variaciones en la composición bioquímica de la leche de animales con mamitis se traducen en importantes consecuencias en la industrialización del producto como menor rendimiento quesero y disminución de la estabilidad al tratamiento térmico. Por último, es de destacar la importancia de las medidas de control frente a la enfermedad para evitar el uso de tratamientos antibióticos, dada su repercusión sobre la salud pública tanto en relación a la presencia de residuos en la leche como con la aparición de resistencias antimicrobianas de patógenos que también infectan al hombre.

2.2. Etiología de las mamitis bovinas. Clasificación de patógenos mamarios. Influencia de los programas de control sobre los diferentes patógenos.

Más de 130 especies diferentes de microorganismos pueden causar mamitis bovina (Watts, 1988b). Sin embargo, las infecciones intramamarias (IIM) son, en su mayoría, causadas por un número más reducido de patógenos. En general, los múltiples trabajos realizados en diferentes partes del mundo coinciden en señalar que los grupos etiológicos aislados con más frecuencia en las mamitis bovinas son estafilococos, estreptococos, corinebacterias y

coliformes (Marco y col., 1998; Makovec y Ruegg, 2003; Pitkälä y col., 2004; Bradley y col., 2007; Ferguson y col., 2007; Piepers y col., 2007; Sampimon y col., 2009b; Nam y col., 2010; Kalmus y col., 2011). Con mucha menor frecuencia, y con marcadas diferencias entre los estudios, se identificaron otros patógenos como *Bacillus* spp., *Nocardia* spp., *Lactotoccus* spp., *Prototheca* spp., *Pseudomonas* spp., *Trueperella pyogenes*, enterococos, micoplasmas, levaduras y hongos.

Tabla 1. Porcentaje de aislamientos sobre el total de cultivos positivos de mamitis subclínicas en España (Marco y col., 1998)

Microorganismo	% aislamiento
Total estafilococos	35,7
<i>Staph. aureus</i>	22,7
Estafilococos coagulasa negativos	13
Total estreptococos	33,7
<i>Strep. agalactiae</i>	7,5
<i>Strep. uberis</i>	11,2
<i>Strep. dysgalactiae</i>	5,4
Otros estreptococos	9,6
Enterococos	4,7
Gram negativos	5,6
<i>Corynebacterium</i> spp.	15,2
Levaduras y hongos	0,5
<i>T. pyogenes</i>	0,9
Otros	3,7

En la tabla 1 se muestran los resultados del estudio más extenso realizado sobre la etiología de las mamitis bovinas en España, basado en los resultados de muestras remitidas a laboratorios de diagnóstico y que incluye información de Galicia, Asturias, Cantabria, Andalucía y País Vasco (Marco y col., 1998).

Una clasificación clásicamente utilizada, en relación a los agentes etiológicos de mamitis, se basa en diferenciar entre **patógenos “mayores”** y **“menores”**. La mayoría de los autores, consideran **patógenos mamarios mayores** a *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* *Strep. uberis*, *Staph. aureus*, y *E. coli* (Zadoks y Fitzpatrick, 2009). El término “mayor” refleja un considerable impacto sobre la salud de la vaca (asociado a mamitis clínicas o mamitis subclínicas con altos RCS), la calidad de la leche y la producción. Por el contrario, otros

patógenos como los ECN y *Corynebacterium* spp. se consideraron **patógenos menores**, dado que, aunque se aíslan frecuentemente en muestras de leche, tienen una menor repercusión en la salud del animal, la calidad de la leche y la producción. Otros microorganismos no se han podido clasificar con claridad siguiendo este criterio puesto que existe poca información dada su baja frecuencia de aislamiento. Esta clasificación ha servido para establecer las prioridades en relación a la adopción de medidas de control y prevención. Sin embargo, como consecuencia de los programas de control, que han hecho disminuir el RCS de tanque y la prevalencia de los patógenos mayores, se ha puesto en relieve la importancia de otros patógenos, particularmente de los ECN (Zadoks y Fitzpatrick, 2009). En el año 2007, se celebró el primer simposio de ECN en las mastitis bovinas, como fiel reflejo del especial reconocimiento de la importancia potencial de este grupo de patógenos (De Vliegher y col., 2009).

Hay principalmente dos aspectos que se han tenido en cuenta en la clasificación de patógenos mayores y menores, que son su mayor o menor predominancia en las mastitis clínicas y el nivel de RCS observado en las mastitis subclínica. Así los RCS (considerando la media geométrica) de cuarterón calculados en base a un meta-análisis (Djabri y col., 2002) de las IIM por *Staph. aureus* (357.000 cel/ml) fueron superiores a los observados en el caso de los ECN (138.000 cel/ml) y *Corynebacterium* spp. (105.000 cel/ml) pero mucho más bajos que los hallados en las infecciones causadas por *Strep. uberis* (1.024.000 cel/ml), *Strep. agalactiae* (857.000 cel/ml), *Strep. dysgalactiae*, (547.000 cel/ml) y coliformes (1.151.000 cel/ml). Otros patógenos menos frecuentes no se incluyen en estos estudios. Wilson y col. (1997) partiendo de muestras de la mezcla de los cuatro cuarterones de 108.312 animales y teniendo en cuenta únicamente los patógenos que fueron aislados en al menos 10 animales, observaron que el RCS oscilaba de mayor a menor valor, en función del siguiente orden de patógenos aislados: *Pasteurella* spp., *Strep. canis*, *Serratia* spp., *Mycoplasma* spp., *Klebsiella* spp., *Strep. agalactiae*, *Pseudomonas* spp., *Prototheca* spp., *T. pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Staph. aureus*, *Escherichia coli*, otros Gram negativos, Levaduras, *C. bovis*, ECN, *Corynebacterium* spp y mohos. Sin embargo, en muchos de estos patógenos el número de infecciones estudiadas no superaba las 50. La información sobre otros patógenos, aislados con menor frecuencia, es muy escasa o se limita a muy pocos casos. En las IIM por *Nocardia* spp. se ha descrito medias aritméticas de RCS de muestras de cuarterón de 863.057 cel/ml (Pisoni y col., 2008).

En cuanto a su frecuencia en relación con casos de mastitis clínica, Kalmus y col. (2011) en un estudio de 8204 muestras remitidas al laboratorio para su diagnóstico, comprobaron que algunas especies se aislaban en mayor porcentaje en casos de mastitis subclínicas (*Staph. aureus*, ECN y *Corynebacterium* spp.), sin embargo, en otras (*Strep. dysgalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *T. pyogenes*) esa cifra era mayor en mastitis clínicas; esas diferencias no fueron tan evidentes cuando se trataba de *Strep. agalactiae*, *Strep. uberis*, *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp. y levaduras. En Polonia (Malinowski y col., 2006) sobre muestras de cuarterón con mastitis clínicas remitidas al laboratorio para diagnóstico, encontraron diferencias en la frecuencia de aislamiento de los diferentes patógenos en función de los intervalos de RCS presentes: si las cifras superaban los 10 millones cel/ml eran más frecuentes en las infecciones por *T. pyogenes* (95,5%), *Strep. agalactiae* (57,6%) y bacterias Gram negativas (46,5%); valores medios entre 5-10 millones cel/ml correspondieron a infecciones por *Prototheca* spp. y Levaduras (60,2%), *Streptococcus* spp. (55,1%) y *Staph. aureus* (76,2%); y finalmente, si los niveles eran inferiores a 5 millones cel/m, los aislamientos eran de ECN (84,2%), bacilos Gram positivos (72,4%) y *Corynebacterium* spp. (83,2%). Es de destacar que en este estudio se asumió que las muestras con alteraciones de la leche presentaban un RCS mayor de 10 millones cel/ml, que se observaron, aunque en baja proporción, RCS relativamente bajos en muestras procedentes de animales que presentaban signos clínicos y también que fueron aislados tanto ECN como *Corynebacterium* spp en muestras procedentes de mastitis clínicas y con altos RCS.

De forma tradicional, según la fuente principal de infección y el modo de transmisión, se **han clasificado a los microorganismos que causan las mastitis como patógenas contagiosas o ambientales** (Smith y Hogan, 1995).

Los patógenos contagiosos, que incluyen a *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp. y *Mycoplasma* spp., tienen como principal fuente de procedencia las glándulas mamarias infectadas, en tanto que el contagio se produce con más frecuencia durante el ordeño (Smith y Hogan, 1995). Como fuentes de infección adicionales pueden actuar las lesiones de los pezones infectados, especialmente si no se practica baño de pezones postordeño (IDF, 1987). Asimismo, algunos de estos microorganismos se caracterizan por su capacidad de colonizar y multiplicarse en la piel y en el canal del pezón (Smith y Hogan, 1995). Estas propiedades contribuyen a su contagiosidad natural y al hecho de que la prevalencia de las IIM pueda ser muy alta en las granjas donde no se apliquen medidas de control efectivas.

Aunque puedan existir fuentes extramamarias, en general, se consideran menos importantes. Debido a esto la transmisión de cuarterón a cuarterón tiene lugar especialmente durante el período de ordeño, como consecuencia de mala higiene o el funcionamiento defectuoso de la máquina de ordeño.

Los patógenos ambientales, que incluyen principalmente a los coliformes y *Streptococcus uberis*, tienen como fuente principal de infección el ambiente en el que viven las vacas y en esos casos la infección se produce en el periodo entre ordeños por contacto con material contaminado y, por tanto, está asociada a una mala higiene ambiental o deficiente manejo (Dodd y Neave, 1970; Smith y Hogan, 1995). Las fuentes de infección incluyen aguas estancadas, comederos contaminados, materiales usados como cama, estiércol, lodo, suelo, etc. Las bacterias Gram negativas son incapaces de sobrevivir y multiplicarse en la piel del pezón. Por tanto, el número de estas bacterias en la piel del pezón viene dado por la exposición reciente de la vaca al medio contaminado (piensos, estiércol, agua y suelo). Debido al constante contacto de los extremos de los pezones con el material de las camas, éste es una de las fuentes de infección más importantes en relación a los patógenos ambientales (Hogan y col., 1989). Así existe una correlación positiva entre el nivel de contaminación por bacterias Gram negativas de las camas y de los extremos de los pezones. Estos dos factores se asocian también con las tasas de mamitis clínicas causadas por este grupo de bacterias (Hogan y Smith, 2003).

Los estreptococos ambientales y las bacterias coliformes sobreviven y se multiplican bien en camas con material orgánico. Virutas de madera, paja, periódico picado, estiércol reciclado y forraje de maíz, materiales que se utilizan como cama, pueden sustentar poblaciones de coliformes de más de un millón de colonias por gramo (Hogan y col., 1989). Por el contrario, el uso de materiales de cama inorgánicos como arena y piedra caliza triturada tiene menos riesgo de exponer a las vacas a bacterias Gram negativas comparado con camas hechas de productos orgánicos como la paja (Hogan y col., 1989). Las cantidades de coliformes totales no difieren mucho entre los materiales de cama orgánicos, sin embargo, la cantidad de patógenos específicos si puede variar. Por ejemplo los brotes de mamitis clínicas causadas por *K. pneumoniae* son comunes en rebaños que usan serrín picado finamente (Newman y Kowalski, 1973). Cuando se usa paja en la cama se puede encontrar una gran cantidad de *Strep. uberis*, mientras que si ésta se hace a base de serrín, viruta o el abono reciclado es habitual altos recuentos de *E. coli* y *Klebsiella* spp. (Hogan y col., 1989).

El origen de los patógenos ambientales también puede ser la administración de tratamientos intramamarios no respetando unas mínimas normas higiénicas o utilizando cánulas contaminadas, que propician la introducción del patógeno en la glándula mamaria (Smith y Hogan, 1995).

Se ha observado que una importante proporción de las IIM causadas por patógenos ambientales se originan durante el período de secado (Smith y Hogan, 1995); no obstante, la tasa de IIM no es la misma en todo este período, sino que es más alta durante las dos semanas siguientes al secado y previas al parto (Smith y Hogan, 1995). La infección por *E. coli* durante los períodos inicial y medio del secado es muy rara y la mayoría de ellas ocurren durante los 7 a 10 días anteriores al parto, aunque se manifiesten clínicamente posteriormente, en los primeros días de lactación (Smith y Hogan, 1995). Las infecciones por otros microorganismos Gram negativos parecen estar distribuidas de manera más uniforme entre la fase inicial y final del período seco (Smith y Hogan, 1995). Se ha observado que el número de estreptococos ambientales y bacterias Gram negativas aisladas en los extremos de los pezones aumenta significativamente al parto, lo que coincide en un momento en el que la glándula mamaria es altamente susceptible a nuevas IIM (Eberhart, 1987). Las infecciones durante el período seco da lugar al hecho de que la incidencia de las mamitis clínicas es mayor durante el primer mes de lactación y disminuye progresivamente a medida que ésta avanza; esto sucede particularmente para las IIM por coliformes y menos en las IIM por estreptococos ambientales, (Hogan y col., 1989).

A pesar de que la incidencia y prevalencia de IIM por patógenos ambientales es mayor en animales estabulados que en los de pastoreo, se ha observado que en pastos durante épocas lluviosas o con zonas lodosas o áreas donde las vacas se reúnen bajo la sombra de árboles pueden contribuir significativamente a incrementar el nivel de mamitis ambientales en rebaños mantenidos en pastoreo. Se comprueba que las condiciones ambientales influyen de forma importante en este tipo de mamitis. Así, la tasa de incidencia de IIM y de casos de mamitis clínicas aumenta durante los meses de verano en rebaños estabulados, mientras que, en áreas donde el ganado permanece al aire libre la mayor frecuencia de mamitis ambientales ocurre durante las estaciones lluviosas (Hogan et al, 1989). Todo esto podría justificarse por el aumento de concentración de los microorganismos en el ambiente y por la mayor exposición del área del esfínter del pezón a los agentes bacterianos (Smith y Hogan, 1995).

A pesar del intento de englobar a todos los patógenos mamarios dentro de las categorías de contagiosos o ambientales, se ha comprobado que algunas especies no han podido ser incluidas de una forma clara en alguno de los dos grupos. Por ejemplo, en el caso de *Strep. dysgalactiae* se ha demostrado que puede presentar tanto un comportamiento ambiental como contagioso (Smith y Hogan, 1995); además, esta clasificación sigue siendo un tema de discusión en relación a los ECN (Piessens y col., 2012). Un inconveniente en el diseño de muchos estudios es que consideran a los ECN como un grupo homogéneo, lo cual se suele traducir en la obtención de resultados contradictorios. Los ECN han sido considerados tradicionalmente como parte de la flora normal de la piel, aunque también se ha demostrado que pueden causar mastitis de forma oportunista (Devriese y De Keyser, 1980). Sin embargo, existen estudios que indican que no todas las especies de ECN se ajustan bien a esta definición (Taponen y col., 2008) y que se manifiestan diferencias epidemiológicas y patológicas entre las diversas especies de ECN (Zadoks y col., 2011b).

En las últimas décadas, los estudios basados en las técnicas microbiológicas y en la biología molecular han mostrado diferencias de comportamiento epidemiológico (fuentes de infección, modo de transmisión y características patológicas) entre los distintos patógenos mamarios, pero también entre cepas de una misma especie (Zadoks y col., 2003; Haveri y col., 2008). Estos resultados han llevado a la conclusión que la clasificación tradicional en patógenos ambientales y contagiosos no puede ser aplicada de una forma tan rígida en el caso de algunos de los microorganismos que producen mastitis bovina (Bradley, 2002). De una forma esquemática se muestra en la Fig. 2 las diferentes comportamientos en los principales patógenos mamarios.

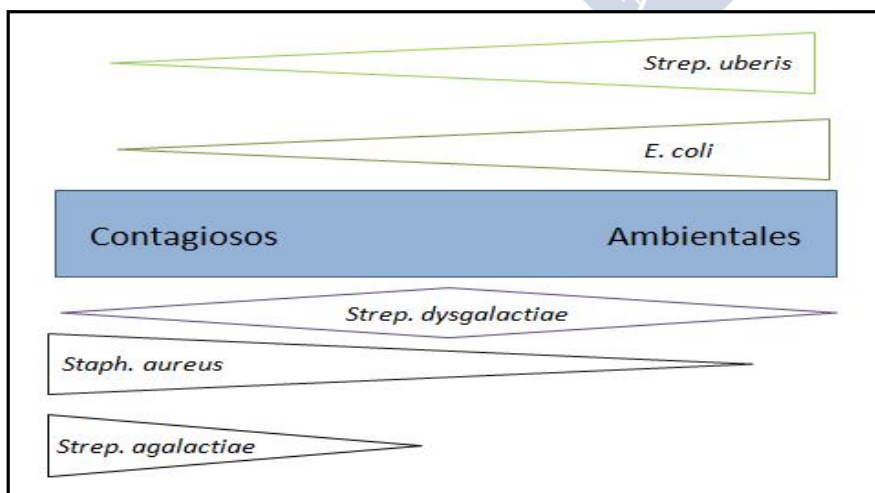


Figura 2. Comportamiento epidemiológico de los principales patógenos en mastitis bovina.

La introducción de programas de control de mamitis basados en el denominado plan de los cinco puntos ha tenido como resultado una rápida disminución tanto de mamitis clínicas como subclínicas en diversas partes del mundo y ha dado lugar a una importante reducción de los RCS en el tanque (Bradley, 2002). Sin embargo, esta situación se justifica principalmente por **la disminución observada en la prevalencia de los patógenos contagiosos puesto que al mismo tiempo ha habido un incremento de la prevalencia de patógenos ambientales** (Myllys y col., 1998; Bradley, 2002; Hogan y Smith, 2003) y ECN (Sampimon y col., 2009a), junto con otros microorganismos poco frecuentes como levaduras o *Prototheca* spp. (Krukowski y col., 2006; Jagielski y col., 2011). Desde el principio se observó que las medidas adoptadas dieron lugar a la reducción de la prevalencia de *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Staph. aureus*, pero resultó menos evidente en el caso de otros patógenos mayores como el *Strep. uberis* (Neave y col., 1969). Por tanto, se considera que los programas de control de mamitis son más eficaces en relación con los patógenos contagiosos que frente a los ambientales (Schukken y col., 1990; Bradley, 2002). Esto justificaría que aunque inicialmente los patógenos contagiosos como *Staph. aureus* y *Strep. agalactiae* fueran los principales causantes de IIM cuando se introdujeron los programas de control (Neave y col., 1969), en la actualidad los patógenos ambientales como los coliformes han llegado a ser la infección predominante en rebaños con buen manejo y bajos RCS de tanque (Hogan y Smith, 2003).

La efectividad de estos programas de control sobre las IIM por ECN sigue en discusión, aunque generalmente se considera que es menor en comparación con los considerados patógenos contagiosos (Erskine y col., 1987; Myllys y col., 1998; Piepers y col., 2007; Taponen y Pyörälä, 2007; Piessens y col., 2011). En diversos estudios se ha descrito que los ECN son la principal causa de IIM en muchos rebaños de leche que realizan prácticas de control efectivas contra los patógenos mayores de tipo contagioso (Linde y col., 1989; Myllys y col., 1998; Pyörälä y col., 2009; Tenhagen y col., 2006; Bradley y col., 2007; Piepers y col., 2007; Schukken y col., 2009). Este cambio en la distribución observada para los patógenos en las mamitis, sugiere que las medidas actuales de control son menos efectivas para reducir las IIM por ECN (Piessens y col., 2011).

Aunque los programas de control hayan tenido éxito al reducir la prevalencia de mamitis por *Staph. aureus* (Myllys y col., 1998; Zadoks y col., 2002; Sommerhäuser y col., 2003), se

considera que no es factible establecer como objetivo su erradicación a nivel de rebaño (Zadoks y col., 2011). De hecho, se han descrito distintas situaciones de prevalencia en explotaciones que realizaban durante años un programa de control de mamitis (Watts y Owens, 1989) y, en general, se observa que la eficacia de estos programas es inferior a la observada en las mamitis por *Strep. agalactiae* (Zadok y Fitzpatrick, 2009).

Estas diferencias en la efectividad de los programas de control de mamitis en relación con el patógeno, se han relacionado con el hecho de que éstos se basan en medidas efectivas contra los patógenos contagiosos como el tratamiento antibiótico en secado a todos los animales del rebaño, desinfección de los pezones previa al ordeño, adecuado funcionamiento del equipo de ordeño, higiene en el ordeño, baño de pezones postordeño y sacrificio de animales con infecciones crónicas. Por el contrario, el empleo de antisépticos después del ordeño no tiene el éxito buscado como medida de control de las mamitis causadas por coliformes (Pankey y col., 1984). Los germicidas aplicados en los baños de pezones suelen eliminar un gran porcentaje de bacterias coliformes en la piel del pezón en el final del ordeño. Sin embargo, las propiedades antibacterianas de esos germicidas disminuyen rápidamente tras el contacto con la piel del pezón y la leche por lo que la contaminación por coliformes de los pezones continúa entre ordeños como resultado de que el germicida pierda gran parte de su eficacia (Hogan y Smith, 2003).

También se han observado **variaciones de tipo estacional** de las IIM de los diferentes patógenos, en relación con el sistema de manejo o las características de los animales (edad, fase de lactación, etc.) que están relacionadas, a su vez, con las características epidemiológicas de cada microorganismo (Smith y Hogan, 2003; Makovec y Ruegg, 2003; Zadoks y col., 2005).

2.3. Aspectos epidemiológicos y patológicos relacionados con los principales patógenos mamarios.

2.3.1. *Staphylococcus aureus*.

Staph. aureus es a la vez un microorganismo comensal y patógeno del hombre y de diversas especies de animales. *Staph. aureus* es **uno de los patógenos más frecuentemente aislados de mamitis bovinas** a pesar de décadas dedicadas a su estudio y control, de modo que continúa siendo un importante problema económico para los productores de leche en todo el mundo (Tenhagen y col., 2006; Olde Riekerink y col.; 2006).

Las IIM por *Staph. aureus* cursan predominantemente de forma subclínica, aunque también produce mamitis clínicas, indicándose que las IIM causadas por este patógeno tienden a persistir más tiempo durante la lactación, si se compara con otros microorganismos causantes de mamitis (Schultze, 1985; Taaponen y Pyörälä, 2009). Dado que en mamitis subclínicas se asocia a RCS superiores a los considerados patógenos menores (ECN y *Corynebacterium* spp.) se considera un **patógeno mayor**. Además de su importancia en relación a la sanidad animal, las IIM por *Staph. aureus* constituyen un riesgo de zoonosis (Guinane y col., 2008), de modo que cada vez son más frecuentes los aislamientos de cepas resistentes a la meticilina en vacuno y ganaderos (Van Loo y col., 2007).

En base a los resultados de diversos estudios epidemiológicos, *Staph. aureus* se clasifica como un **patógeno contagioso** (Fox y col., 1993). Se considera que las ubres infectadas son la principal fuente de infección por lo que se puede diseminar entre cuarterones y pasar de unos animales a otros principalmente durante el ordeño (Leigh, 1999; Neave y col., 1969; Zadoks y col., 2002). Esto ha sido demostrado mediante estudios moleculares que han encontrado que una única cepa suele ser predominante en los animales de un mismo rebaño (Zadoks y col., 2000; Tenhagen y col., 2007).

Sin embargo, a diferencia de un patógeno obligado de la mama como *Strep. agalactiae*, se han demostrado diferentes localizaciones fuera de la mama para *Staph. aureus*. Así pues, se ha considerado que la menor eficacia de los programas de control de mamitis por *Staph. aureus* en comparación con *Strep. agalactiae*, se podría deber a la existencia de fuentes de infección no mamarias (Hutton y col., 1990). Otras posibles causas descritas son la existencia de falsos negativos en el diagnóstico microbiológico y a la reducida respuesta a los tratamientos de las mamitis producidas por este microorganismo (Baseggio y col., 1997; Barkema y col., 2006). La incidencia de infecciones de origen ambiental no sería afectada por la implantación de un programa de prevención de mamitis, que como ya se ha comentado, presenta una menor eficacia sobre las mamitis ambientales.

Staph. aureus se ha aislado prácticamente de todas las superficies externas de animales sanos, aunque la piel de la ubre sea el lugar de colonización más frecuente (Matos y col., 1991; Roberson y col., 1994, 1998). Así se ha aislado este microorganismo en la piel tanto en animales adultos (Trinidad y col., 1990; Matos y col., 1991; Roberson y col., 1994b) como en novillas (Boddie y col., 1987; Trinidad y col., 1990; Matos y col., 1991; Roberson y col., 1994a). Se ha

demostrado que *Staph. aureus* puede persistir períodos más o menos largos de tiempo en pezones, lesiones de piel, vagina y tonsilas (Matos y col., 1991, Trinidad y col., 1990). También se han descrito como fuentes ambientales los materiales de la cama, insectos, personas, otros animales de granja, alimento, equipo de ordeño y aire (Matos y col., 1991; Roberson y col., 1998; Capurro y col., 2010). Así Matos y col. (1991) encontraron que el porcentaje de placas expuestas en ambiente con aislamiento positivo de *Staph. aureus* era mayor en las salas de ordeño durante el período de ordeño (50%) que en el tiempo entre ordeños (20%), mientras que eran negativas en ambiente del alojamiento y material de cama.

Tradicionalmente e incluso en la actualidad se sigue considerando a las ubres infectadas como la principal fuente de infección por *Staph. aureus* y, que a pesar de su aislamiento en muestras no mamarias, no puede considerarse como patógeno ambiental (Kloos, 1997; Capurro y col., 2010). Sin embargo, sigue siendo motivo de discusión la importancia que pueda tener las fuentes de infección no mamarias en las IIM por *Staph. aureus* (Larsen y col., 2000.; Sommerhauser y col., 2003.; Fournier y col., 2008). Algunos autores consideran la presencia no mamaria de *Staph. aureus* como una fuente potencial de IIM, pero otros están a favor de que, en realidad, las IIM son el origen de la contaminación de lugares no mamarios (Haveri y col., 2008; Capurro y col., 2010). Estudios epidemiológicos, basados en biología molecular, han demostrado que *Staph. aureus* también puede ser transmitido por moscas (Capurro y col., 2010).

La detección de un patógeno en diferentes superficies de los animales o en el ambiente no implica necesariamente que actúen como fuente de infección, sin embargo existen evidencias de cierta importancia de las fuentes ambientales en el caso de *Staph. aureus*. Roberson y col. (1998) observaron que aunque la principal fuente de infección de novillas eran las IIM por *Staph. aureus* ya existentes, también lo fueron otras partes del cuerpo de los animales (como piel de pezón) y el ambiente. También se sospechó inicialmente que las lesiones en los pezones podrían posiblemente contribuir como fuente de infección y, por lo tanto, provocar un aumento de animales con IIM por esta bacteria (Trinidad y col., 1990). Este hecho ha sido confirmado en diferentes estudios ya que se aisló *Staph. aureus* en un 40% de las lesiones de pezones (Matos y col., 1991) y que éstas se asociaron, al contrario que en el caso de *Strep. uberis*, con un aumento del porcentaje de mamitis por *Staph. aureus* (Zadoks y col., 2001). Recientemente las

lesiones de la piel del corvejón han sido específicamente identificadas como un lugar común de colonización de cepas asociadas con IIM (Capurro y col., 2010).

La utilización de técnicas moleculares han aportado nuevas aportaciones en el estudio de la epidemiología de las IIM producidas por *Staph. aureus*. Existen estudios sobre cepas originarias de varios continentes que indican que más del 85% de las mamitis bovinas por *Staph. aureus* se deben a la intervención de una subpoblación muy próxima genéticamente (Fitzgerald y col., 1997; Smith y col., 2005) y adaptada al hospedador bovino o, más específicamente, a la ubre de los bovinos (Herron-Olson y col., 2007). Sin embargo, también se han observado diferencias entre cepas en su capacidad de diseminarse entre animales (Smith y col., 1998; Zadoks y col., 2002), de provocar un aumento del RCS (Zadoks y col., 2002), de disminuir la producción de leche (Middleton y Fox, 2002), o en la respuesta al tratamiento antimicrobiano (Barkema y col., 2006).

Se ha demostrado la existencia en un mismo rebaño de varias cepas (4-7 genotipos) con distintas prevalencias (Zadoks y col., 2000; Tenhagen y col., 2007; Capurro y col., 2010) y que el número de cepas es mayor en las granjas que compran animales que en las cerradas (Middleton y col., 2002). La presencia de múltiples cepas en algunos rebaños prueba que no todas las infecciones son resultado de la transmisión vaca a vaca. Algunos estudios, en los que se realizó la tipificación de las cepas, han mostrado que algunos casos de mamitis por *Staph. aureus* no se deben a la transmisión contagiosa si no que más bien tienen un origen ambiental (Kapur y col., 1995; Rivas y col., 1997; Zadoks y col., 2000; Joo y col., 2001). Así se ha encontrado que de un mismo animal pueden aislarse a lo largo del tiempo hasta 5 cepas diferentes, que es un patrón característico de un patógeno ambiental (Zadocks y col., 2002; Sommerhäuser y col., 2003).

Mientras algunos trabajos encuentran que las poblaciones de *Staph. aureus* de la piel del pezón y las aisladas a partir de muestras de leche son diferentes (Zadoks y col., 2002), otros (Haveri y col., 2008) encontraron la mismas cepas en leche, piel de pezón, equipo de ordeño y manos del ordeñador. Un nuevo estudio (Capurro y col., 2010) apunta a resultados intermedios entre los trabajos anteriores, observando la existencia de una cepa predominante en la mayoría de los rebaños que se presentaba tanto en diferentes localizaciones del cuerpo de los animales como en muestras de leche (de acuerdo con los estudios de Haveri y col., 2008), mientras que otras cepas eran aisladas predominantemente o exclusivamente en leche o lugares del cuerpo

(de acuerdo con los resultados de Zadosk y col., 2002). El estudio de Haveri y col. (2008) incluyó un pequeño número de rebaños seleccionados por su alta prevalencia de mastitis por *Staph. aureus*, mientras que el de Zadosk y col. (2002) trabajaron con un mayor número de rebaños.

Otro hecho que ha llevado a la conclusión de la importancia de reservorios no mamarios es la existencia de **infecciones por *Staph. aureus* en novillas antes del parto** (Boddie y col., 1987). La concentración de *Staph. aureus* en el ambiente próximo a novillas parece estar directamente relacionado con la prevalencia de las IIM de este patógeno en el rebaño lechero. Así, la contaminación ambiental es más alta en el entorno de rebaños con alta prevalencia sobre los de menor prevalencia (Roberson y col., 1994b). *Staph. aureus* puede colonizar distintas zonas del cuerpo de las novillas de todas las edades (incluso en animales de menos de un día de vida) aunque parece que solamente en un número reducido de novillas persiste más de un año en la misma región corporal (Roberson y col., 1994b). En las novillas, la colonización del esfínter del pezón o el aislamiento de esta bacteria a partir de las secreciones lácteas antes del primer parto incrementa más de 3 veces el riesgo de las IIM por *Staph. aureus* en el momento del parto (Roberson y col., 1994b).

En general se han observado **diferencias estacionales**, con una mayor prevalencia o frecuencia relativa de aislamiento de *Staph. aureus* en invierno y primavera (Finlandia, Koivula y col., 2007; Italia, Ferguson y col. 2007) o invierno (EEUU, Makovec y Ruegg, 2003) coincidiendo con periodos de estabulación de los animales en estos países. Sin embargo en Noruega, se ha descrito mayor prevalencia en los meses de verano coincidiendo con la época de no estabulación (Østeras y col., 2006).

2.3.2. Estafilococos coagulasa negativos.

Los ECN son un grupo formado por más de 50 especies y subespecies (Pyörälä y col., 2009). De éstas más de 10 han sido aisladas en mastitis bovina si bien hay un pequeño número que predomina sobre el resto. Entre las especies aisladas con más frecuencia en los diferentes estudios se citan *Staph. chromogenes* y *Staph. simulans* (Pyörälä y col., 2009), aunque también figuran entre las que tienen cierta prevalencia *Staph. epidermidis*, *Staph. capitis*, *Staph. warneri*, *Staph. xlosus*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. intermedius*, *Staph. sciuri*, *Staph. hominis* y *Staph. hyicus*

(Taponen y col., 2006, 2008; Capurro y col., 2009; Sampimon y col., 2009a; Perry y col., 2010; Piessens y col., 2011).

En muchos trabajos los ECN se consideran como un grupo, por lo que las conclusiones que se derivan se deben tomar con cierta cautela. Se ha demostrado que existen diferencias entre las distintas especies de ECN en relación a su comportamiento epidemiológico, a su susceptibilidad a antibióticos, la existencia factores de virulencia y respuesta del hospedador a la infección (Devriese y col., 2002; Sawant y col., 2009; Taponen y Pjöräla, 2009; Park y col., 2011). Así los estudios epidemiológicos basados en biología molecular se han observado diferencias entre especies de ECN en el RCS de cuarterón (Supré y col., 2011) y en la capacidad de persistir en la ubre (Gaillespie y col., 2009). Sin embargo, los trabajos basados en biología molecular son menos numerosos que los realizados a los denominados patógenos mayores y, dadas sus características, siempre se realizan sobre un número pequeño de granjas por lo que a veces es difícil establecer asociación entre los factores de riesgo y las IIM producidas por de los distintos ECN (Zadoks y col., 2011). Debido a esto es importante realizar estudios epidemiológicos en los que se diferencien las especies de ECN ya que son la base para el futuro desarrollo de recomendaciones específicas para el tratamiento y prevención de las mamitis por ECN (Zadoks y Watts, 2008).

En varios países el grupo de los ECN se consideran implicados en un importante porcentaje de las IIM e incluso se han descrito como los patógenos predominantes en mamitis subclínicas en varios países (Nevala y col., 2004; Rajala-Schultz y col., 2004; Østerås y col., 2006; Tenhagen y col., 2006; Bradley y col., 2007). Además se consideran patógenos emergentes ya que su importancia relativa ha aumentado en diferentes lugares del mundo que llevan desarrollando programas de control de mamitis desde hace décadas (Calvinho y Tirante, 2005; Jánosil y Baltay, 2004; Pantoja y col., 2009). Así, en Holanda, el porcentaje de ECN sobre los aislamientos de muestras de leche aumentó desde un 16.2% en 1999 a un 42.2% en 2004 en mamitis subclínicas y desde un 7.3% a un 14.1% en mamitis clínicas (Sampimon y col., 2007). Además se han descrito a los ECN como la causa predominante de infección en novillas (Fox, 2009; Piepers y col., 2010).

Los ECN son considerados patógenos menores. Aunque se considera que un bajo porcentaje de las infecciones cursan como mamitis clínica, en algunos trabajos se ha descrito que hasta un 50% de las IIM por ECN presentaron síntomas clínicos (Taponen y col., 2006), aunque normalmente con leves signos locales (Hogan y col., 1987; Jarp, 1991; Taponen y col., 2006; Fox, 2009). Las IIM por ECN se asocian con moderados aumentos del RCS y se considera que induce

una leve reacción inflamatoria en los cuarterones infectados (Bramley y Dodd, 1984; Linde y col., 1989; Schukken y col., 2009). Sin embargo, se ha demostrado que las IIM por ECN provocan un aumento de RCS que es superior a lo hallado en cuarterones sanos y por lo tanto se deben considerar patógenos mamarios en lugar de flora banal del canal del pezón (Bradley y col., 2007; Sampimon y col., 2009a). Además se ha observado una relación entre RCS de tanque > 250.000 cel/ml y altas prevalencias por ECN en las granjas. Por ello, se considera que los ECN son un grupo heterogéneo de microorganismos con un impacto limitado pero no desechable sobre la salud de la ubre y la productividad (Schukken y col., 2009; Taponen y Pyörälä, 2009).

Los diferentes autores coinciden en que los RCS en IIM por ECN son inferiores a los observados en IIM por *Staph. aureus*. Taponen y col., (2007) encontraron una media geométrica de 657.000 cel/ml y una mediana de RCS de 355.400 cel/ml para los cuarterones con infección persistente por ECN, valores muy inferiores a la media geométrica (3.286.000 cel/ml) y mediana (1.898.700 cel/ml) observada para los cuarterones con IIM por *Staph. aureus*. Supré y col. (2011) describieron que los RCS de las IIM por ECN como grupo (media geométrica 137.000 cel/ml) eran inferiores a las IIM por *Staph. aureus* (media geométrica 494.000 cel/ml). Schukken y col. (2009) en un estudio más amplio, encontraron RCS y Linear Score (LS) en muestras de cuarterones con IIM por ECN de 358.000 cel/ml y 3,42 respectivamente, inferior a los valores observados en las IIM por *Staph. aureus* (983.000 cel/ml; LS=5,24). A pesar de que los ECN se asocian con leves aumentos del RCS, en los últimos años se les han dado una mayor importancia al ir reduciéndose los valores máximos de RCS de tanque exigibles en la calidad de la leche (Smith y Hogan, 1995).

Sin embargo, la información sobre las diferencias en relación a su capacidad de producir mamitis clínicas y el RCS entre las distintas especies de ECN es muy limitada, tanto en el número de estudios como en la amplitud de casos estudiados. Varios trabajos no encontraron diferencias entre las especies de ECN en la severidad de los síntomas clínicos (Jarp, 1991; Taponen y col., 2006) ni en el RCS (Thorberg y col., 2009). Sin embargo, en un trabajo reciente (Supré y col., 2011), se ha indicado que algunas especies de ECN como *Staph. chromogenes*, *Staph. simulans* y *Staph. xylosus* presentan, al tener en cuenta la interacción con otros factores, un aumento de RCS similar al causado por *Staph. aureus*. En este trabajo también se observaron diferencias entre las especies de ECN en la media geométrica del RCS: 225.000 cel/ml para *Staph. chromogenes*, 130.000 cel/ml para *Staph. simulans* y 84.000 cel/ml para *Staph. xylosus* y 65.000 cel/ml para *Staph. cohnii*. Sin embargo, este estudio solo incluyó animales de 3 explotaciones. En otro trabajo

que incluía un total de 155 aislamientos y en el que se identificaron 14 especies de ECN (Sampimon y col., 2009) se concluyó que mientras existían diferencias estadísticamente significativas entre las muestras con cultivo negativo y en las que se aislaban *Staph. chromogenes*, *Staph. capitis* y *Staph. xylosus*, éstas diferencias eran cercanas a la significación en comparación con las que se aisló *Staph. epidermidis* y *Staph. hyicus* y no eran estadísticamente significativas en el resto de los ECN.

Se asume que el porcentaje de curaciones espontáneas de las IIM por ECN es alto, con valores de 16-70% (Rainard y Poutrel, 1982; Wilson y col., 1999; Taponen y col., 2006), por lo que en muchos países las mamitis producidas por estos patógenos no suelen ser tratadas. Sin embargo, varios trabajos han descrito IIM por ECN persistentes en el tiempo. Supré y col. (2011) encontraron que casi todas las especies encontradas (especialmente *Staph. chromogenes*) eran capaces de provocar IIM persistentes. Se han descrito mamitis persistentes (63-330 días) en infecciones por *Staph. chromogenes*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. simulans* y *Staph. epidermidis* (Piessens y col., 2011) y que hasta el 50-85% de las infecciones pueden persistir hasta el final de lactación (Timms y Schultz, 1987; Taponen y col., 2007). Aarestrup y Jensen (1997) encontraron diferencias entre especies, así mientras las infecciones por *Staph. chromogenes* disminuían rápidamente después del parto, las IIM por *Staph. simulans* persistían mucho más tiempo. Taponen y col. (2007) y Gillegie y col. (2009) no hallaron diferencias de comportamiento entre las especies y consideraron que algunas infecciones persistentes por *Staph. chromogenes* podrían ser realmente reinfecciones repetidas de una misma cepa.

La **epidemiología de los ECN** en la mamitis bovina no se conoce bien, sobre todo porque en los pocos estudios realizados, si se compara con los de *Staph. aureus*, en realidad se consideran como grupo y no las especies de forma individual. Los ECN son considerados parte de la microflora normal de los mamíferos. Son frecuentemente aislados de distintas zonas del animal como vagina, piel, canal del pezón y muestras de leche obtenidas asépticamente (Trinidad y col., 1990). ECN como *Staph. chromogenes*, *Staph. xylosus*, *Staph. sciuri*, *Staph. saprophyticus* y *Staph. warneri* han sido aislados en pelo, piel del pezón, fosas nasales y otras localizaciones en las vacas (Devriese y DeKeyser, 1980; Boddie y col., 1987; White y col., 1989; De Vlieghe y col., 2003). Por ello, se ha considerado que los ECN colonizan la piel y son oportunistas que por vía ascendente por el canal del pezón producen mamitis (Devriese y De Keyser, 1980; Radostis y

col., 2007). Sin embargo, los resultados de algunos trabajos indican que no todas las especies concuerdan bien con esta definición (Taponen y col., 2008).

Los estudios se han centrado en la detección de ECN en muestras no mamarias, tanto ambientales como de la piel de la mama y el estudio de su relación con los aislamientos en IIM. El aislamiento de diferentes ECN en el ambiente (Piessens y col., 2011; Matos y col., 1991) ha dado lugar a la hipótesis de que el ambiente de las vacas es una posible fuente de los ECN que causan mamitis. Piessens y col. (2011) encontraron que el 96% de las muestras de suelo, el 98% de muestras de aire, el 89% de muestras de cama usada y el 68,3% de cama almacenada había aislamientos positivos de ECN. La existencia de infecciones por ECN durante el parto en novillas, que no están expuestas al proceso de ordeño, también sugieren que existen fuentes de infección no mamarias (Fox, 2009).

Se ha observado que el tipo de estabulación (White y col., 1989) y los diferentes materiales de las camas (Matos y col., 1991) tiene influencia en la distribución de las especies de ECN en diferentes zonas del cuerpo de las novillas y en las muestras de cama, respectivamente. Sin embargo, también se ha observado diferencias entre rebaños, incluso con características similares de instalaciones y manejo, en la distribución de especies de ECN en el ambiente y en las especies aisladas de IIM (Thorberg y col., 2009; Piessens y col., 2011).

Matos y col. (1991) describieron que las especies de ECN más frecuentemente aisladas en las camas y en el ambiente eran *Staph. xylosus* y *Staph. sciuri*. Si bien no existen estudios de epidemiología molecular, se considera su origen ambiental, dadas las bajas frecuencias de aislamientos en IIM incluso en explotaciones donde son frecuentemente aislados en el ambiente. Posteriormente se ha descrito que son frecuentes en el ambiente *Staph. haemolyticus* y *Staph. simulans* (Piessens y col., 2011). Si bien la correspondencia genotípica entre las cepas aisladas de ambiente y de las IIM hacen pensar que el origen ambiental es importante en el caso de *Staph. haemolyticus*, este hecho no es tan claro en el caso de *Staph. simulans* (Piessens y col., 2011). El origen ambiental se ha considerado menos importante en el caso de *Staph. chromogenes* y *Staph. epidermidis* como lo demuestra la baja frecuencia con que se aíslan estos patógenos en el ambiente (Piessens y col., 2011; 2012). Las IIM por *Staph. epidermidis* se ha asociado a un origen humano ya que se han aislado las mismas cepas en IIM y en las manos de los ordeñadores (Thorberg y col., 2006).

En base a la distribución de las especies en las muestras de leche y del ambiente se ha propuesto una clasificación provisional de ECN (Piessens y col., 2011) en: especies asociadas a la vaca (*Staph. chromogenes* y *Staph. epidermidis*) y ambientales oportunistas (*Staph. haemolyticus* y *Staph. simulans*). Sin embargo, como se comentará posteriormente, no todos los estudios llegan a las mismas conclusiones.

Existen diversos trabajos, en los que solo se consideran los ECN como grupo, confirman que la prevalencia de estas IIM está influida por **la estación u otros factores ambientales**. En Finlandia y Noruega la prevalencia de ECN fue mayor durante el invierno y primavera, épocas de estabulación de los animales (Østeras y col., 2006; Koivula y col., 2007). En otros países se han descrito las mayores prevalencias o porcentajes de aislamiento en otoño o invierno (Italia, Ferguson y col. 2007) o en otoño (EEUU, Makovec y Ruegg, 2003). También se ha citado mayor prevalencia en sistemas de producción intensiva respecto de los extensivos (Oliveira y col., 2006; Parker y col., 2007). Sin embargo no existe información de la tendencia estacional a nivel de especie.

Las mamitis por ECN son especialmente comunes durante la primera lactación (Myllys, 1995) pero son encontradas con menor frecuencia en cualquier **edad** (Tenhagen y col., 2006). Se ha descrito que *Staph. chromogenes* se asocia predominantemente con novillas en el período cercano al parto (Rajala-Schulz y col., 2004), mientras que *Staph. simulans* se aísla en IIM durante toda la lactación (Jarp, 1911; Waage y col., 1999; Taponen y col., 2006). También se ha indicado que las primíparas suelen presentar la infección al principio de lactación, mientras que las multíparas suelen infectarse en períodos más tardíos (Taponen y col., 2007).

Staph. epidermidis es uno de los ECN más frecuentemente aislado en mamitis bovina, aunque en menor proporción que *Staph. chromogenes* y *Staph. simulans* (Aarestrup y Jensen, 1997; Thorberg y col., 2006). *Staph. epidermidis* parece presentar un comportamiento específico dentro de los ECN. Las IIM por este microorganismo se ha asociado a un origen humano ya que se han aislado las mismas cepas tanto en IIM como en las manos de los ordeñadores (Thorberg y col., 2006), es raramente aislada desde lugares no mamarios como en la piel de las vacas o en el ambiente no animal (Piessens y col., 2011) y existe una baja heterogeneidad de los aislados que hace pensar en una fuente de infección común (Piessens y col., 2012).

Staph. chromogenes es, en muchos trabajos, uno de los ECN más frecuentemente aislado de mamitis bovina, especialmente en novillas (Piessens y col., 2011). Se ha demostrado que puede producir mamitis de larga duración, casos clínicos (Piessens y col., 2011) y una elevación de RCS tan alta como un patógeno mayor como *Staph. aureus*, lo que incluso ha llevado a discutir su clasificación como patógeno menor (Supré y col., 2011). Se ha identificado como una especie frecuentemente aislada en mamitis de novillas, tanto en no cubiertas, gestantes o recién paridas (Boddie y col., 1987; Trinidad y col., 1990; Nickerson y col., 1995; Aarestrup y Jensen, 1997; De Vliegher y col., 2003).

Staph. chromogenes se ha aislado en baja proporción en ambiente no animal como aire del establo, pisos de rejillas, serrín de cubículos y serrín almacenado previamente a su utilización en camas, lo que parece considerar la poca importancia del origen ambiental de las IIM (Piessens y col., 2011, 2012). Sin embargo, parece adaptado a las condiciones de la piel (perineo, ubre, punta de pezón), fosas nasales, pelo, vagina y al canal del pezón de novillas de 10 meses (White y col., 1989; De Vliegher y col., 2003) y también se ha aislado a partir de manos de ordeñadores (Taponen y col., 2008). Taponen y col. (2008), por métodos moleculares, encontraron relación entre los aislados de leche de animales con mamitis y los aislados en piel de la ubre lo que les llevó a suponer que las cepas de *Staph. chromogenes* que colonizan la piel pueden actuar como patógenos mamarios y a considerar a este patógeno como un típico oportunista de la piel. Por el contrario, Piessens y col. (2012) aislaron con muy poca frecuencia *Staph. chromogenes* en la punta de los pezones y sugieren que aunque este patógeno puede residir en la piel de las vacas, la importancia epidemiológica de esta fuente de infección debe ser todavía evaluada. Además, en este último estudio se observaron una limitada heterogeneidad entre los aislados ambientales de 6 explotaciones estudiadas por lo que sus autores especularon sobre si esta alta relación genética entre cepas podría ser debida a que ciertos genotipos están más adaptados a la mama bovina, con lo que la transmisión vaca a vaca podría tener alguna importancia en la epidemiología de este patógeno.

Staph. simulans es también uno de los ECN más frecuentemente aislado en diversos estudios (Jarp, 1991; Waage y col., 1999; Taponen y col., 2006). Es el ECN más frecuentemente asociado con mamitis más severas ya que predomina, aunque en muchos casos sin significación estadística, en los estudios realizados sobre mamitis clínicas (Myllys, 1995a; Waage y col., 1999; Taponen y col., 2006). Se ha identificado como una especie frecuentemente aislada en

mamitis de novillas, tanto en no cubiertas, gestantes o recién paridas (Boddie y col., 1987; Trinidad y col., 1990; Nickerson y col., 1995; Aarestrup y Jensen, 1997; De Vliegher y col., 2003).

No hay apenas citas de aislamientos extramamarios de *Staph. simulans*, ni tampoco del canal de pezón o piel de vaca (Devriese y De Keyser, 1980; Boddie y col., 1987; Trinidad y col., 1990; Taponen y col., 2008) y en consecuencia, algunos autores lo consideraron un patógeno específico de la ubre (Taponen y col., 2008). Sin embargo, en un estudio reciente se han obtenido aislamientos de muestras ambientales que demuestran que este microorganismo sobrevive bien en el ambiente especialmente en pisos de rejilla y material de cama ya utilizado (Piessens y col., 2011). Esto podría suponer que hay una fuente ambiental, pero también que hubiera contaminación del ambiente a partir de vacas infectadas. Se ha observado una diversidad genética de los aislados de *Staph. simulans* en leche (Aarestrup y col., 1999; Piessens y col., 2012) lo que se podría asociar con una fuente ambiental. Sin embargo todavía no existe consenso en relación a este aspecto ya que en estos mismos estudios son pocos los genotipos que predominan en las IIM de cada rebaño. La alta diversidad genética de las cepas ambientales y los pocos aislados comunes con IIM inducen a pensar que en el caso de *Staph. simulans* este origen ambiental no es tan evidente como en el caso de *Staph. haemolyticus*. (Piessens y col., 2011).

Staph. haemolyticus se considera que procede esencialmente del ambiente, puesto que ha sido aislado de piel de vacas, particularmente en la punta y piel de pezón (Devriese y De Keyser, 1980) y en el ambiente (Matos y col., 1991), predominando en muestras del aire del establo (Piessens y col., 2011). Los resultados de estudios epidemiológicos moleculares reafirman su potencial origen ambiental puesto que se han detectado similares cepas aisladas en el ambiente y en las IIM y además hay gran diversidad de genotipos encontrados en el entorno (Piessens y col., 2011, 2012).

Staph. xylosus y *Staph. sciuri* también han sido asociados a IIM, aunque con baja prevalencia (Thorberg y col., 2009; Davidson y col., 1992). Ambas especies han sido aisladas en muestras ambientales, siendo las especies predominantes en las camas de los animales, aunque también se han detectado en materiales de camas antes de utilizarlos (Matos y col., 1991) e incluso en granjas donde no se aislaron en IIM (Taponen y col., 2008). Por ello se ha sugerido que estas especies tienen una vida libre en el ambiente, proponiendo denominarlos

estafilococos ambientales (Matos y col., 1991; Smith y Hogan, 1995). En un trabajo reciente *Staph. sciuri* se ha encontrado con más frecuencia en suelo del establo, serrín de cubículos y suelo de rejilla, frente a *Staph. xylosus* que prevalece en serrín almacenado (Piessens y col., 2011).

En relación con la capacidad patógena de estos dos microorganismos se ha especulado con que *Staph. xylosus* y *Staph. sciuri* pueden intervenir como patógenos ambientales oportunistas, de forma que produzcan IIM cuando la presión de infecciones es alta o en casos en que la inmunidad de las vacas está comprometida, y que ciertas cepas pueden estar mejor adaptadas para producir infección (Piessens y col., 2011). Normalmente se asocian con bajos resultados en la prueba de CMT y poca persistencia de las IIM (Thorberg y col., 2009). Esta discusión sobre su verdadera capacidad patógena ha llevado a dudar si producen realmente IIM o su aislamiento se deba asociar con muestras con un inadecuado mantenimiento hasta el laboratorio o con una colonización del canal del pezón (Thorberg y col., 2009).

Staph. warneri se aisló de la piel de vaca (Taponen y col., 2008) y en muestras ambientales (Piessens y col., 2011) pero se considera un ECN escasamente aislado en IIM y en muestras tomadas del medio ambiente (Piessens y col., 2011).

En novillas, *Staph. hyicus* ha sido más asociado con síntomas generales que otras especies de ECN (Waage y col., 1999). También fue el ECN más frecuentemente aislado en mamitis clínicas y el que presentó mayor actividad de N-acetyl-beta-D-glucosaminidasa según los estudios de Myllys (1995a).

Otros ECN han sido aislados en el ambiente pero no suelen ser frecuentemente implicados en IIM (Taponen y col., 2008) y se dispone de muy poca información sobre ellos.

2.3.3. *Streptococcus agalactiae*.

Strep. agalactiae causa principalmente infecciones subclínicas y los programas de control de mamitis han llevado a casi su erradicación en varios países de Europa. En Bélgica, Dinamarca, Noruega y Reino Unido, la incidencia de *Strep. agalactiae* es actualmente esporádica (Yersen y col., 2003; Østerås y col., 2006; Bradley y col., 2007; Piepers y col., 2007). La facilidad de realización (Neave y col., 1969) y el beneficio económico (Yamagata y col., 1987; Edmondson, 1989; Erskine y Eberhart, 1990) del control de *Strep. agalactiae* ha sido demostrada

repetidamente. Dado que en mamitis subclínicas se asocia a RCS que superan a las de otros patógenos, se considera un **patógeno mayor**.

Se trata de un **patógeno obligado de la mama** ya que no se ha logrado su aislamiento a partir del ambiente y por tanto un patógeno mamario de tipo contagioso por excelencia. Este hecho junto a su gran susceptibilidad a las penicilinas contribuye a la facilidad de su erradicación en rebaños de vacuno lechero.

La transmisión se considera estrictamente **contagiosa**, vaca a vaca debido a deficiencias de la higiene en el ambiente de ordeño, lo que permite que múltiples animales tenga contacto con el equipo, paños o toallas que están contaminados con leche de vacas infectadas (Neave, y col., 1969). Esto se ha confirmado al tener constancia de la presencia de una única cepa en los animales de un mismo rebaño, aunque si existe diversidad entre rebaños (Baseggio y col., 1997; Duarte y col., 2004). No obstante, las novillas que se introducen en el rebaño de producción pueden estar infectadas con *Strep. agalactiae* y se considera que su infección es el resultado del amamantamiento natural o la lactación artificial de las terneras con leche infectada (Smith y Hogan, 1995).

Ocasionalmente se ha observado mamitis por *Strep. agalactiae* en rebaños con buenas medidas de control contra mamitis contagiosas y bajos RCS de tanque (<150,000 cel/ml) (Barkema y col., 1998). En estos casos son generalmente infecciones de corta duración y no se observa transmisión del patógeno entre los animales del rebaño. Algunos autores atribuyen la aparición de mamitis clínicas esporádicas, así como la presencia de *Strep. agalactiae* en tanque de leche obtenida de explotaciones con animales libres de esta infección a la introducción de cepas del agente de origen humano (Zadoks y Schukken 2006). *Strep. agalactiae* causa infecciones en humanos con enfermedad severa e invasiva en adultos y neonatos e infecciones asintomáticas en mujeres siendo portadoras en el tracto urogenital y gastrointestinal distal (> 30% de las mujeres y 25% en hombres) (Balter y col., 2000; Manning y col. 2000). Se acepta que las cepas de origen humano y bovino representan distintos biotipos (Sukhnany y col., 2005), sin embargo, los *Strep. agalactiae* de origen felino y canino están genéticamente más próximas a las de origen humano que a las de bovino (Yildirim y col., 2002; Sukhananand y col. 2005). Infecciones experimentales con cepas de humanos han mostrado mamitis clínicas pero con tendencia a la autocuración (Jensen, 1982). Las cepas de origen humano pueden causar mamitis subclínica o crónica lo que aumenta la probabilidad de transmisión en el rebaño (Jensen, 1982), sin embargo, parecen tener una capacidad

de contagio inferior a las cepas de bovino. También se ha demostrado que una cepa virulenta de humana asociada a enfermedad invasiva neonatal forma parte de la evolución desde una cepa bovina de *Strep. agalactiae* (Bisharat y col., 2004), lo que podría tener implicaciones desde el punto de vista de la salud pública. Para evitar el posible aumento de cepas humanas originarias del reservorio bovino se ha propuesto que este patógeno debe ser erradicado en la población bovina (Hillerton y col., 2004). Sin embargo, la prevalencia en humana supera a la de los bovinos lo que parece indicar que hay más transmisión desde los humanos al bovino que viceversa, y tampoco está claro que su erradicación en vacuno sea una forma eficiente, desde el punto de vista costo-beneficio, de prevenir la infección humana (Zadoks y Fitzpatrick, 2009).

En cuanto al **efecto de la época del año** no hay suficiente información dada la ausencia o escasa prevalencia citada en la bibliografía (Østeras y col., 2006; Koivula y col., 2007); en unos casos no se observaron diferencias estaciones (Italia, Ferguson y col. 2007) y en otros se evidencia mayores prevalencias en otoño (EEUU, Makovec y Ruegg, 2003).

2.3.4. *Streptococcus uberis*.

Garvie y Bramley (1979) demostraron que la especie *Strep. uberis* podía realmente dividirse en dos subespecies distintas, tipo I y tipo II. Una década más tarde *Strep. uberis* tipo II fue reclasificado como *Strep. parauberis* (Williams y Collins, 1990). Aunque estas dos especies son genéticamente diferentes y fácilmente diferenciables en base a su 16S rRNA, son similares fenotípicamente por lo que es imposible diferenciarlas por métodos bioquímicos (Forsman y col., 1997). En cualquier caso, los aislamientos descritos de *Strep. parauberis* son muy pocos.

Es considerado un **patógeno mayor** y uno de los microorganismos y el estreptococo más frecuentemente implicados en IIM. *Strep. uberis* puede ser la causa más importante de mamitis subclínicas en rebaños de leche y los casos clínicos son una pequeña proporción de las infecciones por este patógeno (Jayarao y col., 1999; Zadoks y col., 2003). Sin embargo, también se ha descrito como la más importante causa de mamitis clínicas bovinas en zonas con ganado con alimentación a base de pasto como Nueva Zelanda y Australia (Pankey y col., 1996; Douglas y col., 2000; McDougall y col., 2004). Los estudios muestran discrepancias en la frecuencia de las infecciones por *Strep. uberis* en vacas secas; en Holanda su frecuencia fue baja (Zadoks y col., 2003), mientras que en EEUU ocurre lo contrario con prevalencias altas (Oliver, 1988; Smith y Hogan, 1993; Todhunter y col., 1995). En estudios con técnicas moleculares se ha observado

que en un mismo cuarterón se suele aislar la misma cepa a lo largo del tiempo, indicando que no es común la infección por diferentes cepas de *Strep. uberis* en un mismo cuarterón (Oliver y col., 1998; Phuektes y col., 2001; Wieliczko y col., 2002), aunque ocasionalmente se hayan encontrado dos cepas (Zadoks y col., 2003). Incluso después de infecciones experimentales con varias cepas, solo suele predominar una de ellas (Pryor y col., 2009). Se ha observado que una considerable proporción de cuarterones infectados por *Strep. uberis* tuvieron una media de RCS menor de 400.000 cel/ml (Zadoks y col., 2003). Esto significa que las infecciones crónicas por *Strep. uberis* podrían no ser detectadas con estrategias de rutinarias de diagnóstico y suponer un problema en su control, dado que partir de estos cuarterones infectados se podrían infectar otros animales en el rebaño.

McDougall y col. (2004) encontraron que la mayoría de las IIM subclínicas por *Strep. uberis* normalmente evolucionaban espontáneamente a la curación bacteriológica. Sin embargo, a pesar de la respuesta inmunitaria del hospedador, *Strep. uberis* puede establecer una IIM lo cual puede obedecer en parte a diversos factores de virulencia propios de este patógeno. Son varios los autores que han descrito casos con infecciones persistentes (McDougall y col., 2004; Milne y col., 2005; Pullinger y col., 2007; Wang y col., 1999; Zadoks y col., 2003). Se supone que se mantienen las infecciones y no son repetidas reinfecciones porque en la mayoría de los casos se observó, por métodos moleculares, que los aislados pertenecen a la misma cepa (Zadoks y col., 2003) y se considera dada la diversidad de cepas encontradas en un mismo rebaño no es lógico que las infecciones de un cuarterón siguieran siendo de la misma cepa durante semanas o meses. Se han observado variaciones en la duración de las infecciones por *Strep. uberis* desde 1 a 370 días (Pullinger y col., 2007) y con una media de 12 (Todhunter y col., 1995) hasta 45 días (Zadoks y col., 2003). Algunos autores han considerado que la persistencia de la infección se puede deber más a variaciones de factores asociados al animal que a la diferencias entre las cepas implicadas. Así la duración de las mamitis clínicas es (13 días) inferior a las subclínicas (46 días), lo que se ha asociado con una inmunitaria respuesta inmunitaria más intensa que suprime la infección o con la detección más temprana por parte de los ganaderos (Zadoks y col., 2003). Otros autores consideran la posibilidad de que algunas cepas estén involucradas en casos crónicos (McDougall y col., 2004). Hay estudios que tienen resultados contradictorios; así por ejemplo, se ha observado que las infecciones causadas por la cepa predominante en cada rebaño tuvo mayor duración que las infecciones atribuidas a otras cepas (Zadock y col., 2003), pero también, que los mismos tipos de cepas puede encontrarse

tanto en infecciones persistentes como de corta duración, por lo que concluyen que el tipo de cepa no tiene influencia en la duración de la infección (Pullinger y col., 2007). También se ha propuesto que existen diferencias de virulencia entre las cepas de *Strep. uberis*. Hill (1988) y Phuektes y col. (2001) documentaron que ciertas cepas encontradas en algunos rebaños tienen la capacidad de causar mamitis clínicas más que otras. Además, Jayarao y col., (1993) detectaron menor heterogeneidad entre los aislados de mamitis clínicas que en los de mamitis subclínicas, sugiriendo que la capacidad de provocar enfermedad clínica podría estar limitada solo a determinadas cepas. Sin embargo, otros estudios no han observado diferencias clínicas, ni en el RCS en mamitis crónicas asociadas a cepas específicas de *Strep. uberis*, aunque si observaron una asociación entre la duración de la infección y ciertas cepas (Zadock y col., 2003). Algunas infecciones por *Strep. uberis* responden bien al tratamiento antibiótico, mientras que otras no lo hacen incluso después de prolongadas terapias intramamarias (Milne y col., 2005). Phuektes y col. (2001) encontraron que en un rebaño la cepa predominante y más patógena era también más resistente a los antibióticos investigados que el resto de cepas estudiadas. Los resultados de los estudios *in vitro* sobre la adherencia, invasión y supervivencia en las células epiteliales mamarias por *Strep. uberis* (Tamilselvam y col., 2006) podrían explicar la persistencia de la infección y los fallos de tratamiento, pero en cambio no se ha podido demostrar *in vivo* la relación entre el resultado patológico y los factores de virulencia de las distintas cepas.

Las IIM por *Strep. uberis* se considera el mayor reto en el control de las mamitis bovinas (Leigh, 1999; Bramley, 1984), particularmente debido al conocimiento parcial de la epidemiología de este proceso (Peeler y col., 2000; Phuekter y col., 2001). *Strep. uberis* es clasificado como **un patógeno ambiental** (Smith y Hogan, 1993; Leigh, 1999). A él están expuestos igualmente los animales en lactación como en el período seco (Smith y col., 1985) y el riesgo de infección no es limitada al periodo de ordeño (Smith y Hogan, 1993). Los pezones se contaminan por *Strep. uberis* desde el ambiente lo cual puede dar lugar a IIM si el microorganismo consigue invadir la glándula mamaria (Douglas y col., 2000; Zadoks y col., 2003; Pullinger y col., 2006). El grado de contaminación del extremo del pezón predispone a la infección de la vaca ya que se encontraron mayores tasas de IIM en rebaños donde se aisló *Strep. uberis* con mayor frecuencia en los pezones (Kruce y Bramley, 1982). Así se ha asociado mayor prevalencia de mamitis con condiciones insuficientes de higiene del establo (Barkema y col., 1998) o de la ubre (Schreiner y Ruegg, 2003). Se ha aislado *Strep. uberis* en el 50-60% de las puntas de pezones (de vacas en patios

con paja) en muestras tomadas inmediatamente antes del ordeño, a pesar de que se aplicaban baños de pezones después del ordeño (NIRD, 1970, 1974).

Son diversas las razones que han llevado a considerar a *Strep. uberis* un microorganismo ambiental:

- Se han observado nuevas infecciones en vacas secas y novillas que no habían parido, circunstancia en la cual el contagio entre vacas no es posible (Oliver, 1988; Todhunter y col., 1995).
- Se han detectado nuevas infecciones en el parto, la mayoría de ellas subclínicas, originadas probablemente en el periodo seco (Zadoks y col., 2003).
- Se conoce bien la eliminación de *Strep. uberis* a través de las heces (Cullen y Little, 1969; Bramley, 1982; Kruze y Bramley, 1982; Zadoks y col., 2005) y además las cepas aisladas en IIM son similares genóticamente a las encontradas en el ambiente y en las heces (Zadoks y col., 2005b; Pullinger y col., 2006).
- Se han encontrado gran variedad de cepas productoras de mamitis en un mismo rebaño y no un número limitado de cepas, lo cual, sería más típico de mamitis contagiosas (Oliver y col., 1998; Leigh, 1999; Wang y col., 1999; Douglas y col., 2000; Phuektes y col., 2001; Wieliczko y col., 2002; Khan y col., 2003; Zadoks y col., 2003; McDougall y col., 2004; Coffey y col., 2006; Pullinger y col., 2006). Esta variedad de cepas aisladas de leche es consecuente con la hipótesis que el medio ambiente alberga una enorme diversidad de cepas de *Strep. uberis* que actúan como fuente de infección (Smith y Hogan, 1993; Todhunter y col., 1995; Leigh, 1999). Esta amplia variedad de cepas también se observó en el ambiente, hasta el punto de que el 86% de las cepas procedentes del entorno de la granja se correspondían con múltiples tipos de cepas (Zadoks y col., 2005b).
- La incidencia de mamitis por *Strep. uberis* son más alta en los cuarterones posteriores lo que es más típico de mamitis de origen ambiental (Zadoks y col., 2001a).
- La importancia que se ha dado al comportamiento ambiental de *Strep. uberis* es parcialmente resultado del fallo observado en su erradicación al aplicar medidas de control

para evitar la transmisión de mamitis contagiosas (Bramley, 1984). A la vez que se ha observado la disminución de la prevalencia de los patógenos contagiosos, ha ocurrido un aumento relativo (y posiblemente absoluto) en los casos clínicos de mamitis causadas por *Strep. uberis* (Leigh, 1999).

- Se han aislado *Strep. uberis* en el ambiente incluyendo estiércol, pasto, zonas de paso de animales, materia vegetal, heno, prados, moscas y material de cama (Bramley, 1982; Harmon y col., 1992; Zadoks y col., 2005b; Pullinger y col., 2006). En el cuerpo de las vacas ha sido aislado del tracto genital, piel, rumen (en grandes cantidades), tonsilas, labios, ubre, piel del pezón y heces (Cullen y Little, 1969; Razavi-Rohani y Bramley, 1981; Kruze y Bramley, 1982; Buddle y col., 1988).

Su **origen fecal** explica el por qué *Strep. uberis* es tan común en el ambiente de las granjas de vacuno de leche. Sin embargo, su aislamiento no se pudo hacer o se hizo en muy pocas ocasiones en zonas o ambientes no relacionados con los animales o en lugares (patios de ejercicio o pastos) donde no se habían mantenido animales (Cullen y Little, 1969; Zadoks y col., 2005b; Lopez-Benavidez y col., 2007). Así, en Nueva Zelanda solamente era aislado en los patios de ejercicio si habían permanecido los animales en ellos al menos un día (Lacy-Hulbert y col., 2006). Por ello se considera que *Strep. uberis* no se mantiene viable en el ambiente durante mucho tiempo y son las vacas las que, por medio de las heces, provocan y mantienen la contaminación del ambiente. Se ha sugerido que podría ocurrir un mecanismo similar al que ocurre en el caso de *Listeria monocytogenes* donde se produce, previa ingestión, un efecto de amplificación en la vaca y su posterior eliminación en heces provoca la recontaminación del ambiente, lo que parece ser esencial para el mantenimiento del ciclo de transmisión de estas bacterias en la granja.

La contaminación por medio de las heces también parece ser importante en los pastos ya que se ha descrito una alta prevalencia en animales que se mantenían mucho tiempo en pastos (Harmon y col., 1992). Los animales eliminan *Strep. uberis* en heces contaminando los pastos y a su vez los animales consumirían esos mismos pastos. Este comportamiento epidemiológico también explicaría el por qué las zonas con alto tráfico de vacas se ha asociado con un mayor número y una mayor diversidad de *Strep. uberis* en comparación con las zonas con bajos niveles de paso de animales por lo que, especialmente en sistemas con pastoreo, las zonas de reunión o de paso de animales puede ser lugares con un alto riesgo de exposición a esta bacteria para los animales (Cullen y Little 1969; Zadoks y col., 2005b; Lopez-Benavidez y col., 2007). También se

encontraron mayores concentraciones de *Strep. uberis* en los pasillos de paso de vacas asociados con menor radiación solar, aireación y temperatura del suelo y en los más húmedos (Lopez-Benavides y col., 2005).

A pesar de que el comportamiento principal de *Strep. uberis* sea como patógeno ambiental, hay **indicios de la existencia de transmisión de *Strep. uberis* por contagio** y que este hecho no ocurre solamente de forma esporádica. Por ello si se considera que el *Staph. aureus* es más un patógeno contagioso que ambiental, lo contrario es verdad para el *Strep. uberis* (Zadoks, 2005). Las razones que llevan a considerar la existencia de contagios entre animales son:

- En estudios moleculares se ha observado la existencia de IIM por cepas indistinguibles de *Strep. uberis* en diferentes vacas del mismo rebaño e incluso la predominancia de ciertas cepas en algunos rebaños (Baseggio y col., 1997; Phuektes y col., 2001; Khan y col., 2003; Zadoks y col., 2003; Coffey y col., 2006). Phuektes y col. (2001) encontraron que la misma cepa predominaba en uno de los rebaños estudiados durante dos lactaciones. Esto podría ser resultado de la incapacidad de la técnica aplicada para diferenciar cepas muy relacionadas, de la infección de muchos animales desde una fuente ambiental común, de una sobrepresentación de una cepa en el ambiente o a la adaptación del hospedador a una subpoblación de *Strep. uberis*. Pero también podría ser resultado de diferencias entre cepas en su virulencia patógena o en su capacidad de producir mamitis crónicas, lo que haría que las más patógenas fueran más fácilmente detectables o las que producen IIM de más larga duración es más factible la transmisión entre animales (Zadoks y col., 2003, Zadoks y Schukken, 2006). En estudios realizados en Nueva Zelanda, varias cepas frecuentemente aisladas en el ambiente no lo fueron entre los aislados causantes de mamitis (Pullinger y col., 2006; Lopez-Benavides y col., 2007), lo cual es un argumento en contra de que la predominancia ambiental de una cepa sea una total explicación para la predominancia de ciertas cepas entre los aislados bovinos. Esta participación en las IIM de un limitado número de cepas es aceptado como evidencia de la naturaleza contagiosa de *Strep. agalactiae* y *Staph. aureus* (Lam y col., 1996; Baseggio y col., 1997; Wang, y col., 1999).
- Por métodos moleculares se ha observado que las cepas de distintos cuarterones de un mismo animal suelen ser las mismas (Phuektes y col., 2001; Zadoks y col., 2003).

Además, Adkinson y col. (1993) encontraron que la incidencia de las infecciones en múltiples cuarterones de una misma vaca parecían estar relacionada con la distancia entre las respectivos puntas de pezones (mayor en diagonal, luego entre los posteriores y por último entre los anteriores). No se puede descartar de que esto sea debido a una exposición ambiental común de los cuarterones de una vaca, sin embargo se ha observado que la infección de un cuarterón suele estar precedida por la infección de otros cuarterones de la misma vaca y es improbable que diferentes cuarterones estén expuestos a la misma fuente ambiental en dos momentos diferentes (Zadoks y col., 2003).

- Los modelos matemáticos mostraron que la prevalencia de infecciones ya existentes de *Strep. uberis* son predictores de la incidencia de nuevas infecciones (Zadoks y col., 2001).
- Han sido documentadas infecciones subclínicas y crónicas por *Strep. uberis* (Oliver y col., 1998; Wang y col., 1999; Zadoks y col., 2003). Las mamitis subclínicas pueden escapar del sistema de control (dado que son más difíciles de detectar) y no suelen ser tratadas. Esto puede conllevar a una larga duración de la infección y, por tanto, que estas IIM pueden dar origen a contagios de otros animales.
- La transmisión en el momento del ordeño ha sido sugerida (Hill, 1988; Adkinson y col., 1993; Peeler y col., 2000). En un brote, la máquina de ordeño fue identificada como el fómite de la transmisión (Zadoks y col., 2003). Es ampliamente aceptado que el ordeño tiene un importante papel en la diseminación de *Staph. aureus* (O'Shea, 1985). Zadoks y col. (2003) proponen que este hecho también podría ocurrir en el caso de *Strep. uberis* ya que ha sido aislado de pezoneras después del ordeño de cuarterones infectados y también después del subsiguiente ordeño con cuarterones no infectados. También factores de ordeño como la presión de vacío han sido asociadas con la tasa de incidencia de mamitis clínicas por *Strep. uberis* (Barkema y col., 1999), lo cual posiblemente se deba al daño en la punta del pezón y por tanto sobre la primera barrera defensiva de la glándula mamaria.
- Se han descrito casos de brotes de mamitis por *Strep. uberis* (Zadock y col., 2003), sugiriendo que estos casos pueden ser debidos a animales no tratados que actúan como fuente de infección.

Hay controversia acerca de la importancia relativa de la vía contagiosa, así se ha observado que en la mayoría de los casos, no se aislaba la misma cepa en los diferentes cuarterones de un mismo animal (Mc Dougall y col., 2004; Pullinger y col., 2007). Otros autores han propuesto la existencia de cepas con diferente comportamiento. Así Zadoks y col (2003) encontraron dos subpoblaciones de *Strep. uberis*: una que engloba la mayoría de los tipos aislados de leche y del ambiente y las infecciones ocurren durante todo el periodo de lactación o secado y son frecuentemente de corta duración y una segunda subpoblación que incluyen dos tipos de cepas que causan predominantemente infecciones subclínicas y de curso crónico que se transmiten vaca a vaca durante el ordeño. Esto explicaría el éxito alcanzado por algunos programas en el control basados en evitar la diseminación vaca a vaca (Neave y col., 1969; Robinson y col., 1985).

La discusión sobre la transmisión contagiosa o ambiental se ha trasladado a la discusión sobre la potencial adaptación al hospedador de *Strep. uberis* (Zadoks, 2005; Ward y col., 2009). La adaptación al hospedador ha sido interpretada como “comportamiento similar a *Strep. agalactiae*”, es decir con presentación predominante en forma de mamitis crónicas o subclínicas, con una débil respuesta al tratamiento posiblemente debido a la supervivencia de la bacteria dentro de las células mamarias (aunque esto último está fuertemente debatido) y con posibilidad de transmisión de vaca a vaca. Por el contrario el “comportamiento como *E. coli*” se caracteriza con mamitis clínicas transitorias con buena respuesta al tratamiento y sin transmisión a otras vacas (Zadoks, 2005). El análisis del genoma de la cepa de referencia *Strep. uberis* O140J, ha permitido la identificación de múltiples elementos genéticos que permiten al *Strep. uberis* adaptarse para sobrevivir en el intestino, el ambiente y la ubre (Ward et al., 2009). La comparación de 10 cepas “supuestamente adaptadas al hospedador” y 10 cepas “oportunistas” con el genoma de referencia permitió la identificación de regiones genómicas que podría estar asociadas con la adaptación al hospedador, pero su papel y relevancia todavía no se han aclarado (Lang y col., 2009).

Se ha descrito una **variación estacional** en la presentación de las infecciones por *Strep. uberis*. En general se han observado diferencias estacionales, con una mayor prevalencia o frecuencia relativa de aislamiento de *Strep. uberis* en verano (Holanda, Bakema, 1999; Noruega, Østeras y col., 2006), primavera o invierno (Italia, Ferguson y col. 2007) o invierno (EEUU, Makovec y Ruegg, 2003; Nueva Zelanda, Lopez-Benavides y col., 2005), en muchos casos

asociados a la época que los animales son mantenidos en pastos. Se debe considerar que en muchos de estos estudios se han englobado como estreptococos diferentes a *Strep. agalactiae* y no como especie aislada. Sin embargo en estudios realizados en Finlandia no se observó una clara tendencia estacional (Koivula y col., 2007).

Esta variación podría ser debida a varias causas:

- Una menor o mayor carga ambiental de *Strep. uberis* en el tiempo puede influir en la contaminación del extremo del pezón. Esta tendencia estacional podría ser debida a una variación en la contaminación a partir de las heces de los animales, a la variación de las condiciones ambientales que afectan a la supervivencia y multiplicación del microorganismo o a variaciones de manejo que faciliten o dificulten la contaminación ambiental. Así se debe considerar varios aspectos:
 - Aunque Kruce y Bramley (1982) observaron una eliminación persistente de *Strep. uberis* en heces, otros estudios han encontrado que no sucede así. Zadoks y col., (2005b), estudiando muestras del ambiente de vacas secas en granjas de EEUU observaron diferencias en el porcentaje de muestras de heces positivas en el tiempo, siendo significativamente mayor en el período de mayo a septiembre (época de pastoreo), mientras que no se observaron diferencias entre los momentos de secado y parto.
 - Se ha observado una mayor presencia de *Strep. uberis* en el ambiente en épocas de altas temperaturas y humedades asociadas con mayor incidencia de mamitis clínicas por *Strep. uberis* en zonas de pasto (Buddle y col., 1988; Lopez-Benavides y col., 2005). Los efectos estacionales en las poblaciones bacterianas en la cama son más importantes en las regiones donde existe una gran variación de temperaturas durante el año. En general el impacto de la cama en la exposición de las vacas en estabulación confinada disminuye durante los meses fríos y aumenta con las temperaturas y la humedad.
 - En los estudios realizados en Nueva Zelanda encontraron que la contaminación de los pezones era intermitente durante la lactación y más frecuente en el periodo de secado (Lacy-Húlburt y col., 2006). Esto podría ser debido a diferencias en el manejo ya que

los animales salen al pasto en estas zonas en el periparto o a que en la lactación se realiza baño de pezones que puede disminuir su contaminación.

- Las instalaciones y las prácticas de manejo en los rebaños contribuyen a la contaminación de los materiales de la cama y la exposición de los pezones a mamitis por estreptococos ambientales (Smith y Hogan, 1993). Las IIM por *Strep. uberis* están asociadas a malas condiciones de higiene en el establo, especialmente con paja húmeda (Bramley, 1982; Barriet y col. (2005)). La ventilación de los establos es esencial para moderar los efectos del calor y la humedad en las épocas de estabulación (Hogan y Smith, 1998). En general se considera que las vacas en pastos tienen un menor riesgo de infección por *Strep. uberis* que el vacuno estabulado. Sin embargo, *Strep. uberis* ha sido aislado de pastos muy utilizados en un número similar a los obtenidos en materiales de cama (Harmon y col., 1992) y los mayores picos de incidencia de *Strep. uberis* se observan durante el periodo de pastoreo en verano en países como Holanda donde pasan el resto del año estabulados (Bakerna, 1999). Las mamitis son más frecuentes en condiciones de pastos sobreexplotados o utilizados en periodos de lluvias donde se pueden simular las condiciones del ganado estabulado. Esto explicaría que en Nueva Zelanda, a pesar de que los animales son estabulados durante cortos periodos de tiempo, *Strep. uberis* es uno de los patógenos inductores de mamitis más importantes (Williamson y col., 1995; Pankey y col., 1996).
- El material de cama puede soportar el crecimiento de *Strep. uberis* y se ha aislado en gran cantidad de camas utilizadas por el ganado (Bramley, 1982). Se ha asociado frecuentemente altas incidencias de mamitis por *Strep. uberis* con camas a base de material orgánico, principalmente la paja la cual es un buen sustrato para la multiplicación de *Strep. uberis* (Hogan y col., 1989; Ward y col., 2002). Se considera que las cargas bacterianas son menores en material inorgánico que en orgánico (Bramley y Dodd, 1984). Sin embargo las cantidades de *Strep. uberis* en cama de arena aumentan con el nivel de contaminación orgánica (Hogan y col., 1989). Dentro de las camas orgánicas las poblaciones son mayores en paja y menores en materiales basados en madera (serrín y virutas) en los cuales suele predominar las bacterias gran negativas (Rendos y col., 1975). Esto es particularmente verdad para la paja,

aunque una paja bien mantenida puede ser más limpia que otra que no lo es. Hay poca evidencia de la eficacia de los acondicionadores que se añaden en la cama para poder limitar las poblaciones bacterianas (Hogan y col., 2007).

- Mayor susceptibilidad de los animales. Se ha indicado que la mayoría de las mamitis clínicas por *Strep. uberis*, tanto en novillas como adultas, ocurre en la primera semana post parto (Parker y col., 2007) o periparto (Williamson y col., 1995; Pankey y col. 1996; Jayarao y col., 1999; Silva y col., 2005; Lopez-Benavides y col., 2006) y que existe un aumento de incidencia de estas IIM durante el inicio o pico de lactación debido a la depresión inmunitaria resultado del balance energético negativo (Zadoks y col., 2001b). En general, los animales de alta producción son especialmente susceptibles a la mamitis, posiblemente debido a la inmunodepresión debida al estrés fisiológico de la lactogénesis (Pyörälä, 2002). Sin embargo en muchos estudios la mayor contaminación en el periodo periparto no se ha podido descartar a que sea asociada más a las condiciones climáticas que al momento del periparto en sí. La combinación de alta exposición ambiental de *Strep. uberis* junto a factores fisiológicos como el edema de ubre o las pérdidas de leche (Waage y col., 1999, 2001) y factores de rebaño como el historial de mamitis pueden contribuir a las IIM por *Strep. uberis* en el período periparto. También se ha asociado el nivel de higiene de la vaca y el grado de lesión de las puntas de los pezones aumenta la susceptibilidad a mamitis clínicas por *Strep. uberis*, aunque menos que en el caso de *E. coli* (Breen y col., 2009).

Sin embargo, no siempre es fácil determinar cuál de los factores pueden tener mayor importancia al coincidir en el tiempo y existir interferencias entre ellos. Así en los estudios realizados en Nueva Zelanda, donde el ganado está en pasto todo el año, la mayor contaminación ambiental y el mayor número de mamitis clínicas por *Strep. uberis* son observadas en invierno coincidiendo con temperaturas altas y humedad del suelo alta (época de lluvias) y en la época donde también es más frecuente el periparto en la mayoría del ganado (Buddle y col., 1988; Lopez-Benavides y col., 2005).

Otras características que se asocian a una mayor susceptibilidad en las mamitis por *Strep. uberis* son: el número de parto, la fase de lactación y la genética (Zadoks y col., 2001b). Otros autores no han encontrado influencia en la edad en la tasa de incidencia por *Strep. uberis* (Buddle y col., 1988). En términos de reinfección, la tasa de mamitis en cuarterones que ya tuvieron una IIM por *Strep. uberis* fue 7,5 veces mayor que en cuarterones que no habían

padecido una infección anterior por este microorganismo (Zadoks y col., 2001b). Esto podría indicar que las infecciones por *Strep. uberis* no confieren inmunidad a la reinfección por el mismo patógeno. Por el contrario, Phuektes y col. (2001) encontraron que la prevalencia de las infecciones disminuía en comparación con la lactación anterior.

2.3.5. *Streptococcus dysgalactiae*.

Es un patógeno mamario puede causar problemas importantes en algunos rebaños. A pesar de su relativa frecuencia como causante de IMI se sabe poco sobre la epidemiología en las mamitis bovinas. Se considera un **patógeno mayor**, y a pesar de ser relativamente frecuente su aislamiento en IIM, no ha sido tan estudiado como en el caso de *Strep. uberis*.

La epidemiología de *Strep. dysgalactiae* es poco conocida (Zadoks y col., 2011). Su comportamiento epidemiológico es el de **un patógeno contagioso en algunos casos, mientras que en otros se comporta como un patógeno ambiental** (Smith y Hogan, 1995; Sommerhäuser y col., 2003), pero los orígenes ambientales no se han investigado (Zadoks y col., 2011). Los estudios moleculares, aunque realizados en un número limitado de explotaciones, han confirmado este doble comportamiento epidemiológico (Basggio y col., 1997; Wang y col., 1999).

En algunos países como Noruega se ha observado que su prevalencia se mantiene estable o incluso con cierto aumento (Whist y col., 2007). Las causas no son conocidas dado que se ha descrito un alto porcentaje de curación tras el tratamiento antibiótico en secado y en lactación (Rose y col., 2003).

Las lesiones en los pezones se han asociado con las IIM por *Strep. dysgalactiae* (Guélat-Brechbuehl y col., 2012) y se confirma que frecuentemente son colonizadas por estafilococos y *Strep. dysgalactiae* (Shearer y col., 2004). Se ha observado una fuerte correlación en la incidencia de mamitis clínicas y factores de riesgo comunes entre las IIM por *Staph. aureus* y *Strep. dysgalactiae* y el hecho contrario entre *Strep. dysgalactiae* y *Strep. uberis* (Barkema y col., 1999). Se ha observado que se incrementa la prevalencia con la edad de los animales (Østeras y col., 2006)

En general se han observado **diferencias estacionales**, con una mayor prevalencia o frecuencia relativa de aislamiento de *Strep. dysgalactiae* en primavera, al final de la época de estabulación (Noruega, Østeras y col., 2006; Finlandia, Koivula y col., 2007).

2.3.6. Otros estreptococos, aerococos, enterococos y lactococos.

En este grupo se encuadran especies pertenecientes a diversos géneros con baja frecuencia de aislamiento. La mayoría de los trabajos los consideran como un único grupo donde se incluyen todos los cocos Gram positivos salvo *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* y *Strep. uberis*. Por ello la información sobre el comportamiento de estas infecciones es muy escasa.

En este grupo las especies que han sido aisladas en IIM son: *Strep. pneumoniae*, *Strep. canis*, *Strep. equi*, *Strep. salivarius*, *Strep. porcinus*, *Strep. mitis*, *Strep. oralis*, *Strep. sanguinis*, *Strep. sacharolyticus*, *Strep. equinus*, *Strep. alactolyticus*, *Strep. acindominimus*, *Strep. gallolyticus* y *Strep. pluranimalium*, entre otros (Watts, 1988; Devriese et al., 1999; Wyder y col., 2011). *Aerococcus viridans* (*A. viridans*) también se relaciona con mamitis bovinas pero no se considera completamente definida su importancia como patógeno mamario (Devriese et al., 1999; Zadoks et al., 2004). Sin embargo, Wyder y col., (2011) observaron en un estudio realizado sobre 40 rebaños que, al contrario de lo que ocurría en el caso de *Lactococcus* spp, los RCS de muestras donde se aisló *A. viridans* y estreptococos del grupo Viridians no se diferenciaban de los valores obtenidos en las muestras con cultivo negativo.

Entre los enterococos los más frecuentemente aislados en IIM se incluyen *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus saccharolyticus* y *Enterococcus casseliflavus* (Petersson-Wolfe y col. 2008; Østerås, y col., 2006). Entre los lactococos más comunes se nombran *Lactococcus lactis* y *Lactococcus garviae* (Devriese et al., 1999). Existe escasa información disponible sobre la capacidad patógena y la epidemiología de las especies de enterococos y lactococos en las mamitis (Zadoks y col., 2011). Aunque las mamitis por enterococos son poco frecuentes, se han descrito brotes de mamitis causados estos patógenos en rebaños concretos (Todhunter y col., 1995). Petersson-Wolfe y col. (2008) demostraron que los enterococos aislados de IIM en una explotación eran diferentes genéticamente, coincidiendo con su probable origen fecal y su comportamiento ambiental. En un trabajo realizado por Guélat-Brechbuehl y col. (2012) por su parte, teniendo en cuenta el RCS de las muestras en las

que se aislaron definieron como patógenos menores al grupo SLE (lactococos, enterococos y estreptococos diferentes a *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* y *Strep. uberis*).

2.3.7. *Escherichia coli*.

E. coli se considera un **patógeno mayor**, dado que generalmente se manifiesta con síntomas clínicos. Las características clínicas y la evolución de las mamitis por *E. coli* varían desde mamitis leves, en la que las vacas solamente tienen signos clínicos locales en la ubre y la duración de la infección es corta, hasta presentaciones muy severas o incluso fatales (Burvenich y col., 2003). En las mamitis clínicas por *E. coli* es típica la aparición repentina, que conlleva cambios en la apariencia de la leche, que primero se vuelve más serosa y amarilla y más tarde presenta coágulos y se espesa. A pesar de que *E. coli* es el patógeno más frecuentemente aislado en mamitis sobreagudas (60-70%), solo un 10% del total de las infecciones por esta bacteria presentan síntomas generales y, por lo tanto, su fama de producir mamitis sobreagudas es exagerada (Hogan y col, 1989a).

En estos casos sobreagudos el RCS experimenta un acusado aumento, además, la ubre aparece dura e inflamada y el animal presenta signos sistémicos, que generalmente incluyen aumento de la temperatura y de la frecuencia cardíaca, reducción del ritmo de las contracciones ruminales, pérdida del apetito, depresión y caída de la producción de leche. En infecciones experimentales los primeros signos observados son los locales aproximadamente 8h después de la infección y la fiebre y los otros signos sistémicos alcanzan el máximo a las 12 horas (Hirvonen y col., 1999). En mamitis leves o moderadas, los síntomas sistémicos desaparecen en 48 horas y los signos locales en 7 días (Hirvonen y col., 1999). En los casos graves, las vacas pueden morir o prolongarse mucho los síntomas generales incluida la pérdida de producción (Hirvonen y col., 1999). En infecciones experimentales, se puede detectar *E. coli* y sus endotoxinas simultáneamente en leche hasta 5-7 días después de la inoculación (Pyörälä y col., 1994). La bacteriemia o endotoxemia suceden excepcionalmente y en casos muy graves (Wenz y col., 1999, 2001). Las endotoxinas se detectan esporádicamente en sangre de vacas con mamitis experimentales por *E. coli* por lo que los síntomas sistémicos parecen explicarse más por la liberación de mediadores de la inflamación que por la acción de las propias endotoxinas (Burvenich y col., 2003). Las infecciones suelen tener corta duración en el curso de la lactación (media menor a 10 días), en tanto que es relativamente raro que las infecciones crónicas se

prolonguen más de 90 días (Todhunter y col., 1991b). Sin embargo, en algunos rebaños también se ha documentado un porcentaje importante de infecciones crónicas (Hogan y col., 1989b).

La alta frecuencia de casos clínicos y de corta duración de estas IIM implican que el RCS de tanque no es un buen indicador de la prevalencia de la enfermedad causada por estas bacterias (Hogan y col., 1989b). Se han observado importantes variaciones en la duración de la infección experimental según las cepas y dosis utilizadas. La mayoría de los casos de mamitis por *E. coli* terminan con la muerte del patógeno o del hospedador. Sin embargo, se han encontrado casos de mamitis clínica por *E. coli* recurrentes que conllevan considerables pérdidas económicas (Lam y col., 1996; Bar y col., 2007). Los animales con episodios recurrentes clínicos suelen presentar síntomas leves (Wenz y col., 2006). Estos casos recurrentes se podrían deber a episodios repetidos de infección y curación (por un incremento de la susceptibilidad a la infección) o a infecciones persistentes con episodios clínicos o subclínicos alternantes. Estudios de tipificación de cepas han confirmado la existencia de ambos mecanismos, observándose que según el caso a lo largo del tiempo se aíslan tanto las mismas cepas como cepas diferentes de un mismo cuarterón (Döpfer y col., 1999; Bradley y Green, 2001; Dogan y col., 2006; Zadoks y col., 2011).

Si se considera el hecho de que no se han encontrado factores de virulencia específicos que diferencien las cepas en su capacidad de causar mamitis, se puede atribuir la gravedad de la infección, desde leve a fatal, a las características del hospedador (Burvenich y col., 2003). En las vacas de alta producción, la mayoría de las infecciones por *E. coli* se manifiestan clínicamente al inicio de lactación, espacialmente cuando hay una inmunodepresión por deficiencias metabólicas (Suriyasathaporn y col., 2000^a; Burvenich y col., 2003) o en animales con RCS extremadamente bajos (Suriyasathaporn y col., 2000^b; Peeler y col., 2003). Las vacas en el periparto o en el inicio de la lactación muestran signos más marcados y con frecuencia se producen muertes (Hill y col., 1979). Algunos casos de mamitis clínicas por *E. coli* observados durante la lactación son, en realidad, el resultado de infecciones que han tenido lugar en el periodo seco (Bradley y Green, 2000), lo que supone que éste puede ser una etapa más crítica para el control de las mamitis por *E. coli* que el período de mayor producción.

E. coli es un normal habitante del tracto gastrointestinal en todos los animales de sangre caliente. Si consideramos que *Strep. agalactiae* puede representar el patógeno contagioso por excelencia, *E. coli* podría ocupar el papel del principal **patógeno ambiental** ya que no existen evidencias claras de transmisión de vaca a vaca (Zadoks y Fitzpatrick, 2009).

Esta afirmación se basa en los datos epidemiológicos y estudios de tipificación de cepas que han mostrado una gran heterogeneidad entre los aislados que causan mamitis dentro de las granjas (Nemeth y col., 1994; Lam y col., 1996). Entre las cepas de *E. coli* aisladas de heces y leche no se han observado diferencias por lo que se considera que las heces son la fuente principal de infección (Nemeth y col., 1994). Sin embargo se ha propuesto la posibilidad de que en algún caso tenga lugar la transmisión entre cuarterones ya que se ha observado que del 8,5% al 28% de las cepas eran las mismas cuando se producía la infección posterior en otro cuarterón de un mismo animal (Döpfer y col., 1999; Bradley y Green, 2001). La transmisión vía sistémica se considera muy improbable y tampoco se sabe si esta transmisión ocurre de forma indirecta o manera indirecta como resultado de una fuente común de exposición desconocida.

Se han observado **variaciones estacionales** en las tasas de nuevas infecciones y casos clínicos por coliformes, siendo mayores en los meses de verano en las vacas confinadas en establos (Todhunter y col., 1991b). En algunos estudios no se observan diferencias estacionales (Italia, Ferguson y col. 2007), pero en la mayoría de ellos se describe mayor prevalencia o frecuencia relativa de aislamiento de *E. coli* en verano (EEUU, Makovec y Ruegg, 2003; Finlandia, Koivula y col., 2007). El aumento de las tasas de mamitis clínicas coincide con el aumento del recuento de bacterias Gram negativas en la cama durante los meses de calor. Cuando las vacas se estabulan en corrales secos o en pastoreo, las tasas de mamitis clínicas son generalmente elevadas durante los periodos más húmedos. Se ha pensado que el estrés por calor podría ser un factor de riesgo de la mamitis coliformes, pero es difícil demostrarlo dada la imposibilidad de disponer de animales controles para establecer comparaciones (Hogan y Smith, 2003).

Se ha asociado las IIM por *E. coli* además de la ya comentada fase de lactación, con **otros factores de riesgo**. En general las vacas más viejas tienen una mayor tasa de mamitis clínicas causadas por Gram negativos comparado con las primíparas, teniendo más riesgo las hembras más viejas que paren en los meses de verano (Smith y col., 1985). Un mal diseño del establo o mal manejo de los rebaños de leche de vacuno pueden también ser factores predisponentes para las mamitis por coliformes (Ward y col., 2002).

2.3.8. *Klebsiella* spp.

Las especies más comunes de *Klebsiella* spp. que causan mastitis bovinas son *K. pneumoniae* y, en menor medida, *K. oxytoca*. La primera es, después de *E. coli*, la especie coliforme más frecuentemente aislada en IIM y mastitis clínicas (Hogan y Smith, 2003). Además, las mastitis por *Klebsiella* spp. se consideran, junto a las debidas a micoplasmas, las IIM más importantes desde el punto de vista clínico en EEUU (Hoe y Ruegg, 2005; Munoz y col., 2007; Paulin-Curlee y col., 2007).

Dado a que se asocian principalmente a mastitis clínicas, **se consideran patógenos mayores**. Las vacas con infecciones por *Klebsiella* spp. suelen tener más probabilidad de morir o ser sacrificadas que en otros tipos de mastitis (Erskine y col., 2002) y se considera que tiende a provocar incluso mastitis más graves que las originadas por *E. coli* (Erskine y col., 2002). Las infecciones por *Klebsiella* spp. responden pobremente a los tratamientos antibióticos (Roberson y col., 2004). La duración de la infección por *K. pneumoniae* tiene una media de 21 días (Smith et al, 1985), superior a la de las IIM por *E. coli* (Todhunter y col, 1991b). Las infecciones crónicas causadas por *K. pneumoniae* de más de 90 días de duración, al igual sucede con *E. coli*, son relativamente raras.

Se dispone de escasa información sobre la heterogeneidad de las cepas que producen IIM y su comparación con muestras ambientales que ayuden a conocer las rutas de transmisión (Zadoks y col., 2011). Sin embargo, se consideran **patógenos ambientales**. Se piensa que la diseminación fecal de *Klebsiella* spp. contribuye a la exposición y a la incidencia de mastitis en rebaños lecheros de USA (Munoz y col. 2006, 2007). Por el contrario, la presentación en forma de brotes de mastitis por *Klebsiella* spp. solamente están documentados en Europa y se asocian predominantemente con camas de serrín contaminadas (Vecht y col., 1987; Sampimon y col., 2006). La eliminación fecal de *Klebsiella* spp. favorece la contaminación de los animales y de su ambiente. La exposición de las puntas de los pezones a *Klebsiella* spp. se produce por el contacto no solo con la cama sino también de otras fuentes como pasillos contaminados (Zadoks y col., 2011).

Klebsiella spp. es muy común en la piel del ganado (Munoz y col., 2008). Los estudios sobre aislamientos ambientales han dado resultados contradictorios. Dentro del mismo tipo de muestras de heces, rumen, agua de bebida y ambiente de granja, hay con frecuencia cepas heterogéneas, lo cual hace que sea más difícil determinar el origen de las cepas que realmente causan mastitis

(Munoz y col., 2007). Camas a base de material de madera (serrín y virutas) intervienen frecuentemente como fuente de *Klebsiella* spp. y están vinculadas con brotes de mamitis (Newman y Kowalski, 1973; Sampimon y col., 2006). El crecimiento de *Klebsiella* spp. es también observado en colchones sin virutas u otro material de cama (Kristula y col., 2008). Se ha encontrado, al igual que ocurre con *E. coli*, una gran heterogeneidad entre las cepas aisladas en las vacas de un mismo rebaño (Paukub-Curlee y col., 2007), aunque también se han detectado que ciertas cepas afectan a varias vacas de una explotación (Munoz y col., 2007). Parece que la explicación más plausible a este hecho es que la excreción de leche por vacas infectadas de lugar a una contaminación de la cama con un gran número de colonias de una sola cepa, más que la intervención de transmisión directa, aunque ésta no pueda ser descartada (Munoz y col., 2007).

Sin embargo se han observado brotes en granjas que usaban arena como cama lo cual se ha atribuido a la **eliminación fecal** de *Klebsiella* spp. en animales sanos adultos (Munoz y col., 2006). Dado que no se ha encontrado *Klebsiella* spp. en material antes de su utilización como cama, se piensa que la contaminación es debido a su eliminación de las heces o por la leche de animales infectados (Munoz y col., 2007). *Klebsiella* spp. se encuentra en suelo, alimento, agua y tracto intestinal de los animales. La eliminación fecal de *Klebsiella* spp. no parece estar asociada con un estado de portador crónico sino más bien con una ingestión frecuente y alta rotación de una gran variedad de cepas de *Klebsiella* spp. que pasan a través del tracto gastrointestinal (Munoz y Zadoks, 2007). En el trigo, maíz y alfalfa, *K. pneumoniae* puede actuar como endófitos que ayudan a la planta a absorber nitrógeno y la bacteria pueden encontrarse en tallos y hojas de plantas en ausencia de contaminación fecal. La ingestión oral de *Klebsiella* spp. podría, provenir (Fig. 3) de su presencia en o sobre granos integrantes de alimentos o por a la contaminación de comida o agua por heces (Zadoks y col., 2011). Zadoks y col. (2011) observaron diferencias en la distribución de aislamiento entre las especies, así *K. oxytoca* fue más frecuentemente aislada en el suelo y en granos de alimentos y menos en heces, mientras que *K. pneumoniae* se encontraba preferentemente en rumen y heces y pasillos.

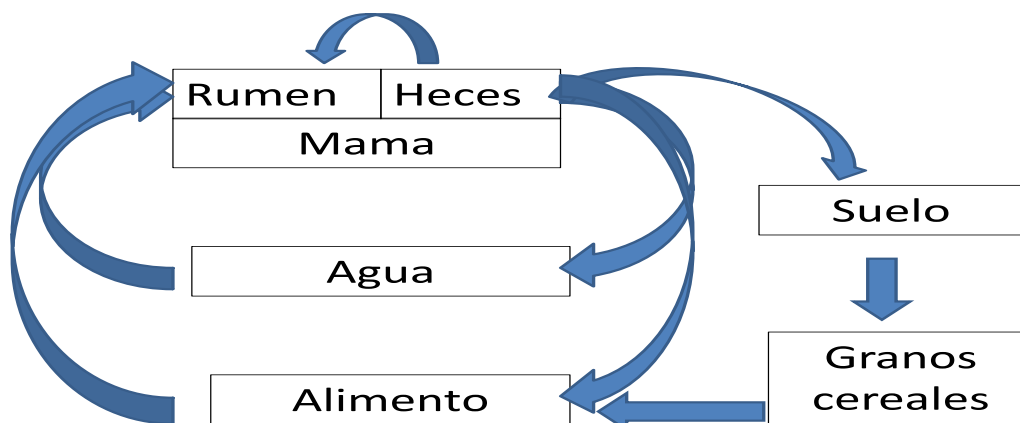


Figura 3. Vías de transmisión oro-fecal de *Klebsiella* spp. en rebaños de vacuno de leche. (1) Transmisión directa, (2) transmisión indirecta mediante agua o alimentos contaminados sin implicación del ambiente, (3) transmisión indirecta por medio de alimentos contaminados en el ambiente. (Zadoks y col., 2011).

En un estudio reciente (Zadoks y col., 2011) se observó que *Klebsiella* spp. se encuentra habitualmente en el suelo, agua, bebederos, contenido ruminal, heces, cama, pasillos y corrales de espera de las granjas. Sin embargo, los resultados obtenidos sugerían que la contaminación del alimento era más el resultado de una contaminación externa que de la colonización endofítica de los granos de alimento. La transmisión oro-fecal debido a la contaminación de los animales, alimento y agua parece más importante para el mantenimiento de la *Klebsiella* spp. en el ecosistema de granja que la introducción externa como puede ser el material de cama o los alimentos (Zadoks y col., 2011).

A pesar de disponerse de poca información sobre la variación estacional de las IIM por este patógeno ya que en la mayoría de los estudios no es considerada de una forma independiente sino incluida en el grupo de coliformes, se describe una mayor prevalencia o frecuencia relativa de aislamiento en verano (EEUU, Makovec y Ruegg, 2003).

2.3.9. Otros microorganismos Gram negativos.

A demás de los ya comentados existen diferentes microorganismos Gram negativos que han sido implicados en IIM, aunque normalmente con mucha menor frecuencia. Por esta razón son pocos los trabajos que se refieren a alguno de los aspectos de las mamitis por ellas producidas. Se

han descrito explotaciones donde se ha observado predominio de alguno de los “otros Gram negativos” como *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, y *Enterobacter cloacae*, spp. (Schukken y col., 2011). Observaciones de campo y experimentales han llevado a sugerir que entre los Gram negativos que provocan IMI, *Klebsiella* spp. son las que producen casos más graves, seguidas de cerca por *E. coli* y con mucho más alejados en importancia clínica los casos producidos por *Serratia* spp. y *Enterobacter* spp (Schukken y col., 2011).

Las infecciones por *Serratia* spp. suelen dar lugar menos frecuentemente síntomas clínicos y los casos clínicos son menos severos que los producidos por *E. coli* (Todhunter y col., 1991b; Hogan y Smith, 1997). La especie más implicada en mastitis es *S. marcescens* y, en segundo lugar, *S. liquefaciens* (Todhunter y col., 1991a). Se han descrito brotes por este patógeno en granjas por el uso de un desinfectante como baño de pezones que había sido contaminado en la propia granja (van Damme, 1982). *Serratia* spp. también tiende a producir infecciones más crónicas que *E. coli*, con una duración media de >160 días y se ha descrito casos que han persistido varias lactaciones (Hogan y col., 1989). Al igual que en el caso de *E. coli*, se ha indicado que pueden alternarse episodios clínicos y subclínicos (Bowman y col., 1986; Di Guardo y col., 1997). Se han descrito fuentes potenciales de *Serratia* spp. el suelo, plantas, alimentos, agua, ambiente de la cama y de sala de ordeño (Kamarudin y col., 1996). No se ha demostrado que las bacterias coliformes adquieran resistencia a los desinfectantes comunes en la higiene del ordeño, sin embargo *Serratia* spp. sí suelen ser resistentes a la actividad antibacteriana de la clorhexidina (Lannigan y Lawrence, 1989), por lo que se ha asociado brotes de *S. marcescens* con el uso de desinfectantes con clorhexidina contaminados en la propia granja (Muellner y col., 2011).

Las IIM causadas por *Pseudomonas aeruginosa* suelen ser de curso crónico (incluso persistir varias lactaciones), pero también pueden dar lugar a cuadros agudos o subagudos o permanecer de forma subclínica (Hogan y col., 1989). Generalmente vive saprófita en suelo y agua y es un patógeno oportunista. El agua y baños de pezones o tratamientos contaminados (normalmente mezclas de varios medicamentos realizada en la propia explotación) o administrados con poca higiene son la principal fuente de infección de este patógeno en las granjas (Bannerman y col., 2005). Se considera que los animales con inmunodepresión o con malnutrición son más susceptibles a la infección, por lo que se asocia más a animales con alta producción al inicio de lactación, aunque en casos de brotes por exposición de una fuente de contaminación (agua de limpieza de las ubres, baños de pezones contaminados, etc.) puede afectar a cualquier animal. La

forma crónica puede presentar recidivas de tipo clínico. En casos de altas exposiciones al patógeno puede darse la muerte del animal con mamitis gangrenosa. Una de las principales características de este patógeno es que presenta un amplio espectro de resistencias a antibióticos dado que producen un biofilm que reducen su eficacia (Bannerman y col., 2005). *Pseudomonas aeruginosa* también suele ser resistente a la actividad antibacteriana de la clorhexidina (Lannigan y Lawrence, 1989).

En mamitis se ha citado bajas prevalencias por otros microorganismos Gram negativos entre los que se incluyen especies de los géneros *Pasteurellas* spp., *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp., *Raoultella* spp. (Watts, 1988b; Wilson y col., 1997). *Enterobacter cloacae* se ha descrito como agente de mamitis menos graves en comparación con otros coliformes (Schukken y col., 2011).

2.3.10. *Corynebacterium* spp.

C. bovis es la especie de este género más frecuentemente aislada en mamitis bovinas. Otras especies de este grupo aisladas en mamitis incluyen, entre otras, *C. renale*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. amylocolatum* y *C. minutissimum* (Watts, 1988). Sin embargo, en la gran mayoría de los estudios se asume que todos los corineformes aislados son *C. bovis* aunque en realidad no se realice pruebas de identificación a nivel de especie. Por esta razón, en estas condiciones, sería más correcto utilizar el término *Corynebacterium* spp.

Corynebacterium spp. es frecuentemente aislado de muestras de leche de cuarterones del ganado vacuno lechero, alcanzando porcentajes hasta del 86% de los cuarterones de algunas explotaciones (Bramley, 1975; Harmon y Langlois, 1986; Linde y col., 1989). Sin embargo, es considerado como un **patógeno menor** ya que generalmente provoca una ligera respuesta inflamatoria con RCS significativamente mayor que las muestras sin crecimiento y un ligero efecto negativo sobre la producción de leche (Bramley, 1975; Wilson y col., 1997; Brooks y col., 1983; Brooks y Barnum, 1984; Honkanen-Buzalski y col., 1984). A pesar de que normalmente su presencia es escasa en mamitis clínicas, sí se ha aislado en cultivo puro en un 3,55% a partir de muestras de mamitis clínicas (Bradely y col., 2007).

Se ha discutido si el aislamiento de *Corynebacterium* spp. a partir de muestras de leche se corresponde siempre con verdaderas IIM o si por el contrario son solo reflejo de una colonización del canal del pezón. Así, recientemente se han observado diferencias significativas en el

aislamiento de este microorganismo según el método de toma de muestras utilizado, siendo menor cuando se realizaba a través de cánulas que eran introducidas por el pezón que cuando se seguía el método más tradicional de toma de muestras (Besiga y col., 2011). Se ha demostrado por infecciones experimentales que *Corynebacterium* spp. puede causar verdaderas IIM (Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984), aunque se considera que en la mayoría de los casos la infección no llega a sobrepasar el canal del pezón (Packer, 1977; Brooks y Barnum, 1984; Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984). Debido a que se observó que el baño de pezones postordenado no eliminaba la colonización del canal del pezón por *Corynebacterium* spp., como si ocurre en el caso de *Staph. aureus*, se sugirió que la colonización de *Corynebacterium* spp. debería situarse más profundamente en el canal del pezón, a nivel de la roseta de Furstenberg (Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984).

Se considera un **patógeno mamario contagioso**. Pankey y col. (1985) por ejemplo, demostraron que, en condiciones de infección experimental el porcentaje de nuevas infecciones por *Corynebacterium* spp. eran cerca de 30 veces mayor que el de *Strep. agalactiae*. Aunque se han aislado *Corynebacterium* spp. en diferentes zonas corporales de la vaca, como el tracto reproductivo o piel del pezón, se considera que las IIM son el origen principal de infección (Pankey y col., 1985; Smith y Hogan, 1995).

En el inicio de lactación la prevalencia de las IIM por *Corynebacterium* spp. es baja, pero conforme avanza este periodo se aprecia su aumento progresivo (Counter, 1981; Oliver, 1988). Este hecho se debe a que los *Corynebacterium* spp. se muestran extremadamente contagiosos durante la lactación y posteriormente la infección persiste durante bastante tiempo (Rainard y Poutrel, 1982; Pankey y col., 1985). Así, cuando los *Corynebacterium* spp. han colonizado el pezón o la glándula mamaria se pueden asilar fácilmente durante un periodo prolongado, salvo la aparición ocasional de alguna muestra negativa (Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984).

El nivel de infección por *Corynebacterium* spp. ha servido como un buen indicador del grado de higiene del ordeño. Si bien, como ya se ha mencionado, el baño de pezones después del ordeño no elimina completamente la colonización del canal del pezón, sí evita la diseminación del microorganismo entre los pezones, con lo que se previene el aumento del nivel de infección de la explotación (Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984). En los rebaños donde no se realiza esta medida de control no es raro que *Corynebacterium* spp. se aísle en más del 60% de las muestras

de cuarterones, alcanzando hasta el 88% si tampoco se realiza tratamiento de secado. Sin embargo, aparece en muy baja proporción si se adoptan ambas medidas de control ya que con ellas la reducción de la prevalencia de infección se estima en el 50% en un año y del 90% en tres años de su aplicación (Bramley y col., 1976; Brooks y col., 1983; Pankey y col., 1985; Watts, 1988). No obstante, se han descrito casos de IIM por *C. bovis* en explotaciones que durante muchos años venían realizando estas medidas tradicionales de control de mamitis (Counter, 1981).

En las mamitis subclínicas causadas por *Corynebacterium spp.* no se observa aumento de prevalencia con la edad si se realiza regularmente tratamiento de secado y baño de pezones postordeño (Honkanen-Buzalski y col., 1984), pero sí se notaba un incremento significativo cuando no se ponían en práctica estas medidas (Brooks y col., 1983). La prevalencia de IIM por *Corynebacterium spp.* en los primeros meses de lactación es baja (Counter, 1981) e incluso disminuye, en ausencia de tratamientos de secado, en el periodo que va del final de lactación hasta el siguiente parto (Oliver, 1988) por razones todavía no bien conocidas. Se ha sugerido que durante este periodo seco, aumente la concentración de compuestos de la secreción de la vaca con efecto bactericida para los *Corynebacterium spp.* puede aumentar durante el período seco (Brooks y col., 1983). Así, Oliver y Juneja (1990) encontraron una mayor inhibición del crecimiento de diferentes cepas de *Corynebacterium spp.* en secreciones obtenidas durante la involución mamaria en comparación con leche. Sin embargo, se ha comprobado que ciertas cepas pueden persistir durante el período seco hasta la siguiente lactación (Sordillo y col., 1989), lo cual coincide con la presencia de cepas menos inhibidas en su crecimiento en secreciones del período seco (Oliver y Juneja, 1990).

2.3.11. *Trueperella pyogenes.*

T. pyogenes (*Arcanobacterium pyogenes*) puede causar mamitis clínica aguda supurativa en ganado vacuno que se denomina mamitis de secado o verano, en la que suele haber también otras bacterias anaeróbicas (principalmente *Peptococcus indolicus*) o aeróbicas (Packer, 1977). Se denomina así porque la infección se produce principalmente en período seco, aunque también afecta a novillas antes del primer parto, pero en muchos casos no suele ser detectada hasta el inicio de la lactación. Se asocia a mamitis con altos RCS (Malinowski y col., 2006), pérdidas de producción apreciables y un alto porcentaje de pérdidas de cuarterones (Waage y col., 2000). La mamitis en secado por *T. pyogenes* conllevan una gran pérdida de funcionalidad de la mama por

la sustitución del tejido epitelial glandular por tejido conectivo, lo que las convierte además en mamitis rebeldes al tratamiento antibiótico y en muchos casos obliga a la eliminación del animal. En la mamitis de secado la secreción tiene una apariencia similar al pus, con mal olor y con la aparición frecuente de fístulas (Pyörälä, 1988).

La infección se produce principalmente en animales que no están en lactación y que pastan durante épocas del año con mayor actividad de la mosca *Hydrotaea irritans* que se ha demostrado actúa como vehículo de infección (Bramley y col., 1985). Por ello se asocia con épocas más calurosas. Se han observado en las zonas donde se presenta, grandes variaciones de prevalencia a lo largo de los años. Dadas sus peculiaridades epidemiológicas no es fácil encuadrarla en la clasificación de patógenos contagiosos o ambientales.

2.3.12. *Prototheca spp.*

El género *Prototheca spp.* incluye microalgas no clorofílicas unicelulares. Se ha descrito como causa de mamitis bovina en diversas zonas del mundo (Zadoks y col., 2011). Por métodos moleculares se ha diferenciados dos genotipos de *P. zoopfi* además de *P. balschkae* (antigua genotipo 3). *P. zoopfi* genotipo 2 es la que más frecuentemente se ha asociado con mamitis bovina, siendo esporádicos los aislamientos de *P. balschkae*. El genotipo 1 se ha asociado con el ambiente de las explotaciones, sin embargo no se aisló a partir de IIM (Zadoks y col., 2011). Se han descrito en muchos países casos esporádicos de IIM por este patógeno, pero en otros también se ha descrito como endémica o con existencia brotes que engloban gran número de animales (Osumi y col., 2008; Scaccabarozzi y col., 2008). Son varios los autores que consideran que la incidencia de esta infección está aumentado en el mundo y que la conceptúan como una patología emergente (Osumi y col., 2008; Marques y col., 2010).

La mamitis por *P. zoopfi* se **relacionan muy poco con mamitis clínicas** y aunque se han descrito casos con alteración de la leche, lo que predomina es la forma subclínica. Los casos clínicos, en los que la secreciones acuosa con presencia de coágulos, se asocian al aumento del RCS y a disminución de la producción. La importancia de las mamitis causadas por este patógeno radica en que al no existir tratamiento efectivo y ante la persistencia de la infección se recomienda el sacrificio de los animales infectados (Scaccabarozzi y col., 2008; Marques y col., 2010).

Se considera un patógeno con doble comportamiento, **ambiental y contagioso** ya que si el ambiente es la fuente primaria de infección, las mamas infectadas intervienen a su vez como fuente de infección secundaria (Richi y col., 2010). Se asocian comúnmente con algunos hábitats naturales, especialmente ambientes húmedos que contengan abundante materia orgánica en descomposición. Se considera que en las explotaciones donde se presente la infección, cualquier material o equipo que tenga contacto con heces, agua o leche de los animales puede estar contaminado (Scaccabarozzi y col., 2008; Richi y col., 2010).

En cuanto a los **factores de riesgo**, la infección está más presente en explotaciones con alta prevalencia de levaduras y además se asocia generalmente con el uso indebido de medicamentos no indicados para su aplicación intramamaria o con la combinación de numerosos antibióticos, con la aplicación de selladores de pezones en el secado y con la reiteración en los últimos dos meses de 3 o más desplazamientos de abomaso (Pieper y col., 2012). A pesar de que se ha observado que la infección puede afectar a animales en todas las fases de la lactación y secado, la mayor susceptibilidad se presentó en las primeras semanas de lactación (Pieper y col., 2012).

2.3.13. Levaduras.

Las levaduras son organismos unicelulares que son ubicuarios en el ambiente. Aunque se trata de patógenos que normalmente se aíslan con escasa frecuencia a partir de IMI, la prevalencia de las IIM por hongos y levaduras varía mucho con los rebaños, pudiendo causar entre el 1-4% de las mamitis subclínicas y hasta un 25% de las mamitis clínicas (Richard y col., 1980). Es destacable el hecho de que en países como Italia se ha descrito un incremento inusual de casos tanto clínicos o subclínicos (Scaccabarozzi y col., 2011). Las levaduras más frecuentemente aisladas en IIM son las especies de *Candida* spp. En Italia, Fadda y col. (2013) utilizando métodos de identificación genotípicos en 142 cepas de levaduras aisladas a partir de IIM, identificaron 17 especies pertenecientes a los géneros *Candida* spp. (47.9%), *Cryptococcus* spp. (21.1%), *Trichosporon* spp. (19.7%), *Geotrichum* spp. (7.1%) y *Rhodotorula* spp. (4.2%); siendo *Candida famata* la levadura más frecuente y, en cambio, no se identificó en ningún caso *Candida albicans*.

Los animales afectados no presentan, normalmente, síntomas generales y los signos clínicos locales desaparecen completamente después de 3-4 semanas postinfección. En este sentido, cabe indicar que lo único que se observa es una disminución de la producción láctea y pérdida de consistencia del cuarterón después del ordeño (Richard y col., 1980). Se producen

frecuentemente curaciones espontáneas de la infección, sin embargo, algunas glándulas mamarias pueden continuar infectadas por estos microorganismos de 6 a 12 meses, estando afectado, por lo general, un solo cuarterón por vaca (Richard y col., 1980). Scaccabarrozzi y col. (2011) en un brote por *C. rugosa* encontraron que en 10 animales se observó curación espontánea mientras que 4 animales tuvieron que ser eliminados por presentar una infección crónica persistente. En este brote se consideró que la fuente primaria de la levadura fue la mezcla de alimento que posteriormente se pudo mantener en el rebaño tanto en el entorno de la vaca (piel, cama y agua) como en IIM persistentes.

Aunque se **consideran patógenos oportunistas** ya que producen enfermedad cuando fallan los mecanismos defensivos del animal, también se han relacionado con el uso incorrecto de jeringuillas, cánulas o preparados antibióticos contaminados (Scaccabarrozzi y col., 2011). También se consideran fuentes de infección la piel de la ubre, la leche de animales infectados, las manos del ordeñador, el equipo de ordeño, el suelo, alimentos contaminados y no se excluye que en algunos brotes la transmisión se produzca durante el ordeño (Scaccabarrozzi y col., 2011).

2.3.14. Otros microorganismos.

El género *Nocardia* se incluye en los actinomycetos. Aunque se conocen 50 especies de este género, frecuentemente *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova* y *N. brasiliensis* son los que se han aislado con más frecuencia a partir de IIM (Condas y col., 2013). La prevalencia de las IIM por este patógeno han ido en aumento en diversos países (Condas y col., 2013). Aunque se define como una infección granulomatosa crónica progresiva, se considera que la mamitis es la forma de manifestación más común. La importancia de esta infección reside en la escasa respuesta al tratamiento que hace aconsejable en muchos casos eliminar a los animales infectados.

Las mamitis por *Nocardia* spp. pueden ser procesos graves, con fibrosis difusa e induración de la ubre, que reducen mucho la producción de leche que además presenta grumos y que está acompañada de síntomas generales como anorexia y fiebre (Tarala y col. 1993).

Se considera una bacteria saprofita y muy ubicua de origen ambiental y no forma parte la flora normal de los mamíferos aunque puede localizarse de forma mecánica en la piel. Los brotes que afectan a varios animales suelen corresponderse con explotaciones con evidentes deficiencias en

sus condiciones de higiene y manejo, como también con la utilización de viales de tratamiento de secado contaminados o la administración no higiénica de tratamientos (Pisoni y col., 2008).

Las mamitis por *Mycoplasma spp.* son ocasionales en Europa (Blackburn y col., 2007; Tolboom y col., 2008), pero tienen una gran importancia en zonas como EEUU (González y Wilson, 2003; Fox y col., 2005).





III. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Área de estudio y toma de muestras.

Galicia es la región española con el mayor censo de ganado vacuno productor de leche dado que en ella se asientan el 53% de las granjas existentes en el país, lo que supone aproximadamente 350.000 vacas mayores de 2 años. En Galicia se produce el 35% de la leche que se obtiene en España, lo que equivale al 1,7% de la producción total de la Unión Europea. A lo largo del periodo de tiempo en que se desarrolló este estudio, se produjo una apreciable disminución de la media geométrica del RCS de tanque en las explotaciones gallegas desde 281,000 a 228,000 cel./ml. (LIGAL, datos propios no publicados). En el año 2009 el porcentaje de eliminación de animales adultos fue de un 19,4%, de los cuales el 15,6% lo fueron a causa de las mamitis (AFRICOR-Lugo, 2010).

Las granjas de leche están localizadas principalmente en zonas con una media de 650 m de altitud, con un bajo o moderado nivel de precipitaciones (<1500 mm/año) y temperaturas moderadas ($\bar{x} = 12.3$ °C). La época más lluviosa incluye los meses de noviembre a diciembre. Las temperaturas más elevadas se registran en verano (junio a agosto) y las más bajas en invierno (diciembre a febrero).

En esta región no se observa una tendencia estacional en relación a la época de partos. Hay varios parámetros de la población que han evolucionado durante el período de estudio. Las granjas de vacuno de leche que envían muestras de tanque para el control de calidad al LIGAL, de acuerdo con la obligación establecida en la normativa de la UE, pasaron de 18.104 en el año 2004 a 11.423 en el año 2011. Además se ha constatado un aumento de la media del tamaño de granja de 19 a 29 animales (AFRICOR Lugo, 2010) y se está produciendo una sustitución gradual de los establos de estabulación fija a libre.

En el estudio se incluyeron todas las muestras de cuarterones individuales enviadas al LIGAL para diagnóstico microbiológico recibidas desde junio de 2005 a septiembre de 2011 (76 meses). Las muestras las obtuvieron los veterinarios o el personal de las explotaciones. Se recogieron muestras de cuarterones en los que se observó signos clínicos o bien que fueron positivas al test de California durante los seguimientos de mamitis subclínicas realizados dentro de los programas de control.

3.2. Análisis microbiológico.

Las muestras de leche se analizaron siguiendo los métodos microbiológicos recomendados por el National Mastitis Council (Hogan y col., 1999). Se sembraron 0,01 ml de leche en sábana en una placa petri con medio agar-sangre (Becton-Dickson Microbiology, Franklin Lakes, NJ) incubándolas hasta el día siguiente a 35-37°C. Las placas se examinaron a las 24 y 48 horas de incubación (Fig. 4), en caso de ausencia de crecimiento las placas se mantuvieron en incubación hasta 5 días.



Figura 4. Aislamientos en medio Agar-sangre de *Streptococcus agalactiae* y *Trueperella pyogenes*.

Se consideró que una muestra era positiva desde el punto de vista microbiológico cuando presentaba al menos una unidad formadora de colonia (UFC) en el caso de *Strep. agalactiae* o *Staph. aureus* o cinco o más UFC en el caso de otros microorganismos. Cuando no se observaba crecimiento microbiano o si alguna de las condiciones anteriormente establecidas no se cumplían, la muestra fue considerada sin crecimiento. En el caso de aislamiento de dos microorganismos, solo se consideraron los definidos como patógenos mayores (especies diferentes a ECN o *Corynebacterium spp.*). Cuando el cultivo primario presentaba más de dos tipos de colonias las muestras fueron consideradas como contaminadas, excepto en el caso de que alguna de ellas fuera *Staph. aureus* o *Strep. agalactiae*.

La identificación primaria de los aislados se basó en la morfología de la colonia, tipo de hemólisis, tinción de Gram, prueba de la oxidasa y la prueba de la catalasa. Posteriormente, los aislados fueron identificados a nivel de especie usando el sistema VITEK 2 (bioMérieux, Hazelwood, MO, USA) (Fig. 5) con las siguientes tarjetas de identificación: GP-test kit (Cocos Gram-positivos), GN-test kit (Gram-negativos) y YST test kit (levaduras y *Prothoteca* spp.). Se siguieron de forma estricta los procedimientos recomendados por el fabricante. El resultado obtenido se consideró como aceptable cuando el nivel de confianza de la identificación obtenida era >85%. En el caso de *Corynebacterium* spp., los aislamientos solamente fueron identificados a nivel de género según el resultado del Gram y la catalasa. *Trueperella pyogenes*, Hongos y *Nocardia* fueron identificados según las características de las colonias en medio agar sangre, Gram, y Catalasa.



Figura 5. Equipo de incubación y lectura del sistema VITEK 2.

3.3. Recuento de células somáticas.

El término RCS se refiere a la concentración de los diferentes leucocitos y células epiteliales en un mililitro de leche. Actualmente, el recuento de células somáticas es ampliamente aceptado como método clásico para monitorizar el estado de salud de la glándula mamaria, puesto que generalmente un incremento en el nivel del RCS, indica un mayor grado de infección que además, suele ir asociado a una disminución de la producción láctea. Está demostrada la alta correlación de estos equipos automáticos con el recuento en microscopio

(método oficialmente reconocido de referencia), además de seguir un protocolo normalizado (ISO 13366-2/IDF 148-2).

En las muestras de leche, después de su utilización para el análisis microbiológico, se realizó el RCS por medio de un equipo Fossomatic-FC (Foss-Electric) (Fig. 6). Las muestras se clasificaron previamente según las siguientes características:

- Muestra con grumos: muestra que presenta alteración de la leche, flóculos o grumos que imposibilitan su procesamiento para el RCS.
- Muestra con leche insuficiente: en la que no había cantidad de leche suficiente para poder introducir la muestra en el equipo.
- Muestra válida para el RCS: en las que no se dio ninguno de los casos anteriores y se obtuvo el valor de RCS correspondiente.

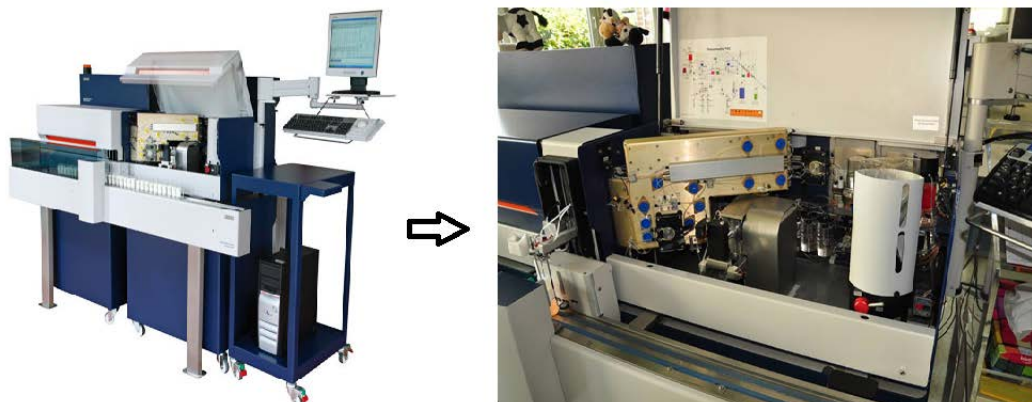


Figura 6. Equipo FOSSOMATIC-FC empleado para el recuento de células somáticas.

El equipo Fossomatic realiza el RCS sobre la base de reconocimiento de ADN de las células mediante tinción fluorométrica específica: una mezcla de leche y solución de tinción con un colorante fluorescente (bromuro de etidio) pasa a través de una célula de flujo en la que su diseño solo permite detectar una célula somática de cada vez. En la célula de flujo, las células somáticas teñidas son expuestas a la luz de una longitud de onda específica, emitiendo de este modo pulsos de luz fluorescente en una longitud de onda diferente para cada célula, estos pulsos son amplificados, contados y registrados mediante un detector (Fig. 7). Después de analizar

cada muestra, el aparato limpia su sistema de flujo, para evitar el efecto del arrastre de una muestra a la siguiente.

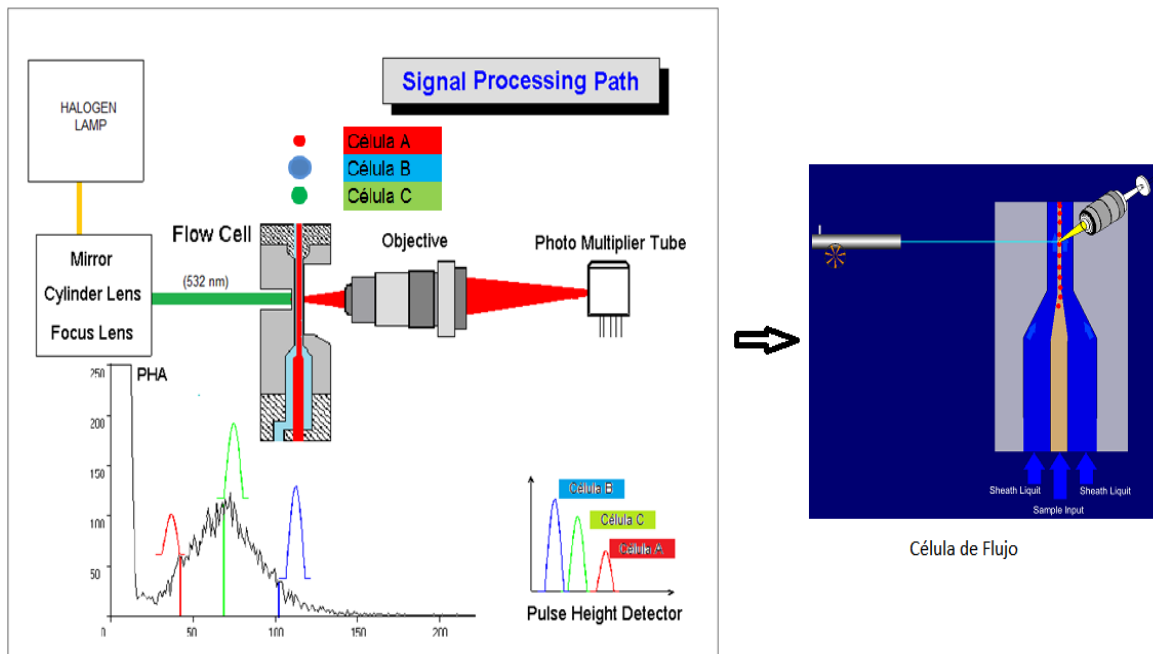


Figura 7. Esquema funcionamiento de equipo Fossomatic de recuento de células somáticas.

El rango de medición de estos equipos oscila desde 10 a 10.000.000 células/ml; no obstante, el intervalo donde se obtienen los mejores resultados de precisión y exactitud se sitúa entre 100.000 y 1.500.000 células/ml. El LIGAL está acreditado por ENAC en el rango de 100.000 a 1.000.000 células/ml, pudiendo dar resultados en rangos más amplios (sin el logo de la Entidad de Acreditación), debido a que, por una parte participa en ensayos de intercomparación que cubren dichos límites, y por otra, realiza diversos controles de calidad que permiten garantizar la fiabilidad de los resultados.

Los controles de calidad realizados fueron los siguientes;

Controles de Calidad Internos

- Controles de calidad diarios:
 - *Zeros*: Para garantizar que el instrumento no presente contaminación.
 - *Ajuste óptico*: Para asegurar una óptima detección y calidad de la señal.

- *Repetibilidad y Exactitud*: Para asegurar la calidad de los resultados, comparando los resultados obtenidos con los valores de referencia y verificando los valores estadísticos obtenidos con los publicados en la Norma.
- *Control de Proceso*: Cada 100 muestras se analizó una muestra de referencia por duplicado. Los resultados se remitieron en tiempo real a la red informática y fueron evaluados por el sistema estadístico de control de proceso (CEP).
- Controles de calidad semanales / mensuales:
 - *Control de arrastre o Carry – Over*: Para corregir posibles problemas de arrastre de una muestra a las siguientes.
- Otros controles:
 - El método fue correctamente validado siguiendo los criterios requeridos por la Norma ISO 17025.
 - El cálculo de incertidumbre fue realizado siguiendo los criterios de la Norma ISO 17025.
 - Se realizaron controles ambientales (temperatura, humedad) y de reactivos.

Controles de calidad Externos

- **Materiales de referencia**: Muestras de valor garantizado, emitidos por entidades de reconocido prestigio (Huffner). Se analizaron a diario utilizando un muestras de rango de control entre 100.000 y 700.000 cel/ml.
- **Intercomparaciones**: Son ensayos participativos, donde se evalúan los resultados obtenidos para las mismas muestras (o muestras de referencia) en un número significativo de laboratorios. El LIGAL participa en un promedio de 4 ensayos de intercomparación anuales, además de una participación mensual para una sola muestra del ensayo de Huffner (organismo alemán). Los rangos de RCS en las intercomparaciones oscilan entre 50.000 y 15.000.000 cel/ml.

3.4. Análisis estadístico.

Análisis de series temporales de frecuencia de aislamiento Dado que existieron grandes diferencias en la frecuencia de aislamiento a partir de las muestras del estudio, los diferentes patógenos o grupos de patógenos fueron clasificados según su frecuencia como:

- $F \geq 0,3$: si la frecuencia de aislamiento $\geq 0,3\%$ del total de muestras.
- $F \geq 0,1$ si la frecuencia de aislamiento $\geq 0,1\%$ del total de muestras.
- No analizados: si la frecuencia de aislamiento $< 0,1\%$ del total de muestras.

Sobre todo en la estadística descriptiva debe tenerse en cuenta que algunos microorganismos, aunque tuvieron al menos una frecuencia de aislamiento de $\geq 0,1\%$ no alcanzaron un valor superior al 0,3%, por lo que las conclusiones deben ser consideradas con mayor cautela dado el número limitado de resultados.

Según el análisis realizado, las levaduras fueron consideradas tanto como grupo (dentro de los $F \geq 0,3$) como a nivel de especie (dentro de los $F \geq 0,1$). En el caso de *Lactococcus* spp. en todos los análisis se consideró únicamente a nivel de género ($F \geq 0,3$) dada la baja frecuencia de aislamiento de las especies identificadas. Aunque *Prototheca* spp. fue considerado solamente a nivel de género en todos los análisis hay que indicar que todas las identificaciones válidas a nivel de especie dieron como resultado *Prototheca zopfii* que, además, se correspondieron con más del 99% de los aislados de este género.

Se consideraron mastitis clínicas las muestras que presentaban alguna alteración de la leche y, en caso contrario subclínicas, independientemente del RCS.

Las muestras consideradas, según el criterio anterior, como mastitis subclínicas fueron divididas para su estudio en muestras con $RCS \geq 100.000$ cel/ml y muestras con $RCS < 100.000$ cel/ml.

Los porcentajes de mastitis clínicas o muestras con $RCS < 100.000$ sobre el total de muestras se calculó para cada microorganismo o grupo de microorganismos sobre el total de muestras en las que fueron aislados .

3.4.1. Análisis de series temporales de frecuencia de aislamiento.

En el estudio estadístico se incluyeron todos los aislamientos en cultivo puro o en los que se consideró el aislamiento de dos patógenos mamarios. En el análisis de series temporales fueron incluidos los patógenos mamarios con $F \geq 0,3$. Se consideraron los aislamientos identificados a nivel de especie, salvo en el caso ya comentado de *Lactococcus* spp. y en el caso de levaduras los cuales se consideraron como grupo debido a la baja frecuencia de aislados identificados a nivel de especie. Los valores de la serie se calcularon como la frecuencia de aislamientos de un patógeno mamario en relación al total de muestras en cada uno de los meses estudiados.

Los pasos realizados en el análisis estadístico fueron los siguientes:

Paso 1: La metodología ARIMA (Box y Jenkins, 1976) fue utilizada en cada una de las series de cada patógeno. Se aplicaron métodos de descomposición para identificar y aislar cada uno de los componentes presentes en las series (tendencia, estacionalidad, heterocedasticidad, etc.). Se analizó la estacionalidad y cada una de las series temporales fue estabilizada utilizando las transformaciones más adecuadas, y se estudió la presencia de regularidades en las series para identificar un posible modelo ARIMA. Se identificaron y examinaron las funciones de autocorrelación (ACFs) y de autocorrelación parcial (PACFs) para observar cuales de los tres patrones potenciales estaban presentes en los datos. Después de seleccionar el modelo ARIMA más apropiado, fueron estimados sus coeficientes y, finalmente, se realizó un diagnóstico del modelo. Los resultados fueron analizados para comprobar si el modelo se ajustaba a los datos de la serie. Se utilizaron los test de Ljung-Box, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov (Shumway y Stoffer, 2006) para comprobar la independencia y normalidad de los residuos (fue considerado p -valor > 0.05 , aceptando la hipótesis de independencia y normalidad).

Paso 2: Cada serie temporal, Y_t , fue descompuesta en dos partes, tendencia y error, $Y_t - m(t) = \varepsilon_t$, donde $m(t)$ representa la tendencia y ε_t el error. Para calcular el error, fueron consideradas la estacionalidad y las partes irregulares en el tiempo t . Una vez aisladas las dos partes de la serie, tendencia y error, fue aplicada la metodología ARIMA a la parte aleatoria. Consideradas dos series temporales Y_1, Y_2 ; la distancia entre las dos series fueron definidas como (Vilar-Fernández y González-Manteiga, 2004):

$$d(Y_1, Y_2) = \int (m_1 - m_2)^2 \omega(t) dt + d(\theta_1, \theta_2)$$

donde m_1 , m_2 son las tendencias de cada serie, θ_1 , θ_2 el grupo de parámetros del modelo ARIMA para la parte aleatoria y $\omega(t)$ una constante.

En este caso, $\omega(t)=1$, todas las series tuvieron la misma constante. Como los modelos ARIMA para la parte aleatoria fueron prácticamente idénticos, para determinar la distancia entre las series de cada patógeno, se utilizó la siguiente expresión:

$$d(m_1, m_2) = \int (m_1 - m_2)^2 \omega(t) dt$$

Esta expresión puede aproximarse a:

$$d(m_1, m_2) = \int (m_1 - m_2)^2 \omega(t) dt \approx \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (m_1 - m_2)^2 \omega(t) dt$$

Paso 3: Una vez que esta distancia fue definida, se aplicó una técnica de análisis multivariante para obtener grupos homogéneos (clúster), es decir, estableciendo grupos donde los elementos son similares. Antes de aplicar la distancia, los datos de la serie fueron estandarizados a una media de 0 y una varianza de 1.

Paso 4: Se realizó un dendograma. Se aplicó el método de clasificación de k-medias para comparar los resultados. Para determinar el número de clusters, se utilizó el PAM algorithm (Partitioning Around Medoids). Los métodos utilizados para confirmar el número de clúster y calcular el dendograma fueron: Método completo o método completo de asociación, método de media y método de Ward o de suma de cuadrados (Everitt, 2005). En el dendograma no fue incluido *T. pyogenes* a pesar de ser un patógeno con $F > 0,3$ dado que las características de los valores mensuales distorsionaban los resultados.

Los paquetes estadísticos utilizados fueron R, versión R-2.15.0, timeSeries (Wuertz y Chalabi, 2012) y TSA (Chan y Ripley, 2012) para el análisis de series temporales, forecast para la metodología ARIMA (Hyndam., 2012) y mclust el análisis de clúster (Fraley y col., 2012).

3.4.2. Análisis de RCS.

Los valores obtenidos de RCS fueron transformados a Linear Score (Shoock, 1982), según la siguiente fórmula:

$$LS = \log_2 (RCS/100) + 3$$

donde RCS se expresa en unidades de 100.000 cel/ml.

Se calculó la media, mediana y desviación típica de los valores de RCS y LS para cada patógeno o grupo de patógenos considerados. Además se calculó la asimetría y curtosis de los valores de LS para cada patógeno o grupo de patógenos.

Para la comparación de medianas de los patógenos o grupos de patógenos con $F \geq 0,3$ se siguió el proceso que se describe a continuación. La normalidad de las distribuciones del LS de cada microorganismo fue rechazada por las pruebas Anderson-Darling y Shapiro-Francia. Sin embargo, en muestras grandes, es muy difícil mantener la asunción de normalidad, ya que, incluso pequeñas variaciones en los datos pueden llevar a rechazar la hipótesis de normalidad. El ANOVA es un procedimiento que resulta muy robusto ante la ausencia de normalidad (Jobson, 1999) y ante un ratio de varianzas σ^2 máxima / σ^2 mínima < 3 (Dean y Voss, 1999). En primer lugar se realizó un ANOVA para comparar las medias de los recuentos transformados a Linear Score (LS) en función del microorganismo. El LS de *Nocardia* spp. presentó valores muy altos y poco dispersos ($\sigma^2 = 0.595$) y por ello fue excluido del análisis dado que su introducción vulneraría el supuesto anterior del ratio de varianzas.

A continuación se realizó un análisis clúster jerárquico de las medianas de cada microorganismo mediante el método de la media (average linkage), para clasificar a los microorganismos en base a su LS. Los grupos obtenidos fueron contrastados mediante el método de clasificación asociativo k-means.

Las medianas y las medias mostraron una alta correlación ($r > 0.99$). Los grupos resultantes fueron sometidos a un análisis ANOVA y se utilizó la técnica de la diferencia honestamente significativa de Tukey (HSD de Tukey) para realizar comparaciones post-hoc entre los grupos formados.

Para el cálculo de la media, mediana, desviación típica, asimetría y curtosis de los valores de RCS y LS se utilizó el paquete estadístico SPSS statistics 20.0 (IBM). El análisis estadístico de la comparación de medias fue realizado con el programa R (R Development Core, 2011), utilizando las funciones `ad.test ()` y `sf.test ()` del paquete `nortest` para estudiar la normalidad de los datos, las funciones `hclust ()` y `kmeans ()` para el análisis clúster y las funciones `aov ()` `TukeyHSD ()` para las pruebas ANOVA y HSD de Tukey .

3.4.3. Otros análisis estadísticos.

Se empleó el test Chi-cuadrado para constatar la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los microorganismos respecto:

- Número de mampitos clínicas sobre el total de muestras (clínicas y subclínicas) en las que fue aislado cada microorganismo.
- Número de mampitos con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total de muestras (clínicas y subclínicas) en las que fue aislado cada microorganismo.

Para calcular el grado de asociación de la media y mediana con la desviación típica del RCS se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

La similitud de los porcentajes de mampitos clínicas de los patógenos clínicas se exploró mediante la elaboración de un dendrograma a partir del análisis clúster jerárquico de dichos porcentajes mediante el método de la media (average linkage) El análisis estadístico fue realizado con el programa R (R Development Core, 2011), utilizando las funciones `ad.test ()` y `sf.test ()` del paquete `nortest` para estudiar la normalidad de los datos, las funciones `hclust ()` y `kmeans ()` para el análisis clúster y las funciones `aov ()` `TukeyHSD ()` para las pruebas ANOVA y HSD de Tukey.





IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1. Sobre las muestras incluidas en el estudio y metodología utilizada.

En la Tabla 2 se resumen las muestras utilizadas en este estudio que incluyen todas las recibidas en el LIGAL durante el período 2005 a 2011. Las muestras se clasificaron en función del recuento de células somáticas, el 1,05% no pudieron ser clasificadas dado el insuficiente volumen de leche para realizar la determinación; en las muestras clasificadas, predominan las mamítis subclínicas (73,35%) frente a las clínicas (26,65%).

En el caso de las muestras clasificadas como mamitis subclínicas, la mayoría (89,23%) presentó un RCS \geq 100.000 cel/ml, sin embargo en el 10,77% restante el recuento era inferior a este valor.

Tabla 2. Número y porcentaje de muestras incluidas en el estudio según su resultado de cultivo microbiológico y de recuento de células somáticas (Galicia 2005-2011).

Resultado del cultivo		Resultado RCS								
		Clasificadas							Sin clasificar	
Nº	% TM	Clínica		Subclínica				Total	Nº	Nº
		Nº	% TMC	Nº		%TMC	Nº			
				< 100	\geq 100			Total		
APT	176.819	73,6	50.925	29,07	8.122	116.143	124.265	70,93	175.190	1.629
<i>ACP</i>	174.965	99,2	50.389	29,07	8.036	114.920	122.956	70,93	173.345	1.620
<i>ACM</i>	1.854	0,8	536	29,06	86	1.223	1.309	70,94	1.845	9
AC	30.561	12,7	6.197	20,81	5.996	17.579	23.575	79,19	29.772	789
MC	32.852	13,7	6.221	19,00	4.656	21.868	26.524	81,00	32.745	107
Total	240.232		63.343	26,65	18.774	155.590	174.364	73,35	237.707	2.525

APT: Muestras con aislamiento positivo; ACP: Muestras con aislamiento de un único microorganismo; ACM: muestras con aislamiento de dos microorganismos; AC: ausencia de crecimiento; MC: muestra contaminada; TM: total de muestras; TMC: total muestras clasificadas; <100 muestras con recuento de células somáticas inferior a 100.000 cel/ml; >100 muestras con recuento de células somáticas superior a 100.000 cel/ml. Las muestras sin clasificar incluyen aquellas que no pudieron ser analizadas dada la insuficiente cantidad de muestra.

La frecuencia de **muestras con más de un patógeno aislado frente a las muestras contaminadas** varía según el diseño de cada estudio dado que no hay un criterio que haya sido

aceptado universalmente. En el presente trabajo se consideró aislamiento positivo con más de un microorganismo en aquellos casos en los que alguno de los dos microorganismos aislados fuera alguno de los considerados patógenos mayores (cualquier aislamiento diferente a *Corynebacterium* spp. y ECN). Este hecho puede explicar la pequeña proporción de muestras del estudio en las que se aisló más de un microorganismo (0,8%) que se observa en la tabla 2, si se compara con otros estudios previos (20,6%) en los que sí se tuvieron en cuenta cualquier aislamiento mixto (Kalmus y col., 2011). Sin embargo, nuestros resultados coincidieron con los obtenidos en otros estudios (1% - 3,5%) en los que igualmente se aplicaron requisitos estrictos a la hora de considerar aislamientos de más de un patógeno (Ferguson y col., 2007; Persson y col., 2011).

El porcentaje de muestras con **ausencia de crecimiento** (12,7%) fue similar al obtenido (16,5%) por Nam y col. (2010). Sin embargo, fue inferior al 25-30% observado en estudios de casos clínicos en el Reino Unido (Bradley y col., 2007) y en EEUU (Hoeg y Ruegg, 2005) y al 20,7-22,3% obtenido en muestras remitidas a laboratorios de diagnóstico (Makovec y Ruegg, 2003; Kalmus y col., 2011). Las muestras en las que no hubo crecimiento fueron menos frecuentes en las muestras clasificadas como mamitis clínicas (9,78%) que en las incluidas como mamitis subclínicas (13,5%). Y esto mismo sucedió cuando las muestras tenían RCS ≥ 100.000 cel/ml (11,30%) respecto de las leches con RCS < 100.000 cel/ml (31,94%), como era de esperar.

Se han descrito diversas causas que justifican la existencia de cultivos negativos a partir de muestras procedentes de casos con procesos inflamatorios. Se sabe que hay casos de mamitis coliformes en los que la acción patógena puede deberse a la toxina bacteriana a pesar de que ya no se mantenga la infección por *E. coli* en la mama (Makovec y Ruegg, 2003). También en el caso de infecciones por *Staph. aureus* es conocido tanto el patrón de eliminación intermitente en leche (Sears y col., 1990) como la localización intracelular de la infección (Brouillette y col., 2003). Dadas las condiciones en las que se ha llevado a cabo este estudio, tampoco se puede excluir la existencia de muestras que puedan proceder de animales en los que se haya realizado tratamiento antibiótico y no se haya respetado el periodo necesario para que éste no interfiera en el cultivo microbiológico.

Por otra parte, en este estudio, la toma de muestras fue realizada tanto por ganaderos como por técnicos veterinarios, lo que explica el mayor porcentaje de **muestras contaminadas**

(13,7%) frente al descrito en trabajos previos (0,05-3,5%), (Myllys y col., 1998; Piepers y col., 2007; Nam y col., 2009; Sampimon y col., 2009) en los que las toma de muestras se realizó por el propio equipo de investigación de una forma más estandarizada. No obstante, en otros trabajos realizados igualmente sobre muestras enviadas al laboratorio (Makovec y Ruegg, 2003) se obtuvieron porcentajes muy próximos a los nuestros (15,29%). Se observó (datos no mostrados) que la proporción de muestras contaminadas disminuyó a lo largo del período de estudio, hecho observado también en otros trabajos realizados sobre muestras remitidas a laboratorios de diagnóstico y que sin duda responde a una mejor formación del personal encargados de los muestreos de leche (Makovec y Ruegg, 2003).

Los resultados de este estudio no pueden ser considerados como prevalencia dado que las muestras no fueron seleccionadas de forma que fueran representativas de la población. Los estudios basados en los resultados de muestras de leche remitidas a laboratorios de diagnóstico generalmente incluyen muchos rebaños con prevalencias altas de mamitis o procedentes de mamitis graves, por lo que en estas situaciones hay una mayor frecuencia relativa los patógenos asociados a IIM más graves. Como consecuencia de este hecho, los porcentajes de aislamiento de patógenos como *Escherichia coli* en este tipo de estudios (Makovec y Ruegg, 2003; Petrovski y col., 2011) son superiores a la prevalencia observada en estudios que parten de muestreos representativos de una población (Myllyst al., 1998; Thenhagen y col., 2006; Piepers y col., 2007). Además, es lógico pensar que dentro de las IIM producidas por un microorganismo determinado, los veterinarios y ganaderos tiendan a remitir al laboratorio las muestras de cuarterones que presenten mayores RCS o animales con síntomas clínicos, de modo que los valores obtenidos en estos parámetros pueden estar sesgados y no tienen porque ser representativos de la población.

Se ha descrito **muchas causas de variación de los valores analizados en este estudio**. En cuanto a **la frecuencia de aislamiento** de un patógeno está influida, además de por los factores ya comentados asociados al tipo de estudio, por la prevalencia de las IIM causadas por ese patógeno en la población. La prevalencia de cada patógeno mamario depende de la implantación y consiguiente eficacia de los programas de control de mamitis (Bradley, 2002), de las instalaciones y prácticas de manejo del rebaño (estabulación, sistema de producción, etc.) y de las características de la población muestreada (edad, estado de lactación, mamitis clínicas o subclínicas, etc.) (Makovec y Ruegg, 2003; Taponen y col., 2006). La frecuencia de la

presentación de mamitis clínicas se ve influida además de por el patógeno implicado (Phuektes y col., 2001) por factores asociados al número de lactación, momento de lactación, genética del animal, respuesta inmunitaria del animal y otros factores asociados como son el parto o estrés (Zadoks y col., 2003), época del año y las interacciones entre ellos (Smith y Hogan, 1995; Zadoks y col., 2001b; Hogan y Smith, 2003; Lopez-Benavides y col., 2005).

El valor del RCS de la leche de vacuno está sujeto a la influencia de muchos factores que pueden incluso hacer difícil su interpretación correcta. Aunque una considerable parte de la variabilidad del RCS no ha sido explicada, se sabe que el factor más importante es de **naturaleza microbiológica**, es decir, la existencia o no de una IIM (Brolund, 1985). Entre las causas microbiológicas de la variación del RCS se incluyen además del patógeno implicado, la localización y duración de la infección (Brolund, 1985). Hay otros factores de **naturaleza no microbiológica** relacionados con la variabilidad del RCS, que influyen tanto a cuarterones infectados como no infectados, como son el número y fase de lactación del animal, estación del año, tiempo de muestreo desde el último ordeño, existencia de mamitis previa, entre otros (Cullen, 1967; Eberhart y col., 1979; Brolund, 1985; Wiggans y Shook, 1987; Vecht y col., 1989).

En un trabajo, como el presente, basado esencialmente en la información recogida a partir de muestras remitidas para el diagnóstico de mamitis bovinas es imposible tener en cuenta el conjunto de las posibles causas que influyen en la variación de la prevalencia y de la gravedad de las mamitis. Por tanto, los resultados obtenidos en este tipo de estudios no pueden ser valorados para cada microorganismo de forma individual. Sin embargo, esta información si puede utilizarse para establecer comparaciones relativas entre los diferentes patógenos, tanto en su variación de proporción de aislamiento en el tiempo como en su capacidad patógena (% de mamitis clínicas y RCS). Aunque, como ya se ha señalado, estos estudios no se hacen de forma representativa de la población, no parece lógico pensar que pueda existir algún sesgo en la selección de las muestras que van a ser remitidas a un laboratorio de diagnóstico que pueda afectar de diferente manera a los distintos patógenos mamarios y por tanto, no permita realizar una comparación relativa entre los resultados de los microorganismos. Los patógenos más frecuentemente implicados en las IIM se han estudiado en profundidad, de manera que se sabe bien las características de su comportamiento epidemiológico y patológico. Sin embargo, no sucede lo mismo respecto de los patógenos menos frecuentes. El análisis adecuado de la

información obtenida a partir de muestras remitidas a los laboratorios para su diagnóstico permite utilizar **el conocimiento del comportamiento epidemiológico y patológico de ciertas especies más frecuentemente estudiadas para obtener información sobre otras, menos comunes, en base a la comparación relativa de los resultados obtenidos.** En este sentido, se puede considerar que dos patógenos mamarios con el mismo comportamiento epidemiológico tendrán una tendencia en el % de aislamiento en el tiempo similar y no una tendencia diferente. Además, dos patógenos con un nivel de patogenicidad similar tendrán valores de RCS o % de mastitis clínicas cercanos.

Los resultados obtenidos que serán mostrados en los apartados correspondientes demuestran la validez de esta hipótesis, dado que coinciden con las características patológicas conocidas en el caso de patógenos mamarios mejor estudiados. Así microorganismos patógenos como *T. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, entre otros, presentan mayores porcentajes de mastitis clínicas (Tabla 6), y mayores LS (Tabla 16) respecto de otros considerados tradicionalmente patógenos menores como *Corynebacterium* spp. o ECN. De otra parte, los resultados obtenidos sobre la comparación de tendencias del % de aislamiento (Figura 37) agrupan de forma separada a patógenos que son tradicionalmente considerados ambientales (*E. coli*, *K. pneumoniae*) o contagiosos (*Strep. agalactiae*).

4.2. Resultados de los cultivos microbiológicos.

4.2.1. Aislamientos de los patógenos en el total de muestras.

Como se puede observar en la Tabla 2 las muestras de leche de cuarterón (n=240.232) se clasificaron según su resultado microbiológico de la siguiente forma: el 12,72% sin crecimiento (n=30.561), el 13,67% contaminadas (n=32.852), y el 73,61% con aislamiento de patógenos mamarios (n=176.819). El número total de aislamientos (n=178.673) incluyeron microorganismos aislados en cultivo puro (n=174.965) y microorganismos (n=3.708) aislados de muestras en las que crecieron dos patógenos mamarios (n=1.854). El porcentaje de muestras con doble aislamiento fue del 0.8% (rango mensual de 0.2-1.7%).

No pudieron ser identificadas a nivel de especie el 5.4 % de los cocos Gram positivos y catalasa positivos, el 1.9% de los *Streptococcus* spp. distintos a *Strep. agalactiae*, el 2,2 % de

los *Enterococcus* spp. y *Lactococcus* spp. y el 1.3% de los Gram negativos. Tampoco fue posible llegar hasta el nivel de género en el 20% de las levaduras.

La distribución de los diferentes patógenos sobre el total de aislamientos se recoge en la Tabla 3 y en la Figura 8. En las Figuras 9 a 11 se muestran las frecuencias de aislamiento de las especies dentro de cada género o grupo bacteriano. Los grupos bacterianos más frecuentemente aislados son los estafilococos y estreptococos que suman el 58,3 % del total de aislamientos, seguidos de *Corynebacterium* spp. y enterobacterias.

Aunque, como se ha comentado, no se puedan considerar los resultados obtenidos en este estudio como prevalencias, sí se pueden comparar las frecuencias de aislamiento sobre el total de muestras con cultivo positivo observadas entre los diferentes patógenos. Así, los estreptococos y los estafilococos fueron los patógenos más frecuentemente aislados (Tabla 3), tanto en mamitis clínicas (55,09%) como subclínicas (58,27%) (Tabla 4), lo que coincide con la mayoría de estudios, seguido de los *Corynebacterium* spp. (7,96% clínicas y 21% subclínicas), las enterobacterias (22,53% clínicas y 7,72% subclínicas), los enterococos (3,04% clínicas y 5,32% subclínicas) y las levaduras (3,88% clínicas y 2,87% subclínicas).

Si comparamos el portanaje de aislamiento sobre el total de muestras de este estudio con los obtenidos en un trabajo realizado hace casi dos décadas (Marco y col., 1998) se observa que en éste los estafilococos y estreptococos representaban un porcentaje mayor (48,1%) respecto de lo hallado por nosotros (43,3%). Por el contrario, para el resto de patógenos nuestros valores superaron a los obtenidos por esos autores, así en el caso de *Corynebacterium* spp. fueron 10% y 12,7%, enterobacterias de 3,9% y 8,6%, enterococos de 2,2% y 3,5%, respectivamente. **Estas diferencias parecen significar que existen cambios apreciables en la etiología de las mamitis bovinas en Galicia, como posteriormente se analizará.**

Los resultados de este estudio se basan, en gran medida, en los resultados de identificación fenotípica de los microorganismos aislados. El genotipado es considerado un método más fiable en la identificación de los patógenos mamarios que los métodos fenotípicos, y esto es particularmente importante en el caso de los ECN (Ruegg, 2009). Sin embargo, la identificación por medio de las técnicas de biología molecular no es utilizada en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico rutinario o de investigación y, dado su alto coste, los estudios basados en la identificación genotípica solo se hacen en un número limitado de aislamientos y

rebaños. Como dentro de los ECN la distribución de especies e incluso de genotipos dentro de una especie varía de un rebaño a otro (Gillespie y col., 2009; Piessens y col., 2011; Supré y col., 2011) y además se ha demostrado la existencia de diferencias de virulencia entre cepas de la misma especie (Phuektes y col., 2001; Zadoks y col., 2002), la información obtenida por este tipo de estudios no ha permitido una clara clasificación epidemiológica y patológicas de las especies de ECN (Piessens y col., 2012). Por esta razón muchos estudios epidemiológicos prefieren emplear métodos fenotípicos de identificación (Zadoks y col., 2001; Østerås y col., 2006; Tenhagen y col., 2006; Nam y col., 2009), incluso en el caso de ECN (Sawant y col., 2009; Gillespie y col., 2009; Sampimon y col., 2009; Nam y col., 2009). El recurso de la identificación fenotípica, apoyada en una base de datos que contenga una información adecuada de las especies que aparecen con más frecuencia en los diagnósticos veterinarios, es suficientemente preciso para las necesidades de diagnóstico e investigación (Ruegg, 2009).

El sistema automatizado Vitek 2 utilizado en este estudio ha mejorado sus porcentajes de acierto en la identificación de especies microbianas, en comparación con sus versiones anteriores, especialmente después de la modificación de las tarjetas de identificación (tarjetas colorimétricas) y al añadir perfiles de especies no incluidas previamente como *Staph. chromogenes*. Además, los estudios sobre identificación de estafilococos muestran un alto porcentaje de identificaciones correctas con el sistema Vitek 2 cuando se compara con métodos moleculares en los casos de *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Staph. sciuri* y *Staph. simulans* y más bajo pero un porcentaje aceptable (90.7-93.3%) para otros ECN (Delmas y col., 2008; Chatzigeorgiou y col., 2011). Sin embargo, estos estudios se efectuaron con cepas de diversos orígenes (animales, humanos, alimentos, etc.), y hasta la fecha no se han realizado evaluaciones específicas de este sistema de identificación en relación a patógenos mamarios de vacuno. Por lo tanto, no es posible establecer como este hecho podría influir en los resultados del presente trabajo y, en este sentido, tienen que considerarse con cautela. Como el procedimiento seguido en el laboratorio se mantuvo de forma constante a lo largo de todo el estudio, los resultados son válidos a no ser que existiera un error significativo en la identificación de alguno de los patógenos estudiados, especialmente en el caso de ECN. Sin embargo, este error en la identificación parece no ser muy importante si se tiene en cuenta que **los ECN aislados con mayor frecuencia en este estudio son similares a los obtenidos en estudios basados en identificación genotípica** (Taponen y col., 2006, 2008; Piessens y col., 2011; Supré y col., 2011; Piessens y col., 2012).

Considerando únicamente **los estafilococos** (Figura 9), más de la mitad de los aislamientos se corresponden con *Staph. aureus* mientras que *Staph. chromogenes* y *Staph. epidermidis* son los ECN más frecuentemente aislados. Estas dos últimas especies junto a *Staph. sciuri*, *Staph. warneri*, *Staph. simulans*, *Staph. xylosus* y *Staph. haemolyticus* fueron las especies de ECN aisladas en al menos el 0,3% de las muestras investigadas. Otras especies mostraron una frecuencia mucho menor, como son *Staph. hominis*, *Staph. hyicus*, *Staph. intermedius*, *Staph. lentus*, *Staph. saprophyticus* y *Staph. gallinarum* que presentaron entre el 0,1-0,3% de aislamiento sobre el total de muestras; resultado que fue incluso inferior en el resto de ECN.

Entre **los estreptococos** (Figura 10), destaca *Strep. uberis*, con más de la mitad de los aislamientos correspondientes a este género, seguidos por *Strep. dysgalactiae* y *Strep. agalactiae*, cuyas frecuencias $\geq 0,3\%$ sobre el total de muestras. Otras especies se identificaron con mucha menor frecuencia, así *Strep. canis*, *Strep. gallolyticus*, *Strep. hyointestinalis*, *Strep. mitis/oralis*, *Strep. suis*, *Strep. porcinus* y *Strep. thoraltensis* presentaron porcentajes de aislamiento sobre el total de muestras entre el 0,1-0,3%; finalmente el resto de las especies aisladas siempre fue inferior al 0,1%.

En el caso de **las enterobacterias** (Figura 11), más de la mitad de los aislamientos correspondieron a *E. coli*, seguido de *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *K. oxytoca*, todos ellos con una frecuencia $\geq 0,3\%$ sobre el total de muestras. Otras especies mostraron una frecuencia mucho menor, así *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Raoultella ornithinolytica* y *Serratia liquefaciens* presentaron un porcentaje de aislamiento sobre el total de muestras entre el 0,1-0,3%, resultado menor al 0,1% para el resto de los casos.

Entre las bacterias **Gram negativas no enterobacterias**, que representan un pequeño porcentaje del total de aislamientos (0,73%), destacan la *Pseudomonas aeruginosa* y la *Pasteurella multocida* que son las únicas especies con un porcentaje de aislamiento sobre el total de muestras superior al 0,1% pero sin alcanzar el 0,3%.

Dentro del género **Lactococcus spp.** las especies identificadas fueron *L. garviae*, *L. lactis* y *L. raffinolactis* con porcentajes de aislamientos sobre el total de muestras del 1,53%, 0,65% y 0,02%, respectivamente.

Entre **las listerias**, el 95,69% fueron identificadas como *L. monocytogenes*, siendo mucho menos frecuentes *L. innocua* y *L. gravi* (1,72%). El total de listerias aisladas no alcanzó el 0,1% del total de muestras. Asimismo, los aislados de *Nocardia spp.* superaron el 0,1% pero no alcanzaron el 0,3% del total de muestras.

En el grupo de **otros Gram positivos** se incluyen *Aerococcus viridans*, *Bacillus spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Actinomyces spp.* con porcentajes sobre el total de aislamientos de 0,23%, 0,10%, 0,02% y 0,01%, respectivamente. Fue *Aerococcus viridans* el único microorganismo de este grupo que alcanzó un porcentaje superior al 0,1% en relación al total de muestras.

En relación a **las levaduras**, el mayor porcentaje de aislamientos hallados, al menos a nivel de género, correspondió al género *Candida spp.* (91,08%), seguido de *Geotrichum spp.* (2,73%), *Rhodotorula glutinis* (2,32%), *Cryptococcus spp.* (1,51%), *Trichosporon spp.* (1,36%) y *Yarrowia lipolytica* (1,33%). Solo cuatro especies de todas las levaduras aisladas, *Candida rugosa* (33,71%), *Candida krusei* (15,71%), *Candida famata* (14,08%) y *Candida tropicalis* (11,47%) sumaron el 74,97% de las levaduras identificadas y fueron las únicas que alcanzaron, al menos, el 0,1% del total de muestras. El resto de especies identificadas representó menos del 2,5% de los aislamientos de este grupo y menos del 0,1% del total de muestras.

Considerando **únicamente las especies o géneros con un porcentaje de aislamiento $\geq 0,3$ % sobre el total de las muestras** (Figura 12), las especies con mayor frecuencia de aislamiento fueron *Corynebacterium spp.* (17,14%), *Strep. uberis* (16,56%), *Staph. aureus* (15,34%), *E. coli* (7,56) y *Streptococcus dysgalactiae* (6,59%), situándose estas cifras por debajo del 5% para el resto de microorganismos.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia de la realización de identificación a nivel de especie de los aislados de mamitis bovina. Con cierta frecuencia, en los laboratorios de diagnóstico o en diversos estudios, no se llega hasta el nivel de especie cuando se trata de patógenos con baja frecuencia de aislamiento (cocos gram positivos catalasa negativos diferentes a *Strep. agalactiae* y *Strep. uberis*, levaduras, Gram negativos no enterobacterias, etc.) o si se consideran patógenos menores (ECN). En este estudio los cocos gram positivos catalasa negativos diferentes a *Strep. agalactiae* y *Strep. uberis* (otros estreptococos, lactococos y enterococos) representaron el 17,19% de los aislamientos. Los ECN representaron el 13,06% de los aislamientos. Las levaduras y *Prototheca spp.* se

correspondieron con el 3,25% y 0,75% de los aislamientos. Aunque individualmente son grupos de patógenos con baja frecuencia de aislamiento, la suma de todos ellos representa un porcentaje del total nada desdeñable. Además el aumento de la prevalencia de las infecciones con presencia de estos grupos de patógenos hace que cada vez sea más necesario el conocimiento de su comportamiento epidemiológico y patológico.

Tabla 3. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en muestras de leche de cuarterón (Galicia 2005-2011).

Microorganismo	%	Microorganismo	%
<i>Staph. aureus</i>	15,34	<i>Lactococcus</i> spp.	2,20
<i>Staph. chromogenes</i>	2,22	<i>Corynebacterium</i> spp.	17,14
<i>Staph. epidermidis</i>	1,98	<i>Trueperella pyogenes</i>	1,42
<i>Staph. simulans</i>	1,55	<i>Listeria</i> spp.	0,07
<i>Staph. haemolyticus</i>	1,38	<i>Nocardia</i> spp.	0,17
<i>Staph. xylosum</i>	1,18	Otros Gram positivos	0,37
<i>Staph. sciuri</i>	1,04	<i>E. coli</i>	7,56
<i>Staph. warneri</i>	0,87	<i>K. pneumonia</i>	1,26
Otros estafilococos	2,83	<i>S. marcescens</i>	0,48
Total <i>Staphylococcus</i> spp.	28,40	<i>K. oxytoca</i>	0,41
<i>Strep. uberis</i>	16,56	<i>E. cloacae</i>	0,28
<i>Strep. dysgalactiae</i>	6,59	<i>C. koseri</i>	0,22
<i>Strep. agalactiae</i>	3,10	<i>C. freundii</i>	0,11
<i>Strep. canis</i>	0,16	Otras enterobacterias	1,33
<i>Strep. bovis</i>	0,05	Total Enterobacterias	11,67
Otros estreptococos	2,64	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,19
Total <i>Streptococcus</i> spp.	29,10	<i>Pasteurella multocida</i>	0,15
<i>E. faecalis</i>	2,67	Otros Gram- no enterobacterias	0,39
<i>E. faecium</i>	0,94	Total Gram-no enterobacterias	0,73
<i>E. saccharolyticus</i>	0,52	Levaduras	3,25
Otros enterococos	0,62	Hongos filamentosos	0,04
Total <i>Enterococcus</i> spp.	4,75	<i>Prototheca</i> spp.	0,76

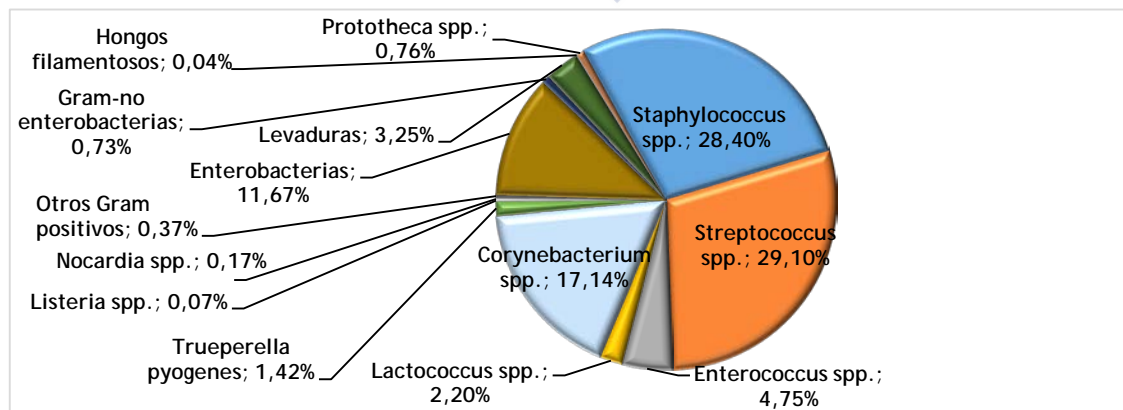


Figura 8. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).

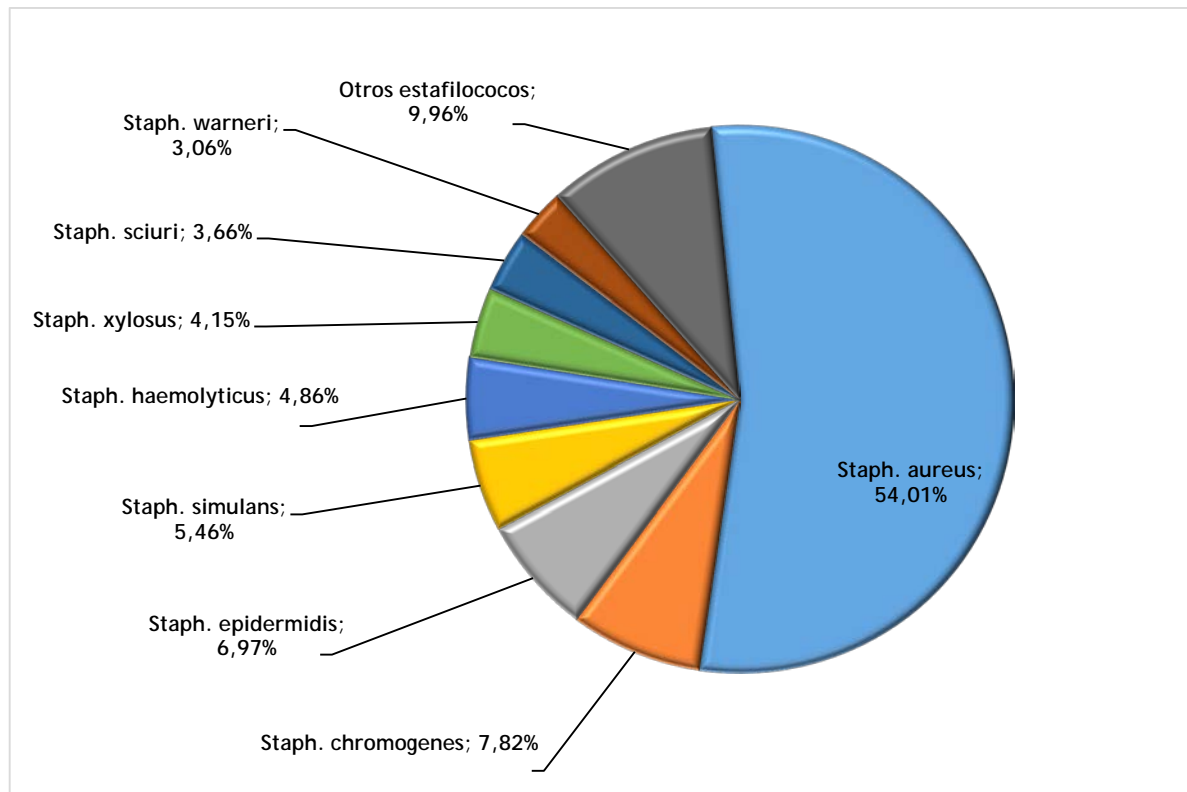


Figura 9. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estafilococos en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).

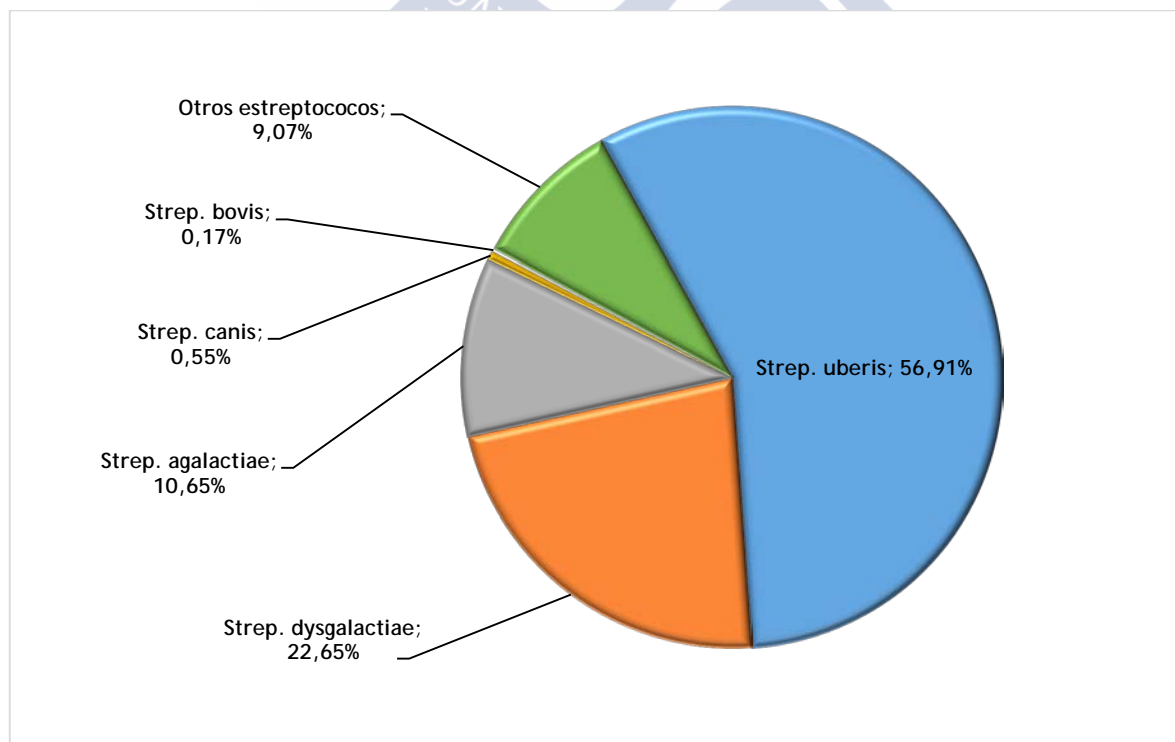


Figura 10. . Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estreptococos en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).

Resultados y discusión

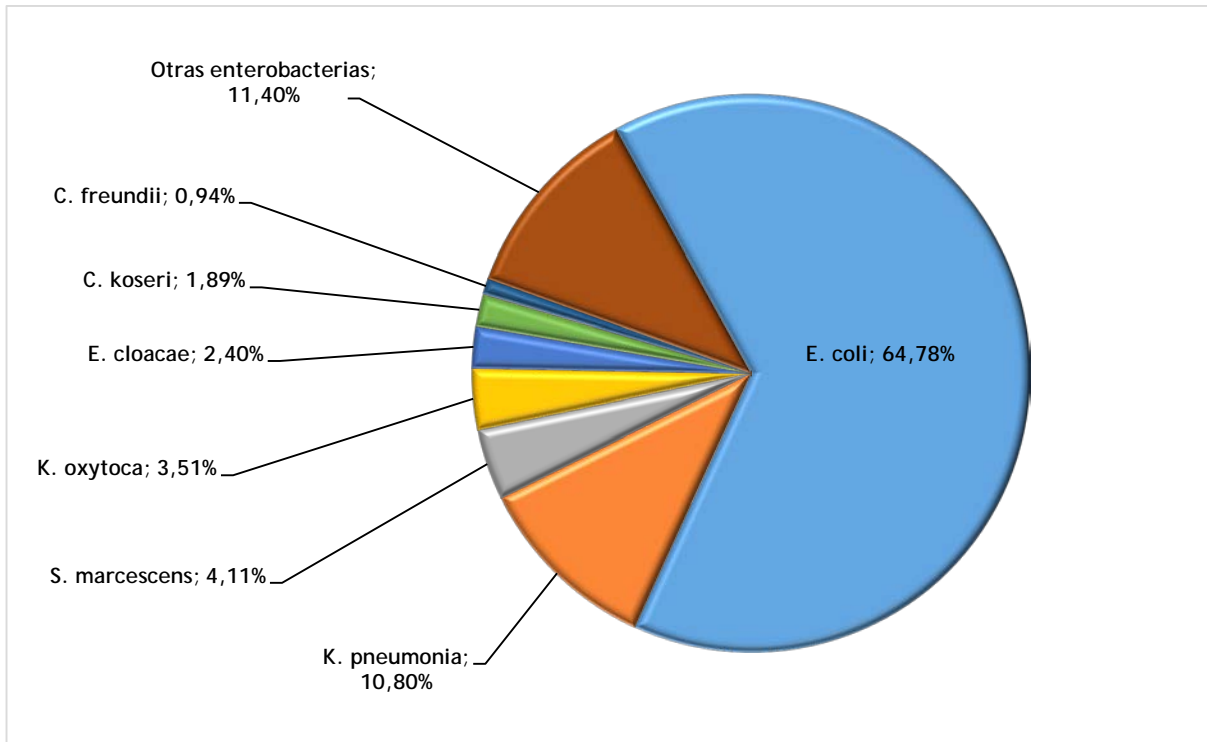


Figura 11. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de enterobacterias en cultivos positivos de muestras de leche (Galicia 2005-2011).

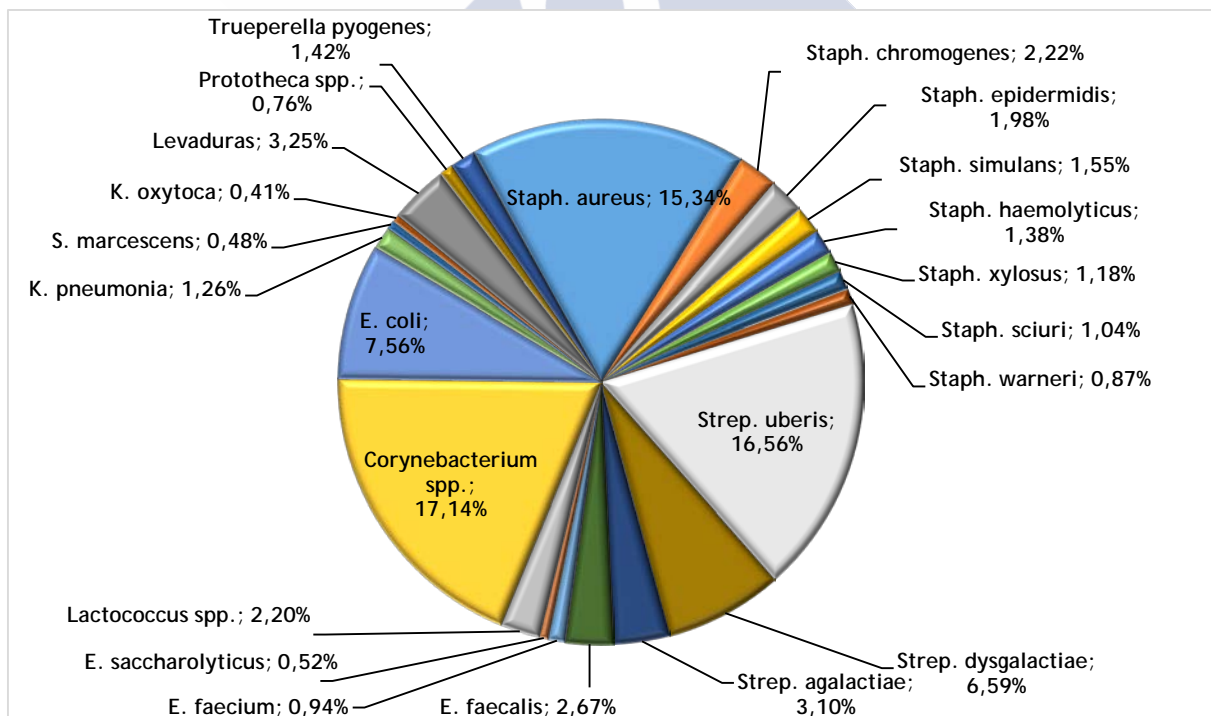


Figura 12. . Frecuencia de aislamientos de microorganismos en cultivos positivos de muestras de leche (aislamientos \geq 0,3%); (Galicia 2005-2011).

4.2.2. Aislamiento de patógenos en muestras de mamitis clínica o subclínica.

De las 174.965 muestras en cultivo puro, 1.620 (0,93%) no pudieron ser clasificadas como clínicas o subclínicas, dado que no presentaban suficiente muestra de leche, por lo que **el total de muestras incluidas en esta parte del estudio fueron 173.345**; de las cuales 50.389 (29,07%) fueron clasificadas como clínicas y 122.954 (70,93%) como subclínicas. Dadas las características del estudio, es posible que los casos considerados como mamitis clínicas estén sobrevalorados en comparación con su prevalencia en las explotaciones. En la Tabla 4 y en la Figura 13 se muestran los porcentajes de aislamiento de cada microorganismo o grupo de patógenos hallados en las muestras de mamitis clínicas o subclínicas.

De las 30.561 muestras con ausencia de crecimiento, 789 (2,58%) no pudieron ser clasificadas como clínicas o subclínicas dado que no existía suficiente muestra. De las muestras restantes con ausencia de crecimiento, 23.575 (79,19%) fueron clasificadas como subclínicas y 6.197 (20,81%) como clínicas. El porcentaje de muestras en las que no hubo crecimiento fue menor en las mamitis clínicas (9,4%) que en las subclínicas (13,91%).

De las 32.852 muestras contaminadas, 107 (0,32%) no pudieron clasificarse como clínicas o subclínicas al no disponerse de suficiente muestra. Del resto de muestras contaminadas, 26.524 (80,74%) fueron clasificadas como subclínicas y 6.221 (18,94%) como clínicas.

En las Figuras 14 a 16 se muestran los porcentajes de aislamiento de cada especie dentro de los diferentes grupos de microorganismos tanto en el caso de mamitis clínicas como subclínicas, y en las Figuras 17 y 18 se recoge el porcentaje de microorganismos con aislamiento $\geq 0,3\%$ tanto en el caso de mamitis subclínicas como de clínicas.

De igual manera que ocurría al estudiar el conjunto de las muestras (Tabla 2), en este caso las muestras procedentes de mamitis subclínicas (73,5%) predominaron sobre las clínicas (26,65%).

En los casos de mamitis **subclínicas**, los microorganismos aislados con mayor frecuencia en relación al total de aislamientos fueron, en primer lugar *Corynebacterium* spp., seguido de *Staph. aureus*, y de *Strep. uberis*, y dentro de las **clínicas** el orden fue *Strep. uberis*, seguido de *E. coli* y de *Staph. aureus* (Tabla 4 y Figura 18). Estas diferencias reflejan la asociación mayor o menor de cada patógeno con las presentaciones clínicas o subclínicas.

Tabla 4. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en cultivos positivos de muestras de leche clínicas y subclínicas (Galicia 2005-2011).

Microorganismo	% S	%C	Microorganismo	% S	%C
<i>Staph. aureus</i>	17,25	10,69	<i>Lactococcus</i> spp.	2,44	1,74
<i>Staph. chromogenes</i>	2,54	1,56	<i>Corynebacterium</i> spp.	21,0	7,96
<i>Staph. epidermidis</i>	2,46	0,87	<i>Trueperella pyogenes</i>	0,43	3,35
<i>Staph. simulans</i>	1,81	0,98	<i>Listeria</i> spp.	0,07	0,06
<i>Staph. haemolyticus</i>	1,70	0,57	<i>Nocardia</i> spp.	0,13	0,24
<i>Staph. xylosus</i>	1,39	0,69	Otros Gram positivos	0,33	0,46
<i>Staph. sciuri</i>	1,15	0,76	<i>E. coli</i>	4,03	16,73
<i>Staph. warneri</i>	1,03	0,52	<i>K. pneumoniae</i>	0,86	2,37
Otros estafilococos	3,30	1,84	<i>S. marcescens</i>	0,45	0,56
Total <i>Staphylococcus</i> spp.	32,63	18,49	<i>K. oxytoca</i>	0,33	0,64
<i>Strep. uberis</i>	14,95	20,98	<i>E. cloacae</i>	0,26	0,34
<i>Strep. dysgalactiae</i>	5,27	9,14	<i>C. koseri</i>	0,20	0,28
<i>Strep. agalactiae</i>	2,84	3,03	<i>C. freundii</i>	0,16	0,02
<i>Strep. canis</i>	0,16	0,16	Otras enterobacterias	1,43	1,59
<i>Strep. bovis</i>	0,04	0,06	Total Enterobacterias	7,72	22,53
Otros estreptococos	2,37	3,23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,17	0,24
Total <i>Streptococcus</i> spp.	25,64	36,60	<i>Pasteurella multocida</i>	0,09	0,31
<i>E. faecalis</i>	3,10	1,38	Otros Gram- no enterobacterias	0,36	0,19
<i>E. faecium</i>	1,04	0,73	Total Gram-no enterobacterias	0,63	0,73
<i>E. saccharolyticus</i>	0,54	0,45	Levaduras	2,87	3,88
Otros enterococos	0,64	0,47	Hongos filamentosos	0,03	0,07
Total <i>Enterococcus</i> spp.	5,32	3,04	<i>Prototheca</i> spp.	0,68	0,86

%S: porcentaje de aislamientos de esa especie en muestras de mamitis subclínicas en relación al total de mamitis subclínicas.

%C: porcentaje de aislamientos de esa especie en muestras de mamitis clínicas en relación al total de mamitis clínicas.

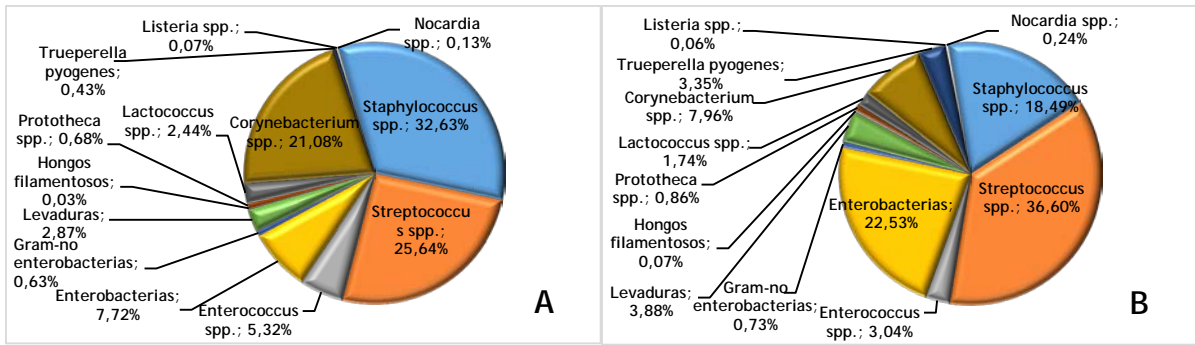


Figura 13. Frecuencias de aislamiento de microorganismos en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011).

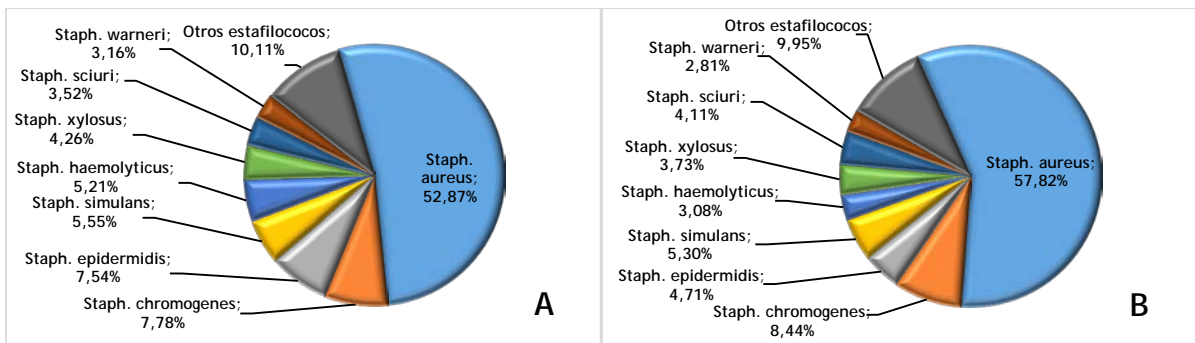


Figura 14. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estafilococos en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011).

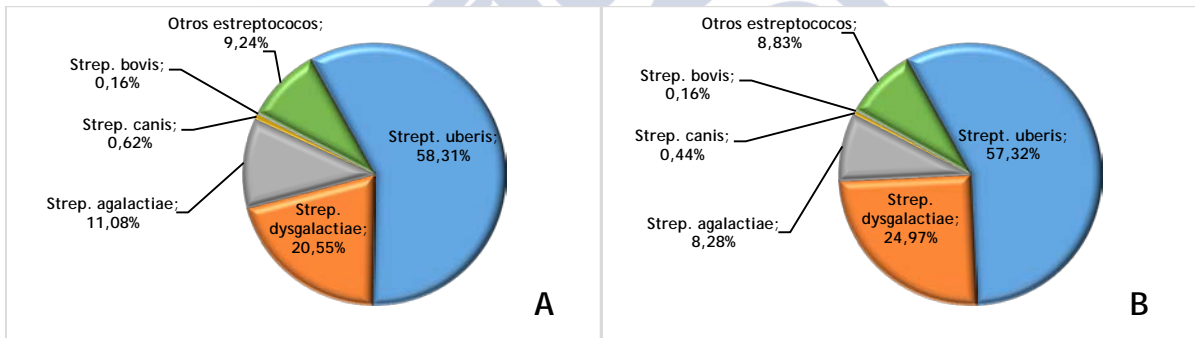


Figura 15. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de estreptococos en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011).

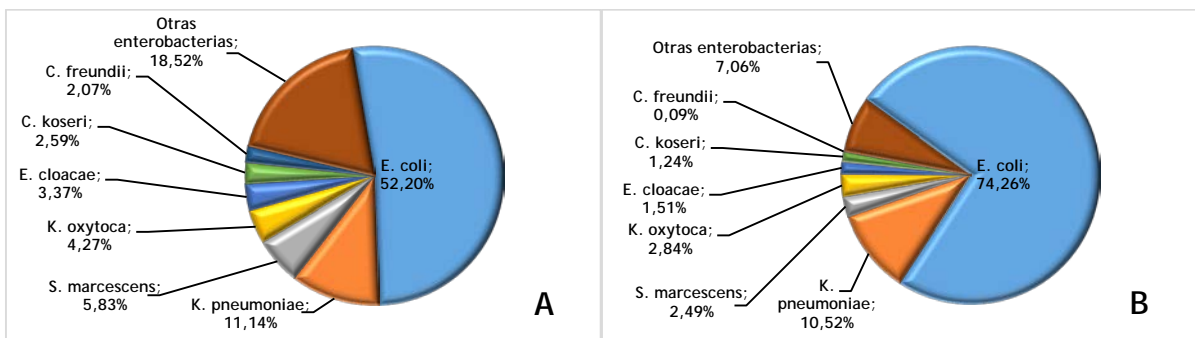


Figura 16. Frecuencia de aislamiento de las distintas especies de enteobacterias en muestras de mamitis subclínicas (A) y clínicas (B); (Galicia 2005-2011).

Resultados y discusión

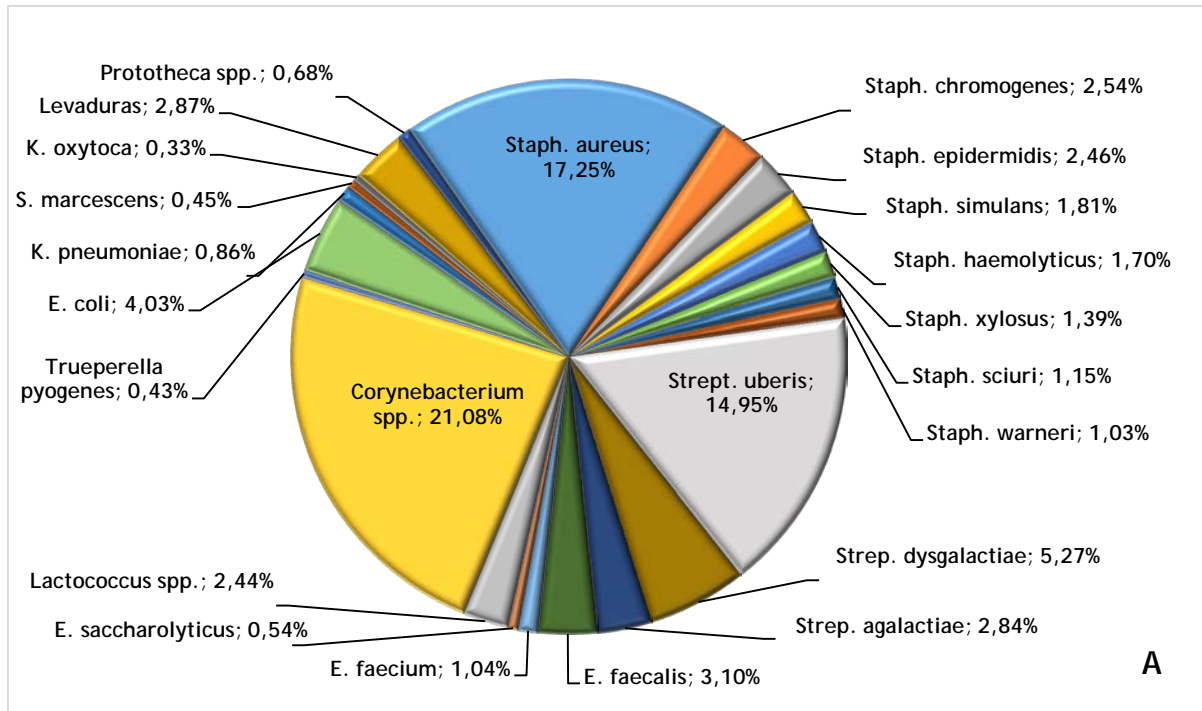


Figura 17. Frecuencia de aislamiento de microorganismos en muestras de mastitis subclínicas; (Galicia 2005-2011).

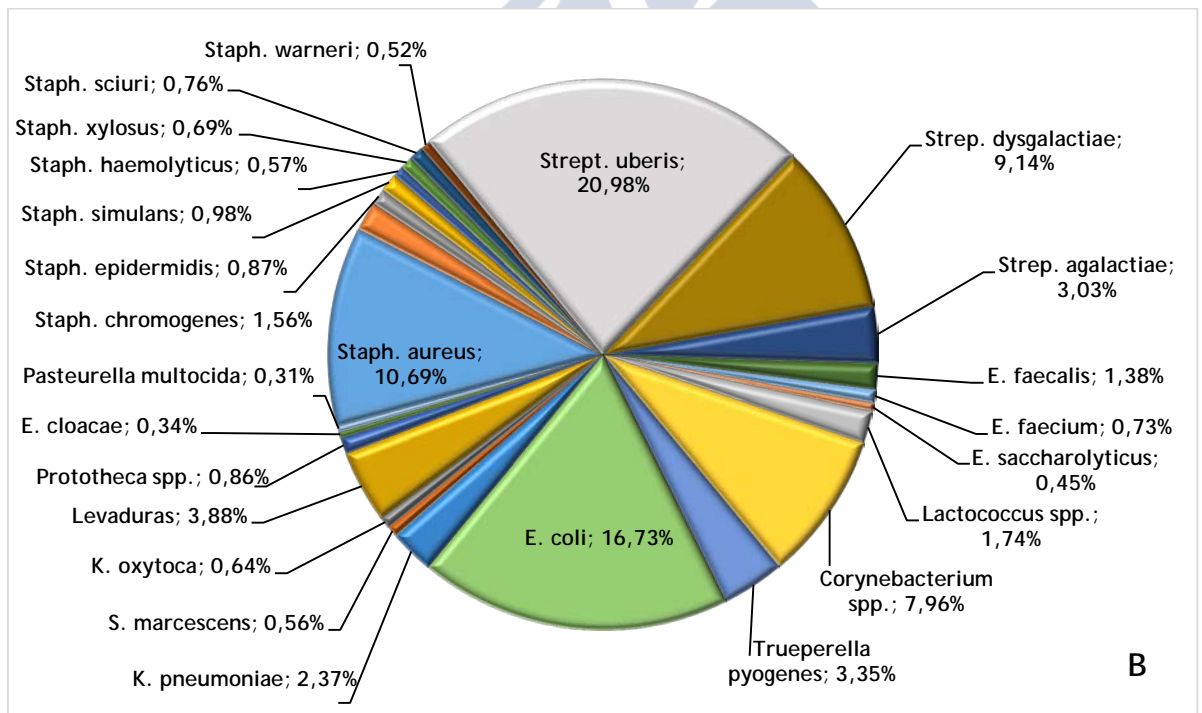


Figura 18. Frecuencia de aislamiento de microorganismos en muestras de mastitis clínicas (aislamientos $\geq 0,3\%$); (Galicia 2005-2011).

4.2.3. Porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de muestras en que se aisló cada microorganismo.

La valoración de la gravedad de las IIM según el patógeno implicado se ha basado en el porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de las muestras en las que se aisló cada microorganismo. Al interpretar los resultados se debe tener en cuenta que no se ha dispuesto de la información relativa a la gravedad de las mamitis clínicas (subaguda, aguda y sobreaguda) por lo que no se ha podido valorar este aspecto.

Una consideración a tener en cuenta es la definición de mamitis clínicas o subclínicas utilizada en el estudio. Se ha considerado como mamitis clínica los casos en que se observó alteración de la leche y mamitis subclínica cuando no ocurría esto. Aunque esta definición es acorde con la clasificación de la IDF (1987a) puede no reflejar exactamente la realidad ya que en algunos casos se han observado RCS relativamente bajos en muestras procedentes de animales con signos clínicos (Malinowski y col., 2006). Así pues, cabría la posibilidad de que animales con mamitis no presentaran alteración de la leche pero sí otros signos clínicos; sin embargo, esta situación no es muy frecuente, por lo que probablemente apenas habrá influido en los resultados obtenidos.

En la Tabla 5 y Figura 19, se muestran, para cada grupo de microorganismos, los porcentajes de mamitis clínicas sobre el total de muestras en las que fueron aislados. Este mismo valor se expresa, en la Figura 20 para los microorganismos con frecuencia de aislamiento $\geq 0,3\%$; y en la Tabla 6 y Figura 21 para aquellos con aislamiento $\geq 0,1\%$. Como se observa en la Tabla 7 cuando se comparó la proporción de mamitis clínicas de los microorganismos con aislamiento $\geq 0,3\%$ se distinguen hasta 12 grupos. Las diferencias entre *T. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae* entre sí y con el resto de microorganismos resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El resto de patógenos se asociaron en 9 grupos con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,05$), que incluyeron dos o tres microorganismos que no presentaban entre sí diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Se observaron **diferencias entre porcentajes de mamitis clínicas entre especies del mismo género.** Así, si se considera de forma conjunta los ECN, las muestras clínicas representaron el 17,17% (Tabla 5 y Figura 19), que es inferior a lo observado en *Staph. aureus* (20,22%). El porcentaje de aislamiento de ECN en relación a las mamitis clínicas y subclínicas varía con los autores consultados, pero todos ellos indican valores de aislamiento superiores

para mastitis subclínicas respecto de las clínicas (Koivula y col., 2007). Sin embargo, **se observaron diferencias en este porcentaje cuando se consideraron individualmente las especies de ECN**, que van desde el 12,02% para *Staph. haemolyticus* hasta el 25,74% para *Staph. hyicus* (tabla 6 y Figura 21).

Algunos autores (Taponen, 2006) no encontraron diferencias en la gravedad de las IIM causadas por diferentes especies de ECN frente a otros que sí las han descrito. Así Waller y col. (2011) observaron que *Staph. hyicus*, al contrario que otros ECN era más común en los casos clínicos lo que coincide con nuestros resultados. Otros autores han asociado a este ECN con altos RCS (Perry y col. 2010) y lo consideran como la especie más patógena de este grupo (Myllys, 1995).

Dos especies de ECN, *Staph. sciuri* y *Staph. chromogenes*, no presentaron diferencias significativas con *Staph. aureus* respecto al porcentaje de mastitis clínicas. Estos resultados concuerdan, en parte con los de Waller y col. (2011) y Taponen y col. (2006) quienes encontraron prevalencias similares en casos clínicos y subclínicos para *Staph. chromogenes* y *Staph. simulans*. El resto de los ECN presentaron valores significativamente inferiores a *Staph. aureus* (Tabla 7) lo que indicaría una capacidad patógena menor que los ECN antes citados. *Staph. epidermidis* y *Staph. saprophyticus* se han asociado principalmente a los casos subclínicos, de modo que se considera que son menos virulentos o que causan infecciones menos persistentes que otros ECN (Waller y col., 2011). Sin embargo, no todos los estudios llegan a las mismas conclusiones. Así, Thorberg y col. (2009) indicaron que las IIM por *Staph. chromogenes*, *Staph. epidermidis* y *Staph. simulans* provocaban una mastitis subclínica con una reacción inflamatoria media o intensa, mientras que para otras especies de ECN las infecciones eran generalmente menos persistentes y RCS más bajas. Estas contradicciones entre trabajos se pueden deber a que se realizaron en pocas explotaciones y en ese sentido nuestros resultados, sobre un mayor número de muestras, pueden dar una visión más aproximada de la capacidad patógena real de las diferentes especies de ECN.

Las diferencias entre especies de un mismo género se observaron también en otros grupos de microorganismos (Tabla 6). Mientras que las mastitis clínicas representaron el 36,86% de las muestras donde se aislaron los estreptococos en su conjunto, se observaron diferencias en este valor entre especies que oscilaron desde el 29,86% de *Strep. canis* hasta el 55,56% de *Strep. hyointestinalis*. En el caso de las enterobacterias (50,40%), el porcentaje de

mamitis clínicas según la especie osciló entre el 23,27% de *S. liquefaciens* hasta el 62,95% de *E. coli*. En el caso de enterococos (18,93%), la variación fue desde el 15,39% para *E. faecalis* hasta el 25,53% para *E. saccharolyticus*. Por último, en el caso de las levaduras (35,65%), el porcentaje de muestras clínicas varió desde el 31,74% para *Candida rugosa* hasta el 42,80% para *Candida krusei*.

Las diferencias estadísticamente significativas encontradas en el % de mamitis clínicas entre especies de un mismo grupo (Tabla 7 y Figura 22) indican que la patogenicidad debe ser valorada independientemente para cada especie y no a nivel de grupo.

Tabla 5. Porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de muestras, para cada grupo microbiano (Galicia 2005-2011).

Microorganismo	% clínicas/total	Microorganismo	%
<i>Trueperella pyogenes</i>	76,12	Gram- no enterobacterias	32,31
Enterobacterias	54,40	<i>Listeria spp.</i>	25,21
Hongos filamentosos	48,05	<i>Lactococcus spp.</i>	22,58
<i>Nocardia spp.</i>	41,90	<i>Staph. aureus</i>	20,22
<i>Streptococcus spp.</i>	36,86	Enterococcus spp.	18,93
Otros Gram positivos	36,18	ECN	17,17
Levaduras	35,65	<i>Corynebacterium spp.</i>	13,38
<i>Prototheca spp.</i>	34,10		

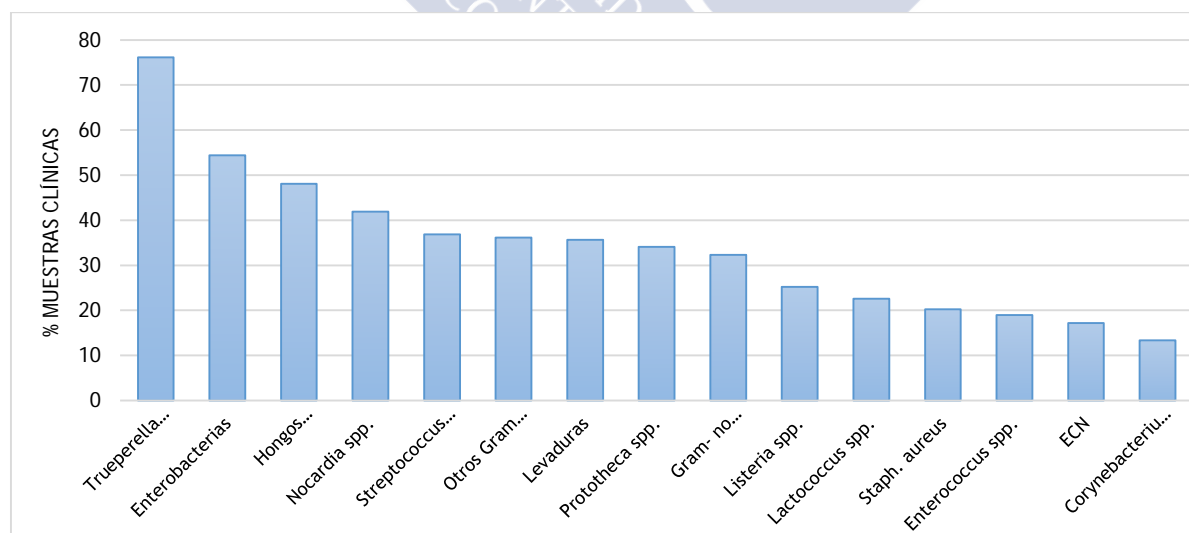


Figura 19. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada grupo de microorganismo (Galicia 2005-2011).

Tabla 6. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada microorganismo; (Galicia 2005-2011).

Microorganismo	% clínicas/total	Microorganismo	% clínicas/total
<i>Trueperella pyogenes</i>*	76,12	<i>Strep. agalactiae</i>	30,40
<i>E. coli</i>	62,95	<i>Strep. canis</i>	29,86
<i>Pasteurella multocida</i>	58,27	<i>Staph. hyicus</i>	25,74
<i>Strep. hyointestinalis</i>	55,56	<i>E. saccharolyticus</i>	25,53
<i>K. pneumoniae</i>	52,93	<i>S. liquefaciens</i>	23,27
<i>K. oxytoca</i>	43,96	<i>Lactococcus spp.</i>	22,58
<i>Candida krusei</i>	42,80	<i>E. faecium</i>	22,32
<i>Nocardia spp</i>	41,90	<i>A. viridans</i>	21,48
<i>Strep. dysgalactiae</i>	41,48	<i>Staph. sciuri</i>	21,37
<i>Strep. mitis/oralis</i>	39,41	<i>Staph. aureus</i>	20,22
<i>Candida tropicalis</i>	39,40	<i>Staph. chromogenes</i>	20,08
<i>Strep. suis</i>	37,85	<i>Staph. lentus</i>	19,02
<i>Strep. porcinus</i>	37,61	<i>Staph. intermedius</i>	18,67
<i>Strep. uberis</i>	36,45	<i>Staph. simulans</i>	18,16
<i>Citrobacter koseri</i>	36,41	<i>Staph. warneri</i>	17,10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36,06	<i>Staph. xylosus</i>	16,92
<i>Strep. gallolyticus</i>	35,71	<i>Staph. gallinarum</i>	15,56
<i>Enterobacter cloacae</i>	34,91	<i>E. faecalis</i>	15,39
<i>Candida famata</i>	34,63	<i>Staph. saprophyticus</i>	14,89
<i>Prototheca spp.</i>	34,10	<i>Staph. hominis</i>	13,89
<i>S. marcescens</i>	33,69	<i>Corynebacterium spp.</i>	13,38
<i>Candida rugosa</i>	31,74	<i>Staph. epidermidis</i>	12,69
<i>Strep. thoralensis</i>	31,54	<i>Staph. haemolyticus</i>	12,02
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	30,83		

*En negrita se indican los microorganismos con aislamientos \geq 0,3% sobre el total de las muestras

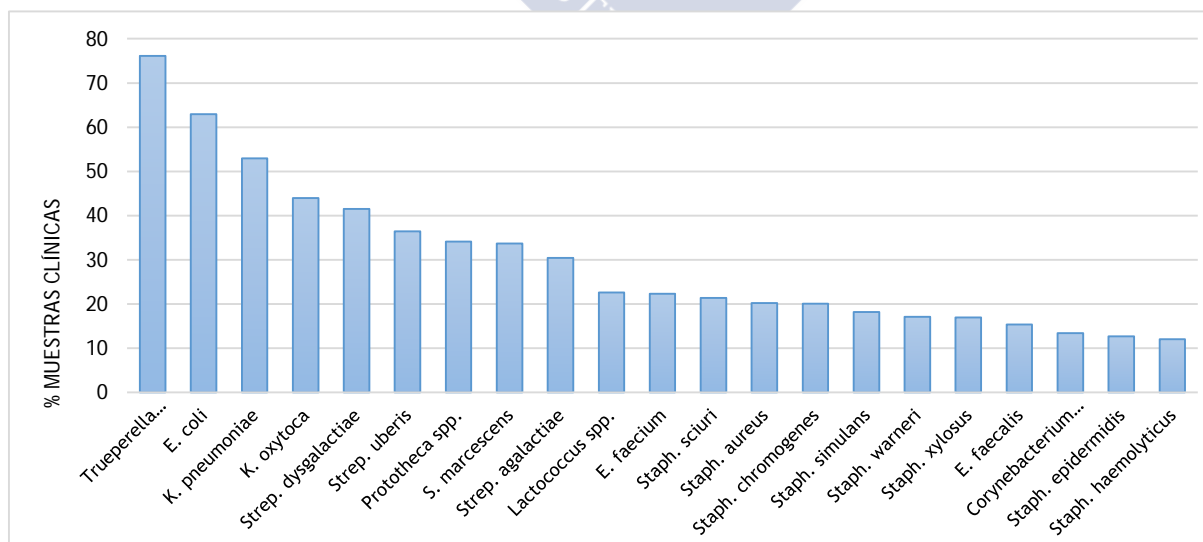


Figura 20. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada microorganismo (aislamientos \geq 0,3%); Galicia 2005-2011.

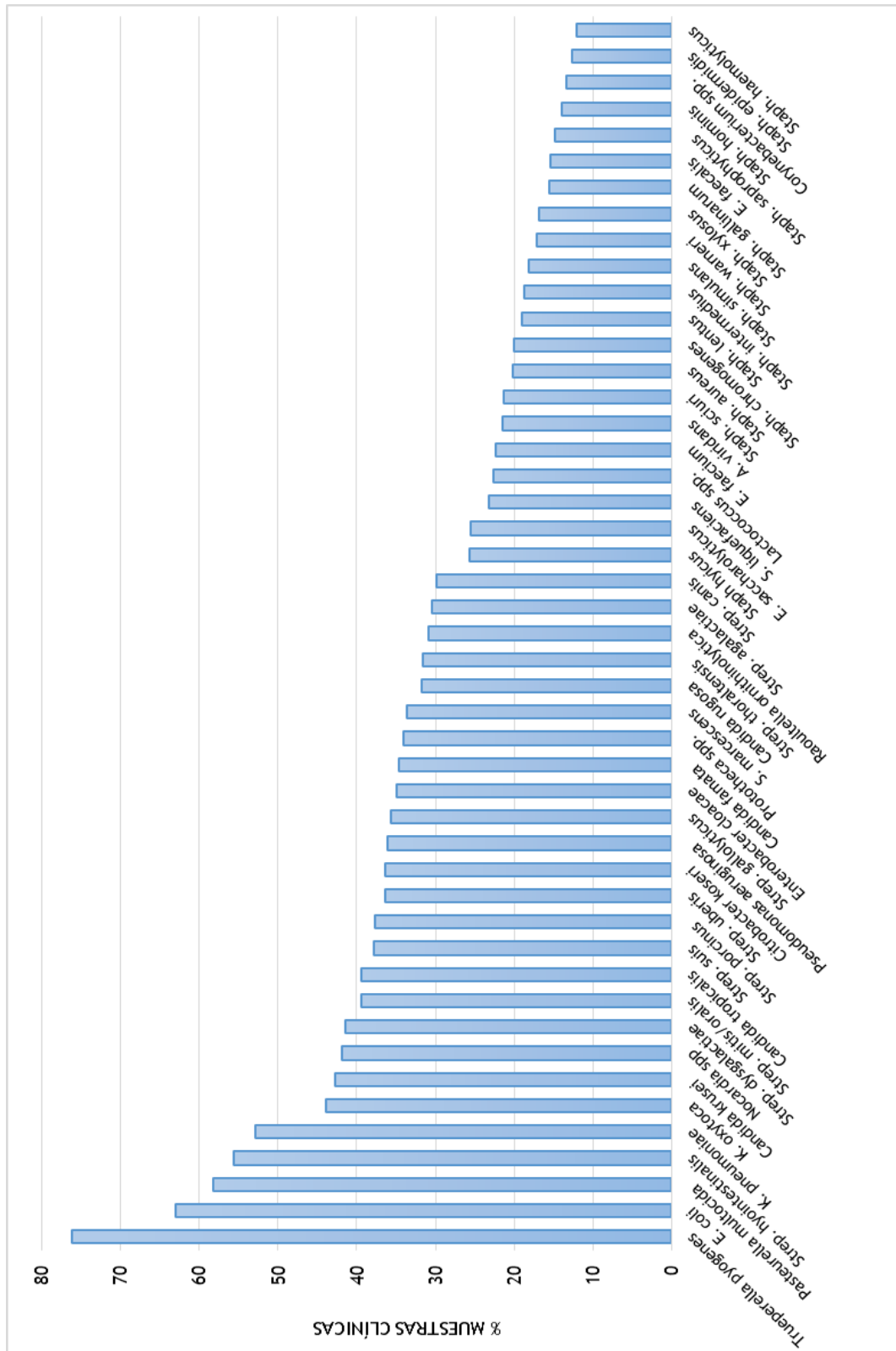


Figura 21. Porcentaje de muestras clínicas sobre el total de muestras para cada microorganismo (aislamiento $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

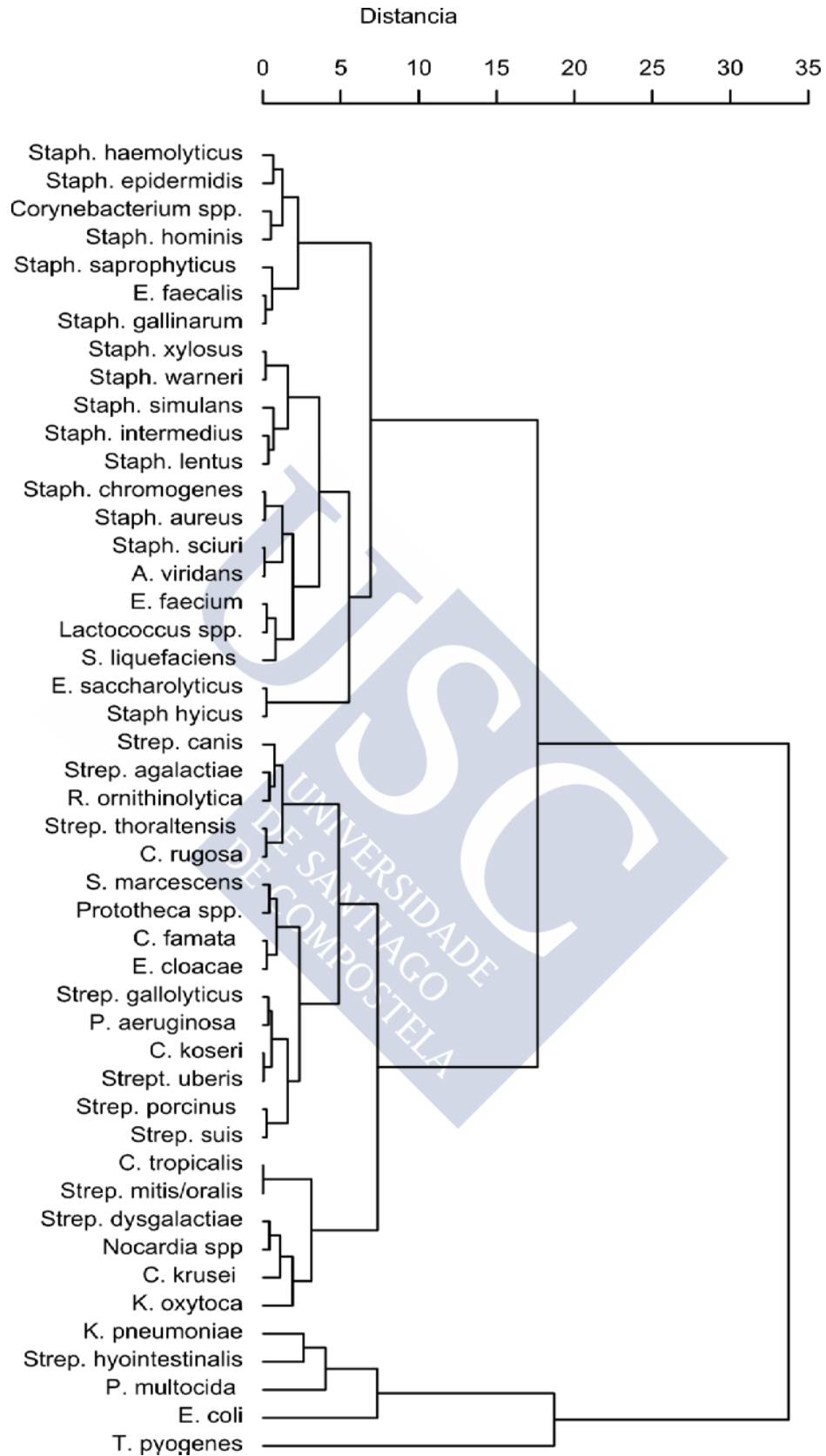


Figura 22. Dendrograma de los patógenos mamarios aislados según el % de mamitis clínicas sobre el total de muestras (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

4.3. Resultados de recuento de células somáticas para cada patógeno.

Se debe tener en cuenta que al analizar los datos que los RCS para cada patógeno mamario, **se han considerado por separado las muestras con RCS < 100.000 cel/ ml** y las muestras con $RCS \geq 100.000$ cel/ml.

En 18.774 muestras los RCS eran menores de 100.000 cel/ml. De éstas, 5.996 (31,94%) tuvieron como resultado ausencia de crecimiento, 4.656 (24,80%) se consideraron muestras contaminadas y en 8.036 (42,80%) se identificó un único microorganismo (Tabla 2). De las 122.956 muestras subclínicas en las que se aisló un solo microorganismo, 8.036 (6,54%) presentaron un recuento inferior a 100.000 cel/ml y 114.920 (93,46%) presentaron un RCS igual o superior a 100.000 cel/ml. De las 23.575 muestras subclínicas en las que no hubo crecimiento, 5.996 (25,44%) presentaron un RCS inferior a 100.000 cel/ml.

Hay diferencias entre los métodos por los que se puede establecer los recuentos normales de RCS a nivel de cuarterón, de modo que se han utilizado diferentes cifras como umbral de RCS para considerar cuando hay una infección, estableciéndose desde 100.000 a 500.000 cel/ml (Schwarz y col., 2010). Cuanto más alto sea el umbral de RCS adoptado para clasificar un cuarterón como infectado, mayor será el porcentaje de falsos negativos, con lo que no serán diagnosticados más casos de mamitis subclínicas. Por el contrario, cuanto más bajo se fije el umbral de RCS mayor será el porcentaje de falsos positivos, y por tanto, mayor porcentaje de cuarterones serán clasificados como enfermos.

Diversos autores han considerado el RCS de 100.000 cel/ml, como el idóneo para considerar el valor a partir del cual empieza la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria, dado que se presentan alteraciones en la secreción láctea, incluyendo disminución en la producción de leche (Schwarz y col., 2010). Un dato muy llamativo de nuestros resultados es que en el 42,80% de las muestras con $RCS < 100.000$ cel/ml hubo aislamiento positivo. No es la primera vez que se encuentra un porcentaje no desdeñable de aislamientos en muestras con RCS bajo aunque, al igual que sucedió en nuestro estudio, resultó inferior al de las muestras con superiores RCS (Napel y col., 2009; Schwarz, et al., 2010). Asimismo, no siempre se puede confirmar que los aislamientos en muestras con $RCS < 100.000$ cel/ml procedan de una contaminación o representen una verdadera IIM. En este sentido, algunos autores coinciden en señalar que no todos los patógenos aislados provienen de la contaminación de las muestras, por lo que, según los criterios actuales,

hay procesos inflamatorios que podrían estar siendo considerado sanos (Napel y col., 2009; Schwarz, et al., 2010). En definitiva, hay autores que consideran que los actuales métodos y criterios microbiológicos, desarrollados en su día para la detección de infecciones crónicas, necesitan una revisión para adecuarlos al espectro completo de los patógenos implicados en mastitis (Makovec y Ruegg, 2003).

4.3.1. Porcentaje de aislamiento de los distintos patógenos en muestras con RCS inferior a 100.000 cel/ml.

En la Tabla 8 y Figura 23, se pueden observar las frecuencias de aislamiento para cada grupo de microorganismo en las muestras con RCS menor de 100.000 cel/ml. En la tabla 9 se muestra estos resultados para los microorganismos con aislamiento $\geq 0,1\%$.

Corynebacterium spp., ECN y *Staph. aureus* son los microorganismos que aparecen con mayor frecuencia de aislamiento en estas muestras, representando en conjunto el 83,51% de las muestras con RCS <100.000 cel/ml. Otros microorganismos, como diversas especies de estreptococos, levaduras y *Prototheca* spp. no se aislaron o lo fueron en baja proporción en este grupo de muestras.

Es de destacar las diferencias apreciables que se hallaron entre los porcentajes de aislamiento de los diferentes microorganismos en el conjunto de muestras subclínicas (Tabla 4) y las que presentaron un RCS < 100.000 cel/ml (Tabla 8). Así, **en el caso de ECN y *Corynebacterium* spp. es mucho mayor su participación proporcional en las muestras con RCS < 100.000 cel/ml que en el total de mastitis subclínicas. Lo contrario pasa en el caso de estreptococos, *Staph. aureus*, enterococos y enterobacterias.** Estas diferencias observadas entre los diferentes patógenos confirman que en la selección del umbral de RCS utilizado para definir una mastitis bovina se debe considerar la prevalencia de los diferentes patógenos mamarios causantes de IIM en una población (Poutrel y Rainard, 1982). La disminución de los RCS en las granjas donde se han realizado programas de control durante años y las cada vez mayores exigencias de calidad de leche (Smith y Hogan, 1995) aumentan la importancia relativa de las IIM causadas por patógenos mamarios asociadas a bajos RCS. Esto justifica la **adopción de valores de umbral de RCS cada vez más bajos para considerar una mastitis bovina**, especialmente cuando se quiere realizar control de las infecciones por *Staph. aureus*, ECN y *Corynebacterium* spp.

Nuestros resultados confirman la existencia de verdaderas IIM en casos con RCS < 100.000 cel/ml. Así *Strep. agalactiae*, considerado un patógeno obligado de la mama, se aisló en el **1,29% de las muestras con RCS < 100.000 cel/ml** (Tabla 9). Sin embargo, microorganismos considerados ambientales como *Listeria* spp. y hongos no fueron aislados en este grupo de muestras.

Tabla 8. Porcentaje de aislamiento de grupos de microorganismos en muestras de leche con RCS < 100.000 cel/ml (Galicia 2005-2011).

Microorganismo	%	Microorganismo	%
<i>Corynebacterium</i> spp.	49,75	Gram- no enterobacterias	0,55
ECN	22,83	Otros Gram positivos	0,47
<i>Staph. aureus</i>	10,93	<i>Trueperella pyogenes</i>	0,04
<i>Streptococcus</i> spp.	5,71	<i>Nocardia</i> spp.	0,02
Enterobacterias	5,33	<i>Prototheca</i> spp.	0,01
<i>Enterococcus</i> spp.	2,54	Hongos filamentosos	0,00
<i>Lactococcus</i> spp.	1,41	<i>Listeria</i> spp.	0,00
Levaduras	0,41		

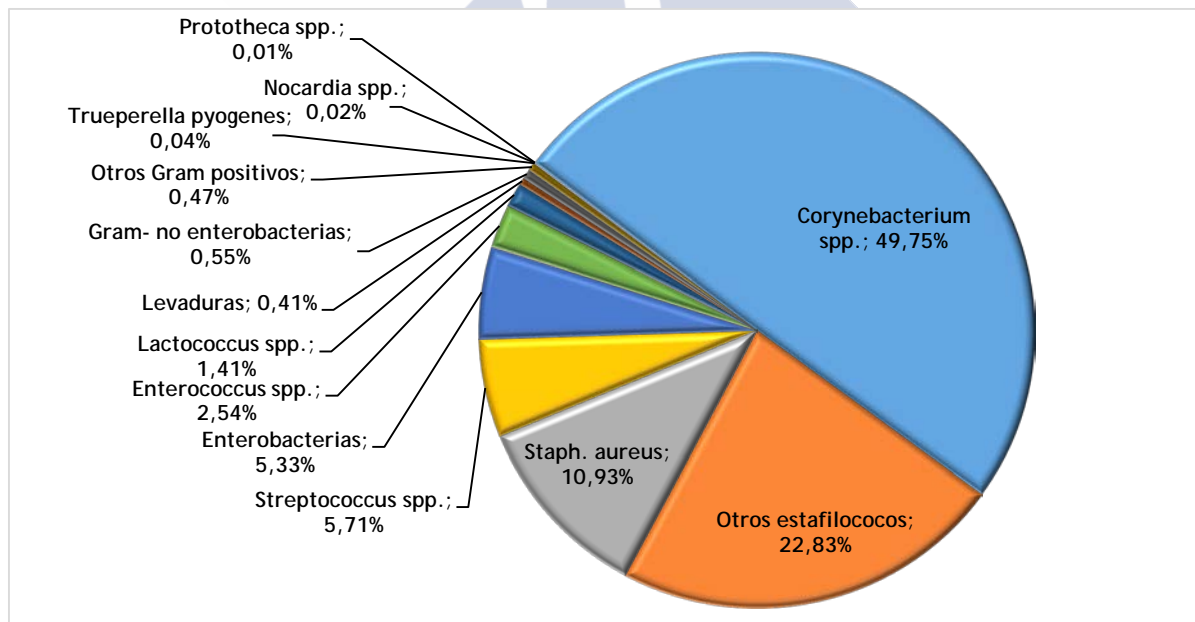


Figura 23. Frecuencia de aislamiento de grupos de microorganismos en muestras de leche con RCS < 100.000 cel/ml (Galicia 2005-2011).

Tabla 9. Porcentaje de aislamiento de microorganismos en muestras de leche con RCS < 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

Microorganismo	%	Microorganismo	%
<i>Corynebacterium spp.*</i>	49,75	<i>Staph. lentus</i>	0,30
<i>Staph. aureus</i>	10,93	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,24
<i>Staph. chromogenes</i>	4,32	<i>K. pneumoniae</i>	0,21
<i>Staph. epidermidis</i>	3,56	<i>S. marcescens</i>	0,14
<i>Strep. uberis</i>	3,26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,11
<i>Staph. haemolyticus</i>	2,54	<i>E. faecium</i>	0,10
<i>Staph. xylosum</i>	2,34	<i>Citrobacter koseri</i>	0,09
<i>Staph. simulans</i>	2,28	<i>Strep. thoraltensis</i>	0,07
<i>E. coli</i>	2,28	<i>E. saccharolyticus</i>	0,07
<i>E. faecalis</i>	2,14	<i>Strep. porcinus</i>	0,04
<i>Staph. warneri</i>	1,82	<i>Strep. canis</i>	0,04
<i>Staph. sciuri</i>	1,42	<i>Strep. mitis/oralis</i>	0,04
<i>Lactococcus spp.</i>	1,41	<i>Trueperella pyogenes</i>	0,04
<i>Strep. agalactiae</i>	1,29	<i>Candida krusei</i>	0,02
<i>Strep. dysgalactiae</i>	0,75	<i>Candida famata</i>	0,02
<i>Staph. saprophyticus</i>	0,75	<i>Nocardia spp.</i>	0,02
<i>Staph. hominis</i>	0,68	<i>Strep. gallolyticus</i>	0,01
<i>Serratia liquefaciens</i>	0,56	<i>Strep. hyointestinalis</i>	0,01
<i>Aerococcus viridans</i>	0,46	<i>Prototheca spp.</i>	0,01
<i>Staph. hyicus</i>	0,41	<i>Candida rugosa</i>	0,01
<i>Staph. intermedius</i>	0,37	<i>Candida tropicalis</i>	0,00
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	0,37	<i>Pasteurella multocida</i>	0,00
<i>K. oxytoca</i>	0,37	<i>Strep. suis</i>	0,00
<i>Staph. gallinarum</i>	0,32		

*En negrita se indican los aislamientos $\geq 0,3\%$.

4.3.1.1. Porcentaje de muestras con RCS menor de 100.000 cel/ml sobre el total de muestras en las que fueron aislados cada patógeno.

En la Tabla 10 y en la Figura 24 se muestra el porcentaje de muestras con RCS <100.000 en relación al total de muestras e n las que fue aislado cada grupo de microorganismos. En la Tabla 11 y Figura 25 se recogen los resultados para los patógenos con aislamiento $\geq 0,1\%$, donde se puede observar *Corynebacterium* spp. y la mayoría de los ECN en especial el *Staph. hominis* esta proporción es superior al 10%.

Tabla 10. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada grupo de microorganismos; Galicia 2005-2011.

Microorganismo	%	Microorganismo	%
<i>Corynebacterium</i> spp.	13,33	<i>Streptococcus</i> spp.	0,92
ECN	8,01	<i>Nocardia</i> spp.	0,70
Otros Gram positivos	5,92	Levaduras	0,42
Gram- no enterobacterias	3,53	<i>Trueperella pyogenes</i>	0,13
<i>Staph. aureus</i>	3,30	<i>Prototheca</i> spp.	0,08
<i>Lactococcus</i> spp.	2,91	<i>Listeria</i> spp.	0,00
<i>Enterococcus</i> spp.	2,51	Hongos filamentosos	0,00
Enterobacterias	2,05		

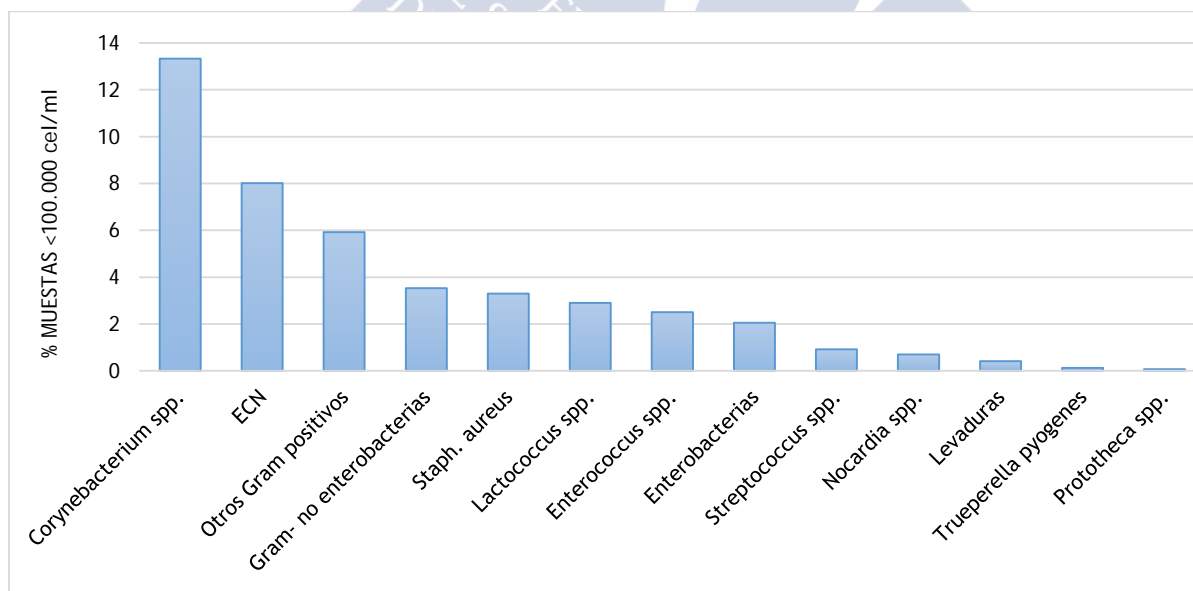


Figura 24. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada grupo de microorganismos; Galicia 2005-2011.

Tabla 11. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada microorganismo (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

Microorganismo	%	Microorganismo	%
<i>Corynebacterium spp.*</i>	13,33	<i>Citrobacter koseri</i>	1,83
<i>Staph. hominis</i>	11,75	<i>E. coli</i>	1,37
<i>Staph. saprophyticus</i>	9,84	<i>Strep. thoraltensis</i>	1,34
<i>Staph. warneri</i>	9,49	<i>Serratia marcescens</i>	1,31
<i>Aerococcus viridans</i>	9,18	<i>Strep. canis</i>	1,06
<i>Staph. xylosus</i>	9,14	<i>Strep. uberis</i>	0,90
<i>Serratia liquefaciens</i>	8,93	<i>K. pneumoniae</i>	0,75
<i>Staph. chromogenes</i>	8,87	<i>Strep. mitis/oralis</i>	0,73
<i>Staph. haemolyticus</i>	8,55	<i>Nocardia spp.</i>	0,70
<i>Staph. gallinarum</i>	8,50	<i>E. saccharolyticus</i>	0,66
<i>Staph. epidermidis</i>	8,25	<i>Strep. dysgalactiae</i>	0,54
<i>Staph. hyicus</i>	7,89	<i>E. faecium</i>	0,48
<i>Staph. lentus</i>	7,34	<i>Strep. porcinus</i>	0,45
<i>Raoultella</i>	7,28	<i>Candida famata</i>	0,31
<i>Staph. simulans</i>	6,71	<i>Candida krusei</i>	0,28
<i>Staph. sciuri</i>	6,33	<i>Strep. hyointestinalis</i>	0,19
<i>K. oxytoca</i>	4,12	<i>Strep. gallolyticus</i>	0,14
<i>Staph. intermedius</i>	3,98	<i>Trueperella pyogenes</i>	0,13
<i>E. faecalis</i>	3,81	<i>Candida rugosa</i>	0,13
<i>Enterobacter cloacae</i>	3,86	<i>Prototheca spp.</i>	0,08
<i>Staph. aureus</i>	3,30	<i>Candida tropicalis</i>	0,00
<i>Lactococcus spp.</i>	2,91	<i>Strep. suis</i>	0,00
<i>Pseudomonas</i>	2,72	<i>Pasteurella multocida</i>	0,00
<i>Strep. agalactiae</i>	2,07		

*En negrita se indican los aislamientos $\geq 0,3\%$.

Estos resultados confirman que un porcentaje importante de infecciones por patógenos como *Corynebacterium*, ECN, *Staph. aureus* y *Strep. agalactiae*, entre otros, no son consideradas al fijar un umbral superior a 100.000 cel/ml. Este hecho tiene una importante aplicación práctica en el caso de *Strep. agalactiae* dado que suele vincularse directamente con protocolos de erradicación en las explotaciones que tienen esta infección.

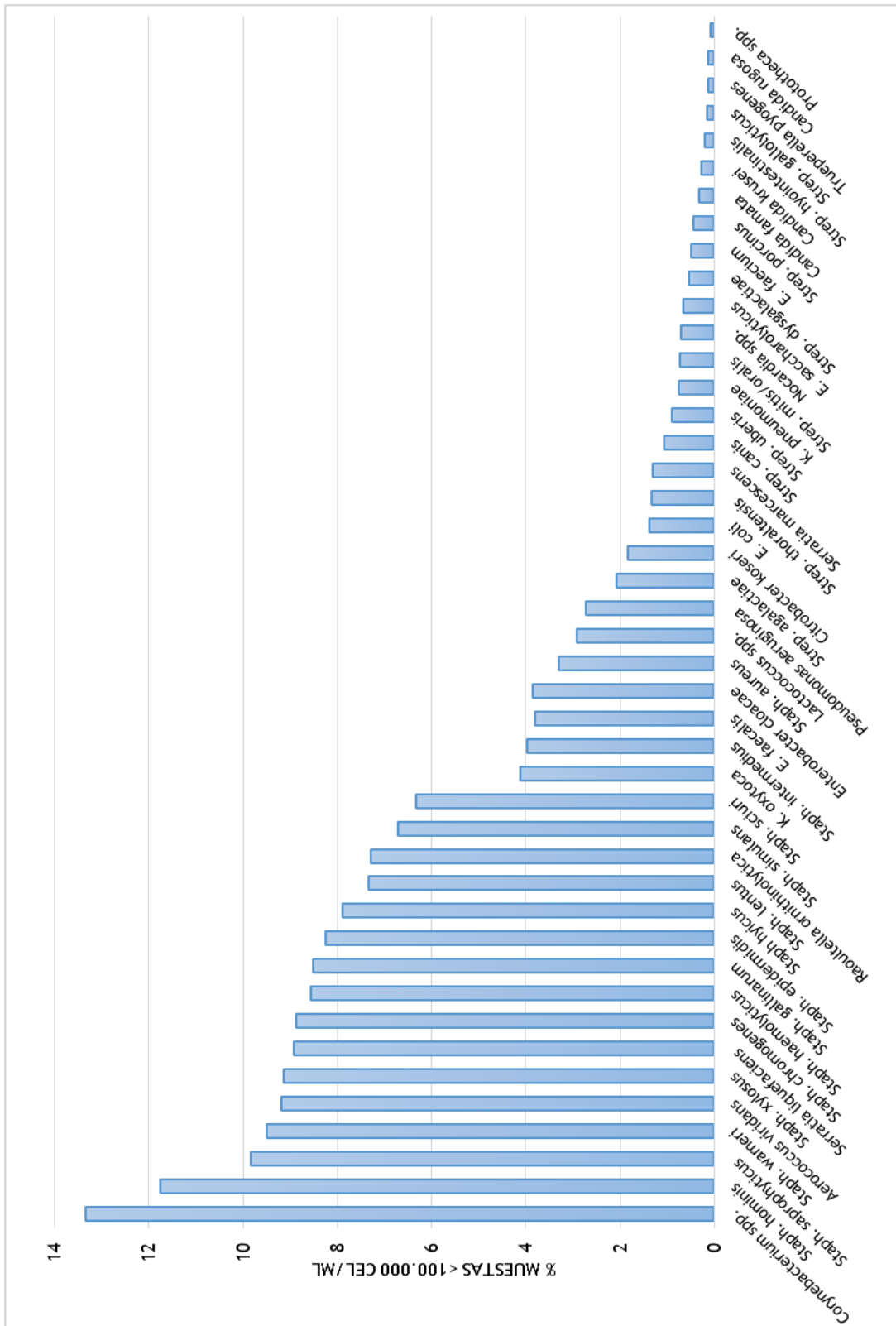


Figura 25. Porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total muestras para cada microorganismo (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

Tabla 12. Agrupación de microorganismos sin diferencias significativas en el porcentaje de aislamiento en muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total de muestras (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011.

<i>Corynebacterium spp.</i>	1									
<i>Staph. warneri</i>		2								
<i>Staph. xylosum</i>		2								
<i>Staph. chromogenes</i>		2								
<i>Staph. haemolyticus</i>		2								
<i>Staph. epidermidis</i>		2								
<i>Staph. simulans</i>			3							
<i>Staph. sciuri</i>			3							
<i>K. oxytoca</i>				4						
<i>E. faecalis</i>				4						
<i>Staph. aureus</i>				4						
<i>Lactococcus spp.</i>				4						
<i>Strep. agalactiae</i>					5					
<i>E. coli</i>						6				
<i>S. marcescens</i>						6				
<i>Strep. uberis</i>							7			
<i>K. pneumoniae</i>							7	8		
<i>Strep. dysgalactiae</i>								8	9	
<i>E. faecium</i>								8	9	
<i>Levaduras</i>									9	10
<i>T. pyogenes</i>										10
<i>Prototheca spp</i>										10

Se indican en un mismo color y número agrupaciones de microorganismos entre los que no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento. La numeración sigue el orden de mayor a menor.

En la tabla 12 se observan 10 agrupaciones de microorganismos en función de la proporción de aislamiento en muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre *Corynebacterium spp.* y el resto de microorganismos. En los otros 9 grupos restantes se incluyen desde dos a cinco microorganismos, entre los cuales no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

4.3.2. Resultados microbiológicos en muestras con RCS igual o superior a 100.000 cel/ml.

En 155.590 muestras se obtuvieron resultados de RCS ≥ 100.000 cel/ml (Tabla 2). De éstas, 17.596 tuvieron como resultado ausencia de crecimiento, 21.868 se consideraron muestras contaminadas y 114.920 resultaron con un único microorganismo. De éstas últimas, 108.267 (94,21%) se corresponden a patógenos con aislamiento igual o superior al 0,3%.

4.3.2.1. *Recuento de células somáticas según los microorganismos aislados de muestras con RCS ≥ 100.000 cel/ml.*

Para valorar **la gravedad de las IIM según el patógeno implicado** se ha utilizado el RCS de las muestras con RCS ≥ 100.000 cel/ml.

En las tablas 13 y 14 se muestran los resultados de los RCS para los diferentes grupos de microorganismos y para los patógenos con frecuencia de aislamiento $\geq 0,1\%$, respectivamente. Las muestras con ausencia de crecimiento tuvieron una media y mediana de 2.961,54 y 1.228, respectivamente y una asimetría de 2,282 y curtosis de 5,90. Los valores más altos se obtuvieron para *Nocardia* spp., *T. pyogenes* y hongos filamentosos, mientras que los más bajos correspondieron a ECN y *Corynebacterium* spp.

En la Figura 26 se muestra la distribución de frecuencias de RCS correspondiente a los grupos de microorganismos y en las Figuras 27 a 29 se muestran las distribuciones de frecuencias de RCS de los microorganismos con porcentajes de aislamiento $\geq 0,1\%$.

Cuando se consideraron los microorganismos con aislamiento $\geq 0,1\%$ se observaron correlaciones estadísticamente significativas tanto de la media (0,898; $p < 0,001$) como de la mediana (0,786; $p < 0,001$) con respecto a la desviación típica. Se ha propuesto que cuanto mayor sea la diferencia de virulencia entre las cepas de una especie mayor será la variación en RCS de las muestras a partir de las cuales se aislaron. Sin embargo, la correlación positiva y estadísticamente significativa observada entre la media y mediana con la desviación típica de los RCS **indica que la variación del RCS se debe más a la mayor amplitud de la inflamación a la que pueden dar lugar los microorganismos más patógenos que a la existencia de diferencias de la patogenicidad entre cepas de una misma especie.** Lo contrario sería asumir que cuanto mayor es la capacidad patógena de un microorganismo, mayor es la variación de la patogenicidad de sus cepas.

Tabla 13. Recuento de células somáticas (RCS x 10³) para cada grupo de microorganismo, en muestras de leche con RCS ≥ 100.000 cel/ml; Galicia 2005-2011.

Grupo	Nº	Media	Mediana	DT
<i>Nocardia</i> spp.	163	8.824	7.953	4.341,433
<i>T. pyogenes</i>	524	7.420	6.100	5.667,773
Hongos filamentosos	40	5.187	4.401	3.989,446
<i>Streptococcus</i> spp.	31.096	5.021	3.403	4.893,625
Enterobacterias	8935	4.930	3.070	5.103,643
<i>Prototheca</i> spp.	833	4.923	4.164	3.387,365
Levaduras	3.633	4.663	3.239	4.200,939
<i>Listeria</i> spp.	89	4.612	3.968	3.194,644
Gram- no enterobacterias	726	4.446	2.736	4.480,945
<i>Staph. aureus</i>	20.441	3.418	1.955	3.892,790
<i>Lactococcus</i> spp.	2.891	3.209	1.845	3.730,105
<i>Enterococcus</i> spp.	6.353	2.947	1.701	3.465,700
Otros Gram positivos	384	2.896	1.587	3269,665
ECN	17.122	2.238	1.056	3.038,581
<i>Corynebacterium</i> spp.	21.688	1.925	793	2.941,220
TOTAL	114.918			

Se observaron diferencias apreciables entre las especies de un mismo grupo (Tabla 14). Así, entre las enterobacterias, los valores más altos se corresponden con *E. coli* (que superan a los estreptococos) y los más bajos a *Raoultella ornithinolytica* (inferiores a *Prototheca* spp., *Staph. aureus* y estreptococos). En el caso de las levaduras, existieron grandes diferencias en la media y mediana de RCS, siendo las más altas las de *Candida krusei* (superior a las enterobacterias, estreptococos y *Prototheca* spp.) y las más bajas las observadas para *Candida famata* (inferiores a *E. faecium*). En el caso de los estafilococos los valores más altos se corresponden con *Staph. aureus* y las más bajos con *Staph. hominis*, que incluso fueron inferiores a los de *Corynebacterium* spp.

Resultados y discusión

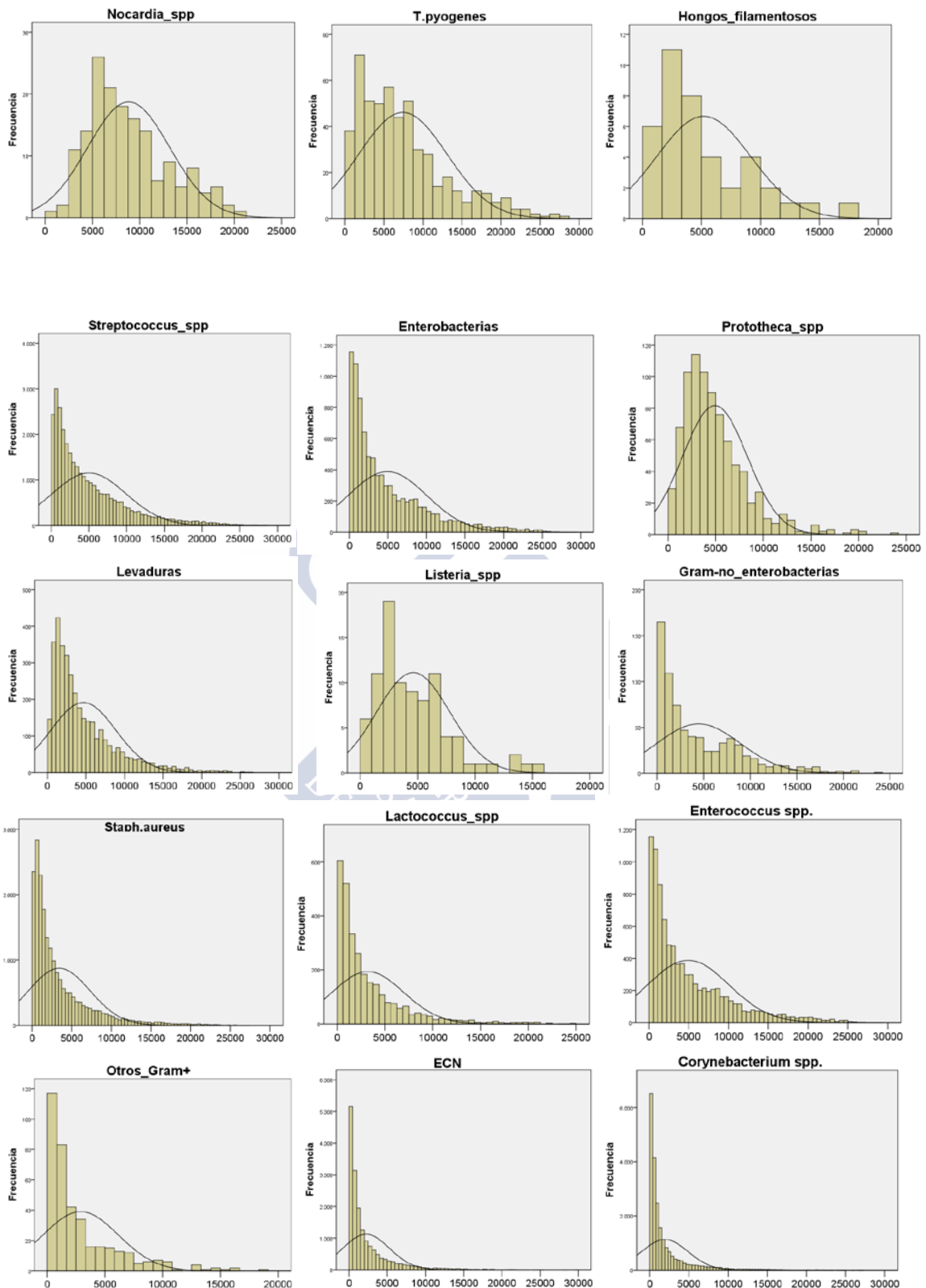


Figura 26. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas (RCS x 10³) de cada grupo de microorganismos (muestras con RCS ≥ 100.000 cel/ml); Galicia 2005-2011.

Tabla 14. Recuento de células somáticas (RCS x 10³) según el microorganismo aislado, en muestras de leche con RCS ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos ≥ 0,1%); Galicia 2005-2011.

Microorganismo	Nº	Media	Mediana	DT**
<i>Nocardia</i> spp.	163	8.825	7.953	4.341
<i>Pasteurella multocida</i>	111	7.895	7.719	4.962
<i>T. pyogenes</i>*	524	7.420	6.100	5.667
<i>Strep. hyointestinalis</i>	235	5.882	4.779	4.370
<i>Candida krusei</i>	407	5.626	4.145	4.804
<i>Escherichia coli</i>	4.771	5.617	3.795	5.439
<i>Strep. suis</i>	155	5.552	3.959	5.225
<i>Strep. mitis/oralis</i>	243	5.530	3.948	5.132
<i>K. pneumoniae</i>	1.035	5.398	3.539	5.231
<i>Strep. dysgalactiae</i>	6.427	5.386	3.625	5.179
<i>Strep. uberis</i>	18.148	5.139	3.594	4.905
<i>Strep. gallolyticus</i>	440	5.064	3.876	4.282
<i>Prototheca</i> spp.	833	4.923	4.164	3.387
<i>Strep. porcinus</i>	419	4.896	3.375	4.668
<i>Strep. canis</i>	192	4.665	3.431	4.096
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	201	4.629	2.970	4.520
<i>S. marcescens</i>	545	4.619	3.088	4.375
<i>Candida rugosa</i>	1.051	4.366	3.072	3.993
<i>Candida tropicalis</i>	323	4.344	2.488	4.260
<i>E. saccharolyticus</i>	659	4.290	3.012	4.058
<i>K. oxytoca</i>	375	4.133	2.549	4.386
<i>Strep. agalactiae</i>	3.389	4.108	2.276	4.660
<i>E. faecium</i>	1.276	4.038	3.048	3.595
<i>Strep. thoralensis</i>	300	3.873	3.103	3.352
<i>Candida famata</i>	417	3.787	2.493	3.612
<i>Enterobacter cloacae</i>	297	3.544	1.845	4.442
<i>Staph. aureus</i>	20.441	3.418	1.955	3.892
<i>Citrobacter koseri</i>	235	3.293	1.957	3.448
<i>Staph. intermedius</i>	580	3.279	1.911	3.530
<i>Lactococcus</i> spp.	2.891	3.209	1.845	3.730
<i>Serratia liquefaciens</i>	344	2.834	1.266	3.666
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	255	2.676	1.551	3.092
<i>Staph. sciuri</i>	1.303	2.506	1.276	3.292
<i>Staph. simulans</i>	2.047	2.351	1.088	3.110
<i>Staph. warneri</i>	1.123	2.317	1.043	3.328
<i>E. faecalis</i>	3.650	2.221	1.072	3.028
<i>Staph. hyicus</i>	270	2.221	1.039	3.116
<i>Staph. lentus</i>	240	2.206	1.172	2.813
<i>Staph. haemolyticus</i>	1.903	2.197	1.005	3.097
<i>Staph. xylosus</i>	1.521	2.177	1.048	2.933
<i>Staph. saprophyticus</i>	460	2.158	1.072	2.843
<i>Aerococcus viridans</i>	281	2.131	1.372	2.189
<i>Staph. epidermidis</i>	2.741	2.113	991	2.846
<i>Staph. gallinarum</i>	229	2.020	1.063	2.528
<i>Staph. chromogenes</i>	2.781	1.994	826	2.953
<i>Corynebacterium</i> spp.	21.688	1.926	793	2.941
<i>Staph. hominis</i>	348	1.308	675	1.914

*En negrita se indican los microorganismos con aislamientos ≥0,3%

**DT: desviación típica

Resultados y discusión

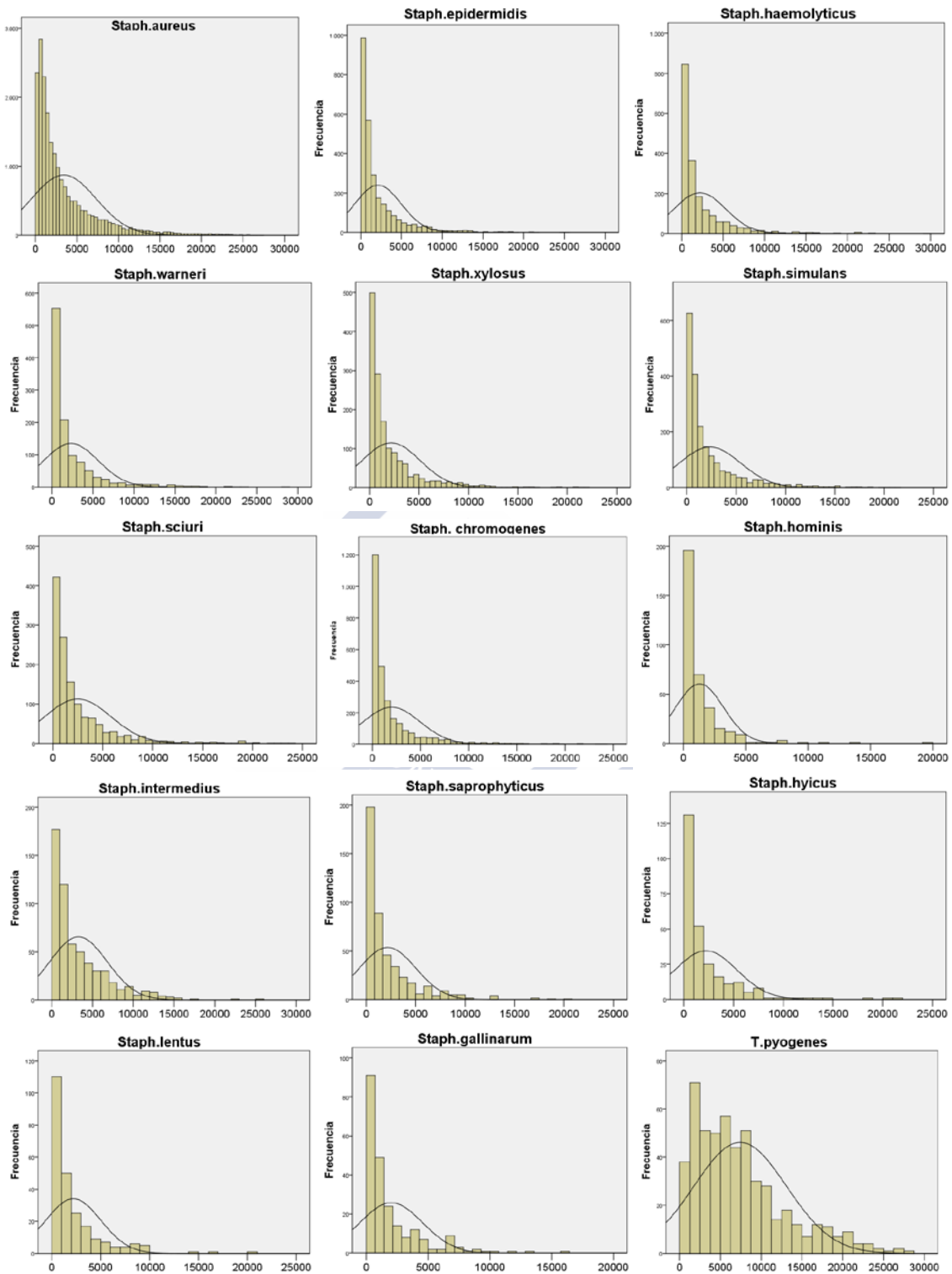


Figura 27. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas ($RCS \times 10^3$) de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

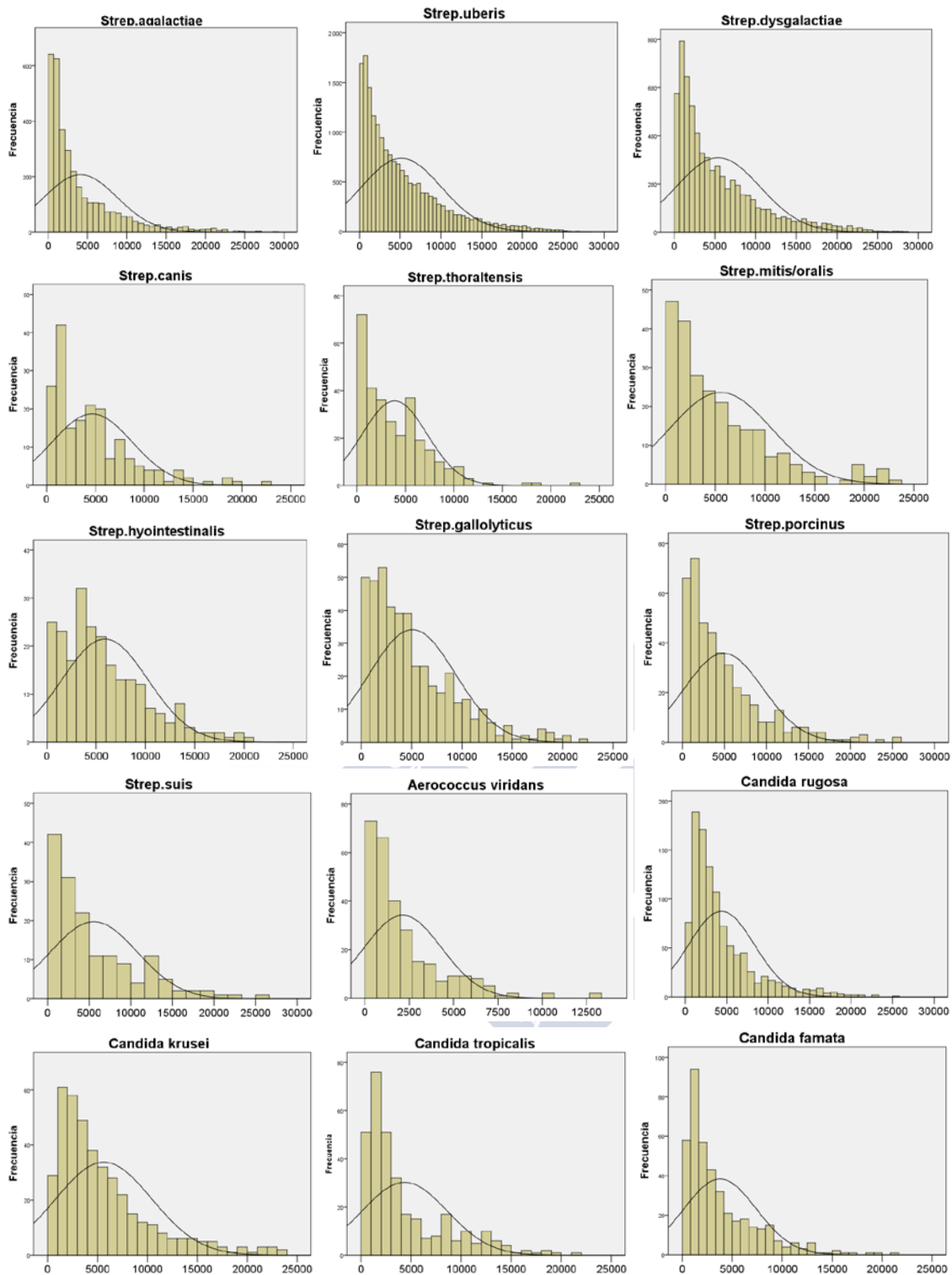


Figura 28. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas (RCS x 10³) de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos ≥ 0,1%); Galicia 2005-2011.

Resultados y discusión

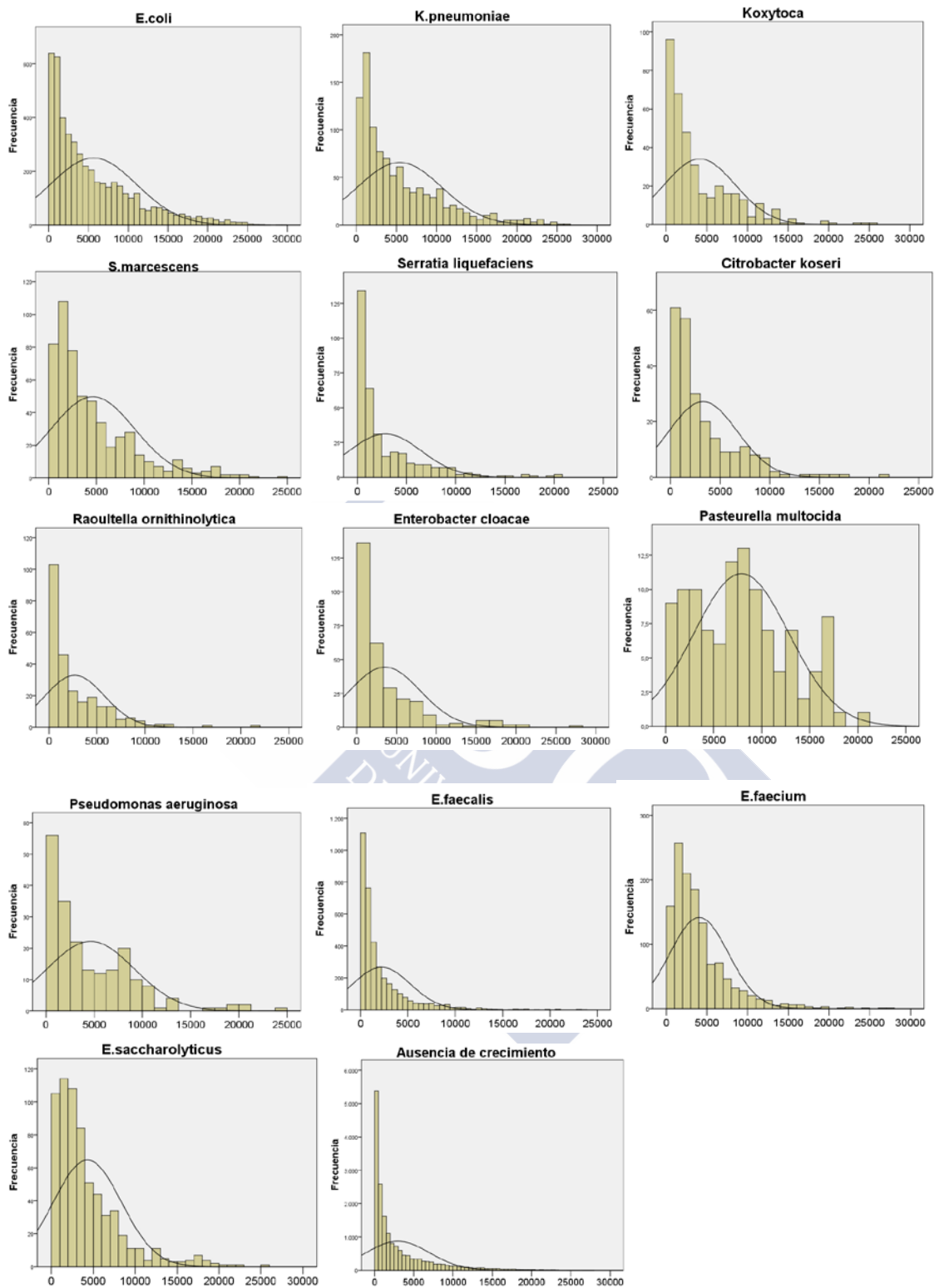


Figura 29. Distribución de frecuencias de recuento de células somáticas (RCS x 10³) de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

4.3.2.2. *Análisis de los Lineal Score según microorganismo aislado en muestras con RCS ≥ 100.000 cel/ml.*

En la tablas 15 y 16 se recogen los resultados obtenidos de LS para los distintos grupos de patógenos y para los microorganismos con frecuencia de aislamiento $\geq 0,1\%$, respectivamente. Las medias de LS variaron desde el 5,828 de *Staph. hominis* hasta el 9,277 de *Nocardia* spp. Las muestras con ausencia de crecimiento presentaron una media de 6,624 y una mediana de 6,618, con un valor de curtosis de -1.044 y de asimetría de 0,04. Comparando los resultados para cada patógeno obtenidos en el LS y el % de mastitis clínicas, aunque el orden de mayor a menor patogenicidad es en general muy similar, existen algunas excepciones a las que nos referiremos posteriormente. Es lógico pensar que cuanto mayor sea la capacidad patógena mayor serán el % de mastitis clínicas y el LS de las mastitis subclínicas de un microorganismo.

En la Figura 30 se muestran la distribución de frecuencias de LS de cada grupo de microorganismos y en las Figuras 31 a 33 se muestran las distribuciones de frecuencias de LS de los microorganismos con aislamiento $\geq 0,1$ %.

Tabla 15. Linear Score para cada grupo de microorganismos, en muestras de leche con RCS ≥ 100.000 cel/ml; Galicia 2005-2011.

Microorganismo	Media	Mediana	DT	Asimetría	Curtosis
<i>Nocardia</i> spp.	9,277	9,313	0,770	-0,516	0,371
<i>T. pyogenes</i>	8,685	8,931	1,427	-1,035	1,317
Hongos filamentosos	8,239	8,460	1,269	-0,732	1,363
<i>Prototheca</i> spp.	8,278	8,380	1,068	-0,712	1,306
<i>Listeria</i> spp.	8,153	8,310	1,139	-0,743	0,756
<i>Streptococcus</i> spp.	7,862	8,089	1,684	-0,486	-0,397
Levaduras	7,969	8,017	1,367	-0,344	-0,085
Enterobacterias	7,721	7,940	1,812	-0,434	-0,553
Gram- no enterobacterias	7,534	7,774	1,879	-0,450	-0,725
<i>Staph. aureus</i>	7,220	7,289	1,695	-0,193	-0,582
<i>Lactococcus</i> spp.	7,106	7,205	1,721	-0,201	-0,612
<i>Enterococcus</i> spp.	6,985	7,088	1,713	-0,177	-0,659
Otros Gram positivos	6,981	6,988	1,685	-0,134	-0,659
ECN	6,435	6,400	1,785	0,108	-0,809
<i>Corynebacterium</i> spp.	6,113	5,987	1,808	0,308	-0,703

Resultados y discusión

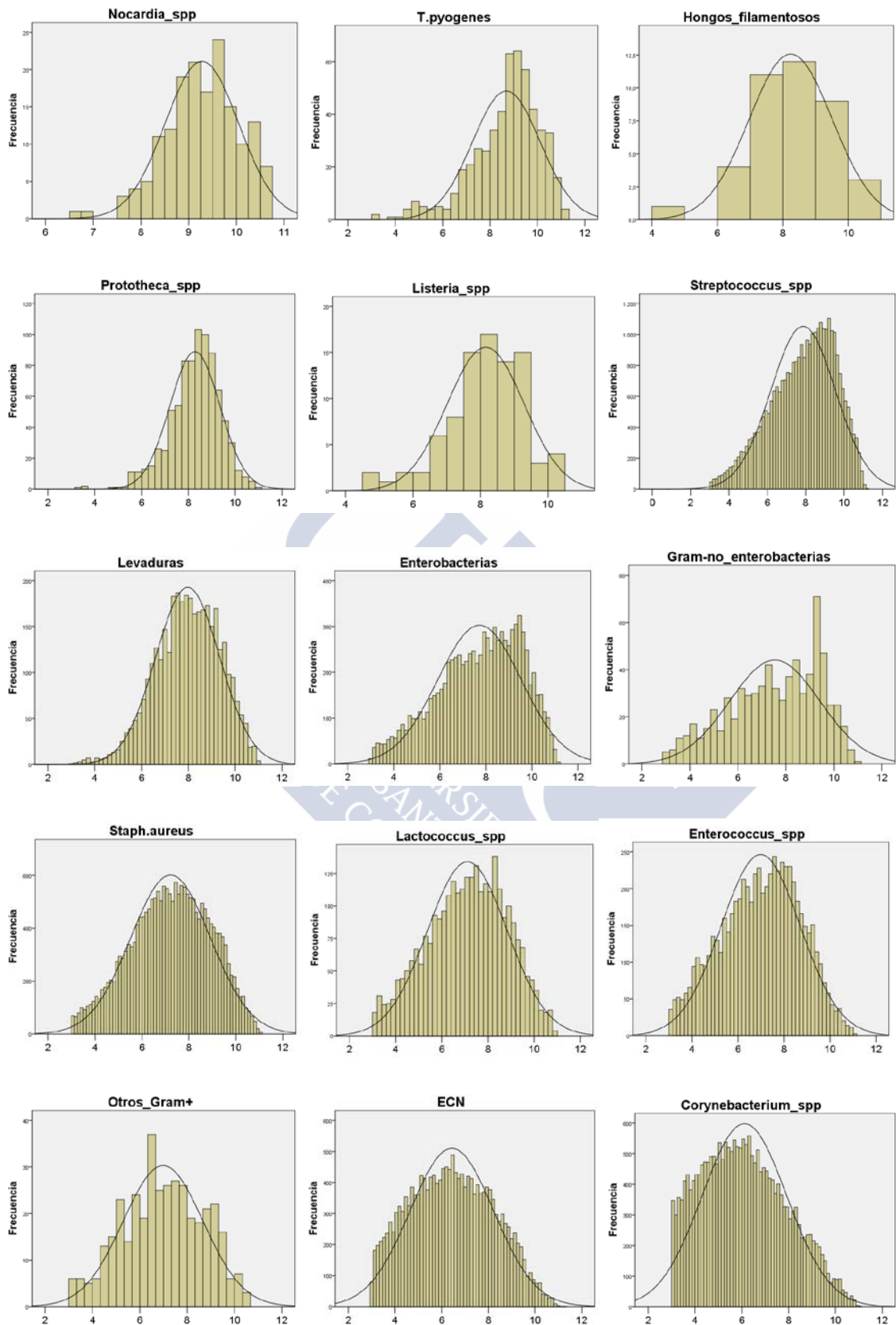


Figura 30. Distribución de frecuencias de Linear Score en cada grupo de microorganismos en muestras con RCS ≥ 100.000 cel/ml; Galicia 2005-2011.

Tabla 16. Linear Score de microorganismos aislados en muestras de leche con RCS ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

Microorganismo	Media	Mediana	DT	Asimetría	Curtosis
<i>Nocardia</i> spp.	9,277	9,313	0,770	-0,516	0,371
<i>Pasteurella multocida</i>	8,867	9,270	1,343	-1,314	1,767
<i>T. pyogenes</i>*	8,685	8,931	1,427	-1,035	1,317
<i>Strep. hyointestinalis</i>	8,370	8,579	1,389	-0,911	0,600
<i>Candida krusei</i>	8,289	8,373	1,309	-0,361	-0,163
<i>Prototheca</i> spp.	8,278	8,380	1,068	-0,712	1,306
<i>Strep. mitis/oralis</i>	8,120	8,303	1,502	-0,304	-0,651
<i>Strep. suis</i>	8,042	8,307	1,660	-0,560	-0,135
<i>Strep. gallolyticus</i>	8,053	8,276	1,486	-0,644	-0,55
<i>Strep. dysgalactiae</i>	8,001	8,180	1,625	-0,441	-0,381
<i>Escherichia coli</i>	7,973	8,246	1,769	-0,545	-0,382
<i>K. pneumoniae</i>	7,969	8,145	1,682	-0,500	-0,227
<i>Strep. canis</i>	7,958	8,101	1,411	-0,444	-0,121
<i>Strep. porcinus</i>	7,928	8,077	1,536	-0,438	-0,245
<i>Candida rugosa</i>	7,920	7,941	1,268	-0,125	-0,179
<i>Strep. uberis</i>	7,897	8,167	1,702	-0,547	-0,360
<i>S. marcescens</i>	7,849	7,949	1,533	-0,491	0,209
<i>E. faecium</i>	7,806	7,930	1,323	-0,523	0,582
<i>E. saccharolyticus</i>	7,783	7,913	1,488	-0,574	0,334
<i>Candida tropicalis</i>	7,775	7,637	1,430	-0,004	-0,655
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,696	7,892	1,775	-0,565	-0,358
<i>Candida famata</i>	7,597	7,640	1,453	-0,288	-0,293
<i>Strep. thoraltensis</i>	7,579	7,956	1,634	-0,708	-0,179
<i>K. oxytoca</i>	7,462	7,672	1,797	-0,355	-0,657
<i>Strep. agalactiae</i>	7,450	7,508	1,737	-0,193	-0,618
<i>Citrobacter koseri</i>	7,279	7,291	1,584	-0,234	-0,482
<i>Staph. aureus</i>	7,220	7,289	1,695	-0,193	-0,582
<i>Staph. intermedius</i>	7,134	7,256	1,777	-0,313	-0,733
<i>Lactococcus</i> spp.	7,106	7,205	1,721	-0,201	-0,612
<i>Enterobacter cloacae</i>	7,084	7,205	1,884	-0,122	-0,865
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	6,717	6,955	1,874	-0,123	-1,123
<i>Serratia liquefaciens</i>	6,686	6,662	1,921	0,023	-1,013
<i>Staph. sciuri</i>	6,683	6,674	1,722	0,006	-0,652
<i>Staph. lentus</i>	6,545	6,551	1,673	0,050	-0,683
<i>Staph. simulans</i>	6,511	6,444	1,788	0,92	-0,812
<i>E. faecalis</i>	6,493	6,423	1,701	0,137	-0,672
<i>Staph. warneri</i>	6,436	6,383	1,810	0,143	-0,734
<i>Staph. hyicus</i>	6,426	6,378	1,785	0,082	-0,742
<i>Staph. xylosus</i>	6,413	6,390	1,766	0,117	-0,805
<i>Staph. saprophyticus</i>	6,412	6,422	1,777	0,060	-0,853
<i>Staph. haemolyticus</i>	6,387	6,329	1,793	0,133	-0,790
<i>Staph. epidermidis</i>	6,383	6,309	1,749	0,124	-0,772
<i>Staph. gallinarum</i>	6,363	6,410	1,731	0,100	-0,916
<i>Staph. chromogenes</i>	6,174	6,046	1,815	0,272	-0,765
<i>Corynebacterium</i> spp.	6,113	5,987	1,808	0,308	-0,703
<i>Staph. hominis</i>	5,828	5,756	1,556	0,313	-0,550

*En negrita se indican los aislamientos $\geq 0,3\%$.

Resultados y discusión

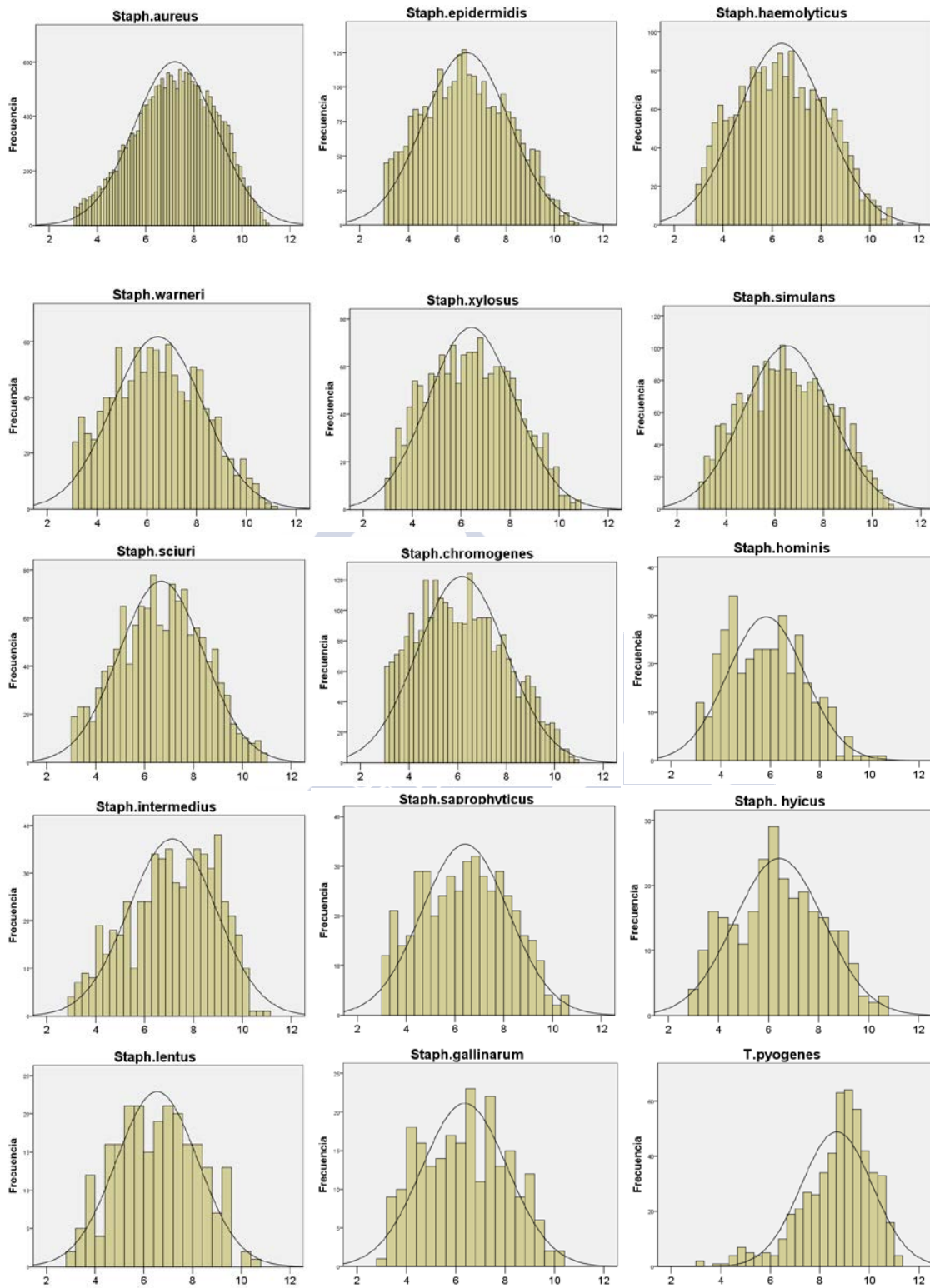


Figura 31. Distribución de frecuencias de Linear Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

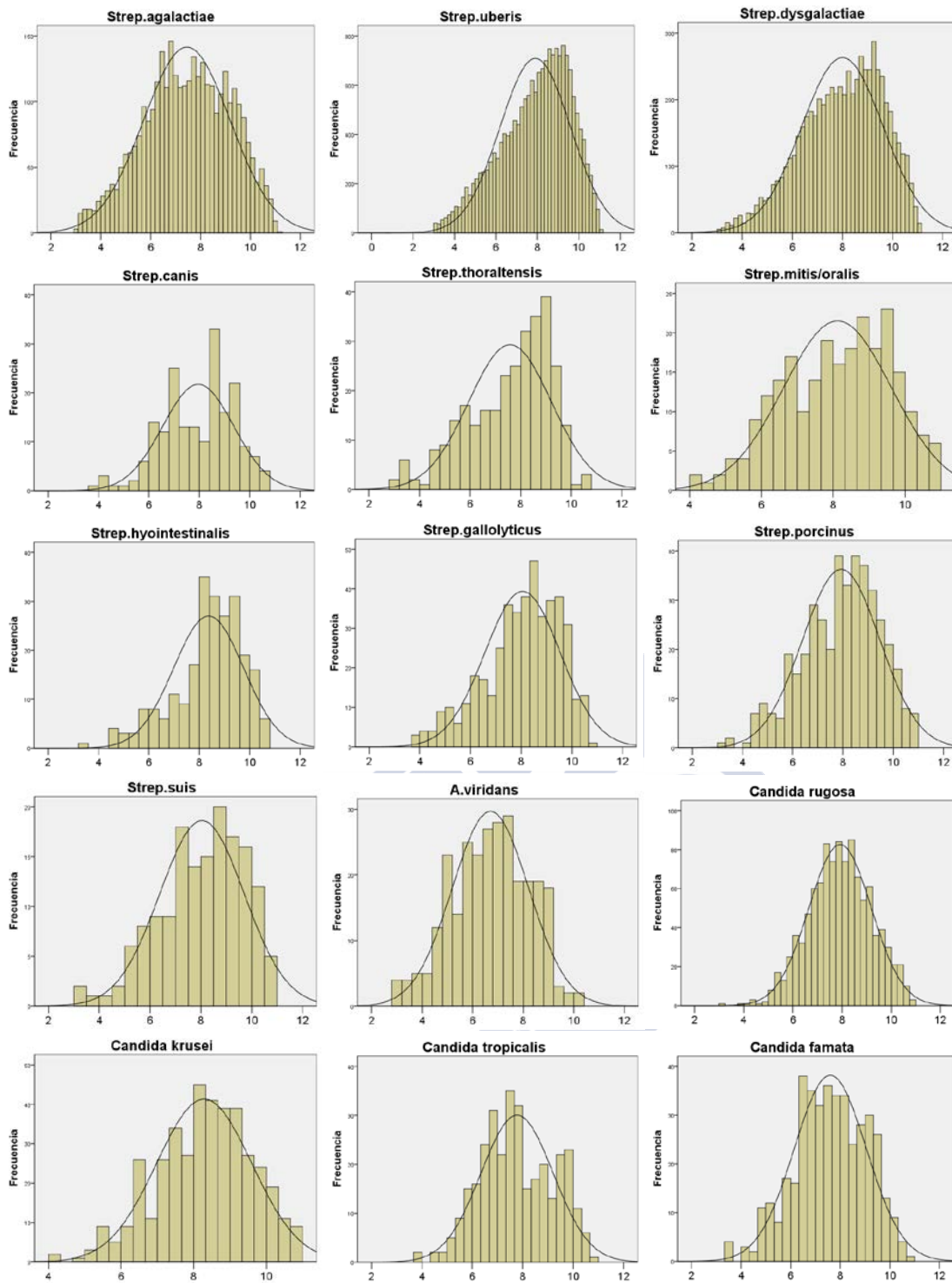


Figura 32. Distribución de frecuencias de Linear Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

Resultados y discusión

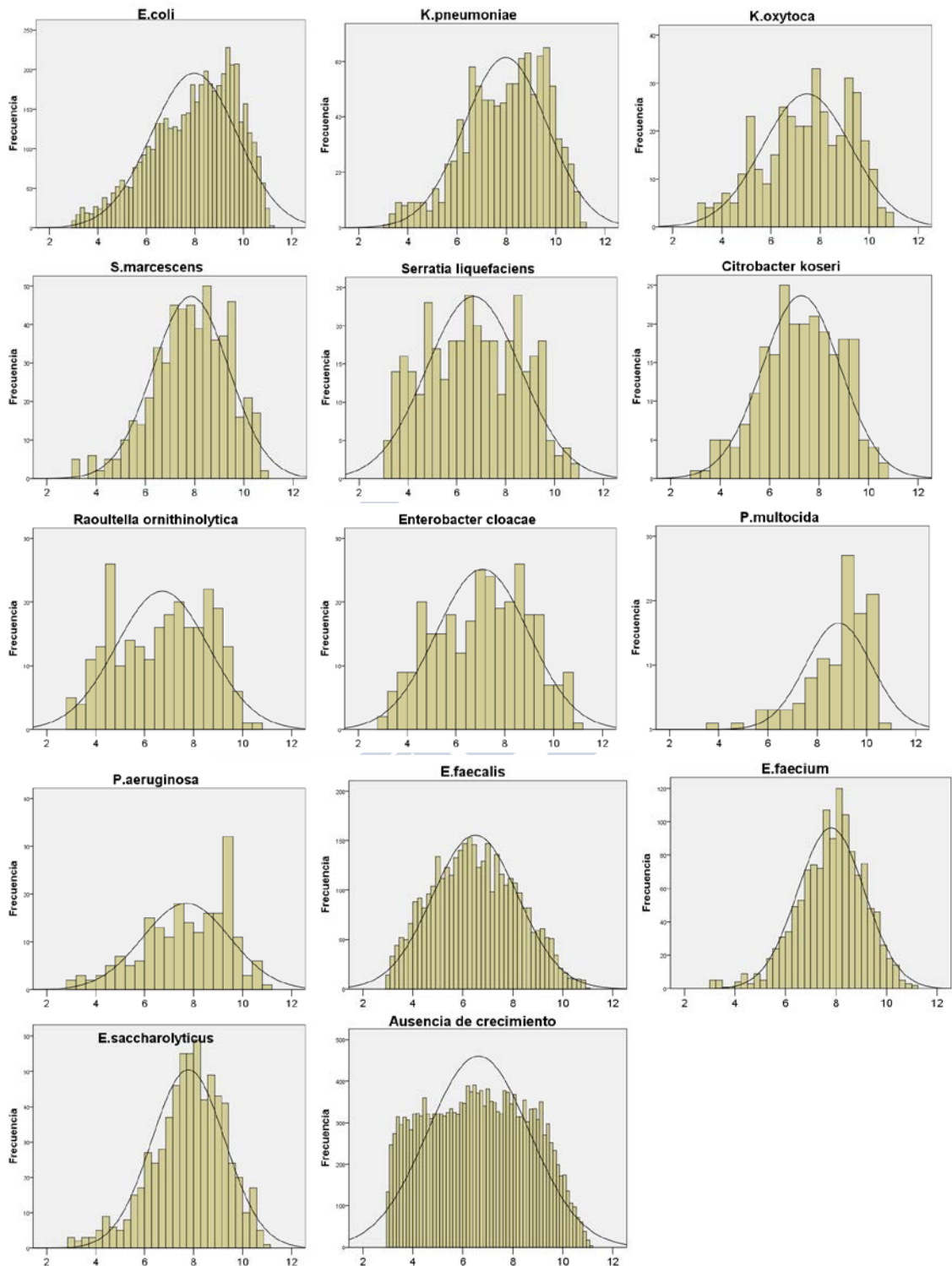


Figura 33. Distribución de frecuencias de Linear Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

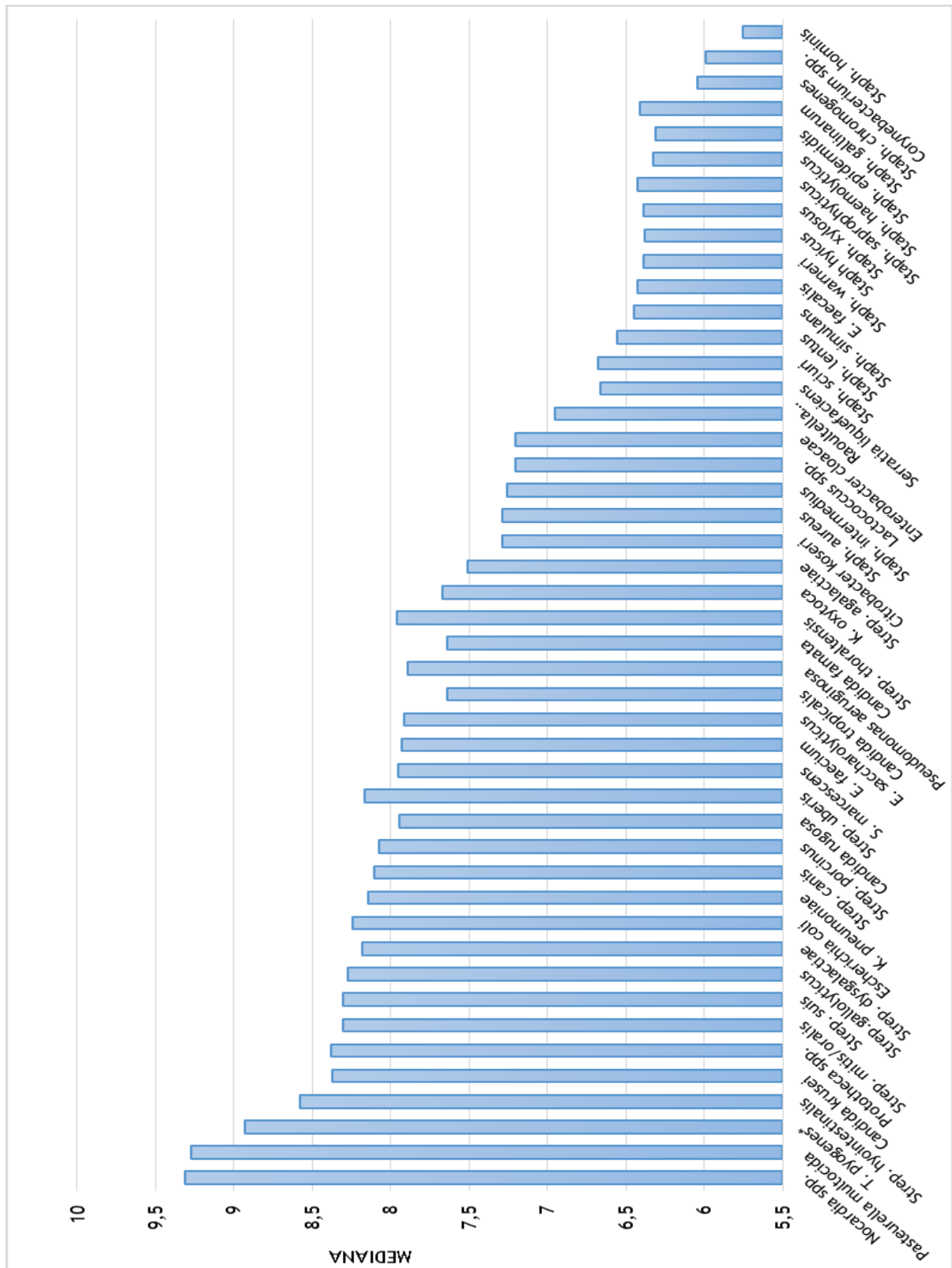


Figura 34. Mediana de Lineal Score de microorganismos aislados de muestras con recuento de células somáticas ≥ 100.000 cel/ml (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011.

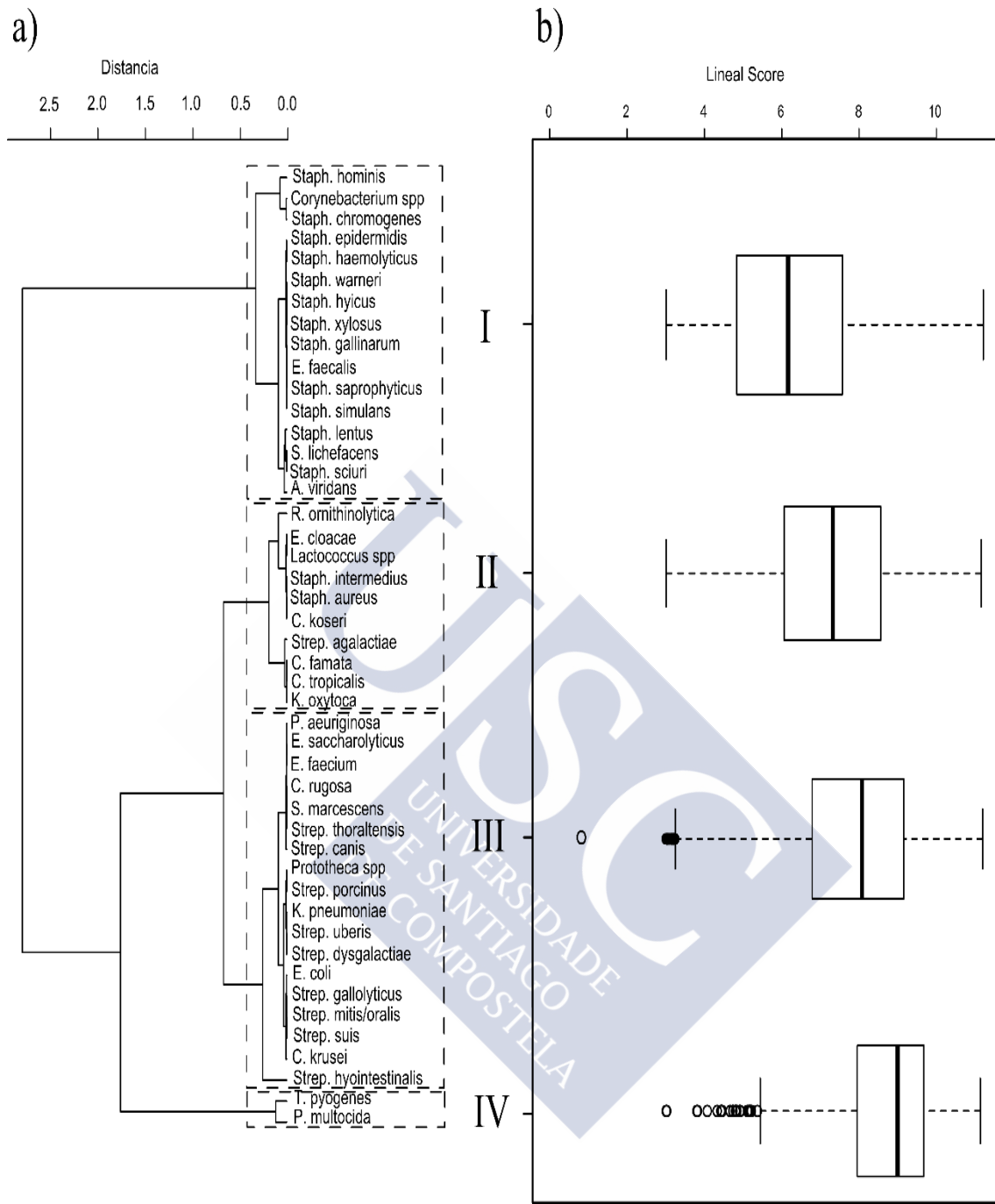


Figura 35. a) Dendrograma y análisis de las medianas de LS (aislamientos $\geq 0,1\%$); Galicia 2005-2011. El dendrograma está representando por dos ejes perpendiculares. En el eje horizontal los microorganismos aparecen ordenados según el valor de su mediana (de menor a mayor) indicando los grupos formados (I, II, III, IV) y el eje vertical representa las distancias en las que los clústeres se unen. b) Diagrama de cajas de la distribución de los LS en los grupos de microorganismos formados a partir del análisis clúster.

En la Figura 34 se muestra la mediana de LS de los microorganismos con aislamientos $\geq 0,1\%$. En la Figura 35 se muestra el dendrograma del análisis clúster (a), y el diagrama de cajas de la distribución del LS en los grupos de microorganismos formados a partir del análisis clúster

(b). El dendograma está representando por dos ejes perpendiculares. En el eje horizontal los microorganismos aparecen ordenados según el valor de su mediana de LS, en 4 grupos homogéneos o clústeres (I, II, III, IV) y el eje vertical representa las distancias en las que los clústeres se unen.

En este análisis no se incluyó *Nocardia* spp. dado que no se cumplía la premisa de similitud de varianzas.

Los resultados muestran un valor medio alto de LS para algunas especies. Este es el caso de *Prototheca* spp. (Grupo IV), patógeno mamario que presenta una cada vez mayor prevalencia en Europa, incluida España, con valor medio de LS significativamente superior a otros microorganismos que tradicionalmente son considerados como patógenos mayores como por ejemplo *E. coli* (Tabla 16). Lo mismo ocurre con *T. pyogenes* que si bien se asocia normalmente a infecciones clínicas que se detectan en el parto, igualmente los resultados indican que pueden provocar mastitis subclínicas con altos LS. En relación a los ECN, contrariamente a lo afirmado por otros autores (Supré y col., 2011), en nuestro estudio solo *Staph. intermedius* presentó una mediana de LS comparable al de *Staph. aureus* (Grupo II), encontrándose el resto de estafilococos en el grupo I. Es posible que la justificación a esta discrepancia se halle en el menor número de explotaciones incluidas en el estudio de Supré y col., 2011, respecto de nuestro muestreo. La mayoría de los estudios se realizan considerando los ECN como grupo y no las diferentes especies de forma individualizada. También se observan diferencias significativas entre las enterobacterias, así *K. oxytoca* (Grupo II) y *S. liquefaciens* (Grupo I) presentaron una mediana de LS menor que el resto de microorganismos pertenecientes a este grupo.

Entre las especies pertenecientes al género *Enterococcus* spp. también se observaron diferencias y *E. faecium* y *E. saccharolyticus* se asociaron a mayores LS que *E. faecalis*. La especies de levaduras con mayores LS fueron *Candida krusei*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis* y *Candida famata*. Entre los patógenos con baja prevalencia en mastitis bovina se asociaron a mayores LS especies como *Strep. mitis/oralis*, *Strep. canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que otras como *Klebsiella ornitolytica*, *Enterobacter cloacae*, los valores de LS fueron más bajos. Los microorganismos con aislamientos $\geq 0,3\%$ que presentaron la mediana de LS más baja fueron *Staph. chromogenes* y *Corynebacterium* spp. Estos resultados pueden ayudar, en unión con otros factores, a determinar mejor la patogenicidad de estos

microorganismos en relación a las mamitis subclínicas bovinas, especialmente aquellos que tienen, por lo general baja prevalencia.

4.4. Análisis de las series temporales de las frecuencias de aislamiento mensuales.

Las frecuencias de aislamientos mensuales sobre el total de muestras (aislamientos \geq 0,3%), de muestras sin crecimiento y de muestras contaminadas se muestran en la Tabla 17.

En ninguno de los patógenos se observó correlación entre la frecuencia de aislamiento y el número total de muestras de cada uno de los meses incluidos en el estudio; el coeficiente de correlación más elevado fue 0,53 y en la mayoría de los casos resultó menor de 0,3.

En la Tabla 17 además se muestran los modelos de tendencia ARIMA y los porcentajes mensuales más altos y más bajos para cada patógeno mamario. Se observó que *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae*, *Staph. aureus*, *Staph. xylosus*, *Staph. sciuri*, *S. marcescens*, *Corynebacterium* spp., *T. pyogenes* y las levaduras mostraron tendencias estacionales.

En la Figura 36 se incluyen las tendencias de la frecuencia de aislamiento mensual estandarizado para cada microorganismo sobre el total de muestras.

Del mismo modo, en la Figura 37 se muestra el dendograma obtenido en base a las diferencias entre los porcentajes de aislamiento de los distintos microorganismos en cada uno de los meses de la serie. En base a los dos métodos utilizados, PAM (Partitioning Around Medoids) algorithm y K-means algorithm, el número de clúster más apropiado fue de 4. Los coeficientes de correlación cofenética utilizados en los diferentes métodos para calcular el dendograma fueron 0.737, 0.691, 0.794 y 0.688 para los métodos completo, simple, media y ward, respectivamente. Se seleccionó el método completo dado que presentaba un coeficiente similar al coeficiente del método de media, y los resultados del dendograma eran así de más fácil interpretación; los tamaños obtenidos para los clúster fueron 10, 3, 3 y 4 (Figura 37). No se pudo incluir en esta fase a *T. pyogenes* dado que presentaba un comportamiento inadecuado para su consideración en este análisis.

Tabla 17. Modelos de tendencia ARIMA y porcentajes de aislamientos sobre el total de muestras de leche de cuarterón. Meses con mayor y menor frecuencia de aislamiento de patógenos con tendencia estacional (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011.

Patógeno	% Total ⁽¹⁾	Rango % mensual ⁽¹⁾	Modelo	p-valor test Box-Ljung ⁽²⁾	% mensual ⁽³⁾	
					Superior	Inferior
<i>Strep. uberis</i>	12,37	7,71-17,01	ARIMA(0,1,1)X	0,5282	Junio	Noviembre
<i>Strep. dysgalactiae</i>	4,79	3,21-6,75	ARIMA(1,0,1) ₁₂ con constante	0,4921	Enero	Agosto
			ARIMA(0,1,1) X ARIMA(0,1,1) ₁₂ sin constante			
<i>Strep. agalactiae</i>	2,14	0,40-4,44	ARIMA(0,1,1) con constante	0,9797		
<i>Staph. aureus</i>	11,28	6,64-16,20	ARIMA(0,1,1) X ARIMA(0,1,1) ₁₂ sin constante	0,772	Abril	Agosto
			ARIMA(0,1,1) con constante			
<i>Staph. chromogenes</i>	1,68	0,91-2,87	ARIMA(0,1,1) con constante	0,5967		
<i>Staph. epidermidis</i>	1,47	0,59-3,22	ARIMA(0,1,1) con constante	0,6819		
<i>Staph. simulans</i>	1,16	0,49-1,88	ARIMA(0,0,0) con constante	0,1082		
<i>Staph. haemolyticus</i>	1,05	0,31-1,92	ARIMA(0,1,1) con constante	0,123		
<i>Staph. xylosus</i>	0,83	0,23-1,70	ARIMA(0,1,1) X	0,5771	Septiembre	Marzo
			ARIMA(0,1,1) ₁₂ sin constante			
<i>Staph. sciuri</i>	0,77	0,26-1,56	ARIMA(0,0,1) X	0,9276	Octubre	Febrero
			ARIMA(0,0,1) ₁₂ con constante			
<i>Staph. warneri</i>	0,67	0,25-1,40	ARIMA(0,1,1) sin constante	0,6625		
<i>E. coli</i>	5,72	3,79-8,65	ARIMA(1,0,0) con constante	0,6712		
<i>K. pneumoniae</i>	0,96	0,44-1,88	ARIMA(1,0,0) con constante	0,1447		
<i>S.marcescens</i>	0,36	0,13-0,87	ARIMA(0,1,1) X ARIMA(0,1,1) ₁₂ sin constante	0,7108	Enero	Marzo
			ARIMA(0,0,0) con constante			
<i>K. oxytoca</i>	0,31	0,05-0,66	ARIMA(0,0,0) con constante	0,6482		
<i>E. faecalis</i>	1,92	0,79-3,01	ARIMA(0,1,1) sin constante	0,1315		
<i>E. faecium</i>	0,70	0,29-1,39	ARIMA(1,0,0) con constante	0,924		
<i>E. sacharolyticus</i>	0,39	0,039-1,01	ARIMA(1,1,1) con constante	0,6864		
<i>Lactococcus spp</i>	1,65	0,95-4,80	ARIMA(1,0,0) con constante	0,8816		
<i>Corynebacterium spp.</i>	12,57	8,4-18,46	ARIMA(0,1,1) X ARIMA(1,1,0) ₁₂ sin constante	0,7698	Septiembre	Mayo
			ARIMA(0,1,1) X			
<i>Levaduras</i>	2,40	1,47-3,93	ARIMA(0,1,1) ₁₂ sin constante	0,7421	Octubre	Abril
<i>Prototheca spp.</i>	0,56	0,10-1,20	ARIMA(0,1,1) con constante	0,4021		
<i>T. pyogenes</i>	1,09	0,52-1,83	ARIMA(0,1,1)X(1,1,0) ₁₂ sin constante	0,6314	Febrero	Septiembre
Ausencia crecimiento	12,72	9,9-15,6				
Muestra contaminada	13,67	7,5-18,9				

(1) % de todos los aislamientos del estudio sobre el total de muestras.

(2) Test estadístico para valorar si los grupos de autocorrelaciones de una serie temporales son diferentes a cero.

(3) Solamente en patógenos mamarios en los cuales se observó tendencia estacional.

Resultados y discusión

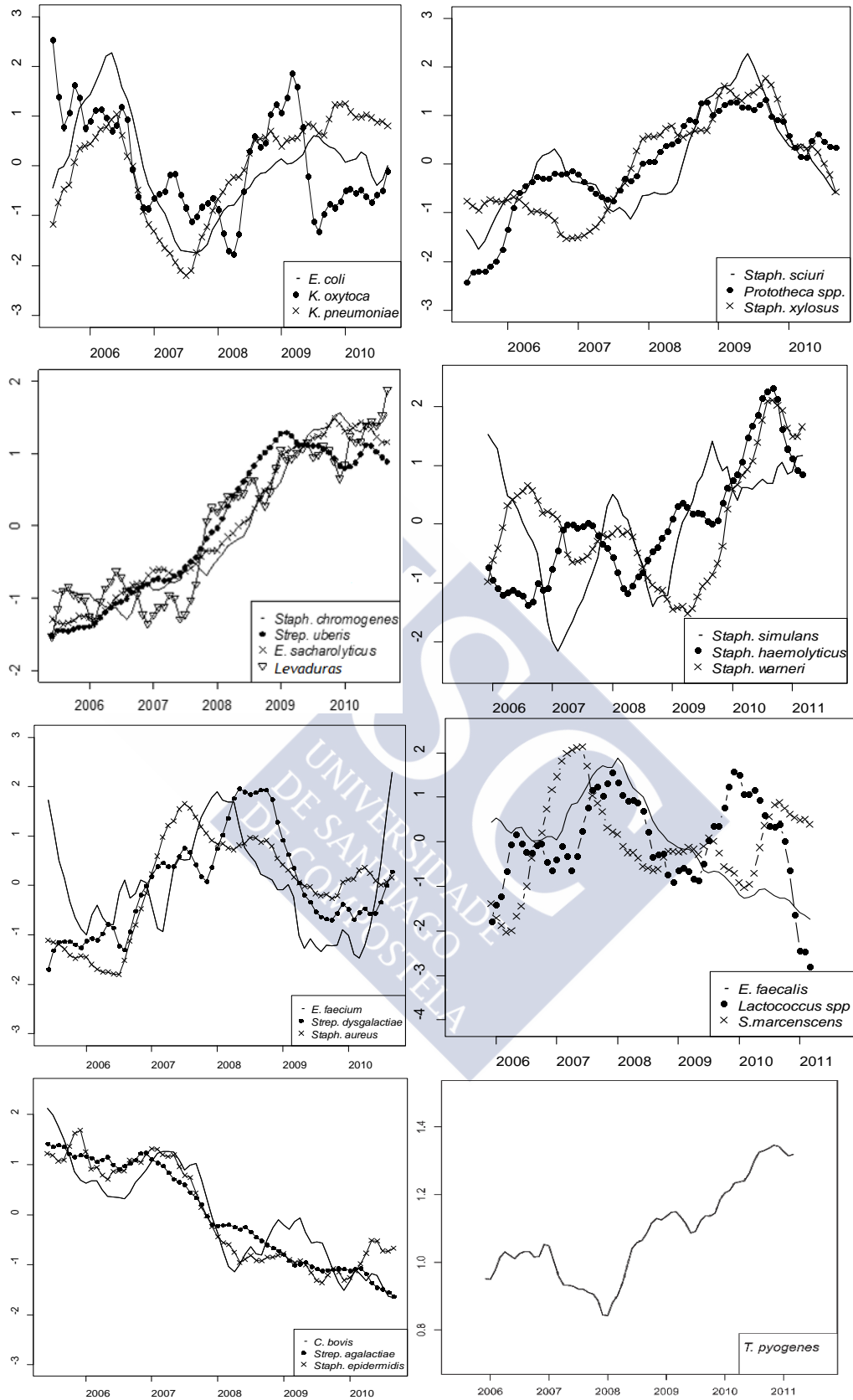


Figura 36: Tendencia del % de aislamiento estandarizado en relación al total de muestras (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011. El eje Y representa la tendencia de las series temporales.

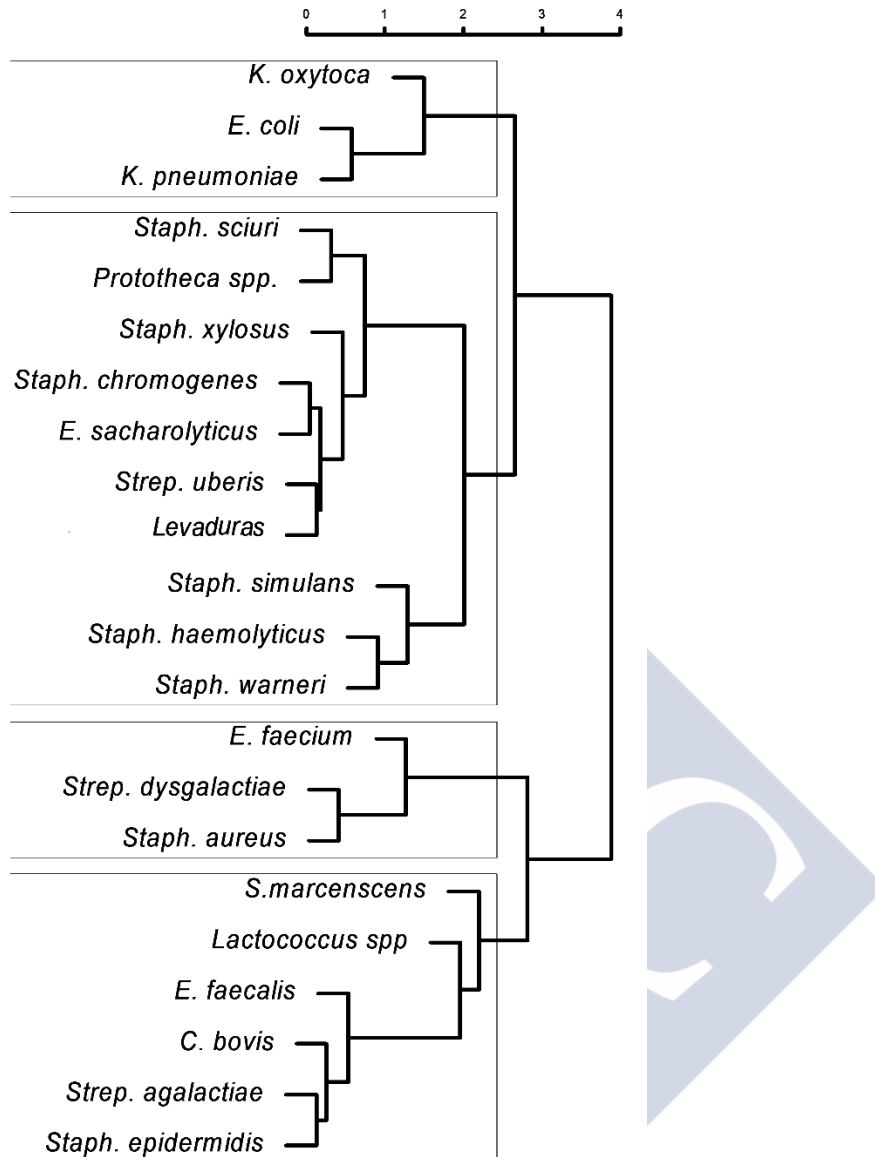


Figura 37. Dendrograma y análisis de clúster de porcentajes de aislamientos mensuales de los patógenos mamarios en muestras de leche de cuarterón individual sobre el total de muestras (aislamientos $\geq 0,3\%$); Galicia 2005-2011. El dendrograma se representa en dos ejes perpendiculares. En el eje horizontal se representa los elementos a clasificar, en el eje vertical se representa las distancias a las cuales los clúster son asociados según las distancias entre sus tendencias.

Este es un estudio novedoso que permite evaluar y comparar los resultados de las muestras de leche remitidas a un laboratorio de diagnóstico empleando la **metodología ARIMA y técnicas de estadística multivariante** tales como el análisis de clúster. Hasta ahora, los estudios epidemiológicos relacionados con el análisis de los resultados de las muestras

remitidas para el diagnóstico de mamitis, se han basado en métodos estadísticos que asumen que los datos observados son realizaciones (valor que es asignado a una variable aleatoria) de una variable aleatoria independiente (Makovec y Ruegg, 2003). Sin embargo, cualquier variable medida en periodos de tiempo, como la frecuencia de aislamientos observados de un microorganismo, no es una variable independiente ya que está potencialmente influida por observaciones previas (autocorrelación), por lo que la aplicación de análisis como la regresión podría ser inapropiada al considerar las observaciones como independientes (Box y Jenkins, 1976). Desde inicio de los años setenta, los métodos de análisis temporales, en particular los modelos autorregresivos integrados de media móvil (ARIMA), que permiten salvar la dependencia estocástica de los datos consecutivos, se vienen utilizando con frecuencia en diferentes ámbitos de la industria, la economía, y la epidemiología (Zeger y col., 2006).

Además estos métodos permiten el estudio de la **estacionalidad de las series de datos** teniendo en cuenta la dependencia estocástica de los datos y no considerando erróneamente las frecuencias de aislamiento en diferentes estaciones o meses como datos independientes. La estacionalidad del porcentaje de aislamiento puede ser debida a factores climáticos (humedad y temperatura principalmente), a causas asociadas al manejo o variaciones en la susceptibilidad de los animales. Así se ha visto que las infecciones por *Escherichia coli* son más frecuentes en las épocas de salida al pasto en producción de tipo semi-intensivo o en la época de partos en zonas con concentración temporal de mismos (López-Benavides y col., 2005). Es de destacar que de las tres especies consideradas típicamente contagiosas (*Strep. agalactiae*, *Corynebacterium* spp. y *Staph. aureus*) la única que no presenta estacionalidad fue *Strep. agalactiae*. Por el contrario, se observa tendencia estacional en las mamitis producidas por *Corynebacterium* spp. y *Staph. aureus*, que se detectaron con más frecuencia en otoño y primavera, respectivamente (Tabla 17).

Entre los patógenos considerados tradicionalmente como ambientales (estreptococos diferentes a *Strep. agalactiae* y *Strep. dysgalactiae*) y coliformes, solamente *Strep. uberis* y *S. marscescens* presentaron estacionalidad. Tampoco se demostró estacionalidad en ECN considerados ambientales como *Staph. haemolyticus* o *Staph. warneri*. **Esto indica que no debe asociarse estacionalidad con un comportamiento de tipo ambiental, si bien otros factores de manejo, como las ya comentados, pueden condicionar la existencia de diferentes comportamientos estacionales según el sistema de producción de la zona**

estudiada. Así la estacionalidad, observada en el caso *Strep. uberis* que presenta mayor porcentaje de aislamiento en verano, se podría asociar con períodos más habituales de salida de los animales del establo, mientras que este mismo hecho podría no tener influencia en el caso de las enterobacterias. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este estudio no se dispuso de información sobre el sistema de producción o manejo de las explotaciones por lo que es aventurado sacar conclusiones específicas. De las especies que mostraron variación estacional, tres presentaron una mayor frecuencia de aislamiento en invierno (*S. marscescens* y *Strep. dysgalactiae* y *T. pyogenes*), una en verano (*Strep. uberis*), una en primavera (*Staph. aureus*), en tanto que otras cuatro mostraron mayor frecuencia en otoño y menor en primavera (*Staph. xylosus*, *Staph. sciuri*, *Corynebacterium spp.* y levaduras). **Un adecuado conocimiento de la estacionalidad de la IIM es necesario para llegar a establecer pautas de control apropiadas a las características epidemiológicas de los patógenos implicados en las mamitis de una población determinada.**

Además, la metodología ARIMA y las técnicas estadísticas multivariantes como el análisis de clúster, permiten una comparación adecuada de las tendencias de aislamiento de los diferentes patógenos mamarios teniendo en cuenta la naturaleza de este tipo de datos (autocorrelación). Dos patógenos mamarios con el mismo comportamiento epidemiológico (es decir, con similar respuesta a las variaciones comentadas anteriormente) tendrán una tendencia de % de aislamiento similar y no una tendencia diferente. Sin embargo, en la interpretación de los resultados también es necesario tener en cuenta que es posible que dos patógenos mamarios con diferente comportamiento epidemiológico puedan presentar una tendencia de aislamiento similar como resultado de diferentes causas que no siempre son bien conocidas.

Cuando se trata de valorar la tendencia de aislamiento de los patógenos mamarios, una carencia potencial de los estudios realizados sobre las **muestras de leche enviadas a los laboratorios de diagnóstico, es que la proporción de aislamiento de un patógeno puede también ser influida por la selección de las muestras dentro de un rebaño y de los rebaños muestreados**, circunstancias que pueden variar mucho con el tiempo (Makovec y Ruegg, 2003). Entre los diversos factores que pueden influir en el el tipo de muestras remitidas al laboratorio está el económico, y en este sentido, la capacidad económica del ganadero predispone mucho al envío de muestras al laoratorio y de manera especial guarda relación con el nivel de remuneración de la leche producida. En épocas de menor valor comercial de la leche

el productor tenderá a seleccionar las muestras de mamitis clínicas que subclínicas, lo que puede condicionar variaciones de la proporción de los patógenos aislados ya que, como ya se ha comentado, existen patógenos con significadas diferencias en su capacidad para causar mamitis clínicas. Esto implicaría que, por ejemplo, el aumento de aislamiento de un patógeno mayor podría deberse a este hecho y no a un aumento real de su prevalencia. Sin embargo, la falta de correlación observada en los valores mensuales del porcentaje de aislamiento de cada uno de los patógenos estudiados y el número de muestras total indican que no ha sido un factor significativo en el mismo.

Además, los resultados obtenidos demuestran la validez de esta metodología estadística en la comparación del comportamiento epidemiológico de los patógenos mamarios ya que los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo aportado por la mayoría de los autores revisados. **Así muestran en grupos claramente diferenciados, patógenos con comportamientos epidemiológicos típicamente ambientales como los de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, de los considerados típicamente contagiosos como *Strep. agalactiae* y *Corynebacterium spp.* y de *Strep. dysgalactiae* siendo este último un microorganismo que se ha descrito tanto con comportamiento contagioso como ambiental (Figura 37).**

Se ha descrito repetidamente la variación de la frecuencia de aislamiento o prevalencia de los diferentes patógenos a lo largo del tiempo en poblaciones donde, por efecto de los programas de control, ha disminuido el RCS de tanque de las explotaciones. A lo largo de este estudio se produjo una apreciable disminución de la media geométrica del RCS de tanque en las explotaciones gallegas que pasó de 281.000 a 228.000 cel/ml. (LIGAL, datos propios no publicados). Los resultados obtenidos ahora muestran que esta disminución en el RCS se asocia con la menor importancia relativa de un número limitado de patógenos. **Solamente se ha observado una clara tendencia a la disminución en la frecuencia de aislamiento durante el período de este estudio en el caso de *Corynebacterium spp.*, *Strep. agalactiae* y *Staph. epidermidis* (Fig. 36). Por el contrario se observa un aumento claro de la frecuencia de aislamiento por diversas especies de ECN, *Strep. uberis* (de forma más clara que otros considerados como patógenos ambientales como *E. coli*), *E. saccharolyticus* e incluso por patógenos considerados en el pasado como causantes de IIM de forma esporádica, como levaduras y *Prototheca spp.* Estos cambios no se deben solamente a la diferente eficacia de**

los programas de control según el patógeno considerado, puesto que existen otros factores asociados al ambiente (sistema de manejo, instalaciones, etc.) o del propio animal (variación de la susceptibilidad), y en consecuencia parece claro que la **reducción del RCS de tanque de la población estudiada en este período se debe a la disminución de frecuencia de aislamiento de un pequeño número de patógenos mamarios.**

En este estudio, al contrario a lo observado en EEUU por Makovec y Ruegg (2003), no se observó un aumento de las muestras con resultado microbiológico negativo en el tiempo. Este hecho debe ser debido a diferencias geográficas en los patógenos involucrados y en las características de las IIM producidas por ellos. Una de ellas puede ser la mayor importancia de las infecciones por *Mycoplasmas* spp. en EEUU (el cual requiere métodos de cultivo microbiológico específicos) que sin embargo solamente tienen presencia esporádica en las granjas de vacuno de leche de Europa.

En el análisis de la **tendencia del % de aislamiento de la serie temporal** (Figura 37) se agrupan los microorganismos en diferentes clúster de acuerdo a su similitud en las tendencias del porcentaje de aislamientos a lo largo del periodo estudiado, de esta forma los patógenos que estén en el mismo clúster van a ser semejantes en su tendencia y, por el contrario, diferentes a los de otros clusters.

En función de las distancias entre las tendencias del % de aislamientos elegidas en este estudio, se establecieron cuatro clúster o grupos y a su vez dentro de uno de estos grupos se establecieron dos subgrupos.

En un primer clúster fueron incluidos: *Staph. epidermidis*, *Strep. agalactiae*, *Corynebacterium* spp., *E. faecalis*, *Lactococcus* spp. y *S. marcescens*. Dentro de este primer clúster, *Staph. epidermidis*, *Strep. agalactiae*, y *Corynebacterium* spp. fueron los únicos microorganismos que presentaron una clara disminución del porcentaje de aislamientos a lo largo del estudio (Figura 36), esto podría responder a una eficacia específica de los programas de control sobre estas infecciones. Estos resultados concuerdan con el hecho de que *Strep. agalactiae* y *Corynebacterium* spp. son considerados patógenos contagiosos y con que en áreas donde se han llevado a cabo programas de control durante años, se ha observado una disminución de su prevalencia (Myllys y col., 1998; Andersen y col., 2003; Bradley y col., 2007; Piepers y col., 2007). Mientras que *Strep. agalactiae* se considera patógeno obligado de

la mama, *Corynebacterium spp.* también se considera un patógeno contagioso a pesar de que ha sido aislado de diversas áreas del cuerpo de las vacas, incluyendo puntas de pezones (Smith y Hogan, 1995). Así la disminución de su proporción de aislamiento de este patógeno en el tiempo respondería a la ya conocida eficacia de las medidas generales de prevención de mamitis causadas por este microorganismo, como son una adecuada higiene durante el ordeño, el baño de pezones en el secado y el tratamiento antibiótico durante el secado. Tal es la eficacia de estas medidas de control sobre las IIM por *Corynebacterium spp.* que incluso se ha propuesto el utilizar el nivel de prevalencia de este patógeno como un indicador de la higiene del ordeño en los rebaños (Bramley y col., 1976; Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984).

Staph. epidermidis de forma similar a *Strep. agalactiae*, ha sido aislado con muy poca frecuencia, en el ambiente o en la piel de los bovinos (Pissens y col., 2011). Aunque no puede ser descartada la posibilidad de transmisión vaca a vaca desde cuarterones infectados (Piessens y col., 2012), se ha desarrollado la hipótesis de que, *Staph. epidermidis* podría ser introducido en los rebaños de vacuno de leche, desde una fuente humana y en particular desde las manos de los ordeñadores (Thorberg y col., 2006). Por lo tanto, a pesar de no considerarse que tiene un comportamiento contagioso, también es de esperar una alta eficacia de las medidas relacionadas con la higiene de ordeño.

Cabe destacar que *S. marcescens* es el único coliforme que se sitúa en el mismo clúster que los patógenos contagiosos como *Strep. agalactiae*. Además, es también el único de este grupo que muestra una tendencia estacional (Tabla 17). Estos resultados sugieren que su comportamiento epidemiológico es diferente del resto de coliformes. Este patógeno mamario ha sido poco estudiado, pero es conocido que las IIM por *S. marcescens* dan lugar a mamitis clínicas menos frecuentemente y de menor severidad que otras bacterias gran negativas (Todhunter y col., 1991a).

En un segundo clúster se incluyeron *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Su agrupación en el mismo clúster coincide con su comportamiento epidemiológico similar, ya que los tres considerados tradicionalmente patógenos ambientales. Mientras que en el caso de *E. coli* (Nemeth y col., 1994) y *K. pneumoniae* (Munoz y col., 2006) la eliminación fecal contribuye a la exposición e incidencia de mamitis por estos patógenos; en el caso de *K. oxytoca* podría tener otras posibles fuentes de infección. Así, en un estudio reciente, se observó que *K. oxytoca* fue

aislada con frecuencia en suelo y plantas y no lo fue en heces mientras que *K. pneumoniae* fue encontrada principalmente en rumen, heces y pasillos de explotación (Zadoks y col., 2011a).

En un tercer clúster fueron incluidos *Staph. aureus*, *Strep. dysgalactiae* y *E. faecium*. En este estudio, *Staph. aureus* presenta una tendencia de aislamiento (mismo clúster) y una tendencia estacional (con mayor porcentaje de aislamiento en verano) similar a *Strep. dysgalactiae*, un patógeno mamario que puede presentar tanto un comportamiento ambiental como contagioso (Smith y Hogan, 1995). Además *Staph. aureus* es el único patógeno contagioso en el que no disminuye el % de aislamientos a lo largo del tiempo del estudio. (Figura 36).

El resto de patógenos estudiados fueron incluidos en un **cuarto clúster**. Estos resultados nos indican la dificultad de clasificar a estos patógenos dentro de grupos tradicionalmente contagiosos o ambientales. Sin embargo se observaron dos subgrupos dentro de este clúster.

En un subgrupo de este cuarto clúster se incluyeron tres especies de ECN: *Staph. simulans*, *Staph. haemolyticus* y *Staph. warneri*. Estas especies de ECN se han asociado a IIM transitorias (Supré y col., 2011) y a un origen ambiental. En un estudio reciente, *Staph. simulans* y *Staph. haemolyticus* han sido frecuentemente aisladas de muestras tomadas del ambiente (Piessens y col., 2011). En ambas especies se han observado una diversidad genética entre las cepas aisladas de un mismo rebaño, lo cual sugiere la existencia de múltiples fuentes más que una naturaleza contagiosa de estos patógenos (Aarestrup y col., 1999; Piessens y col., 2012).

En el otro subgrupo de este cuarto clúster se incluyeron: levaduras, *Strep. uberis*, *E. sacharolyticus*, *Prototheca spp.*, *Staph. chromogenes*, *Staph. xylosus* y *Staph. sciuri*.

Todos ellos presentaron un aumento del % de aislamientos a lo largo del tiempo del presente estudio (Figura 36).

La tendencia estacional se observó tanto en *Strep. uberis* con mayor porcentaje de aislamientos en el verano, como en levaduras con mayor porcentaje de aislamientos en otoño, así como en *Staph. xylosus* y *Staph. sciuri* (que son los únicos ECN que la mostraron) obteniéndose también en el primer caso, los mayores porcentaje de aislamiento a finales del verano y en el segundo en el otoño, a diferencia de *Staph. chromogenes* que, aun estando en el mismo subgrupo que estos dos, no tiene tendencia estacional (Tabla 17).

Por otra parte, *Staph. chromogenes*, al igual que *Staph. epidermidis*, raramente ha sido aislado de muestras del ambiente (Gillespie y col., 2009; Piessens y col., 2011). Aunque los resultados de un estudio reciente basado en biología molecular ha llevado a considerar que la transmisión vaca a vaca podría jugar un importante papel en la transmisión de *Staph. chromogenes* (Piessens y col., 2012), de acuerdo con Taponen y col. (2008), es un microorganismo típicamente oportunista de la piel de los animales. Sin embargo, *Staph. sciuri* y *Staph. xylosus* han sido aislado de muestras del ambiente de los animales: camas o suelo (Matos y col., 1991; Piessens y col., 2011), así como de la piel de vacas de leche (Devriese y De Keyser, 1980; Taponen y col., 2008).

Sin embargo, tanto *Staph. chromogenes* como *Staph. xylosus* son algunos de los ECN que, con mayor frecuencia, producen IIM persistentes en el tiempo (Supré y col., 2011, Piessens y col., 2011).

En este último subgrupo también fueron incluidas tanto levaduras como *Prototheca* spp. Estos resultados llevan a la conclusión de que la idea hasta ahora considerada de que estos patógenos mamarios tienen comportamiento ambiental no puede ser aplicada de una forma estricta. Como un indicador de las diferencias en su comportamiento epidemiológico se observó que solamente las levaduras mostraron una tendencia estacional con mayor proporción de aislamientos en el otoño. Como en el caso de algunas especies de ECN incluidas en este grupo, ha sido documentada la existencia de infecciones persistentes tanto por levaduras como por *Prototheca* spp. (Scaccabarozzi y col., 2011).

4.5. Comportamiento epidemiológico y patológico de los diferentes microorganismos.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran diferencias entre las distintas especies del mismo género o grupo microbiológico (ECN, *Enterococcus* spp. y levaduras) en relación al comportamiento epidemiológico y patológico. **Por tanto, demuestran la falta de validez de los resultados y conclusiones obtenidos cuando son considerados como género o grupo microbiológico en estudios donde no son identificados a nivel de especie.** Así, la falta de identificación a nivel de especie podría explicar, al menos parcialmente, los resultados contradictorios sobre la epidemiología o la patogenia de estos grupos de microorganismos. Si las medidas de control tienen distinta eficacia según la especie, los estudios de valoración de medidas de control o evolución de prevalencias deberían considerar cada una de las especies de

forma independiente ya que los resultados podrían variar según la distribución de las especies microbianas de un género o grupo de microorganismos en la población estudiada. Este hecho lleva a que en estos patógenos no existan recomendaciones específicas para su control (Roegg, 2009) y se produzca el hecho pernicioso de que los veterinarios no consideren importante la identificación de especie dado que no ven su utilidad práctica. **Es importante determinar el comportamiento epidemiológico y patológico de estas especies para aplicar las medidas específicas de control y prevención** (Piessens y col., 2011).

A continuación se realiza una discusión según las diferentes especies o grupos de patógenos estudiados.

4.5.1. *Staphylococcus aureus*.

Los resultados obtenidos demuestran la alta frecuencia relativa de las IIM producidas por *Staph. aureus* al igual que lo que ocurre en otras partes del mundo (Tenhagen y col., 2006; Olde Riekerink y col.; 2006), siendo el **estafilococo más frecuentemente aislado** tanto en mamitis clínicas (10,69%) como subclínicas (17,25%).

La media y mediana de **RCS** (Tabla 4) observadas en este estudio fueron 3.418.000 cel/ml y 1.955.000 cel/ml, respectivamente (Tabla 4). La media de **LS** (Tabla 16) fue de 7,22 (Tabla 16) que se corresponde con un RCS de 1.870.000 cel/ml. Estos valores son muy superiores a los calculados en un metanálisis realizado sobre los RCS de infecciones por diferentes patógenos donde, para *Staph. aureus*, la media aritmética y geométrica eran de 1.426.000 cel/ml y 357.000 cel/ml, respectivamente (Djabri y col., 2002). Sin embargo, en la revisión bibliográfica se observó un amplio rango de valores de la media aritmética y del RCS variando desde 191.000 hasta 9.433.000 cel/ml. Así por ejemplo, los resultados de Taponen y col., (2007) se parecen más a los resultados del presente estudio, obteniendo en las 12 muestras donde se aisló *Staph. aureus* una media de RCS de 3.268.000 cel/ml y una mediana de 1.898.700 cel/ml. Estas diferencias reflejan la dificultad de comparar los resultados de estudios que presentan diferentes metodologías, principalmente en relación a la selección y número de los animales muestreados. Los valores más altos observados pueden reflejar la selección de mamitis más graves, en el caso de estudios como el presente que se basan en muestras remitidas para el diagnóstico de laboratorio.

Sin embargo, cuando se hace la comparación relativa entre patógenos, los resultados de dicho metanálisis y de todos los estudios revisados coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo (Djabri y col., 2002; Taponen y col., 2007; Schukken y col., 2009; Supré y col., 2011). Así las muestras donde aislamos *Staph. aureus* presentaron RCS inferiores que en el caso de *Strep. agalactiae*, *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae* y coliformes y RCS superiores que en el caso de ECN y *Corynebacterium* spp. (Tabla 14).

Similares resultados se observaron al valorar **el % de mamitis clínicas** sobre el total de muestras, siendo este valor en caso de *Staph. aureus* inferiores a *Strep. agalactiae* y *Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae* y coliformes y superiores a ECN (excepto *Staph. sciuri*) y *Corynebacterium* spp. (Tabla 6), lo que coincide con la literatura (Malinowski y col., 2006; Kalmus y col., 2011).

De los patógenos mamarios clasificados clásicamente como contagiosos, *Staph. aureus* es el único que su porcentaje de aislamiento no disminuye de forma importante a lo largo del período estudiado (Figura 36). Aunque se ha observado una disminución en la prevalencia en áreas donde los programas de control de mamitis se han desarrollado durante años (Sommerhäuser y col., 2003), *Staph. aureus* continúa siendo una importante causa de mamitis subclínicas en todo el mundo (Østeras y col., 2006; Tenhagen y col., 2006; Piepers y col., 2007; Capurro, y col., 2010).

La explicación más común a esta discordancia entre los resultados obtenidos y los esfuerzos de control realizados ha sido la mayor complejidad epidemiológica de este microorganismo en comparación con un patógeno contagioso típico como es *Strep. agalactiae*, dado que son conocidas varias fuentes de *Staph. aureus* distintas a las mamarias (Matos y col., 1991; Capurro y col., 2010). Otras posibles explicaciones son la existencia de resultados falsos negativos por cultivo microbiológico (y por tanto, no es tomada ninguna medida en estos animales que sin embargo pueden actuar como fuente de infección para el rebaño) y la pobre respuesta a los tratamientos en las mamitis por *Staph. aureus* (Barkema y col., 2006).

Los estudios de biología molecular han demostrado la existencia de cepas de *Staph. aureus* con un comportamiento epidemiológico que se corresponde a un patógeno ambiental y que pueden coexistir con cepas contagiosas dentro de una misma población (Sommerhäuser y col., 2003; Haveri y col., 2008; Capurro y col., 2010).

Sin embargo, en este estudio la proporción de aislamientos de *Staph. aureus* sobre el total de muestras (11.28%) (Tabla 17) ha sido menor al 15.3% descrito en 1997 en Galicia (Marco y col., 1998), pero aún sigue alto. Una posible explicación de este hecho es la menor eficacia de los programas de control de mamitis con el paso del tiempo en relación a la IIM causadas por *Staph. aureus*, debido al incremento de la frecuencia relativa de las IIM causadas por cepas con comportamiento ambiental.

En, este estudio, *Staph. aureus* presenta una **tendencia de aislamientos en la serie temporal (clúster)** (Figura 37) y una **tendencia estacional** (con menor, porcentaje de aislamiento en verano) (Tabla 17), **similar a *Strep. dysgalactiae***, un patógeno mamario que puede presentar tanto un comportamiento ambiental como contagioso (Smith y Hogan, 1995). Este hecho parece apoyar la hipótesis de coexistencia en la población de cepas de *Staph. aureus* con **comportamiento contagioso y ambiental**. No es la primera vez que un estudio epidemiológico encuentra similitudes epidemiológicas entre *Staph. aureus* y *Strep. dysgalactiae*. Las lesiones en los pezones suelen estar colonizadas por ambos patógenos (Matos y col., 1991; Shearer y col., 2004) y se ha observado una fuerte correlación entre el porcentaje de incidencia a nivel de rebaño de mamitis clínicas causadas por estos microorganismos (Barkema, 1999).

Estas semejanzas en el comportamiento epidemiológico no se observaron, en cambio en la valoración de la patogenicidad, *Staph aureus* presentó resultados indicativos de una menor capacidad patógena en todos los parámetros estudiados (mayor proporción en muestras subclínicas que clínicas, menor proporción de mamitis clínicas sobre el total, mayor % de muestras con RCS <100.000, menores RCS y LS) en comparación con *Strep. dysgalactiae*.

Es de destacar el hecho de la **detección de estacionalidad** en la serie de proporciones de aislamiento de *Staph. aureus*, no observada sin embargo en un patógeno obligado como *Strep. agalactiae* (Tabla 17). La menor proporción en verano y la mayor en primavera es similar a la observada en otros trabajos realizados en USA (Makovec y Ruegg, 2003).

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Staph. aureus* sigue siendo el estafilococo más frecuentemente implicado en las mamitis subclínicas y clínicas, no presenta una clara disminución en el tiempo que sería la esperable en un patógeno típicamente contagioso) con

una tendencia similar a *Strep. dysgalactiae* (patógeno con comportamiento tanto ambiental como contagioso) y las IIM presentan estacionalidad.

4.5.2. ECN.

Los ECN se correspondieron con el 13,06% del total de aislamientos (Tabla 3), pero con diferencias según se consideren separadamente las mamitis clínicas (7,8%) o subclínicas (15,38%) (Tabla 4). Esto demuestra **la alta frecuencia de los aislamientos** de estas especies en las muestras remitidas a laboratorio de diagnóstico y su consideración de patógeno menor, aunque no raramente implicado en mamitis clínicas. Es de destacar que su frecuencia en las mamitis subclínicas es algo menor (11,4%) al observado en la misma zona (13,3%) hace más de dos décadas (Marco y col., 1998).

La media y mediana de **RCS** (Tabla 13) observadas en este estudio fueron 2.238.000 cel/ml y 1.056.000 cel/ml, respectivamente. La media de **LS** (Tabla 15) de este estudio fue de 6,435 que se corresponde con un RCS de 1.008.000 cel/ml. Como era de esperar, dado su condición ampliamente aceptada de patógenos menores, presentaron un RCS inferior a todos los grupos estudiados excepto al de *Corynebacterium* spp. (Sampimon y col., 2010; Supré y col. 2011).

Las causas de variación del RCS asociadas a los patógenos son el patógeno implicado, la virulencia de la cepa y la duración de la infección (Brolund, 1985; Phuektes y col., 2001; Zadoks y col., 2002). Aunque se ha descrito IIM por algunas especies de ECN con cierta persistencia (Supré y col., 2011) se considera que el porcentaje de curaciones espontáneas de las IIM por ECN es alta, (Rainard y Poutrel, 1982; Wilson y col.1999; Taponen y col., 2006). Esto conlleva que la duración de las infecciones por ECN son de media menores que en las IIM *Staph. aureus* (Anderson, 1983; Supré y col., 2011) y concuerda con el hecho de que la capacidad de invasión de las células de la glándula mamaria es menor en el caso de los ECN en comparación con *Staph. aureus* (Hyvonen y col., 2009).

Al comparar los resultados de este estudio a nivel de especie con la bibliografía, existe el problema de que la información es muy limitada, ya que los pocos trabajos publicados con identificación a nivel de especie se han realizado con un número muy limitado de IIM. En concreto, nuestros resultados contradicen la afirmación de Supré y col. (2011) de que diversas especies de ECN presentan un aumento de RCS similar al causado por *Staph. aureus*, ya que

solamente este hecho fue observado en *Staph. intermedius* y, por lo tanto, también contradicen, al menos en parte, otros estudios que no encontraron diferencias entre las distintas especies en el RCS (Thorberg y col., 2009).

Supré y col. (2011) en un estudio realizado en tres explotaciones observaron, de mayor a menor RCS, el siguiente orden entre los ECN aislados: *Staph. chromogenes*, *Staph. simulans*, *Staph. xylosus* y *Staph. cohnii*. Sin embargo, Sampimon y col. (2009a) en un trabajo realizado sobre 49 explotaciones el orden, de mayor a menor RCS, fue el siguiente: *Staph. xylosus*, *Staph. hyicus*, *Staph. intermedius*, *Staph. chromogenes*, *Staph. capitis*, *Staph. epidermidis*, *Staph. simulans*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. cohnii*, *Staph. saprophyticus* y *Staph. hominis*.

Estas contradicciones entre trabajos reflejan diferencias entre las pequeñas poblaciones estudiadas y los resultados no tienen por qué ser representativos de la población. La realización de estudios en un número limitado de explotaciones podría llevar a resultados discordantes. En la bibliografía ha sido ampliamente documentada la variación de la distribución de las especies de ECN entre los rebaños (Gillespie et al., 2009; Sampimon et al., 2009a; Thorberg et al., 2009). Por lo tanto un estudio tan amplio como el realizado aporta una información mucho más veraz sobre la patogenicidad de las diferentes especies de ECN. Nuestros resultados indican que no existen diferencias significativas en cuanto al RCS entre los ECN salvo en el caso de *Staph. intermedius*, patógeno que en los trabajos anteriormente citados no es considerado el ECN con mayor RCS.

También presentaron los valores más bajos, en el **% de mamitis clínicas** sobre el total de muestras, de todos los grupos estudiados a excepción del *Corynebacterium* spp. (Tabla 5 y Figura 19). Sin embargo, al estudiar las diferentes especies se observa que *Staph. hyicus* presenta mayores porcentajes que *Staph. aureus* y que en el caso de *Staph. sciuri* y *Staph. chromogenes* son similares (Tabla 6 y Figura 21). El diferente comportamiento de una especie de ECN según se valore el LS o el % de mamitis clínicas podría ser explicada también por la existencia de diferencias en la virulencia de las cepas dentro de la misma especie, ya que la distribución de los factores de virulencia varían entre cepas y éstas entre las explotaciones (Supré y col., 2011). Nuestros resultados también contradicen los trabajos donde no se han observado diferencias entre los ECN en la gravedad de las mamitis (Jarp, 1991; Taponen y col., 2006).

Al analizar la **tendencia de aislamiento en el tiempo**, salvo el caso de *Staph. epidermidis* todos los ECN fueron incluidos en un clúster diferente a los patógenos mamarios considerados

típicamente contagiosos o ambientales (Figura 37). Estos resultados parecen consistentes con la dificultad de clasificar los ECN dentro de uno de estos dos comportamientos epidemiológicos. Por tanto, aunque se hable, por ejemplo, de ECN ambientales no debe considerarse tal calificación en el sentido que se utiliza en el caso de patógenos ambientales como *E. coli*. Además se establecieron dos subgrupos dentro del mismo clúster (hecho que indica que las diferencias entre ellos no fueron tan definidas): uno que incluye *Staph. chromogenes*, *Staph. xylosus* y *Staph. sciuri* y otro que incluía *Staph. simulans*, *Staph. haemolyticus* y *Staph. warneri*. Además solamente *Staph. xylosus*, *Staph. sciuri* presentaron **tendencia estacional**, con mayores porcentajes de aislamiento en el otoño, en ambos casos (Tabla 17).

Son numerosos los esfuerzos realizados para clasificar los ECN según su comportamiento epidemiológico, como patógenos contagiosos o ambientales. Nuestros resultados indican que, exceptuando el caso de *Staph. epidermidis*, las diferencias parecen no ser tan claras entre los ECN como las existentes entre los considerados tradicionalmente patógenos contagiosos o ambientales. Este hecho podría explicar la dificultad encontrada por los diferentes autores a la hora de clasificar epidemiológicamente a las diferentes especies de ECN.

A continuación se realiza una discusión según las diferentes especies de ECN estudiadas.

Staph. epidermidis aunque es uno de los ECN más frecuentemente aislado en mamitis bovina, se describe en muchos trabajos que hay una menor proporción de aislamiento frente a *Staph. chromogenes* y *Staph. simulans* (Aarestrup y Jensen, 1997; Thorberg y col., 2006). Sin embargo, en el presente trabajo, *Staph. epidermidis* presentó mayor frecuencia de aislamiento que *Staph. simulans* en las mamitis subclínicas (Tabla 4).

El % de mamitis clínicas sobre el total de muestras, fue bajo y similar a *Corynebacterium spp.* y *Staph. haemolyticus* (las tres especies con el menor valor de este parámetro de todas las incluidas en el estudio), e inferior al resto de ECN estudiados (Tabla 6 y Figura 21). Lo mismo ocurre al valorar los LS, presentando uno de los valores más bajos de todos los patógenos estudiados (Tabla 16). Todos estos resultados parecen indicar la **baja capacidad patógena de esta especie de ECN**.

Es de destacar que *Staph. epidermidis* es el único ECN que mostró una **marcada disminución en la tendencia de la proporción de aislamiento** a lo largo del periodo estudiado (Figura 36) y que, al evaluar la tendencia de aislamientos en la serie temporal (Figura 37), se observa que es el único ECN que está en el mismo clúster que otros microorganismos típicamente contagiosos como el *Strep. agalactiae* o el *Corynebacterium spp.* Aunque no puede ser descartada la posibilidad de transmisión vaca a vaca desde cuarterones infectados, dado que *Staph. epidermidis*, de una forma similar a *Strep. agalactiae*, ha sido aislado con muy poca frecuencia en la piel de los bovinos y en el ambiente (Piessens y col., 2012), se ha desarrollado la hipótesis de que *Staph. epidermidis* podría ser introducido en los rebaños de vacuno de leche desde una **fente humana**, en particular desde las manos de los ordeñadores (Thorberg y col., 2006). Por tanto, es esperable una alta eficacia de las medidas relacionadas con la higiene de ordeño para reducir la frecuencia de las IIM causadas por este patógeno mamario y que al mejorar éstas se produzca una disminución en la proporción de aislamientos.

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Staph. epidermidis* es uno de los ECN con mayor porcentaje de aislamiento, pero con bajos porcentajes de mamitis clínicas sobre el total de muestras. Es el único ECN que presenta una clara disminución en el tiempo (indicando una posible eficacia de las medidas de control), con baja patogenicidad en comparación con otros ECN (posible reflejo de cepas no adaptadas a la ubre de origen humano) y las IIM no presentan estacionalidad.

Staph. chromogenes fue el **ECN más frecuentemente aislado** tanto en mamitis clínicas como subclínicas (Tabla 3), al igual que se ha descrito en otros estudios (Piessens y col., 2011).

Es de destacar que presentó un **% de mamitis clínicas** sobre el total de las muestras en las que fue aislado similar a *Staph. aureus* (Tablas 6 y 7). Sin embargo es uno de los ECN que presentaron menor mediana de **LS** (Tabla 16) e inferior estadísticamente a *Staph. aureus* (Fig. 35). *Staph. chromogenes* ha sido asociado, con mayor frecuencia que otras especies de ECN, a IIM persistentes en el tiempo (Supré y col., 2011, Piessens y col., 2011). Este hecho debería ser reflejado con altos RCS, ya que este parámetro aumenta con la duración de la infección, sin embargo, en este estudio presentó bajos RCS.

La diferencia en el comportamiento de este patógeno en las mamitis clínicas y subclínicas podría ser reflejo de diferencias de patogenicidad de las cepas implicadas. Al contrario de lo

observado por Piessens y col. (2012), la mayoría de los autores muestran diversidad genética de las cepas aisladas en los rebaños (Gillespie y col., 2009; Mørk y col., 2012). Además, debe tenerse en cuenta que la mayor frecuencia de infecciones persistentes (Mørk y col., 2012) y de aislamiento de este patógeno se da en novillas de primer parto (Trinidad y col., 1990). Dado que no se conoció el parto de los animales que fueron origen de las muestras de este estudio, no es posible valorar si las mamitis clínicas se asociaron con animales de primer parto y esto podría ser la causa de la diferencia de comportamiento de este patógeno en relación al % de mamitis clínicas y al RCS.

Este microorganismo mostró un marcado aumento en **la tendencia de aislamiento en la serie temporal**, y en el análisis del clúster se incluyó en el mismo subgrupo que *Staph. sciuri* y *Staph. xylosus*. (Figura 37). De acuerdo con Taponen y col. (2008), es un microorganismo típicamente oportunista de la piel de los animales, y de acuerdo con Devriese y De Keyser, 1980; Taponen y col., 2008, también *Staph. sciuri* y *Staph. xylosus* han sido aislados de la piel de vacas de leche. Sin embargo, fue el único de estos tres patógenos que no presentó tendencias estacionales (Tabla 17). Esta diferencia de comportamiento podría explicarse por el hecho de que mientras *Staph. chromogenes* es raramente aislado de muestras del ambiente (Gillespie y col., 2009; Piessens y col., 2011), *Staph. sciuri* ha sido aislado frecuentemente de el serrín de la cama y suelo de rejilla y *Staph. xylosus* en serrín no utilizado (Matos y col., 1991; Piessens y col., 2011). Sin embargo hay que recordar que en el dendograma y análisis de clúster todos los ECN, menos *Staph. epidermidis* fueron incluidos en el mismo grupo, por lo que las diferencias no fueron suficientemente grandes para que puedan sacarse conclusiones.

En los últimos años se ha discutido el comportamiento epidemiológico de esta especie de ECN. De hecho *Staph. chromogenes* no muestra una tendencia de aislamiento similar a los considerados patógenos contagiosos (Fig. 37), que sería lo esperable si la transmisión vaca a vaca jugara un papel importante, como ha sido considerado por algunos autores (Piessens y col., 2012). Además el hecho de que presenta un aumento de la proporción de aislamientos en el tiempo (Figura 36) sería contrario a un comportamiento típicamente contagioso, al ser las medidas de control más eficaces en relación a este grupo de patógenos. Se ha considerado que la relación genética con patrones PFGE entre las cepas aisladas por Piessens y col. (2012), que llevaron a la hipótesis de su comportamiento contagioso, pueden ser debidas más a un alto nivel de conservación genética en esta especie que a un indicador de contagio entre animales, ya que

se han observado cepas de diferentes continentes con patrones PFGE idénticos (Rajala-Schultz y col., 2009; Mørk y col., 2012). Por otra parte presentó diferencias en la tendencia de aislamiento en comparación con *Staph. haemolyticus*, *Staph. simulans* y *Staph. warneri* (Fig. 37), que se encuentran en otro subgrupo dentro de este clúster y que son microorganismos asociados a un origen ambiental (Piessens y col., 2012). Sin embargo las diferencias no fueron tan claras como entre otros patógenos ya que se incluyeron todos en un mismo clúster aunque en diferente subgrupo.

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Staph. chromogenes* es el ECN con mayor porcentaje de aislamiento, presenta un claro aumento de la proporción de aislamientos en el tiempo (indicando una posible falta de eficacia de las medidas de control), con un comportamiento patológico diferente en mamicis subclínicas (con RCS bajos similares a otros ECN) que en mamicis clínicas (con porcentajes similares a *Staph. aureus* en relación al total de muestras), y su aislamiento no presenta estacionalidad.

Staph. simulans es el **tercer ECN más aislado en este estudio** (Tabla 3), al igual que ha sido repetidamente observado en diferentes trabajos (Jarp, 1991; Waage y col., 1999; Taponen y col., 2006).

Aunque se ha descrito que es el ECN que predomina en los estudios realizados sobre **mamicis clínicas** (Myllys, 1995a; Waage y col., 1999; Taponen y col., 2006), en el presente estudio, en relación al total de aislamientos, ocupó un segundo lugar después de *Staph. chromogenes* (Tabla 4). Además presentó un **porcentaje de mamicis clínicas** sobre el total de muestras (Tablas 6 y 7) y un valor de **LS** estadísticamente inferior a *Staph. aureus* (Tabla 16 y Fig. 35). Por lo tanto, los resultados obtenidos no parecen indicar una patogenicidad mayor que la del *Staph. aureus*.

Al evaluar la **tendencia de aislamiento en la serie temporal**, *Staph. simulans* se incluyó en el mismo subgrupo que *Staph. haemolyticus* y *Staph. warneri* (Fig. 37), presentando los tres un ligero aumento en la tendencia del porcentaje de aislamientos en el tiempo (Figura 36). Estas dos últimas especies de ECN se han asociado con un origen ambiental (Piessens y col., 2011). En el caso de *Staph. simulans* existe discusión sobre su frecuencia de aislamiento en el ambiente, ya que existen estudios que la consideran alta (Piessens y col., 2011), mientras que otros obtienen pocos aislamientos de lugares extramamarios, incluso en canal del pezón o la

piel (Devriese y De Keyser, 1980; Boddie y col., 1987; Trinidad y col., 1990; Taponen y col., 2008) por lo que incluso se ha propuesto su consideración como patógeno específico de la ubre (Taponen y col., 2008). Nuestros resultados indican que su comportamiento no es el de un patógeno típicamente contagioso y que se podría asimilar más al comportamiento de otros ECN considerados patógenos ambientales. Ninguna de estas tres especies presentó tendencia estacional.

En el estudio de Piessens y col. (2011), *Staph. simulans* fue aislado principalmente en suelo emparrillado y en serrín de cubículos, mientras que *Staph. haemolyticus* lo fue en el aire y menos en el suelo emparrillado y *Staph. warneri* en el serrín de los cubículos lo que indica su posible condición ambiental aunque con diferencias entre estas especies.

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Staph. simulans* es el tercer ECN con mayor porcentaje de aislamiento, presenta un ligero aumento de la proporción de aislamientos en el tiempo (indicando una posible falta de eficacia de las medidas de control), con una patogenicidad menor que la del *Staph. aureus* y su aislamiento no presenta estacionalidad.

Staph. haemolyticus fue el **cuarto ECN más aislado** en el total de muestras y si bien mantiene este puesto al considerar únicamente las muestras de mamitis subclínicas, pasa a ser el sexto ECN al considerar las mamitis clínicas (Tabla 4), dado que es el ECN con menor % de **mamitis clínicas** sobre el total de muestras (Tablas 6 y 7). Al observar los **LS** también presenta valores bajos (Tabla 16) e inferiores a *Staph. aureus* (Figura 35). Por lo tanto, los resultados obtenidos parecen indicar una patogenicidad menor que la del *Staph. aureus*. Estos resultados concuerdan con que esta especie de ECN se ha asociado a IIM transitorias (Supré y col., 2011).

Se considera que las IIM por este patógeno tiene un **origen ambiental** (Piessens y col., 2011), lo cual se basa en que se ha observado una gran diversidad genética entre las cepas aisladas de un mismo rebaño, lo cual sugiere la existencia de **múltiples fuentes de infección** más que una naturaleza contagiosa de este patógeno (Piessens y col., 2012).

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Staph. haemolyticus* es el cuarto ECN con mayor porcentaje de aislamiento, presenta un ligero aumento de la proporción de aislamientos en el tiempo (indicando una posible falta de eficacia de las medidas de control), con una patogenicidad menor que la del *Staph. aureus* y su aislamiento no presenta estacionalidad.

Otros ECN

Otros ECN fueron aislados en un % mucho menor de muestras, lo que coincide con trabajos previos (Taponen y col., 2008; Piessens y col., 2011). Solamente *Staph. warneri*, *Staph. xylosus* y *Staph. sciuri* representaron $\geq 3\%$ del total de las muestras. Los dos últimos fueron los únicos ECN que presentaron estacionalidad en la proporción de aislamientos. Diferentes autores los consideran como ECN ambientales oportunistas (Matos y col., 1991; Smith y Hogan, 1995; Piessens y col., 2011).

Las tres especies presentaron **LS** inferiores a *Staph. aureus*. Sin embargo al contrario que los otros dos, *Staph. sciuri* presentó un **% de mamitis clínicas** sobre el total de muestras similar a *Staph. aureus*. Además, *Staph. warneri* y *Staph. xylosus*, al contrario que *Staph. sciuri*, fueron los ECN más frecuentemente aislados en muestras con RCS < 100.000 cel/ml.

Se ha especulado con la verdadera capacidad de estas especies de ECN de producir verdaderas IIM y que el aislamiento a partir de muestras de leche respondan más a una colonización del pezón que a una verdadera IIM (Thorberg y col., 2009). Nuestros resultados parecen indicar que sí, dado que se asocian a LS superiores o similares otros ECN claramente considerados causantes de IIM (Figura 35), como *Staph. haemolyticus*, *Staph. epidermidis* o *Staph. chromogenes*.

Como **conclusión** los resultados obtenidos también confirman las afirmaciones de su asociación a bajos RCS y con IIM de baja persistencia descrita para estos ECN aunque en el caso de *Staph. sciuri* destaque por la capacidad de dar lugar a mamitis clínicas lo que puede coincidir con el hecho de que ciertas cepas pueden estar mejor adaptadas para producir infección (Piessens y col., 2011). Se ha especulado con el hecho de las infecciones por ECN menos frecuentemente aislados estén asociados a altas presiones de infección o a animales con estados de inmunidad comprometidos y que en realidad actúen como oportunistas ambientales o que las diferencias entre explotaciones se deban a diferencias entre las cepas en su capacidad de causar infección (Davidson y col., 1992; Thorberg y col., 2009; Piessens y col., 2011).

Otros ECN con aún menor frecuencia de aislamiento aunque representaron al menos el 0,1% del total de muestras fueron: *Staph. lentus*, *Staph. hominis*, *Staph. intermedius*, *Staph. gallinarum*, *Staph. hyicus* y *Staph. saprophyticus*.

En general fueron aislados en **muy baja proporción** (por lo que no pudieron ser introducidos en la mayoría de los análisis) y en general se asociaron a **bajos valores de LS** (Tabla 16), **bajo % de mamitis clínicas** (Tabla 6 y 7) y dentro de la baja proporción de aislamientos se encontraron **altos porcentajes muestras con RCS <100.000 cel/ml** (Tabla 11 y 12).

Sin embargo podemos destacar los siguientes resultados:

- *Staph. hominis*, *Staph saprophiticus* y *Staph. gallinarum* fueron los ECN de este grupo con el mayor porcentaje de muestras con RCS < 100.000 cel/ml sobre el total de las muestras en las que fueron aislados (Tabla 11), menor proporción de aislamientos en mamitis clínicas y más bajos LS.
- *Staph. hyicus* presentó un porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de muestras superior a *Staph. aureus* (Tabla 6 y 7), y al resto de ECN lo que concuerda con la mayor asociación con síntomas generales y mamitis clínicas observadas en estudios anteriores (Myllys, 1995; Waage y col., 1999).
- *Staph intermedius* fue el único ECN que presentó un LS similar a *Staph. aureus* (Figura 35).

4.5.3. *Streptococcus agalactiae*.

La **frecuencia de aislamiento** en relación al total de aislamientos es menor que otros estreptococos como *Strep. dysgalactiae* o *Strep. uberis* y que otros patógenos como *Staph. aureus* o *E. coli* (Tabla 3).

Los valores de **RCS** observadas en este estudio fueron de media aritmética 4.108.000 cel/ml, y mediana 2.276.000 cel/ml (Tabla 14); la media de LS fue de 7,45 (Tabla 16) que se corresponde con un RCS de 2.190.000 cel/ml. Estos valores son muy superiores a los calculados en un metanálisis realizado sobre los RCS de infecciones por diferentes patógenos donde, para *Strep. agalactiae*, la media aritmética era de 3.792.000 cel/ml y la mediana 1.129.000 cel/ml (Djabri y col., 2002). Por otra parte, en la revisión bibliográfica de este estudio, se observa un amplio rango de valores de media aritmética de RCS según el estudio analizado, que va desde 561.000 hasta 4.758.000 cel/ml. Estas diferencias reflejan la dificultad de comparar los

resultados de diferentes estudios, ya comentado anteriormente. Cuando se hace la comparación relativa entre patógenos, los resultados de dicho metanálisis (Djabri y col., 2002) coinciden con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en que hay mayor RCS para *Strep. agalactiae* en comparación con *Staph. aureus*, con la mayoría de ECN y con *Corynebacterium* spp. y menor RCS en comparación con los coliformes. Sin embargo, al contrario que el estudio metanálisis mencionado, este patógeno también presentó menor recuento que otros estreptococos estudiados como el *Strep. dysgalactiae*. Los trabajos revisados por Djabri y col., (2002) tienen fecha de publicación entre 1987 y 2000; en la actualidad es lógico pensar que, dada la presión de control y las medidas de erradicación ejercidas en los últimos años sobre las mamitis producidas por *Strep. agalactiae*, los brotes por este patógeno sean detectados mucho antes y se asocien, por tanto, a RCS relativamente más bajos.

Es de destacar en este estudio que, sobre el total de muestras con aislamientos $\geq 0,1\%$ con $RCS < 100.000$ cel/ml, en el 2,07 % de ellas se aisló el *Strep. agalactiae*, como se puede ver en la tabla 11. Este hecho tiene gran importancia dado que normalmente en las explotaciones donde se detecta IIM por este microorganismo se lleva a cabo un protocolo de erradicación tratando a todos los animales en lactación que presenten inflamación en algún cuarterón detectada por medio de CMT. Aunque el tratamiento con penicilina tiene buenos resultados, si la infección se mantiene en algún animal de la explotación y, dada la alta contagiosidad de esta IIM, se produce una diseminación de la infección a otros animales del rebaño. También este hecho tiene que ser tenido en cuenta en la valoración sanitaria de animales cuando son introducidos en la explotación.

Al valorar el **% de mamitis clínicas** sobre el total de muestras (Tabla 6 y 7), los valores observados en el caso de *Strep. agalactiae*, fueron superiores a *Staph. aureus*, ECN y *Corynebacterium* spp., e inferiores a *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis* y coliformes, lo que coincide con la literatura (Malinowski y col., 2006; Kalmus y col. 2011).

Este estreptococo presentó una **clara tendencia a disminuir** su frecuencia de aislamiento en el tiempo, como se puede ver en el análisis de las series temporales (Figura 36). También la frecuencia de su aislamiento en mamitis subclínicas, en relación al total de muestras, es mucho menor (2,84%) (Tabla 4) que el observado en la misma zona (5,8%) hace cerca de dos décadas (Marco y col., 1998). Estos resultados concuerdan con el hecho de que *Strep. agalactiae* es considerado el patógeno contagioso por excelencia (patógeno obligado de la mama) por lo que

en áreas donde se han llevado a cabo programas de control durante años, se ha observado una disminución de su prevalencia (Myllys y col., 1998; Andersen y col., 2003; Bradley y col., 2007; Piepers y col., 2007).

Es de destacar que **no presentó estacionalidad** (Tabla 17), y que al analizar la **tendencia de aislamiento en la serie temporal** (clúster), fue incluido en el mismo clúster que *Corynebacterium* spp. y *Staph. epidermidis* (Figura 37).

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Strep. agalactiae* presenta el comportamiento de patógeno contagioso por excelencia, con una disminución de proporción de aislamiento en el tiempo (indicando una alta eficacia de las medidas de control) y su aislamiento no presenta estacionalidad. Se ha observado la existencia de infecciones con RCS < 100.000 cel/ml en los que se ha aislado este microorganismo.

4.5.4. *Streptococcus uberis*.

Los resultados obtenidos demuestran la **alta frecuencia relativa de las IIM** producidas por *Strep. uberis*, al igual que lo que ocurre en otras partes del mundo (Jayarao y col., 1999; Zadoks y col., 2003) y es el estreptococo más frecuentemente aislado (Tabla 3) tanto en mamitis clínicas como subclínicas (Tabla 4). Es de destacar que su frecuencia en las mamitis subclínicas, en relación al total de muestras, es mucho mayor (12,4%) (Tabla 17) que el observado en la misma zona (8,2%) hace más de dos décadas (Marco y col., 1998).

Los valores de **RCS** observadas en este estudio fueron de media aritmética 5.139.000 cel/ml y mediana 3.594.000 cel/ml (Tabla 14). La media de **LS** fue de 7,89 (Tabla 16) que se corresponde con un RCS de 2.980.000 cel/ml. Estos valores de RCS son muy superiores, como ocurre en todos los patógenos estudiados, a los calculados en un metanálisis realizado sobre los RCS asociados a las IIM de diferentes patógenos (Djabri y col., 2002). Las medianas de RCS y LS, fueron superiores a *Staph. aureus* y similares a las observadas en el caso de *E. coli* y *K. pneumoniae* (en el segundo grupo de microorganismos con mayores valores de mediana de LS (Figura 35).

Se ha descrito para este patógeno que los casos clínicos son una pequeña proporción de las infecciones (Jayarao y col., 1999; Zadoks y col., 2003). Sin embargo en este estudio, **el % de mamitis clínicas** de *Strep. uberis* solamente fue superado, entre los patógenos con frecuencia

de aislamiento $\geq 0,3\%$ sobre el total de muestras, por *Strep. dysgalactiae*, las *Klebsiella spp.*, *E. coli*, y *T. pyogenes* y muy superior al de otro microorganismo considerado patógeno mayor como *Staph. aureus* (Tabla 6 y 7).

En cuanto a la **tendencia del porcentaje de aislamiento en el tiempo** fue uno de los patógenos con un aumento más pronunciado. El aumento del porcentaje de aislamiento sobre el total de muestras también se observa al comparar los resultados obtenidos en este estudio (12,4%; Tabla 17) con los valores descritos en la misma zona (8,2%) hace más de dos décadas (Marco y col., 1998). Sin embargo, *Strep. uberis* presentó una tendencia de aislamiento en la serie temporal (clúster) diferente a los coliformes (Figura 37), a pesar de ser todos ellos considerados patógenos ambientales. Una de las posibles explicaciones de este hecho podría ser que en el caso de *Strep. uberis* hay evidencias de la existencia de cepas con ambos tipos de comportamiento epidemiológico (Zadoks y col., 2003). Se ha discutido mucho sobre la importancia relativa de la vía contagiosa en este patógeno considerado ambiental (Zadoks y col., 2003; Mc Dougall y col., 2004; Pullinger y col., 2007). Nuestros resultados al analizar las tendencias de la serie de temporales parecen indicar que aunque puedan existir cepas con comportamiento contagioso, su importancia relativa es pequeña dado que, en el clúster no se asoció con patógenos contagiosos como *Strep. agalactiae* o con patógenos de comportamiento contagioso o ambiental como *Strep. dysgalactiae*.

Otra explicación es que en el caso de este patógeno sean más frecuentes, en comparación con los coliformes, las IIM persistentes (Zadoks y col., 2003; Pullinger y col., 2007) o los casos con baja respuesta al tratamiento antibiótico (Milne y col., 2005). Estas circunstancias pueden incrementar su importancia relativa en las mamitis subclínicas en rebaños de leche. Así se ha observado en explotaciones con RCS de tanque menor a 400.000 cel/ml., donde los casos clínicos pueden representar una pequeña proporción de las IIM (Zadoks y col., 2003). Por el contrario, las IIM causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* generalmente muestran síntomas clínico, y son un proceso de corta duración que acaba con la muerte del animal o la eliminación del patógeno (Hogan y Smith, 2003). Nuestros resultados avalan este hecho dado que se observan valores más bajos de RCS (Tabla 14) y de % de mamitis clínicas (Tablas 6 y 7) en el caso de *Strep. uberis* que en el caso de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

La **tendencia de aislamiento de la serie de temporal** (clúster), tampoco se asoció a las enterobacterias (Figura 37), dado que están en diferente clúster. Se ha discutido mucho sobre

la importancia relativa de la vía contagiosa en este patógeno considerado ambiental (Zadoks y col., 2003; Mc Dougall y col., 2004; Pullinger y col., 2007). Nuestros resultados al analizar las tendencias de las serie de temporales parecen indicar que aunque puedan existir cepas con comportamiento contagioso, su importancia relativa es pequeña dado que, en el clúster no se asoció con patógenos contagiosos como *Strep. agalactiae* o con patógenos de comportamiento contagioso o ambiental como *Strep. dysgalactiae*.

Además, *Strep. uberis* es el único de estos tres patógeno ambientales que presentó **tendencia estacional** (Tabla 17), observando porcentajes de aislamientos, mayores en verano y menores en otoño. Este hecho concuerda con el mayor aislamiento de *Strep. uberis* observados en diversos países en verano (Holanda, Bakema, 1999; Noruega, Østeras y col., 2006) y contradiciéndose con la mayor frecuencia en primavera o invierno observadas en otros (EEUU., Makovec y Ruegg, 2003; Nueva Zelanda, López-Benavides y col., 2005; Italia, Ferguson y col. 2007). Esta tendencia estacional podría ser debida a una variación en la contaminación a partir de las heces de los animales, a la variación de las condiciones ambientales que afectan a la supervivencia y multiplicación del microorganismo o a variaciones de manejo que faciliten o dificulten la contaminación ambiental. Dado que en la zona de este estudio no existe una concentración estacional de partos, la mayor frecuencia de infecciones asociada a la época de post parto o peri parto (Williamson y col., 1995; Pankey y col. 1996; Jayarao y col., 1999; Silva y col., 2005; López-Benavides y col., 2006; Parker y col., 2007) no justificaría este comportamiento estacional. Sin embargo, si es posible que el efecto de la mayor frecuencia de salida de animales al pasto (Zadoks y col., 2005b), aunque no se poseen datos de las explotaciones incluidas en el estudio que puedan ayudar a confirmarlo. Sin embargo, si las condiciones de temperatura y humedad justificaran esta variación (Buddle y col., 1988; López-Benavides y col., 2005), este hecho debería también observarse una tendencia estacional en los coliformes, hecho que no fue observado. El conocimiento de las causas de la estacionalidad observada serían de gran interés a la hora de establecer posibles medidas de control de estas infecciones.

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Strep. uberis* es uno de los patógenos más frecuentemente aislados tanto en mamitis clínicas como subclínicas, aumentando la frecuencia relativa de la proporción de aislamientos en el tiempo, presenta un comportamiento temporal diferente a otros patógenos ambientales como *E. coli* y *K. pneumoniae* y su aislamiento presenta

estacionalidad. Además, los resultados obtenidos en relación a su capacidad patógena hacen que este microorganismo sea uno de los retos más importantes en el futuro del control de las mamitis.

4.5.5. *Streptococcus dysgalactiae*.

Es de destacar que su **fel porcentaje de aislamientos** sobre el total de muestras en las mamitis subclínicas es similar (4,8%) (Tabla 17) al observado en la misma zona (4,1%) hace casi dos décadas (Marco y col., 1998).

Los valores de **RCS** observadas en este estudio fueron de media aritmética 5.386.000 cel/ml y mediana 3.625.000 cel/ml (Tabla 14). La media de **LS** fue de 8 (Tabla 16) que se corresponde con un RCS de 3.202.000 cel/ml. Estos valores son muy superiores, como ocurre en todos los patógenos estudiados, a los calculados en un metanálisis realizado sobre los RCS asociados a las IIM de diferentes patógenos (Djabri y col., 2002). En el presente estudio los valores de RCS de *Strep. dysgalactiae* son similares a los de *Strep. uberis*, al contrario de lo reseñado por Djabri y col., (2002), sin embargo el **% de mamitis clínicas** fue superior en el caso de *Strep. dysgalactiae*, siendo el estreptococo con un mayor valor de este parámetro (Tablas 6 y 7).

Al analizar la **tendencia de aislamiento de la serie de temporal** (clúster), y de acuerdo con su doble comportamiento epidemiológico como contagioso y ambiental (Smith y Hogan, 1995; Sommerhäuser y col., 2003) se incluyó en un grupo epidemiológico diferente a los patógenos típicamente contagiosos como *Strep. agalactiae* o típicamente ambientales como *E. coli*. (Figura 37), sin embargo se incluyó en el mismo clúster que el *Staph. aureus* y además tiene una **tendencia estacional** parecida, ya que los dos se aíslan con menor frecuencia en el verano.

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *Strep. dysgalactiae* presenta una tendencia en el tiempo compatible con el hecho de considerarse tanto contagioso como ambiental, no observando una disminución de su proporción de aislamiento en el tiempo y presenta estacionalidad.

4.5.6. Otros estreptococos, enterococos y lactococos.

Es de destacar, en el caso de los enterococos, que su frecuencia sobre el total de muestras en las mamitis subclínicas es mayor (3,0%) (Tabla 17) al observado en la misma zona (2,2%) hace casi dos décadas (Marco y col., 1998).

La literatura sobre estos patógenos es muy escasa, dado que suelen ser considerados como grupo y no se realiza identificación a nivel de especie, por lo que lo único que suelen indicar los trabajos, es su baja frecuencia de aislamiento en las mamitis bovinas (Watts, 1988a; Devriese et al., 1999; Wyder y col., 2011). Los resultados de este estudio también indican una menor **frecuencia de aislamientos** en comparación con otros patógenos, siendo para los enterococos del 4,75%, otros estreptococos 3,65, y lactococos 2,2% (Tabla 3). Este hecho no ha permitido, en muchos casos, realizar algunos análisis planteados en este estudio en todas las especies. Los análisis de tendencia y de valor estadístico de las diferencias en proporciones de aislamiento se han centrado en *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. saccharolyticus*, y se ha considerado los lactococos como género.

Poco se conoce sobre su comportamiento epidemiológico y se discute en algunos casos su verdadero papel patógeno (Devriese et al., 1999; Zadoks et al., 2004; Zadocks y col., 2011b). Mientras que algunos autores los consideran, en su conjunto como patógenos menores (Guélat-Brechbuehl y col. 2012) también se han descrito brotes de mamitis clínicas causados por estos patógenos en rebaños concretos (Todhunter y col., 1995). Dado que existen muy pocos estudios que se centren en estos patógenos mamarios, se asume que generalmente tienen un comportamiento epidemiológico similar, y suelen ser referidos como especies de estreptococos diferentes a *Strep. agalactiae*. Por tanto, no es posible comparar con otros estudios los resultados obtenidos en estos patógenos ya que, que conozcamos, es la primera vez que se realiza una clasificación sobre la capacidad patógena o comportamiento epidemiológico de este grupo de patógenos.

Nuestros resultados sugieren diferencias en el comportamiento epidemiológico y patológico a nivel de especie. Así el **% de mamitis clínicas sobre el total de muestras** (Tabla 6) y los valores de **RCS** (Tabla 14) de este grupo varían según el tipo de microorganismo. Tanto en el caso de *A. viridans* como en el de *E. faecalis*, se observaron valores bajos de RCS, similares a los obtenidos por diversas especies de ECN. Además, *A. viridans* fue el patógeno

de este grupo que presentó un mayor porcentaje de aislamientos en muestras con RCS < 100.000 cel/ml entre aquellas en las que fue aislado (Tabla 11). No existe información de la patogenicidad de *E. faecalis*, sin embargo si se ha discutido la importancia como patógeno mamario de *A. viridans* (Devriese et al., 1999; Zadoks et al., 2004) e incluso no se han descrito diferencias en el RCS con muestras con cultivo negativo (Wyder y col., 2011). Nuestros resultados indican una baja capacidad patógena de ambas especies.

Por otro lado, *Lactococcus spp.*, *E. faecium* y *E. saccharolyticus* se mostraron asociados a mamitis más graves. Así se observaron valores de RCS superiores o similares (Tabla 14) y % de mamitis clínicas (Tabla 7) similares a patógenos mayores como *Staph. aureus* y *Strep. agalactiae*.

La diversidad genética de las cepas aisladas de enterococos en IIM es atribuible a un posible origen ambiental (Petersson-Wolve y col., 2008) y son clasificados como patógenos ambientales dado que se considera que se transmiten desde el ambiente al animal más que entre animales (Rossitto et al. 2002). Sin embargo, también los resultados de la comparación de la **tendencia del % de aislamiento de la serie de temporal**, muestran diferencias entre los patógenos de este grupo. Así, las tres especies de enterococos más aisladas se incluyeron en clúster diferentes (Figura 37). Estos resultados indican diferencias en el comportamiento epidemiológico entre las especies incluidas en este grupo de patógenos. En ninguno de los enterococos se observó una disminución en el tiempo, presentando de *E. saccharolyticus* un claro aumento del % de aislamientos a lo largo de los años de este estudio (Figura 36). Ninguno de los patógenos estudiados en este grupo presentó tendencia estacional (Tabla 17).

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, se observaron diferencias en la capacidad patógena, siendo mayor en *Lactococcus spp.*, *E. faecium* y *E. saccharolyticus* que en el caso de *A. viridans* y *E. faecalis*. Las tres especies de enterococos presentaron un comportamiento diferente en la tendencia de aislamiento en el tiempo que indica la existencia de diferencias en el comportamiento epidemiológico. Ningún patógeno de este grupo presentó estacionalidad.

4.5.7. Enterobacterias.

La **frecuencia de aislamientos** de enterobacterias en relación al total de aislamientos (11,67%), indica la frecuencia relativa de estas infecciones. Sin embargo, como ha sido descrito en diversas partes del mundo, es *E. coli* (7,56%) la especie más frecuente, seguida de *K. pneumoniae* (1,26%), *S. marcescens* y *K. oxytoca* (Tabla 3).

Nuestros resultados concuerdan con la afirmación generalizada de que las IIM causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* generalmente muestran síntomas clínicos por lo que son consideradas patógenos mayores (Burvenich y col., 2003). Así fueron, después de *Trueperella pyogenes* las especies que presentaron un mayor **% de mamitis clínicas** (Tabla 6). También, en las mamitis subclínicas presentaron un nivel alto de **LS** (Figura 35). Sin embargo, los valores fueron inferiores en el caso LS para *K. oxytoca* y en el caso del porcentaje de mamitis clínicas para de *S. marcescens*. Estos resultados concuerdan con la afirmación de que las IIM por *Serratia* spp no suelen desarrollar síntomas clínicos y los casos clínicos son menos severos que los producidos por *E. coli* (Todhunter y col., 1991^a; Hogan y Smith, 1997).

También los resultados de la comparación de **la tendencia del % de aislamiento de la serie temporal**, muestran diferencias en el comportamiento epidemiológico entre las distintas especies de enterobacterias. Así se observa que *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* se encuentran en un mismo clúster, lo que es compatible con una semejanza epidemiológica. Estas especies, y principalmente *E. coli* se consideran patógenos ambientales ya que no existen evidencias claras de la importancia epidemiológica de la transmisión de vaca a vaca (Zadoks y Fitzpatrick, 2009). Sin embargo, *S. marcescens* presentó una tendencia en el tiempo del porcentaje de aislamiento diferente a las tres especies mencionadas (Figura 37).

Otra diferencia de *S. marcescens* con el resto de coliformes fue que presentó **tendencia estacional** con mayores porcentajes de aislamiento en el invierno y los menores en la primavera. Estos resultados también sugieren que su comportamiento epidemiológico es diferente del resto de coliformes. Mientras que en algunos estudios no se observan diferencias estacionales en la frecuencia de mamitis por coliformes (Italia, Ferguson y col. 2007), la mayoría si se describe mayor prevalencia o frecuencia relativa de aislamiento, tasa de nuevas infecciones y casos clínicos de *E. coli* en verano (EEUU, Makovec y Ruegg, 2003; Finlandia, Koivula y col., 2007). Se ha asociado este hecho con el aumento del recuento de bacterias gran

negativas en la cama durante los meses húmedos y calurosos (Todhunter y col., 1991b; Makovec y Ruegg 2003). También se ha considerado la posibilidad de que el estrés por calor pueda ser un factor de riesgo de la mamitis coliformes, pero es difícil demostrarlo dada la imposibilidad de disponer de animales controles para establecer comparaciones (Hogan y Smith, 2003). La falta de estacionalidad en la mayoría de los coliformes encontrada en este estudio podría ser debida a que no exista tanta diferencia, dentro de los establos, de humedad y temperatura entre las estaciones como en otras zonas del mundo donde se ha encontrado estacionalidad.

Como **conclusión** de los resultados obtenidos, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* presentan una tendencia similar en el tiempo, sin estacionalidad y asociados a un alto porcentaje de mamitis clínicas y altos RCS. Por el contrario, se observó una tendencia diferente, estacionalidad y menor proporción del porcentaje de mamitis clínicas en el caso de *S. marcescens*.

4.5.8. Otros microorganismos Gram negativos con baja proporción de aislamiento.

Todas las especies incluidas en este grupo presentaron un porcentaje de aislamiento menor del 0,3% de los aislamientos.

Destaca *Pasteurella multocida* tanto en los elevados LS observados como en el porcentaje de mamitis clínicas. En el resto de patógenos de estos grupos se asociaron a LS altos (similares a *E. coli*) *Pseudomonas aeruginosa*, medios (similares a *Staph. aureus*) *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri* y *Routella ornithinolytica* y bajos (similares a la mayoría de ECN) *Serratia liquefaciens*. Todos ellos se asociaron con % de mamitis clínicas inferiores a *E. coli* y superiores a *Staph. aureus*.

4.5.9. *Corynebacterium spp.*

Corynebacterium spp. es considerado un patógeno contagioso y aunque ha sido aislado de diversas áreas del cuerpo de las vacas, incluyendo puntas de pezones, no se considera que tenga un origen ambiental (Smith y Hogan, 1995). Aunque se ha demostrado que puede provocar verdaderas IIM, el aislamiento de *Corynebacterium spp.* a partir de muestras de leche suele reflejar, realmente, una colonización del canal del pezón (Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984; Bexiga y col., 2011). Así en nuestro estudio no solamente fue uno de los patógenos con menor

mediana de **LS**, sino que también presentó una baja **% de mamitis clínicas** y fue el patógeno con mayor % de muestras con **RCS** <100.000 cel/ml. Sin embargo se ha de considerar que, aunque en una proporción menor que la mayoría de los patógenos, existen infecciones con síntomas clínicos. La gravedad de estas mamitis no ha podido ser valorada al carecer de esta información. En este trabajo, al igual que en la bibliografía revisada, no se realizó identificación a nivel de especie. Si bien se considera que la mayoría de los aislamientos se corresponden con *Corynebacterium bovis*, esto no es siempre así por lo que es posible que existan diferencias en la capacidad de dar lugar a mamitis clínicas entre las diferentes especies de este género.

La marcada disminución de la **frecuencia de aislamientos** de este microorganismo a lo largo del estudio podría responder a la ya conocida eficacia de las medidas generales de prevención de mamitis en las infecciones por *Corynebacterium* spp. Una adecuada higiene durante el ordeño, el baño de pezones en el secado y el tratamiento antibiótico durante el secado son medidas efectivas de control en relación a las IIM causadas por *Corynebacterium* spp., e incluso, el nivel de prevalencia de este patógeno ha sido propuesto como un indicador de la higiene del ordeño en los rebaños (Bramley y col., 1976; Honkanen-Buzalski y Bramley, 1984).

Los resultados obtenidos indican una mayor influencia de las condiciones estacionales sobre las IIM por *Corynebacterium* spp. que sobre otros patógenos considerados contagiosos, dado que es el único que presenta **tendencia estacional** con mayor proporción de aislamiento en otoño.

Como **conclusión** los resultados indican una asociación de las infecciones por *Corynebacterium* spp. asociadas a mamitis subclínicas y bajos recuentos, son compatibles con un comportamiento epidemiológico de tipo contagioso (disminución de proporción de aislamiento en el tiempo) y a que una importante proporción de infecciones se correspondan con colonizaciones del canal del pezón. Sin embargo, aunque en baja proporción son capaces de producir mamitis clínicas.

4.5.10. *Trueperella pyogenes*.

Es el patógeno que presentó un mayor **% de mamitis clínicas** y una mediana de **LS** superior a patógenos mayores como *E. coli*. *T. pyogenes* se ha asociado a las mamitis de secado

que son detectadas al inicio de lactación dado que se presentan signos clínicos evidentes. Sin embargo nuestros resultados indican que existen también un porcentaje, aunque menor en comparación con otros patógenos, de IIM subclínicas. Los resultados indican un aumento **del % de aislamientos en el tiempo** de este patógeno.

Otra de las consideraciones a tener en cuenta es que se suele definir como mamitis de verano. Sin embargo este término parece adecuarse más a la realidad epidemiológica de zonas del norte de Europa y no a la del Noroeste de España. Así aunque en este estudio se observó una **tendencia estacional**, el mes con el máximo porcentaje de aislamiento (febrero) no concuerda con la existencia de un mayor número de nuevas infecciones en los meses de verano. Por tanto los programas de control deberán tener en cuenta la existencia de IIM por este patógeno durante todo el año.

En el estudio de series temporales (Figura 36), se observa un claro aumento del % de aislamientos de esta especie. Dado el mal pronóstico de esta IIM, es necesario considerar cada vez más a este patógeno en los esquemas de los programas de control de mamitis bovinas.

Como **conclusión** las IIM por *T. pyogenes* se asociaron a mamitis clínicas y altos RCS y presentó un aumento de proporción de aislamiento en el tiempo. Sin embargo debe tenerse en cuenta la existencia de infecciones subclínicas y la existencia de infecciones a lo largo de todo el año, y no solamente como una infección asociada a las épocas estivales, en los programas de control.

4.5.11. Otros microorganismos Gram positivos con baja proporción de aislamiento.

El único patógeno de este grupo con un % de aislamiento $>0,1\%$ fue ***Nocardia spp.*** Nuestros resultados (tanto de LS como de % de mamitis clínicas) reafirman la consideración de ser un patógeno que, aunque **poco frecuentemente aislado, produce mamitis graves.**

4.5.12. *Prototheca spp.*

Un % importante de mamitis por este patógeno presentaron manifestaciones clínicas y medianas de **LS** altas (similares en ambos casos a patógenos mayores como *Strep. uberis*). Por tanto se ha de reconsiderar la afirmación de que las IIM por estos patógenos se asocian de forma poco frecuente con **mamitis clínicas** (Scaccabarozzi y col., 2008; Marques y col., 2010).

Existió un aumento de la **tendencia del % de aislamiento** de este patógeno a lo largo del estudio. Si bien no era casi aislado hace casi dos décadas (Marco y col., 1998) en Galicia, cada vez tiene mayor importancia, alcanzando algunos años más del 1% de los aislamientos. Este hecho tiene gran importancia dado el mal pronóstico de esta infección. A pesar de estar asociado su multiplicación a las condiciones de humedad y temperatura no se observó tendencias estacionales.

Como **conclusión**, las características de las IIM por *Prototheca* spp. (no tratamiento efectivo) y el aumento observado en la proporción de aislamiento en el tiempo hacen que sea necesario que estas infecciones sean consideradas de forma particular en los programas de control de mamitis en Galicia.

4.5.13. Levaduras.

Cuatro especies de candidas representaron casi el 75% de este grupo: *C. rugosa*, *C. krusei*, *C. famata* y *C. tropicalis*. En un estudio reciente en Italia, Fadda y col. (2013) en un estudio sobre 142 cepas aisladas de IIM, también *Candida* spp. fue el género predominante, aunque en su caso *C. famata* fue la especie más frecuente.

Desde el punto de su capacidad patógena existieron diferencias claras entre las especies de levaduras. Se asociaron a LS altos (similares a *E. coli*) *C. krusei* y *C. rugosa*, a LS medios (similares a *Staph. aureus*) *C. famata* y *C. tropicalis*, mientras que ninguna especie de levadura se asoció a LS bajos. En relación al **% de mamitis clínicas** también destaca el alto valor obtenido de *C. krusei* y con resultados menores, por orden de mayor a menor, en *C. tropicalis*, *C. famata* y *C. rugosa*, siendo superiores en todos los casos a los obtenidos, por ejemplo, para *Staph. aureus*. Estos resultados contradicen la **baja patogenicidad** de estos microorganismos, ya que se suelen considerar que provocan infecciones leves y sean raramente asociados a mamitis clínicas. Ya otros autores también han discutido la afirmación de que suelen tender a la auto curación, así se han descrito brotes donde el 40% de los animales infectados por padecer mamitis crónicas (Scaccabarozzi y col., 2011).

Las levaduras, como grupo, en el análisis de tendencia no fueron incluidas en los clúster de los patógenos considerados típicamente contagiosos o ambientales. Este hecho coincide con las

múltiples fuentes de infección ambientales y la posibilidad de transmisión durante el ordeño (Scaccabarozzi y col., 2011).

Como grupo presentaron una tendencia al aumento en la proporción de aislamiento a lo largo del estudio y estacionalidad con una mayor frecuencia en otoño y más bajo en primavera. Esta estacionalidad puede asociarse a las condiciones ambientales ya que su multiplicación se ve favorecida por temperaturas medias y alta humedad, sin embargo deben existir otros factores que influyan en este hecho ya que esta estacionalidad no fue observada en el caso de *Prototheca* spp.







V. CONCLUSIONES



Respecto de la etiología de las infecciones y la variación en el tiempo:

1. Los patógenos aislados con mayor frecuencia en las mamitis subclínicas fueron estreptococos y estafilococos, en tanto que en las clínicas predominaron los estreptococos y enterobacterias.
2. Se observaron claras diferencias en la tendencia de los distintos patógenos, incluso dentro del mismo género o grupo, lo que indicaría cambios evidentes en la etiología de las mamitis en Galicia. El hecho de que *Strep. uberis*, algunas especies de ECN, levaduras, *Prototheca spp.*, *E. saccharolyticus* y *T. pyogenes* aumenten su presencia en el curso del estudio, pone de manifiesto una insuficiente eficacia de las medidas de control frente a estos patógenos. Por el contrario, *Corynebacterium spp.*, *Strep. agalactiae* y *Staph. epidermidis* fueron los únicos patógenos que disminuyeron apreciablemente en su proporción de aislamiento, y en consecuencia, la reducción del RCS del tanque de leche observada en la población del estudio, es el resultado de la menor frecuencia del aislamiento de un pequeño número de patógenos mamarios.

En relación con la utilización de metodología ARIMA y los métodos estadísticos multivariantes, así como la comparación relativa de proporción de mamitis clínicas y de recuento de células somáticas:

3. Los resultados obtenidos demuestran la validez de este tratamiento estadístico para comparar el patrón de comportamiento epidemiológico y patológico de los patógenos mamarios, ya que concuerda con lo obtenido en la mayoría de los estudios sobre los patógenos más frecuentes. Además, estos métodos permiten analizar, de forma comparada, los resultados de los patógenos mamarios hallados con menos frecuencia en muestras enviadas al laboratorio para el diagnóstico de mamitis.
4. Las variaciones del recuento de células somáticas observadas en cada patógeno se deben a la mayor amplitud de este parámetro en los microorganismos más patógenos que a la existencia de diferencias de patogenicidad entre las cepas de una misma especie.
5. No debe asociarse la estacionalidad con comportamientos de tipo ambiental, dado que no se observó estacionalidad en muchos de los patógenos considerados ambientales, por ejemplo en *E. coli*, en cambio sí se vio en la mayoría de los patógenos considerados

contagiosos. En este sentido, los factores ambientales o asociados al animal pueden intervenir directamente en el comportamiento estacional de patógenos mamarios contagiosos.

Del estudio comparado entre los patógenos aislados se puede concluir que:

6. La frecuencia de aislamiento de *Staph. aureus*, ECN y *Corynebacterium spp* en muestras con recuento de células somáticas inferiores a 100.000 cel/ml, confirma que, si se quiere hacer un buen control de esas infecciones, los límites de RCS para considerar que hay mastitis, sean cada vez más bajos. Además, en los protocolos de erradicación de *Strep. agalactiae*, se debe tener en cuenta que hay aislamientos también en muestras con recuento de células somáticas inferiores a 100.000 cel/ml.
7. De los patógenos que mostraron variación estacional, *Staph. xylosus*, *Staph. sciuri*, *Corynebacterium spp.* y levaduras presentaron mayor frecuencia en otoño; *S. marscescens*, *Strep. dysgalactiae* y *T. pyogenes* en invierno y *Strep. uberis* y *Staph. aureus* lo hicieron en verano y primavera, respectivamente.
8. Los resultados del estudio sobre el comportamiento epidemiológico de los diferentes patógenos mamarios demostraron que la complejidad va más allá de la simple clasificación tradicional en contagiosos y ambientales. Así, exceptuando *Staph. epidermidis* (con un comportamiento compatible con un origen humano), las diferencias en la epidemiología entre los ECN no parecen tan claras como las existentes entre los patógenos tradicionalmente clasificados como contagiosos o ambientales.
9. El hecho de que *Staph. aureus* sea el único patógeno contagioso que no presenta una disminución en la proporción de aislamiento en el tiempo, así como las similitudes en la tendencia estacional y de la serie temporal con *Strep. dysgalactiae*, patógeno que puede presentar tanto un comportamiento ambiental como contagioso, parecen indicar que se ha producido un incremento de la frecuencia relativa de infecciones causadas por cepas con comportamiento ambiental de esta especie.
10. En general, los ECN presentaron menor patogenicidad que *Staph. aureus*; sin embargo, *Staph. hyicus*, *Staph. Sciuri* y *Staph. chromogenes* mostraron porcentajes de mastitis

clínicas al menos similares a los de *Staph. aureus*, y lo mismo sucedió con *Staph. intermedius* respecto al recuento de células somáticas.

11. El porcentaje de aislamiento de *Strep. uberis* presentó una tendencia temporal y de estacionalidad distinta a los coliformes, lo que refleja un comportamiento epidemiológico diferente entre estos patógenos considerados típicamente ambientales y de origen fecal. Este hecho podría explicarse, al menos en parte, por la asociación de las infecciones por *Strep. uberis* con cifras de recuento de células somáticas y porcentajes de mastitis clínicas más bajos, en comparación con lo hallado en coliformes.
12. Entre las enterobacterias, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* presentaron una tendencia temporal similar, sin embargo, no mostraron tendencia estacional y además se asociaron a elevados RCS y porcentajes altos de mastitis clínicas. Por contra, *S. marcescens* mostró tendencia temporal diferente, cierta estacionalidad y menor % de mastitis clínicas, lo que es indicativo de un comportamiento patológico y epidemiológico distinto al resto de patógenos de este grupo.
13. Se observaron notables diferencias en el comportamiento epidemiológico y patológico de las especies de *Enterococcus* spp., *Aerococcus* spp. *Lactococcus* spp. Así, por ejemplo, *Aerococcus viridans* y *E. faecalis* se asociaron a recuentos de células somáticas y a porcentajes de mastitis clínicas inferiores a los observados para *Lactococcus* spp., *E. faecium* y *E. saccharolyticus*, que, a su vez, mostraron resultados similares a los de patógenos mayores.
14. Se observó un aumento del porcentaje de levaduras y *Prototheca* spp. a lo largo del estudio, y ambos grupos de patógenos se asociaron con alta capacidad patógena, en especial *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. famata* y *C. rugosa*). Entre los patógenos de baja frecuencia de aislamiento, sobresalieron por su mayor capacidad patógena *Nocardia* spp., *Pasteurella multocida* y *Pseudomonas aeruginosa*.





VI. RESUMEN



Resumo

O obxectivo deste traballo foi estudar e comparar as tendencias de illamento e a capacidade patóxena dos microorganismos illados en mostras de cuarteirón (n=240.232) enviadas para a súa análise microbiolóxica ao Laboratorio Interprofesional Galego de Leite (L.I.G.A.L.) desde xuño de 2005 a setembro de 2011.

Para a valoración da capacidade patóxena dos axentes patóxenos achados tívose en conta tanto a porcentaxe de mamites clínicas sobre o total de mostras analizadas como os correspondentes recontos de células somáticas.

Para a análise da tendencia de frecuencia de illamento utilizáronse modelos autoregresivos integrados de media móbil (ARIMA) e tratamentos estatísticos con técnicas multivariantes como son a análise de clúster, para detectar tendencias estacionais, e similitude entre as tendencias mensuais das series de porcentaxe de illamento, co obxectivo de distribuír os patóxenos mamarios en grupos relativamente homoxéneos.

A diminución observada no curso da investigación do reconto de células somáticas das mostras de tanque, que se produce como consecuencia dos programas de control implantados nos últimos anos en Galicia, céntrase especialmente na redución das infeccións intramamarias causadas por moi poucas especies de patóxenos.

Os resultados obtidos reflicten unha maior complexidade no comportamento epidemiolóxico dos patóxenos mamarios do que representa a habitual clasificación en contaxiosos ou ambientais.

Staphylococcus aureus presenta unha tendencia similar a *Streptococcus dysgalactiae*, un patóxeno mamario que pode considerarse tanto con comportamento contaxioso como ambiental.

Entre os patóxenos mamarios considerados tradicionalmente como ambientais, *Strep. uberis* mostrou un comportamento diferente a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

As distintas especies de estafilococos coagulasa negativos (ECS) e de estreptococos distintos a *Strep. agalactiae*, mostraron diferenzas apreciables nos seus modelos de tendencias.

Resumen

O apoio da análise de series temporais e de técnicas estatísticas de análises multivariante, por exemplo o estudo de clusters, demostra ser de gran utilidade para investigar as tendencias de illamento dos patóxenos mamarios, debido a que se adecúan á dependencia estocástica de datos consecutivos. Ademais, permiten a súa utilización na identificación dos comportamentos epidemiolóxicos dos patóxenos mamarios cando se aplican aos resultados das mostras remitidas de forma rutineira para o seu diagnóstico microbiolóxico, facilitando así a súa clasificación en grupos relativamente homoxéneos.

A frecuencia de illamento de *Staph. aureus*, ECN e *Corynebacterium spp* en mostras con RCS <100.000 cel/ml confirma que, se se quere facer un bo control desas infeccións, está xustificado o emprego de cifras limiar de RCS máis baixas para considerar que realmente hai unha mamite. Ademais, nos protocolos de erradicación de *Strep. agalactiae* débese considerar que houbo illamentos en mostras con RCS < 100.000 cel/ml.

En xeral, os ECN presentaron menor patoxenicidade que *Staph. aureus*; con todo, *Staph. hyicus*, *Staph. Sciuri* e *Staph. chromogenes* mostraron porcentaxes de mamites clínicas polo menos similares aos de *Staph. aureus*, e o mesmo sucedeu con *Staph. intermedius* respecto ao RCS.

Tamén se observaron diferenzas no comportamento patolóxico entre as especies de *Enterococcus spp.*, *Aerococcus spp.* *Lactococcus spp.* Así, *Aerococcus viridans* e *E. faecalis* asociáronse a recontos de células somáticas e a porcentaxes de mamites clínicas inferiores ao observado para *Lactococcus spp.*, *E. faecium* e *E. saccharolyticus*, que á súa vez, presentaron valores similares a patóxenos maiores. Pola súa banda, os fermentos, *Prototheca spp.*, *Nocardia spp.*, *Pasteurella multocida* e *Pseudomonas aeruginosa* asociáronse cunha alta capacidade patóxena.

(Palabras clave: vacún de leite, mamites, micrororganismos, mamites clínicas, reconto de células somáticas, tendencias, epidemioloxía, series temporais, análises de clúster).

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar y comparar las tendencias de aislamiento y la capacidad patógena de los microorganismos aislados en muestras de cuarterón (n=240.232) enviadas para su análisis microbiológico al Laboratorio Interprofesional Gallego de Leche

(L.I.G.A.L.) desde junio de 2005 a septiembre de 2011. Para la valoración de la capacidad patógena de los agentes patógenos hallados se tuvo en cuenta tanto el porcentaje de mamitis clínicas sobre el total de muestras analizadas como los correspondientes recuentos de células somáticas. Para el análisis de la tendencia de frecuencia de aislamiento se utilizaron modelos autoregresivos integrados de media móvil (ARIMA) y tratamientos estadísticos con técnicas multivariantes como son el análisis de clúster, para detectar tendencias estacionales, y similitud entre las tendencias mensuales de las series de porcentaje de aislamiento, con el objetivo de distribuir los patógenos mamarios en grupos relativamente homogéneos.

La disminución observada en el curso de la investigación del recuento de células somáticas de las muestras de tanque, que se produce como consecuencia de los programas de control implantados en los últimos años en Galicia, se centra especialmente en la reducción de las infecciones intramamarias causadas por muy pocas especies de patógenos. Los resultados obtenidos reflejan una mayor complejidad en el comportamiento epidemiológico de los patógenos mamarios de lo que representa la habitual clasificación en contagiosos o ambientales. *Staphylococcus aureus* presenta una tendencia similar a *Streptococcus dysgalactiae*, un patógeno mamario que puede considerarse tanto con comportamiento contagioso como ambiental. Entre los patógenos mamarios considerados tradicionalmente como ambientales, *Strep. uberis* mostró un comportamiento diferente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Las distintas especies de estafilococos coagulasa negativos (ECS) y de estreptococos distintos a *Strep. agalactiae*, mostraron diferencias apreciables en sus modelos de tendencias. El apoyo del análisis de series temporales y de técnicas estadísticas de análisis multivariante, como por ejemplo el estudio de clusters, demuestra ser de gran utilidad para investigar las tendencias de aislamiento de los patógenos mamarios, debido a que se adecúan a la dependencia estocástica de datos consecutivos. Además, permiten su utilización en la identificación de los comportamientos epidemiológicos de los patógenos mamarios cuando se aplican a los resultados de las muestras remitidas de forma rutinaria para su diagnóstico microbiológico, facilitando así su clasificación en grupos relativamente homogéneos.

La frecuencia de aislamiento de *Staph. aureus*, ECN y *Corynebacterium* spp en muestras con RCS <100.000 cel/ml confirma que, si se quiere hacer un buen control de esas infecciones, está justificado el empleo de cifras umbral de RCS más bajas para considerar que realmente hay una

mamitis. Además, en los protocolos de erradicación de *Strep. agalactiae* se debe considerar que ha habido aislamientos en muestras con RCS < 100.000 cel/ml.

En general, los ECN presentaron menor patogenicidad que *Staph. aureus*; sin embargo, *Staph. hyicus*, *Staph. Sciuri* y *Staph. chromogenes* mostraron porcentajes de mamitis clínicas al menos similares a los de *Staph. aureus*, y lo mismo sucedió con *Staph. intermedius* respecto al RCS.

También se observaron diferencias en el comportamiento patológico entre las especies de *Enterococcus* spp., *Aerococcus* spp. *Lactococcus* spp. Así, *Aerococcus viridans* y *E. faecalis* se asociaron a recuentos de células somáticas y a porcentajes de mamitis clínicas inferiores a lo observado para *Lactococcus* spp., *E. faecium* y *E. saccharolyticus*, que a su vez, presentaron valores similares a patógenos mayores. Por su parte, las levaduras, *Prototheca* spp., *Nocardia* spp., *Pasteurella multocida* y *Pseudomonas aeruginosa* se asociaron con una alta capacidad patógena.

(Palabras clave: vacuno de leche, mamitis, microorganismos, mamitis clínicas, recuento de células somáticas, tendencias, epidemiología, series temporales, análisis de clúster).

Abstract

The aim of this work was to study and compare the tendencies of isolation and pathogenicity of the microorganisms isolated from milk teat samples (n = 240,232) sent for microbiological analysis at the Galician Interprofessional Laboratory for Milk (LIGAL) from June 2005 to September 2011. Percentage of clinical mastitis over the total number of analyzed samples and the corresponding somatic cell counts were taken into account for the assessment of the pathogenicity of the found microorganisms. To analyze the trend of isolation frequency, autoregressive integrated moving average models (ARIMA) and statistical multivariate techniques as clúster analysis to detect seasonal trends and similarity between the monthly trends of the isolation percentage series were used, in order to distribute mammary pathogens in relatively homogeneous groups.

The reduction observed in the course of the investigation of somatic cell count of tank samples, which occurs as a result of the monitoring programs implemented in last years in Galicia, is focused particularly on reducing the intramammary infections caused by a very few

species of pathogens. The obtained results show a greater complexity in the epidemiological behavior of mammary pathogens rather than the usual classification, which represents in contagious or environmental pathogens. *Staphylococcus aureus* has a similar trend to *Streptococcus dysgalactiae*, a mammary pathogen that can be considered both as a contagious as an environmental behavior. Among the mammary pathogens traditionally considered as environmental pathogens, *Strep. uberis* showed a different behavior to *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. The different species of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci other than *Strep. agalactiae* showed significant differences in their trend patterns. Support from time-series analysis and multivariate statistical analysis techniques, such as the study of clusters, proves to be very useful to investigate the isolation trends of mastitis pathogens, due to they are suited to the stochastic dependence of consecutive data. Additionally, they allow its use in the identification of the epidemiological behavior of mammary pathogens when they are applied to the results of the routinely sent samples for microbiological diagnosis, thus facilitating their classification in relatively homogeneous groups.

Frequency of isolation of *Staph. aureus*, CNS and *Corynebacterium* spp in samples with SCC <100,000 cells/ml confirms that, if a good control of these infections is desired, the use of a lower SCC threshold is justified for considering that a mastitis is really occurring. Furthermore, isolation in samples with SCC <100,000 cells / ml should be considered in the *Strep. agalactiae* eradication protocols.

In general, CNS showed lower pathogenicity than *Staph. aureus*; however, *Staph. hyicus*, *Staph. Sciuri* and *Staph. chromogenes* showed percentages of clinical mastitis at least similar to *Staph. aureus*, and so happened with *Staph. intermedius* respect to SCC.

Differences were also observed in the pathological behavior among the species of *Enterococcus* spp., *Aerococcus* spp. and *Lactococcus* spp. Thus, *Aerococcus viridans* and *E. faecalis* were associated with somatic cell counts and clinical mastitis rates lower than those observed for *Lactococcus* spp., *E. faecium* and *E. saccharolyticus*, which in turn, had similar values to major pathogens. On their behalf, yeasts, *Prototheca* spp., *Nocardia* spp., *Pasteurella multocida* and *Pseudomonas aeruginosa* were associated with a high pathological ability.

(Keywords: dairy cattle, mastitis, microorganisms, clinical mastitis, somatic cell count, trends, epidemiology, time series, cluster analysis).





VII. BIBLIOGRAFÍA



- Aarestrup, F.M., Larsen, H.D., Jensen, N.E. 1999. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 66, 165-170.
- Aarestrup, F.M., Jensen, N.E., 1997. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *J. Dairy Sci.* 80, 307-312.
- Adkinson, R.W., Ingawa, K.H., Blouin, D., Nickerson, S.C. 1993. Distribution of clinical mastitis among quarters of the bovine udder. *J. Dairy Sci.* 76, 3453-3459.
- Africor Lugo. 2010. Memoria 2010. http://issuu.com/transmediacomunicacion/docs/memoria_africor_2010_web/1.
- Africor Lugo. 2011. Memoria 2011. http://issuu.com/transmediacomunicacion/docs/memoria_africor_2011web/1.
- Andersen H.J., Pedersen L.H., Aarestrup F.M., Chriél, M. 2003. Evaluation of the surveillance programme of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. *J. Dairy Sci.* 86, 1233-1239.
- Balter, S., Whitney, C.G., Schuchat, A. 2000. Epidemiology of group B streptococcal infections. In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferreti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington, D.C. 154-162.
- Bannerman, D.D., Chockalingam, A., Paape, M.J., Hope, J.C. 2005. The bovine immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107, 201-215.
- Bar, D., Grohn Y.T., Bennett G., Gonzalez R.N., Hertl, J.A., Schulte H.F., Tauer L.W., Welcome, F.L., Schukken Y.H. 2007. Effect of repeated episodes of generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4643-4653.
- 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. *J. Dairy Sci.* 89, 1877-1895.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J., Beiboer, M.L., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A. 1998. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 81, 411-419.
- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Lam, T.J.G.M., Beiboer, M.L., Benedictus, G., Bry, A. 1999. Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 82, 1643-1654.
- Baseggio, N., Mansell, P.D., Browning, J.W., Browning, G.F. 1997. Strain differentiation of isolates of *Streptococci* from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. *Mol. Cell Probes.* 11, 349-354.
- Besiga, R., Pereira, H., Pereira, O., Leiao, A., Carneiro, C., Ellis, K.A., Vilela, C.L. 2011. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. from bovine milk samples by use of a teat cannula. *J. Dairy Res.* 78, 9-14.

Bibliografia

- Bisharat, N., Crook, D.W., Leigh, J. 2004. Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2161-2167.
- Blackburn, P., Brooks, C., McConnell, W. 2007. Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland from 1999 to 2005. *Vet. Rec.* 161, 452-453.
- Boddie, R.L., Nickerson, S.C., Owens, W.E., Watts, J.L. 1987. Udder microflora in nonlactating heifers. *Agri-Practice.* 8, 22-25.
- Bowman, G.L., Hueston, W.D., Boner G.J., Hurley, J.J., Andreas, J.E. 1986. *Serratia liquefaciens* mastitis in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189, 913-915.
- Box, G.E.P., Jenkins, G. M. 1976. *Time Series Analysis: Forecasting y Control.* San Francisco, CA: Holden Day, pp. 181-218.
- Bradley, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164, 116-128.
- Bradley, A.J., Green, M.J. 2000. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *J. Dairy Sci.* 83, 1957-1965.
- Bradley, A.J., Green, M.J. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1845-1849.
- Bradley, A.J., Leach K.A., Breen J.E., Green, L.E., Green, M.J. 2007. Survey of the incidence y aetiology of mastitis on dairy farms in Engly y Wales. *Vet. Rec.* 160, 253-257.
- Bramley, A.J. 1975. Infection of the udder with coagulase negative Micrococci and *Corynebacterium bovis*. *IDF. Brusselss.* 85, 377-381.
- Bramley, A.J. 1982. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. *J. Dairy Res.* 49, 369-373.
- Bramley, A.J. 1984. *Streptococcus uberis* udder infection -a major barrier to reducing mastitis incidence. *Br. Vet. J.* 140, 328-335.
- Bramley, A.J., Dodd, F.H. 1984. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. *J. Dairy Res.* 51, 481-512.
- Bramley, A.J., Hillerton, J.E., Higgs, T., Hogben, E.M. 1985. The carriage of summer mastitis pathogens by muscid flies. *Br. Vet. J.* 141, 618-627.
- Bramley, A.J., Kingwill, R.G., Griffin, T.K., Simpkin, D.L. 1976. Prevalence of *Corynebacterium bovis* in bovine milk samples. *Vet. Rec.* 99, 275.
- Breen, J.E., Green, M.J., Bradley, A. 2009. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J. Dairy Sci.* 92, 2551-2561.
- Brolund, L. 1985. Cellcounts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 80, 1-123.

- Brooks, B.W., Barnum, D.A. 1984. Experimental colonization of the bovine teat duct with *Corynebacterium bovis* and the effect on milk somatic cell counts. *Can. J. Comp. Med.* 48, 141-145.
- Brooks, B.W., Barnum, D.A., Meek, A.H. 1983. An observational study of *Corynebacterium bovis* in selected Ontario dairy herds. *Can. J. Comp. Med.* 47, 73-78.
- Brouillette, E.1, Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P., Talbot, B.G. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Micro. Pathog.* 35, 159-168.
- Buddle, B.M., Tagg, J.R., Ralston, M.J. 1988. Use of an inhibitor typing scheme to study the epidemiology of *Streptococcus uberis* mastitis. *N. Z. Vet. J.* 36, 115-119.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34, 521-564.
- Calvinho, L.F., Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE.* 4, 29-40.
- Capurro, A., Artursson, K., Waller, K.P., Bengtsson, B., Ericsson-Unnerstad, H., Aspán, A. 2009. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 134, 327-333.
- Capurro, A., Aspán, A., Unnerstad, H.R., Waller, K.P., Artursson, K. 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* mastitis problems. *J. Dairy Sci.* 93, 180-191.
- Chan, K., Ripley, B. 2012. TSA: Time Series Analysis. <http://cran.r-project.org/web/packages/TSA/index.html>.
- Chatzigeorgiou, K.S., Sergeantanis, T.N., Tsiodras, S., Hamodrakas, S.J., Bagos, P.G. 2011. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of Gram-Positive y Gram-Negative bacteria: a comprehensive Meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3284-3291.
- Coffey, T.J., Pullinger, G.D., Urwin, R., Jolley, K.A., Wilson, S.M., Maiden, M.C., Leigh, J.A. 2006. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1420-1428.
- Condas, L.A.1, Ribeiro, M.G., Yazawa, K., de Vargas, A.P., Salerno, T., Giuffrida, R., Langoni, H., Melville, P.A., Biesdorf, S., Matsuzawa, T., Gonoï, T., Kastelic, J.P., Barkema, H.W. 2013. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* spp. isolated from bovine mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol.* 167, 708-712.
- Counter, D.E. 1981. Outbreak of bovine mamitis associated with *Corynebacterium bovis*. *Vet. Rec.* 108, 560-561.
- Cullen, G.A. 1967. A method of counting cells in milk using an electronic cell counter. *Vet. Rec.* 80, 188-195.

Bibliografia

- Cullen, G.A., Little, T.W. 1969. Isolation of *Streptococcus uberis* from the rumen of cows and from soil. *Vet. Rec.* 85, 115-118.
- Cullor, J.S. 1991. Mamitis in dairy cows: Does it hinder reproductive performance?. *Vet. Med.* 86, 830-835.
- Davidson, T.J., Dohoo, I.R., Donald, A.W., Hariharan, H., Collins, K.A. 1992. Cohort study of coagulase negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince Edward Island. *Can. J. Vet. Res.* 56, 275-280.
- De Vliegheer, S., Laevens, H., Devriese, L.A., Opsomer, G., Leroy, J.L.M., Barkema, H.W., Kruijff, A. 2003. Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Vet. Microbiol.* 92, 245-252.
- De Vliegheer, S., Zadoks, R.N., Barkema, H.W. 2009. Heifer and CNS mastitis. *Vet. Microbiol.* 134, 1-2.
- Dean, A., Voss, D., 1999. *Design and Analysis of Experiments*. Ed. Springer-Verlag.
- Delmas, J., Chacornac, J.P., Robin, F., Giammarinaro, P., Talon, R., Bonnet, R. 2008. Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 46, 311-313.
- Devriese, L.A., Baele, M., Vaneechoutte, M., Martel, A., Haesebrouck, F. 2002. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. *Vet. Microbiol.* 87, 175-182.
- Devriese, L.A., Hommez, J., Lae Ven S, H., Pot, B., Van Damme, P., Haesebrouck, F. 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 70, 87-94.
- Devriese, L.S., Keyser, H. 1980. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats y milk samples from dairy cows. *J. Dairy Res.* 47, 155-158.
- Di Guardo, G., Battisti, A., Agrimi, U., Forletta, R., Reitano, M.E., Calderini, P. 1997. Pathology of *Serratia marcescens* mastitis in cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 44, 537-546.
- Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F., Seegers, H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet. Res.* 33, 335-357.
- Dodd, F.H., Neave, F.K. 1970. *Mamitis control biennial reviews*. National Institute Dairying Reading. UK.
- Dogan, B., Klaessig, S., Rishniw, M., Almeida, R.A., Oliver, S.P., Simpson, K., Schukken, Y.H. 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 116, 270-282.
- Döpfer, D., Barkema, H.W., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W. 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 80-85.

- Douglas, V.L., Fenwick, S.G., Pfeiffer, D.U., Williamson, N.B., Holmes, C.W. 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 75, 27-41.
- Duarte, R.S.1, Miranda, O.P., Bellei, B.C., Brito, M.A., Teixeira, L.M. 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4214-4222.
- Eberhart, R.J. 1987. Environmental effects of teat skin microflora. In *Proceedings National Mamitis Council*, 71-80.
- Eberhart, R.J., Gilmore, H.C., Hutchinson, L.J., Spencer, S.B. 1979. Somatic cell counts.
- Edmondson, P.W. 1989. An economic justification of 'blitz' therapy to eradicate *Streptococcus agalactiae* from a dairy herd. *Vet. Rec.* 125, 591-593.
- Erskine, R.J., Barlett, P.C., VanLente, J.L., Phipps, C.R. 2002. Efficacy of systematic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 2571-2575.
- Erskine, R.J., Eberhart, R.J. 1990. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control programme that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 1230-1235.
- Erskine, R.J., Eberhart, R.J., Hutchinson, L.J., Spencer, S.B. 1987. Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cells counts. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 190, 1411-1416.
- Everitt, B.S. 2005. *An R y S-PLUS companion to multivariate analysis*. Springer-Verlag, London.
- Fadda, M.E., Pisano, M.B., Scaccabarozzi, L., Mossa, V., Deplano, M., Moroni, P., Liciardi, M., Cosentino, S. 2013. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species isolated from bovine intramammary infection. *J. Dairy Sci.* 96, 1-6.
- Faull, W.B., Hughes, J.W. 1983. *Mamitis notes for the dairy practitioner*. Liverpool University Press. UK. 4^a Edition.
- Ferguson, J.D., Azzaro, G., Gambina, M., Licitra, G. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *J. Dairy Sci.* 90, 5798-5813.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J.; Kapur, V. 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119, 261-269.
- Forsman, P., Tilsala-Timisjarvi, A., Alatosava, T. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiol.* 143, 3491-3500.

Bibliografía

Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., Steiner, A., Graber, H.U. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res. Vet. Sci.* 85, 439-448.

Fox, L.K. 2009. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Vet. Microbiol.* 134, 82-88.

Fox, L.K., Kirk, J.H., Britten, A. 2005 *Mycoplasma mastitis*: a review of transmission and control. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 52, 153-160.

Fox, L.K., Gay, J.M. 1993. Contagious mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9, 475-487.

Fraley C., Raftery A., Scrucca L. 2012. Normal Mixture Modeling for Model-Based Clustering, Classification, y Density Estimation. <http://cran.r-project.org/web/packages/mclust/index.html>.

Garvie, E.I., Bramley, A.J. 1979. *Streptococcus uberis*: an Approach to its Classification. *J. Appl. Bacteriol.* 46, 295-304.

Giesecke, M. 1974. The diagnosis of subclinical mamitis in lactating cows. *J. South African Vet. Ass.* 45, 195-202.

Gillespie, B.E., Headrick, S.I., Boonyayatra, S., Oliver, S.P. 2009. Prevalence y persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet. Microbiol.* 134, 65-72.

González, R.N., Wilson, D.J. 2003. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19, 199-221.

Green, M.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E., Bradley, A.J. 2007. National intervention study of mastitis control in dairy herds in England and Wales. *Vet. Rec.* 160, 287-293.

Guélat-Brechbuehl, M., Thomann, A., Albini, S., Moret-Stalder, S., Reist, M., Bodmer, M., Michel, A., Niederberger, M.D., Kaufmann, T. 2012. Cross-sectional study of *Streptococcus* species in quarter milk samples of dairy cows in the canton of Bern, Switzerland. *Vet. Rec.* 167, 211-215.

Guinane, C.M., Sturdevant, D.E., Herron-Olson, L., Otto, M., Smyth, D.S., Villaruz, A.E., Kapur, V., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Fitzgerald, J.R. 2008. Pathogenomic analysis of the common bovine *Staphylococcus aureus* clone (ET3): emergence of a virulent subtype with potential risk to public health. *J. Infect. Dis.* 197, 205-213.

Harmon, R.J., Clark, T., Ramesh, T., Crist, W.L., Langlois, B.E., Akers, K., Smith, B. 1992. Environmental pathogen numbers in pastures and bedding of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75, 256.

Harmon, R.J., Langlois, B.E. 1986. Prevalence of minor pathogens and associated somatic cell counts. *Proceedings of 25th annual Meeting N.M.C. Arglington, V.A.* 11-23.

Haveri, M., Hovinen, M., Roslof, A., Pyörälä, S. 2008. Molecular types y genetic profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection y extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3728-3735.

- Herron-Olson, L., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Kapur, V. 2007. Molecular correlates of host specialisation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2: e1120.
- Hill, A.W. 1988. Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands. *Res. Vet. Sci.* 45, 400-404.
- Hill, A.W., Shears, A.L., Hibbit, K.G. 1979. The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in newly calved dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 26, 97-101.
- Hillerton, J.E., Leigh, J.A., Ward, P.N., Coffey, T.J. 2004. *Streptococcus agalactiae* infection in dairy cows. *Vet. Rec.* 154, 671-672.
- Hirvonen, J., Eklund, K., Teppo, A.M., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., Pyörälä, S. 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet. Scand.* 40, 35-46.
- Hoe, F.G., Ruegg, P.L. 2005. Relationship between antimicrobial reviewed susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 1461-1468.
- Hogan, J.S., Wolf, S.L., Petersson-Wolfe, C.S. 2007. Bacterial counts in organic materials used as free-stall bedding following treatment with a commercial conditioner. *J. Dairy Sci.* 90, 1058-1062.
- Hogan, J.S., Smith, K.L. 1997. Bacteria counts in sawdust bedding. *J. Dairy Sci.* 80, 1600-1605.
- Hogan, J.S., Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S. 1989. Serum susceptibility of coliforms isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 72, 1893-1899.
- Hogan, J.S., Smith, K.L. 1998. Presented at the National Mastitis Council 37th Annual Meeting, St. Louis, Missouri. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, 93.
- Hogan, J.S., Gonzalez, R.N., Harmon, R.J., Nickerson, S.C., Oliver, S.P., Pankey, J.W., Smith, K.L. 1999. Laboratory Hybook on Bovine Mastitis, National Mastitis Council, Inc., Madison, WI.
- Hogan, J.S., Pankey, J.W., Smith, K.L. 1987. *Staphylococcus* species other than *Staphylococcus aureus*. In: Proceedings of the National Mastitis Council 26th Ann Meeting, Orlando, Florida, 21-32.
- Hogan, J.S., Smith, K.L. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34, 507-519.
- Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H., Schoenberger, P.S., Todhunter, D.A., Hueston, W.D., Pritchard, D.E., Bowman, G.L., Heider, L.E., Brockett, B.L. 1989. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *J. Dairy Sci.* 72, 250-258.
- Honkanen-Buzalski, T., Bramley, A.J. 1984. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the mammary gland II. Experimental infection. *J. Dairy Res.* 51, 379-385.
- Honkanen-Buzalski, T., Griffin, T.K., Dodd, F.H. 1984. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland. I. Natural infection. *J. Dairy Res.* 51, 371-378.

Bibliografia

Hortet, P.I., Seegers, H. 1998. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. *Vet. Res.* 29, 497-510.

Huijps, K., Lam, T.J., Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.* 75, 113-120.

Hutton, C.H., Foc, L.K., Hancock, D.D. 1990. Mamitis milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 73, 1135-1143.

Hyndman, R.J. forecast: Forecasting functions for time series y linear models, <http://cran.r-project.org/web/packages/forecast/index.html>.

Hyvönen, P.I., Käyhkö, S., Taponen, S., von Wright, A., Pyörälä, S. 2009. Effect of bovine lactoferrin on the internalization of coagulase-negative staphylococci into bovine mammary epithelial cells under in-vitro conditions. *J. Dairy Res.* 76, 144-151.

I.D.F. 1987a. Bovine mamitis. Definition and guidelines for diagnosis. Bulletin of the international Dairy Federation n° 211.

I.D.F. 1987b. Enviromental influences on bovine mamitis. Bulletin of the International Dairy Federation n° 217.

ISO 13366-2/IDF 148-2. Milk- Enumeration of somatic cells- Parte 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counter.

Jagielski, T., Lassa, H., Ahrholdt, J., Malinowski, E., Roesler, U. 2011. Genotyping of bovine *Prototheca mastitis* isolates from Poly. *Vet. Microbiol.* 149, 283-287.

Jánosi, S., Baltay, Z. 2004. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica.* 52, 173-183.

Jarp, J. 1991. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 27, 151-158.

Jayarao, B.M., Gillespie, B.E., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., Oliver, S.P. 1999. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. *Zentralbl Veterinarmed [B].* 46, 433-442.

Jayarao, B.M., Schilling, E.E., Oliver, S.P. 1993. Genomic deoxyribonucleic acid restriction fragment length polymorphism of *Streptococcus uberis*: evidence of clonal diversity. *J. Dairy Sci.* 76, 468-474.

Jensen, N.E. 1982. Experimental bovine group-B streptococcal mastitis induced by strains of human and bovine origin. *Nord. Vet. Med.* 34, 441-450.

Jobson, J.D., 1999. *Applied Multivariate Data Analysis: Regression and Experimental Design*, vol. 1. Ed. Springer-Verlag.

Joo, Y.S., Fox, L.K., Davis, W.C., Bohach, G.A., Park, Y.H. 2001. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet. Microbiol.* 80, 131-138.

- Kalmus, P., Asmäe, B., Kärssin, A., Orro, T., Kask, K. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scandinavica*. 53, 1-7.
- Kamarudin, M.I., Fox, L.K., Gaskins, C.T., Gay, J.M. 1996. Environmental reservoirs for *Serratia marcescens* intramammary infections in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 555-558.
- Kapur, V., Sisco, W.M., Greer, R.S., Whittam, T.S., Musser, J.M. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J. Clin. Microbiol.* 33, 376-380
- Khan, I.U., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Lammler, C., Wolter, W., Zschock, M. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J. Vet. Sci.* 4, 213-224.
- Kloos, W.E., Faltyn, M., George, C.G., Driedger, D., Hemmingsen, S.M. 1997. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3116-3121.
- Koivula, M., Mantysaari, E. A., Pitkala, A., Pyörälä, S. 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric. Scand. A*, 57, 89-96.
- Kossaibati, M.A. 2000. The costs of clinical mastitis in UK dairy herds. *Cattle Practice*. 8, 323-328.
- Kossaibati, M.A., Esslemont, R.J. 1997. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.* 154, 41-51.
- Kristula, M.A., Dou, A.Z., Toth, J.D., Smith, B.I., Harvey, N., Sabo, M. 2008. Evaluation of free-stall mattress bedding treatments to reduce mastitis bacterial growth. *J. Dairy Sci.* 91, 1885-1892.
- Krukowski, H., Lisowski, A., Skórka, A. 2006. Yeast y algae isolated from cows with mastitis in the Southeastern part of Polony. *J. Vet. Sci.* 9, 181-184.
- Kruze, J., Bramley, A.J. 1982. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. II. Evidence of colonization of the bovine intestine by *Str. uberis*. *J. Dairy Res.* 49, 375-379.
- Lacy-Hulbert, J., Lopez-Benavides, M., Williamson, J., Summers, E., Pryor, S., Cursons, R. 2006. Ecology of *Streptococcus uberis* within a pasture-based dairying system. In NMC 45th Annual Meeting. Florida.
- Lam, T.J., Jansen, J., Van den Borne, B., Van Veersen, J. 2007. A structural approach of udder health improvement via private practitioners: ups and downs. NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, Texas, USA. 142-151.
- Lam, T.J., Lipman, L.J., Schukken, Y.H., Gaastra, W., Brand, A. 1996. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. *Am. J. Vet. Res.* 57, 39-42.

Bibliografia

- Lang, P., Lefébure, T., Wang, W., Zadoks, R.N., Schukken, Y., Stanhope, M.J. 2009. Gene content differences across strains of *Streptococcus uberis* identified using oligonucleotide microarray comparative genomic hybridization. *Infect. Genet.* 9, 1779-1788.
- Lannigan, R., Lawrence, L.E. 1989. Decreased susceptibility of *Serratia marcescens* to chlorhexidine related to the inner membrane. *J. Antimicrobiol. Chemother.* 15, 559-565.
- Larsen, H.D.1, Sloth, K.H., Elsberg, C., Enevoldsen, C., Pedersen, L.H., Eriksen, N.H., Aarestrup, F.M., Jensen, N.E. 2000. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Vet. Microbiol.* 71, 89-101.
- Leigh, J.A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?. *Vet. J.* 157, 225-238.
- Linde, C., Holmberg, O., Äström, G. 1989. The interference between coagulase-negative staphylococci and *Corynebacterium bovis* and the common udder pathogens in the lactating cow. *Nord. Veterinaarmed.* 32, 552-558.
- Lopez-Benavides, M.G., Williamson, J.H., Cursons, R.T. 2005. Associations between *Streptococcus uberis* populations on farm races and climatic changes during a twelve-month period. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 65, 153-156.
- Lopez-Benavides, M.G., Williamson, J.H., McGowan, J.E., Lacy-Hulbert, S.J., Jago, J.G., Davis, K.L., Woolford, M.W. 2006. Mastitis in cows milked in an automated or conventional milking system in New Zealand. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 66, 252-257.
- Lopez-Benavides, M.G., Williamson, J.H., Pullinger, G.D., Lacy-Hulbert, S.J., Cursons, R.T., Leigh, J.A. 2007. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *J. Dairy Sci.* 90, 5558-5566.
- Makovec, J.A., Ruegg, P.L. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 86, 3466-3472.
- Malinowski, E., Lassa, H., Klossowska, A., Markiewicz, H., Kaczmarowski, M., Smuski, S. 2006. Relationship between mastitis agents and somatic cell count in foremilk samples. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 50, 349-352.
- Manning, S., Tallman, P., Foxman, B. 2000. Prevalence and co-colonisation with group b streptococcus (GBS) among heterosexual college couples. *Ann. Epidemiol.* 10, 472.
- Marco, J.C.; Rodríguez, M., González, M., Ziluaga, I., Salazar, L.M., Palomino, A., Méndez, A., Díaz, A., Fernández, G. 1998. Mamitis bovina y calidad de la leche (I), Etiología de las mamitis bovinas en España. *Bovis n°85, Grupo Luzán 5, Madrid,* 13-31.
- Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., Thompson, G. 2010. Phenotypic characterization of mastitic *Prototheca* spp. isolates. *Res. Vet. Sci.* 89, 5-9.
- Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., Thompson, G. 2010. Short communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitic milk. *J. Dairy Sci.* 93, 5110-5113.

- Matos, J.S., White, G.G., Harmon, R.J., Langlois, B.E. 1991. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *J. Dairy Sci.* 74, 1544-1549.
- McDougall, S., Parkinson, T.J., Leyland, M., Annis, F.M., Fenwick, S.G. 2004. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. *J. Dairy Sci.* 87, 2062-2072.
- Middleton, J.R., Fox, L.K. 2002. Influence of *Staphylococcus aureus* strain on mammary quarter milk production. *Vet. Rec.* 150, 411-413.
- Middleton, J.R., Fox, L.K., Gay, J.M., Tyler, J.W., Besser, T.E. 2002. Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. *Epidemiol. Infect.* 129, 387-395.
- Milne, M.H., Biggs, A.M., Barrett, D.C., Young, F.J., Doherty, S., Innocent, G.T., Fitzpatrick, J.L. 2005. Treatment of persistent intramammary infections with *Streptococcus uberis* in dairy cows. *Vet. Rec.* 157, 245-250.
- Mørk, T., Kvitle, B., Jørgensen, H.J. 2012. Reservoirs of *Staphylococcus aureus* in meat sheep and dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 155, 81-87.
- Muellner, P., Zadoks, R.N., Perez, A.M., Spencer, S.E., Schukken, Y.H., French, N.P. 2011. The integration of molecular tools into veterinary and spatial epidemiology. *Spatial Spatio-temporal Epidemiol.* 2, 159-171.
- Munoz, M.A., Zadoks, R.N. 2007. Short communication: Patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1220-1224.
- Munoz, M.A., Ahlström, C., Rauch, B.J., Zadoks, R.N. 2006. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 3425-3430.
- Munoz, M.A., Welcome, F.L., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3964-3971.
- Munoz, M.A., Zadoks, R.N. 2007. Short communication: patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1220-1224.
- Munoz, M.A., Bennett, G.J., Ahlström, C., Griffiths, H.M., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. 2008. Cleanliness scores as indicator of *Klebsiella* exposure in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 3908-3916.
- Myllys, V. 1995. *Staphylococci* in heifer mastitis before and after parturition. *J. Dairy Res.* 62, 51-60.
- Myllys, V., Asplund, K., Brofeldt, E., Hirvelä-Koski, V., Honkanen-Buzalski, T., Junntila, J., Kulkas, L., Myllykangas, O., Niskanen, M., Saloniemi, H., Syholm, M., Saranpää, T. 1998. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995: changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.* 39, 119-126.

Bibliografía

- Nam, H.M.1, Kim, J.M., Lim, S.K., Jang, K.C., Jung, S.C. 2010. Infectious aetiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008. *Res. Vet. Sci.* 88, 372-374.
- Nam, H.M., Lim, S.K., Kang, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Jang, G.C., Kim, J.M., Joo, Y.S., Jung, S.C. 2009. Prevalence y antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 y 2008 in Korea. *J. Dairy Sci.* 92, 2030-2026.
- Neave, F.K., Dodd, F.H., Kingwill, R.G., Westgarth, D.R. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy Sci.* 52, 696-707.
- Nemeth, J., Muckle, C.A., Gyles, C.L. 1994. In vitro comparison of bovine mastitis y fecal *Escherichia coli* isolates. *Vet. Microbiol.* 40, 231-238.
- Nevala, M., Taponen, S., Pyörälä, S. 2004. Bacterial etiology of clinical mastitis – data from Saari Ambulatory Clinic in 2003-2004. (in Finnish) *Finnish Vet. J.* In print.
- Newman, L.E., Kowalski, J.J. 1973. Fresh sawdust bedding - a possible source of *Klebsiella* organisms. *Am. J. Vet. Res.* 34, 979-980.
- Nickerson, S.C., Owens, W.E., Boddie, R.L. 1995. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J. Dairy Sci.* 78, 1607-1618.
- NIRD. 1970. National Institute for Research in Dairying Annual Report 1969-1970, 65.
- NIRD. 1974. National Institute for Research in Dairying Annual Report 1973-1974, 56.
- Olde Riekerink, R.G., Barkema, H.W., Veenstra, S., Poole, D.E., Dingwell, R.T., Keefe, G.P. 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can. Vet. J.* 47, 567-572.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela, C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* 118, 133-140.
- Oliver, S. P. 1988. Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infections during the nonlactating period. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1789-1793.
- Oliver, S.P., Gillespie, B.E., Jayarao, B.M. 1998. Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 69-73.
- Oliver, S.P., Juneja, V.K. 1990. Growth of *Corynebacterium bovis* in mammary secretions during physiological transitions of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 7, 351-356.
- O'Shea, J. 1985. The role of machine milking in the spread of mastitis organisms and practical preventive steps. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* 37, 390-397.
- Østerås, O., Sølverød, L., Reksen, O. 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, y clustering. *J. Dairy Sci.* 89, 1010-1023.

- Osumi, T.I, Kishimoto, Y., Kano, R., Maruyama, H., Onozaki, M., Makimura, K., Ito, T., Matsubara, K., Hasegawa, A. 2008. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet. Microbiol.* 15. 131, 419-423.
- Packer, R.A. 1977. Bovine mastitis produced by *Corynebacteria*. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 170, 1164-1165.
- Pankey, J.W., Eberhart R.J., Cuming, A.L., Daggett, R.D., Farnsworth, R.J., McDuff, C.K. 1984. Update on postmilking teat antiseptics. *J. Dairy Sci.* 67, 1336-1353.
- Pankey, J.W., Pankey, P.B., Barker, R.M., Williamson, J.H., Woolford, M.W. 1996. The prevalence of mastitis in primiparous heifers in eleven Waikato dairy herds. *N. Z. Vet. J.* 44, 41-44.
- Pankey, J.W., Nickerson, S.C., Bodie, R.L., Hogan, J.S. 1985. Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mammitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 68, 2684-2693.
- Pantoja, J.C., Hullan, C., Ruegg, P.L. 2009. Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. *Prev. Vet. Med.* 90, 43-54.
- Park, J.Y., Fox, L.K., Seo, K.S., McGuire, M.A., Park Y.H., Rurangirwa, F.R., Sicho, W.M., Bohach, G.A. 2011. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol.* 147, 149-154.
- Parker, K.I., Compton, C., Anniss, F.M., Weir, A., Heuer, C., McDougall, S., 2007. Subclinical and clinical mastitis in heifers following the use of a teat sealant precalving. *J. Dairy Sci.* 90, 207-218.
- Paulin-Curlee, G.G., Singer, R.S., Sreevatsan S., Isaacson, R., Reneau, J., Foster, D., Bey, R. 2007. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 3681-3689.
- Peeler, E.J., Green, M.J., Fitzpatrick, J.L., Green, L.E. 2003. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 59, 169-180.
- Peeler, E.J., Green, M.J., Fitzpatrick, J.L., Morgan, K.L., Green, L.E. 2000. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. *J. Dairy Sci.* 83, 2464-2472.
- Perry, J., Middleton, J.R., Dufour, S., Scholl, D., Calloway, C., Anderson, S., Dohoo, I. 2010. Association of coagulase negative staphylococcal species in milk somatic cell count of cows from the Canadian national cohort of dairy farms. *NMC Annual Meeting Procedures*, Albuquerque, New Mexico, 204-205.
- Persson, Y., Nyman, A.K., Grönlund-Andersson, U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 53, 36.

Bibliografia

- Petersson-Wolfe, C.S., Adams, S., Wolf, S.L., Hogan, J.S. 2008. Genomic typing of enterococci isolated from bovine mammary glands and environmental sources. *J. Dairy Sci.* 91, 615-619.
- Petrovski, K.R.1, Williamson, N.B., Lopez-Villalobos, N., Parkinson, T.J., Tucker, I.G. 2011. Culture results from milk samples submitted to veterinary diagnostic laboratories from August 2003 to December 2006 in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 59, 317-322.
- Philpot, W. N. 1984. Economics of mastitis control. *Vet. Clin. North Am. -Large Animal Practice* 6, 233-245.
- Phuektes, P., Mansell, P.D., Dyson, R.S., Hooper, N.D., Dick, J.S., Browning, G.F. 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1460-1466.
- Pieper, L., Godkin, A., Roesler, U., Polleichtner, A., Slavic, D., Leslie, K.E., Kelton, D.F.2012. Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. *J. Dairy Sci.* 95, 5635-5644.
- Piepers, S., De Meulemeester, L., De Kruijff, A., Opsomer, G., Barkema, H.W., De Vliegheer, S. 2007. Prevalence y distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flyers, Belgium. *J. Dairy Res.* 74, 478-483.
- Piepers, S., Opsomer, G., Barkema, H.W., De Kruif, A., De Vliegheer, S. 2010. Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than non-infected heifers. *J. Dairy Sci.* 93, 2014-2024.
- Piessens, V., De Vliegheer, S., Verbist, B., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Van Coillie, E. 2012. Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *J. Dairy Sci.* 95, 7027-7038.
- Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supré, K., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., De Vliegheer, S. 2011. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk y environment of dairy cows differs between herds. *J. Dairy Sci.* 94, 2933-2944.
- Pillai, S.R., Kunze, E., Sordillo, L.M., Jayarao, B.M. 2001. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *J. Dairy Sci.* 84, 1413-1420.
- Pisoni, G., Locatelli, C., Alborali, L., Rosignoli, C., Allodi, S., Riccaboni, P., Griego, V., Moroni, P. 2008. Short Communication: Outbreak of *Nocardia neocaledoniensis* Mastitis in an Italian Dairy Herd. *J. Dairy Sci.* 91, 136-139.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87, 2433-2441.
- Poutrel, B., Rainard, P. 1982. Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens) from somatic cell concentration. *Am J. Vet. Res.* 43, 1296-1299.

- Poutrel, B. 1985, Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthodes de contrôle. *Rec. Méd. Vet.* 161, 497-511.
- Pryor, S.M., Cursons, R.T., Williamson, J.H., Lacy-Hulbert, S.J. 2009. Experimentally induced intrmammary infection with multiple strains of *Streptococcus uberis*. *J. Dairy Sci.* 92, 5467-5475.
- Pullinger, G.D., Coffey, T.J., Maiden, M.C., Leigh, J.A. 2007. Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of *Streptococcus uberis* are responsible for bovine intramammary infections of short y long duration. *Vet. Microbiol.* 119, 194-204.
- Pullinger, G.D., Lopez-Benavides, M., Coffey, T.J., Williamson, J.H., Cursons, R.T., Summers, E., Lacy-Hulbert, J., Maiden, M.C., Leigh, J.A. 2006. Application of *Streptococcus uberis* multilocus sequence typing: analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1429-1436.
- Pyörälä, S., Taponen, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 16, 1, 34, 3-8.
- Pyörälä, S. 2002. New strategies to prevent mastitis. *Reprod. Domest. Anim.* 37, 211-216. Review.
- Pyörälä, S. 1988. Clinical aspects on bovine mastitis and treatment during lactation. Ambulatory Clinic, College of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland.
- Pyörälä, S., Kaartinen, L., Käck, H., Rainio, V. 1994. Efficacy of two therapy regimes for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in the bovine. *J. Dairy Sci.* 77, 453-461.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. 2007. A textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses. *Veterinary Medicine: 10th Edition*, 674. Philadelphia PA, USA: Elsevier Ltd.
- Rainard, P., Poutrel, B. 1982. Dynamics of nonclinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens. *Am. J. Vet. Res.* 43, 2143-2146.
- Rajala-Schultz, P.J., Smith, K.L., Hogan, J.S., Love, B.C. 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102, 33-42.
- Rajala-Schultz, P.J., Torres, A.H., Degraives, F.J., Gebreyes, W.A., Patchanee, P. 2009. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Vet. Microbiol.* 134, 55-64.
- Razavi-Rohani, M., Bramley, A. J. 1981. A study of the frequency and distribution of *Streptococcus uberis* contamination on the body of lactating and non-lactating cows. *Indian Vet. J.* 58, 804-811.

Bibliografia

- Rendos, J.J., Eberhart, R.J., Kesler, E.M. 1975. Microbial populations of teat ends and bedding materials. *J. Dairy Sci.* 58, 1492-1500.
- Richard, J.L., McDonald, J.S., Fichtner, R.E., Anderson, A.J. 1980. Identification of Yeast from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1991-1994.
- Rivas, A.L., González, R.N., Wiedmann, M., Bruce, J.L., Cole, E.M., Bennett, G.J., Schulte, H.F.3rd., Wilson, D.J., Mohammed, H.O., Batt, C.A. 1997. Diversity of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* ribotypes recovered from New York dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 58, 482-487.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E. 1998. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *J. Dairy Sci.* 81, 687-693.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D. 1994a. Coagulase-positive *Staphylococcus* intramammary infections in primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77, 958-969.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M. 1994b. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77, 3354-3364.
- Roberson, J.R., Warninck, L.D., Moore, G. 2004. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin and frequent milk-out treatment versus no treatment. *J. Dairy Sci.* 87, 583-592.
- Robinson, T.C., Jackson, E.R., Marr, A. 1985. Factors involved in the epidemiology and control of *Streptococcus uberis* and coliform mastitis. *Br. Vet. J.* 141, 635-642.
- Rossitto, P.V.1, Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J.L., Cullor, J.S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J. Dairy Sci.* 85, 132-138.
- Ruegg, P.L. 2009. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *J. Anim. Sci.* 87, 43-55.
- Ruegg, L. 2009. The quest for the perfect test: phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 134, 15-19.
- Sampimon O, van den Borne BH, Santman-Berends I, Barkema H.W, Lam T. 2010. Effect of coagulase-negative staphylococci on somatic cell count in Dutch dairy herds. *J Dairy Res.* 77, 318-324.
- Sampimon, O.C., Barkema, H.W., Berends, I.M.G.A., Sol, J., Lam, T.J.G.M. 2009a. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 134, 37-44.
- Sampimon, O.C., Barkema, H.W., Berends, I.M.G.A., Sol, J., Lam, T.J.G.M. 2009b. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *J. Dairy Res.* 76, 129-136.

- Sampimon, O.C., Sol, J., Kock, P.A. 2006. Een uitbraak van *Klebsiella pneumoniae* mastitis. Tijdschr Diergeneeskd. 131, 2-4.
- Sampimon, O.C., Vernooij, J.C., Mevius, D.J. Sol, J. 2007. Gevoeligheid voor diverse antibiotica van coagulase negatieve staphylococcen, geïsoleerd uit melkmonsters van Nederlands rundvee. Tijdschr Diergeneeskd. 132, 200-204.
- Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. 1995. The bovine udder y mamitis. 1^a Ed. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. Finland.
- Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Oliver, S.P. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. Vet. Microbiol. 134, 73-81.
- Scaccabarozzi, L., Turchetti, B., Buzzini, P., Pisoni, G., Bertocchi, L., Arrigoni, N., Boettcher, P., Bronzo, V., Moroni, P. 2008. Short communication: isolation of *Prototheca* species strains from environmental sources in dairy herds. J. Dairy Sci. 91, 3474-3477.
- Scaccabarozzi, L., Locateli, C., Pisoni, G., Manarolla, G., Casula, A., Bronzo, V., Moroni, P. 2011. Short Communication: Epidemiology y genotyping of *Cyida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. J. Dairy Sci. 94, 4574-4577.
- Schepers, A.J., Lam, T.J., Schukken, Y.H., Wilmink, J.B., Hanekamp, W.J. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J. Dairy Sci. 80, 1833-1840.
- Schreiner, D.A., Ruegg, P.L. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. J. Dairy Sci. 86, 3460-3465.
- Schrick, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. J. Dairy Sci. 84, 1407-1412.
- Schukken, Y.H., Bennett, G.J., Zurakowski, M.J., Sharkey, H.L., Rauch, B.J., Thomas, M.J., Ceglowski, B., Saltman, R.L., Belomestnykh, N., Zadoks, R.N. 2011. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. J. Dairy Sci. 94, 6203-6215.
- Schukken, Y.H., Gonzalez, R.N., Tikofsky, L.L., Schulte, H.F., Santisteban, C.G., Welcome, F.L., Bennett, G.J., Zurakowski, M.J., Zadoks, R.N. 2009. CNS mastitis: nothing to worry about?. Vet. Microbiol. 134, 9-14.
- Schukken, Y.H., Grommers, F.J., Van de Geer, D., Erb, H.N., Brand, A. 1990. Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. 1. Data and risk factors for all cases. J. Dairy Sci. 73, 3463-3471.
- Schultze, W.D. 1985. Control of new intramammary infections at calving by prepartum teat dipping. J. Dairy Sci. 68, 2094-2099.
- Schwarz, D.I., Diesterbeck, U.S., Failing, K., König, S., Brügemann, K., Zschöck, M., Wolter, W., Czerny, C.P. 2010. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany--a longitudinal study. J. Dairy Sci. 93, 5716-5728.

Bibliografia

- Sears, P.M., Smith, B.S., English, P.B., Herer, P.S., Gonzales, R.N. 1990. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 73, 2785-2789.
- Shearer, J.K., Townsen, D.J.R., Gibbs, E.P.J. 2004. Skin infections of the bovine teat and udder and their differential diagnosis. In *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. 2nd edn. Eds A. H. Andrews, R. W. Blowey, H. Boyd, R. G. Eddy. Blackwell Science. 363-372.
- Shoock, G.E. 1982. A linear scale for scoring somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 65, Supl. 1, 108.
- Shumway, R.H., Stoffer, D.S. 2006. *Time Series Analysis y Its Applications. With R Examples*. Springer, New York.
- Silva, K.E., Quinn, A.K., Morel, P.C.H., Holmes, C.W., Thatcher, A., Shadbolt, N.M., Kelly, T. 2005. A study of mastitis in two small experimental dairy herds managed either organically or conventionally, during one year. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 65, 148-152.
- Smith, K.L., Hogan, J.S. 1993. Environmental mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 9, 489-498.
- Smith, K.L., Hogan, J.S. 1995. Epidemiology of mamitis. *Proceedings of The 3rd International Mamitis Seminar, Tel Aviv, Israel*, 3-12.
- Smith, K.L., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68, 1531-1553.
- Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A., Failing, K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol.* 96, 91-102.
- Sordillo, L.M., Oliver, S.P., Doane, R.M., Shull, E.P., Maki, J.L. 1989. Duration of experimental *Corynebacterium bovis* colonization of bovine mammary gland during the lactating, nonlactating, and peripartum periods. *Am. J. Vet. Res.* 50, 267-270.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., De Rosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80, 1851-1865.
- St Rose, S.G.1, Swinkels, J.M., Kremer, W.D., Kruitwagen, C.L., Zadoks, R.N. 2003. Effect of penethamate hydriodide treatment on bacteriological cure, somatic cell count and milk production of cows and quarters with chronic subclinical *Streptococcus uberis* or *Streptococcus dysgalactiae* infection. *J. Dairy Res.* 70, 387-394.
- Sukhnanand, S., Dogan, B., Ayodele, M.O., Zadoks, R.N., Craver, M.P.J., Dumas, N.B., Schukken, Y.H., Boor, K.J., Wiedmann, M. 2005. Molecular Subtyping and Characterization of Bovine and Human *Streptococcus agalactiae* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1177-1186.
- Supré, K., Haesebrouk, F., Zadoks, R.N., Vanechoutte, M., Piepers, S., De Vliegher, S. 2011. Some CNS species are affecting udder health more than others. *J. Dairy Sci.* 94, 2329-2340.
- Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E.N., Schukken, Y.H. 2000a. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet. Res.* 31, 397-412.

- Suriyasathaporn, W., Schukken, Y.H., Nielen, M., Brand, A. 2000b. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J. Dairy Sci.* 83, 1248-1255.
- Tamilselvam, B.1, Almeida, R.A., Dunlap, J.R., Oliver, S.P. 2006. *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microb. Pathog.* 40, 279-285.
- Taponen, S., Björkroth, J., Pyörälä, S. 2008. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites y intramammary infections in a single dairy herd. *J. Dairy Res.* 75, 422-429.
- Taponen, S., Pyörälä, E., 2007. How important is coagulase-negative staph as a cause of mastitis? In: Proceedings of the 46th Annual Meeting of the National Mastitis Council, San Antonio, TX, USA. 81-91.
- Taponen, S., Pyörälä, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-no so different from *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.* 134, 29-36.
- Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H.D., Pyörälä, S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 115, 199-207.
- Tarabla, H.D., Zurbriggen, M.D., Canavesio, V.R., Vitulich, C.A., Calvino, L.F. 1993. *Nocardia asteroides* mastitis in a small Argentinian herd. *Vet. Rec.* 132, 303.
- Ten Napel, J.1, de Haas, Y., de Jong, G., Lam, T.J., Ouweltjes, W., Windig, J.J. 2009. Characterization of distributions of somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 92, 1253-1264.
- Tenhagen, B.A., Koster, G., Wallmann, J., Heuwieser, W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens y their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Bryenburg, Germany. *J. Dairy Sci.* 89, 2542-2551.
- Tenhagen, B.A., Scheibe, N.N., Zucker, B.A., Köster, G., Heuwieser, W. 2007. *Staphylococcus aureus* strains in primiparous and multiparous cows in six herds with a high prevalence of *Staph. aureus* intramammary infections. *J. Dairy Res.* 74, 406-411.
- Thorberg, B.M., Danielsson-Tham, M.L., Emanuelson, U., Waller, K.P. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.* 92, 4962-4970.
- Thorberg, B.M., Kuhn, I., Aarestrup, F.M., Brystrom, B., Jonsson, P., Danielsson-Tharn, M.L. 2006. Pheno- y genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk y human skin. *Vet. Microbiol.* 115, 163-172.
- Timms, L.L.1, Schultz, L.H. 1987. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 70, 2648-2657.
- Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S. 1995. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 78, 2366-2374.
- Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S., 1991a. *Serratia* species isolated from intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 74, 1860-1865.

Bibliografia

- Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S., Schoenberger P.S. 1991b. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52, 184-188.
- Tolboom, R.K., Snoep, J.J., Sampimon, O.C., Sol, J., Lam, T.J.G.M. 2008. *Mycoplasma mastitis bij het rund*. *Tijdschr Diergeneeskd.* 133, 96-101.
- Trinidad, P., Nickerson, S.C., Alley, T.K. 1990. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73, 107-114.
- Van Damme, D.M., 1982. Mastitis caused by contaminated teat dip and dipping cup. *Vet. Med. Sm. Anim. Clin.* 77, 541-544.
- Van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E. de Neeling, A., vande Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., Kluytmans, J. 2007. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1834-1839.
- Vecht, U.I, Wisselink, H.J., Vette, H.M. 1989. Sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from quarter milk from cattle. *Tijdschr Diergeneeskd.* 1, 114, 260-269.
- Vecht, U., Meijers, K.C. Wisselink, H.J. 1987. *Klebsiella pneumoniae* mastitis als bedrijfsprobleem. *Tijdschr Diergeneeskd.* 112, 653-659.
- Vilar-Fernández, J.M., González-Manteiga, W. 2004. Nonparametric comparison of curves with dependent errors, *Statistics: A Journal of Theoretical y Applied Statistics.* 38, 81-99.
- Waage, S., Mork, T., Roros, A., Aasland, D., Hunshamar, A., Odegaard, S.A. 1999. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 82, 712-719.
- Waage, S., Odegaard, S. A., Lund, A., Brattgjerd, S., Rothe, T. 2001. Case-control study of risk factors for clinical mastitis in postpartum dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 84, 392-399.
- Waage, S., Skei, H.R., Rise, J., Rogdo, T., Sviland, S., Ødegaard, S.A. 2000. Outcome of clinical mastitis in dairy heifers assessed by reexamination of cases one month after treatment. *J. Dairy Sci.* 83, 70-76.
- Waller, P.K., Aspán, A., Nyman, A., Persson, Y., Anderson, U.G. 2011. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 152, 112-116.
- Wang, S.M., Deighton, M.A., Capstick, J.A., Gerraty, N. 1999. Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol. Infect.* 123, 317-24.
- Ward, P.N., Holden, M.T., Leigh, J.A., Lennard, N., Bignell, A., Barron, A., Clark, L., Quail, M.A., Woodward, J., Barrell, B.G., Egan, S.A., Field, T.R., Maskell, D., Kehoe, M., Dowson, C.G., Chanter, N., Whatmore, A.M., Bentley, S.D., Parkhill, J. 2009. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics.* 28, 10-54.
- Ward, W.R., Hughes, J.W., Faull, W.B., Cripps, P.J., Sutherland, J.P., Sutherst, J.E., 2002. Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Vet. Rec.* 151, 199-206.

- Watts, J. L. 1988b. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16, 41-66.
- Watts, J.L. 1988a. Characterization and identification of Streptococci isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 71, 1616-1624.
- Wenz, J.R., Barrington G.M., Garry, F.B., Ellis, R.P., Magnuson, R.J. 2006. Escherichia coli Isolates' Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. *J. Dairy Sci.* 89, 3408-3412.
- Wenz, J.R., Barrington, G.M., Dinsmore, R.P. 1999. Differentiation of bacteremic and nonbacteremic cows with acute coliform mastitis. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 279-284.
- Wenz, J.R., Barrington, G.M., Garry, F.B., McSweeney, K.D., Dinsmore, R.P., Goodell, G., Callan, R.J. 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219, 976-981.
- Whist, A.C., Osterås, O., Sølverød, L. 2007. Staphylococcus aureus and Streptococcus dysgalactiae in Norwegian herds after introduction of selective dry cow therapy and teat dipping. *J. Dairy Res.* 74, 1-8.
- White, D.G., Harmon, R.J., Matos, J.E.S., Langlois, B.E. 1989. Isolation and identification of coagulase-negative Staphylococcus species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. *J. Dairy Sci.* 72, 1886-1892.
- Wieliczko, R.J., Williamson, J.H., Cursons, R.T., Lacy-Hulbert, S.J., Woolford, M.W. 2002. Molecular typing of Streptococcus uberis strains isolated from cases of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 85, 2149-2154.
- Williams, A.M., Collins, M.D. 1990. Molecular taxonomic studies on Streptococcus uberis types I and II. Description of Streptococcus parauberis sp. nov. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 485-490.
- Williamson, J.H., Woolford, M.W., Day, T.M., 1995. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against Streptococcus uberis. *N. Z. Vet. J.* 43, 228-234.
- Wilson, D.J.1, Gonzalez, R.N., Case, K.L., Garrison, L.L., Gröhn, Y.T. 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 82, 1664-1670.
- Wilson, D.J.1, Gonzalez, R.N., Das, H.H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80, 2592-2598.
- Wuertz, D., Chalabi, Y. 2012. Time Series: Rmetrics - Financial Time Series Objects, <http://cran.r-project.org/web/packages/timeSeries/index.html>.
- Wyder, A.B., Boss, R., Naskova, J., Kaufmann, T., Steiner, A., Graber, H.U. 2011. Streptococcus spp. and related bacteria: Their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis - A molecular approach. *Res. Vet. Sci.* 91, 349-357.

Bibliografia

- Yamagata, M.I., Goodger, W.J., Weaver, L., Franti, C. 1987. The economic benefit of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Dec. 15, 191, 1556-1561.
- Yildirim, A.O., Lämmle, Ch., Weiss, R. 2002. Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses. *Vet. Microbiol.* 26, 85, 31-35.
- Zadoks, R., van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampimon, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., van Belkum, A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1931-1939.
- Zadoks, R.N., Allore, H.G., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Gröhn, Y.T., Schukken, Y.H. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J. Dairy Sci.* 84, 590-599.
- Zadoks, R.N., Allore, H.G., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Wellenberg, G.J., Gröhn, Y.T., Schukken, Y.H. 2001. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 84, 2649-2663.
- Zadoks, R.N., Allore, H.G., Hagenaars, T.J., Barkema, H.W., Schukken, Y.H. 2002. A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 129, 397-416.
- Zadoks, R.N., van Leeuwen, W.B., Kreft, D., Fox, L.K., Barkema, H.W., Schukken, Y.H., van Belkum, A. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3894-3902.
- Zadoks, R.N., Gillespie, B.E., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Oliver, S.P., Schukken, Y.H. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol. Infect.* 130, 335-349.
- Zadoks, R.N., Allore, H.G., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Wellenberg, G.J., Gröhn, Y.T., Schukken, Y.H. 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4214-4222.
- Zadoks, R.N., González, R.N., Boor, K.J., Schukken, Y.H. 2004. Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. *J. Food Prot.* 67, 2644-2650.
- Zadoks, R.N., Schukken, Y.H. 2006. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22, 229-261.
- Zadoks, R.N. 2007. Sources and epidemiology of *Streptococcus uberis*, with special emphasis on mastitis in dairy cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2, No. 30.
- Zadoks, R., Fitzpatrick, J. 2009. Changing trends in mastitis. *Ir. Vet. J.* 1; 62 Suppl. 4, S59-S70.

Zadoks, R.N., Watts, J.L. 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet. Microbiol.* 16, 13, 20-28.

Zadoks, R.N., Tikofsky, L.L., Boor, K.J. 2005. Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a Dairy's Environment, Bovine Feces and Milk. *Vet. Microbiol.* 109, 257-265.

Zadoks, R.N., Griffiths, H.M., Munoz, M.A., Ahlstrom, C., Bennett, G.J., Thomas, E., Schukken, Y.H. 2011. Sources of *Klebsiella* y *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J. Dairy Sci.* 94, 1045-1051.

Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougall, S., Katholm, J., Schukken, Y.H. 2011b. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle y comparative relevance to humans. *J. Mammary Gly. Biol. Neoplasia* 16, 357-372.

Zeger, S.L., Irizarry, R., Peng, R.D. 2006. On time series analysis of public health y biomedical data. *Annu. Rev. Public Health* 27, 57-79.



