UNIVERSIDAD DE LEÓN
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

# Estudio de los caracteres epidemiológicos de *Streptococcus uberis* en explotaciones de vacuno lechero en Cantabria aplicando técnicas de tipificación molecular

Directores: Dr. D.ª Ana M. Villar Bonet
Dr. D. Jesús A. Santos Buelga

**Doctoranda: D.ª Lucía Lavín Alconero**

LEÓN, 2013

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas Dña. Lucía Lavín Alconero para optar al título de Doctora por la Universidad de León.

La autora de esta memoria disfrutó de una beca predoctoral del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), adscrita al Centro de Investigación y Formación Agrarias (CIFA) de Cantabria.

El proyecto ha sido financiado por la Consejería de Ganadería, Pesca y Desarrollo Rural del Gobierno de Cantabria, y se ha desarrollado en el CIFA y en el Área de Nutrición y Bromatología —Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos— de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León.

*Si veo desde lejos es porque voy a hombros de "gigantes".*

Dedicado a mis padres, mis "gigantes".

Con estas líneas me gustaría expresar mi más sentido agradecimiento a todas aquellas personas que, durante estos cuatro años, me han ayudado y han contribuido a mi enriquecimiento académico y personal.

A mi directora de tesis, Dña. Ana Villar Bonet, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. A mi co-director de tesis, D. Jesús Santos Buelga, por haberme acogido en su maravilloso grupo de investigación y haberme hecho sentir como un miembro más del equipo, por haberme ayudado en todo momento del desarrollo de la tesis y por transmitirme su vocación investigadora.

Al personal del laboratorio del Servicio de Sanidad y Control de la Consejería de Ganadería, Pesca y Desarrollo Rural de la Comunidad de Cantabria, por su colaboración durante la realización de los análisis de las muestras del estudio y, en especial, a Dña. Gloria Gradillas y Dña. Hortensia Martínez, por toda su inestimable aportación dado su conocimiento sobre las leches mamíticas.

Al personal del Laboratorio Interprofesional Lechero de Cantabria, por haber recepcionado las muestras de leche cada semana, en especial a Juanjo, por esa simpatía natural.

A mis compañeros del CIFA y del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, que de una u otra manera me han apoyado en todo momento a lo largo de estos cuatro años, muchos de cuales os habéis convertido en amigos y amigas de verdad. Gracias por estar a mi lado en los malos y en los buenos momentos, por todos esos eventos que consiguieron subir el ánimo en los momentos difíciles, y por los divertidos instantes en el rincón de la salud unidos a sesiones de tarde

en el centro. A Susi, Rosa, Ester, Atha, Marcos, Rommel, Pablo, Mari-José, Elo, Raquel, Juan, Paula, Beas…

Y, cómo no, a los jefes que he tenido en el centro durante este tiempo: Benito y Marisa, a los que estoy muy agradecida. Gracias Marisa por transmitirme esa energía y entenderme siempre. Y gracias Benito por todo tu apoyo.

A todos los ganaderos que han colaborado durante los años de muestreo, por su paciencia y por enseñarme el maravilloso mundo bovino, junto con los veterinarios de Vet-control, Andrés y Alberto, por su simpatía y por no perder nunca el sentido del humor.

A Ynte Schukken y Paolo Mooroni, por haberme dado la oportunidad de disfrutar y vivir el sueño americano, que me hizo madurar como persona y me enriqueció en el plano profesional.

A Pedro Muñoz Cacho, por sus aportaciones estadísticas y su paciencia.

A mis amigos y amigas que han estado todo este tiempo aguantándome con la mejor de sus sonrisas.

A Raúl, por su cariñoso apoyo durante estos últimos meses y por compartir su vida conmigo.

A mi familia abuelos, tíos y mi prima Bárbara.

Por último, a las personas a las que va dirigida esta tesis mis padres, gracias por todo vuestro apoyo, por vuestras frases diarias llenas de vitalidad y comprensión y, sobre todo, porque la mejor herencia que puedes dejar a tus hijos es la cultura, así que, ¡va por vosotros!

# ÍNDICE

**1. INTRODUCCIÓN . . . . . 1**

1.1. MAMITIS INFECCIOSAS Y SU MANEJO DURANTE EL SECADO . . . . . 3

1.1.1. TIPOS DE MAMITIS INFECCIOSAS . . . . . 4

1.1.2. ETIOLOGÍA DE LAS MAMITIS INFECCIOSAS . . . . . 5

1.1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOGENIA DE LAS MAMITIS INFECCIOSAS. . . . . 7

1.1.4. DIAGNÓSTICO DE LAS MAMITIS INFECCIOSAS. . . . . 10

1.1.5. ANTIMICROBIANOS EMPLEADOS EN VACUNO LECHERO . . . . . 13

1.1.6. EL SECADO: PERIODO CRÍTICO PARA LAS INFECCIONES MAMARIAS . . . . . 16

1.1.7. SUSCEPTIBILIDAD DE LA UBRE A LA MAMITIS DURANTE EL SECADO . . . . . 18

1.1.8. REPERCUSIÓN DE LAS INFECCIONES MAMARIAS PRODUCIDAS DURANTE EL SECADO EN LA SIGUIENTE LACTACIÓN . . . . . 19

1.1.9. PREVALENCIA DE PATÓGENOS AMBIENTALES DURANTE EL SECADO . . . . . 19

1.1.10. CURACIÓN DURANTE EL SECADO . . . . . 20

1.2. IMPORTANCIA DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* Y SUS MÉTODOS DE ESTUDIO . . 22

1.2.1. INTERÉS ACTUAL DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* EN ESPAÑA . . . . . 23

1.2.2. TIPO DE TRANSMISIÓN DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* . . . . . 25

1.2.3. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA. . . . . 25

1.2.4. Tipificación molecular de *Streptococcus uberis* . . . . . 27

1.2.5. Factores de virulencia de *Streptococcus uberis* . . . . . 29

1.2.6. Métodos de estudio: La tipificación molecular aplicada a los estudios epidemiológicos . . . . . 32

1.2.7. Avances recientes en la investigación de la mamitis . . . . . 33

1.2.8. Terminología molecular . . . . . 34

1.2.9. Métodos moleculares . . . . . 34

**2. JUSTIFICACIÓN . . . . . 39**

**3. OBJETIVOS . . . . . 45**

**4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* PROCEDENTE DE PROCESOS INFECCIOSOS MAMARIOS DURANTE EL SECADO Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES EN EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO LECHERO EN CANTABRIA . . . . . 49**

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . . 52

4.1.1. Características de las explotaciones en estudio . . . . . 52

4.1.1.1. Manejo general en las explotaciones en estudio . . . . . 52

4.1.1.2. Protocolo de seguimiento de las infecciones . . . . . 55

4.1.1.3. Protocolo de toma de muestras medioambientales . . . . . 56

4.1.2. Análisis de las muestras de leche . . . . . 59

4.1.2.1. Análisis microbiológico . . . . . 59

4.1.2.2. Análisis del recuento de células somáticas (RCS) . . . . . 61

4.1.3. Análisis de las muestras medioambientales . . . . . 61

4.1.4. Caracterización de las cepas de *Streptococcus uberis* aisladas de muestras de leche y muestras medioambientales . . . . . 62

4.1.4.1. Identificación bioquímica de los aislamientos sospechosos para *Strep.uberis* . . . . . 63

4.1.4.2. Caracterización por PCR de los aislamientos sospechosos para *Strep.uberis* . . . . . 65

4.1.4.3. Comparación de los 3 métodos de identificación de *Streptococcus uberis* . . . . . 66

4.1.5. DEFINICIONES ASOCIADAS A LA DINÁMICA DE INFECCIONES MAMARIAS PRODUCIDAS POR *STREPTOCOCCUS UBERIS* . . . . . 66

4.1.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS . . . . . 67

4.2. RESULTADOS . . . . . 67

4.2.1. MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS . . . . . 67

4.2.2. PATÓGENOS MAMARIOS AISLADOS DE MUESTRAS DE LECHE . . . . . 70

4.2.3. COMPARACIÓN DE LOS 3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* 72

4.2.4. ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LAS INFECCIONES MAMARIAS POR *STREP.UBERIS* DURANTE EL SECADO APLICANDO TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO A NIVEL DE ESPECIE . 79

4.2.5. *STREP.UBERIS* AISLADOS DE LAS MUESTRAS AMBIENTALES TOMADAS . . . . . 81

4.3. DISCUSIÓN . . . . . 87

**5. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* EN EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO EN CANTABRIA . . . . . 99**

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . . 102

5.1.1. TIPIFICACIÓN MOLECULAR . . . . . 102

5.1.1.1. PFGE . . . . . 102

5.1.1.2. $GTG_5$-PCR . . . . . 104

5.1.2. TEST DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA . . . . . 105

5.1.3. DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN LA CEPAS DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* . . 107

5.1.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS . . . . . 108

5.2. RESULTADOS . . . . . 109

5.2.1. Dinámica de las infecciones mamarias durante el secado, aplicando técnicas de tipificación: PFGE y $GTG_5$-PCR . . . . . 110

5.2.2. Análisis de los datos epidemiológicos . . . . . 115

5.2.3. Test de susceptibilidad antibiótica . . . . . 120

5.2.4. Detección de genes de virulencia en las cepas de *Streptococcus uberis*. . 129

5.3. DISCUSIÓN . . . . . 133

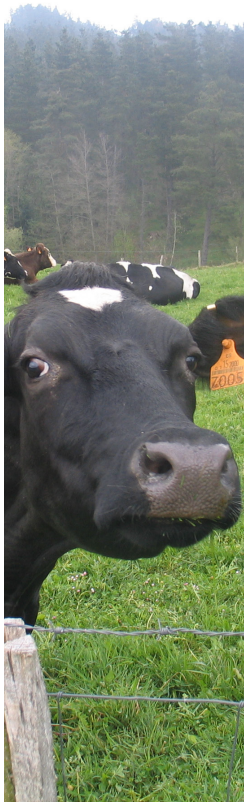
**6. CONCLUSIONES . . . . . 143**

**7. BIBLIOGRAFÍA . . . . . 147**

**8. ANEXOS . . . . . 163**

# 1

# INTRODUCCIÓN



## 1.1. MAMITIS INFECCIOSAS Y SU MANEJO DURANTE EL SECADO.

### Consideraciones previas

Según la Federación Internacional de Lechería en 1973 (FIL, 1973), la mamitis se puede definir como una inflamación de la glándula mamaria que, además de modificaciones físicas, químicas y microbiológicas, se caracteriza por un aumento de células somáticas y, particularmente, de los leucocitos presentes en la leche así como modificaciones patológicas en el tejido mamario. Aunque existen, en otros casos menos numerosos, mamitis debidas a cambios en la alimentación, mamitis irritativas producidas por agentes químicos y mamitis debidas a traumatismos o lesiones en la ubre, la principal mamitis es de naturaleza infecciosa. El nexo común son los mecanismos de defensa que la glándula mamaria emplea para protegerse de cualquier agresión. En primer lugar, sucede una respuesta inmune innata e inespecífica mediada por las barreras físicas del canal del pezón, macrófagos, neutrófilos, células NK (natural killer) y factores solubles, seguida de una segunda respuesta específica y adquirida, que facilita una selectiva eliminación del agente agresor, mediada por anticuerpos, macrófagos y linfocitos (Sordillo et al., 1997).

Es importante destacar las repercusiones que conlleva la comercialización de la leche "mamítica" y el impacto producido en las explotaciones de ganado vacuno lechero, pues afecta no sólo a la producción, composición y calidad de la leche, sino que también da lugar a elevados costes indirectos debido al empleo de antibióticos para el tratamiento de las mamitis, reposición de animales enfermos, etc.

Los criterios de evaluación de la calidad higiénica de la leche cruda están basados en el análisis e identificación de patógenos, células somáticas, toxinas, biocidas, residuos químicos, etc. No obstante, las condiciones más importantes a la hora de valorar una leche como higiénica, es la sanidad de la glándula mamaria. Algunas de las herramientas utilizadas para diagnosticar el estado sanitario de la mama, es el recuento de células somáticas (RCS) como método indirecto, el cual está incluido en los programas de control de mamitis.

El Reglamento (CE) n.° 853/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, establece las normas sanitarias específicas, destinadas a los operadores de empresa alimentaria, en materia de higiene de los alimentos de origen animal, las cuales son aplicables a la producción y comercialización de la leche cruda, leche de consumo tratada térmicamente y leche destinada a la elaboración de productos lácteos para el consumo humano. Se contemplan disposiciones relativas a la producción de leche cruda en diferentes aspectos, como la sanidad animal, higiene de la explotación, higiene del ordeño, de los locales, utillaje del personal y de la producción. Igualmente, las normas deben respetarse en el momento de la recogida de la leche cruda de vaca en la explotación o en el momento de su recepción en el establecimiento de tratamiento o transformación, fijando el umbral aceptable en 400000 células/ml para la recogida de la leche en el tanque.

En otros países distintos a los de la Unión Europea (UE), como Estados Unidos, el límite se encuentra en 750000 cs/ml en tanque, o en Canadá, que el límite se encuentra en 500000 cs/ml (Sargeant et al., 1998a, Schukken et al., 2003). Pero estos valores se han disminuido a 400000 cs/ml desde enero de 2001, según USDA (United States Department of Agriculture), para permitir la exportación a países de la UE.

### 1.1.1. Tipos de mamitis infecciosas.

La Federación Internacional de Lechería (FIL, 1967), en función de la identificación de microorganismos en la leche (análisis bacteriológico), de la intensidad de respuesta inflamatoria (RCS) y de la presencia o no de signos clínicos, estableció una serie de definiciones para los distintos tipos de mamitis presentes en el ganado vacuno:

La glándula mamaria sana es aquella libre de microorganismos, sin incremento de células somáticas y sin signos de inflamación. **Infecciones latentes,** son aquellas en las que se aíslan microorganismos, pero estos no producen reacción inflamatoria; **mamitis subclínica**, definidas como aquellas en las que no hay signos externos de inflamación, pero se detecta la presencia de microorganismos mediante cultivos bacterianos, así como un incremento de leucocitos en la leche y, **mamitis clínicas,** aquellas en las que además se presentan síntomas clínicos y el aspecto de la secreción láctea esta más o menos alterado. Además, dentro de las mamitis clínicas pueden diferenciarse varios tipos:

- Mamitis agudas, aquellas que se caracterizan por la presencia de una fuerte inflamación de la ubre asociada con dolor, que puede llegar a producir cojera y, en algunos casos, fiebre.
- Mamitis sobreagudas o hiperagudas, en las que el estado general del animal se encuentra alterado por toxemia o septicemia, y el animal puede llegar a morir en pocas horas.
- Mamitis crónicas, en las que no existen signos sistémicos y son pocos los signos externos de cambios en la ubre, si bien aparecen secreciones anormales en la ubre de manera intermitente y también presenta recuentos celulares elevados. Este tipo de mamitis suele ser resultado de mastitis clínicas o subclínicas que no han sido detectadas y, por tanto, no tratadas, y que, posteriormente, dan lugar a la aparición de procesos de fibrosis y abscesos en el parénquima mamario.

### 1.1.2. Etiología de las mamitis infecciosas.

Las mamitis infecciosas son procesos complejos que tienen como agentes causantes, numerosas especies de gérmenes y en las que son muchos los factores que intervienen. Esto ha llevado a muchos autores a abordar la mamitis no sólo como la infección causada por un único germen, sino como la interacción entre el patógeno y el manejo realizado. En la mamitis se han encontrado numerosos microorganismos: bacterias, hongos, levaduras, algas etc. Dentro de este amplio y complejo problema, no cabe duda que las bacterias son los agentes causantes de la mayoría de los casos (90 %).

Los microorganismos causantes de mamitis han sido divididos clásicamente en microorganismos contagiosos, ambientales (Jain, 1979, Smith, 1983, Bramley & Dodd, 1984, Bramley, 1996, Riffon et al., 2001) y oportunistas de acuerdo con las siguientes definiciones:

- Patógenos contagiosos: su principal reservorio es la glándula mamaria, de modo que el contagio se produce fundamentalmente a través del ordeño, entre mamas del mismo animal o entre distintos animales a través del ordeñador o de la máquina de ordeño, constituyendo este último, el mayor riesgo de diseminación, lo que se denomina transmisión horizontal, es decir, transmisión de vaca a vaca. Las bacterias más comunes que forman este grupo son: *Staphylococcus aureus* —aunque su principal reservorio sea el epitelio del canal del pezón y la piel de la ubre, puede sobrevivir en otros lugares de la vaca—, *Streptococcus agalactiae* —que habita en los conductos y cisternas de la glándula mamaria— y, en menor medida, *Corynebacterium bovis* y *Mycoplasma* spp.
- Patógenos ambientales: a diferencia de los patógenos contagiosos, el principal reservorio de los ambientales son las zonas extramamarias de las vacas, es decir, el entorno en el que viven los animales, como la cama, estiércol, suelo, agua etc. El contagio se produce cuando un animal entra en contacto con el patógeno presente en alguno de los reservorios, por lo que, es un tipo de transmisión a partir de reservorios ambientales. Los patógenos más importantes incluidos en este grupo son: —*Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium*—, *Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae*, coliformes —*Escherichia coli, Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. y *Enterobacter* spp.—, y otros *Gram negativos como Proteus* spp.
- Patógenos oportunistas: estos patógenos invaden la glándula mamaria cuando los mecanismos de defensa del hospedador están disminuidos o cuando se introducen inadvertidamente en la glándula mamaria al realizar un tratamiento antibiótico. En este grupo de microorganismos oportunistas se incluyen: *Pseudomonas* spp., levaduras, *Prototheca* spp., *Serratia* spp.

Los agentes causantes de mamitis también se clasifican en: patógenos principales y patógenos secundarios (tabla 1), con base a la prevalencia y la gravedad de la infección que suelen producir en la glándula mamaria (Bramley, 1996).

Los patógenos principales son los agentes responsables en la mayoría de las veces de mastitis clínicas o de fuertes respuestas inflamatorias (recuentos elevados de células somáticas en la leche) y comprenden a *Staphylococcus aureus, Streptococcus* (*uberis, agalactiae, dysgalactiae*) y coliformes *(Escherichia coli).*

Los patógenos secundarios son los agentes que infectan la glándula mamaria, causando recuentos moderados de células somáticas, pero, en general, no causan signos clínicos. Se incluyen en este grupo algunas especies de *Staphylococcus* (principalmente *S.chromogenes, S.hyicus, S.epidermidis, y S.xylosus*) denominados genéricamente SCN (*Staphylococcus* Coagulasa Negativo), por su reacción negativa a la prueba de la coagulasa y *Corynebacterium* bovis (White et al., 2001, Djabri et al., 2002, Bedolla, 2003).

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos causantes de la mamitis bovina.

| TIPOS | MICROORGANISMOS CONTAGIOSOS | MICROORGANISMOS AMBIENTALES | MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS |
|---|---|---|---|
| Principales | *Staphylococcus aureus*<br>*Streptococcus agalactiae*<br>*Mycoplasma* spp. | *Enterococcus faecalis*<br>*Enterococcus faecium*<br>*Streptococcus uberis*<br>Streptococcus dysgalactiae<br>*Escherichia coli* | *Pseudomona* spp.<br>Levaduras<br>*Prototheca* spp.<br>*Serratia* spp.<br>*SNC*[1] |
| Secundarios | *Corynebacterium bovis* | *Klebsiella* spp.<br>*Citrobacter* spp.<br>*Enterobacter* spp.<br>Otros Gram negativos | |

* Cuadro de clasificación adaptado de Bramley (1996).

[1] *SCN* (*Staphylococcus* Coagulasa Negativo).

### 1.1.3. Epidemiología y patogenia de las mamitis infecciosas.

Aunque en la inmensa mayoría de los casos los patógenos llegan a la leche por vía mamaria ascendente, es decir, a través del orificio del pezón, también ocurre vía descendente:

A) Por vía ascendente, la vía de entrada, como se ha comentado, es el canal del pezón. La colonización de las bacterias se produce entre ordeños o por una lesión en la piel del pezón, ya que en el interior de la ubre es estéril. En este punto los microorganismos comienzan a multiplicarse lentamente o rápidamente dependiendo del patógeno,

acompañándose de la liberación de toxinas, metabolitos, etc., y extendiéndose hasta la cisterna del pezón y los alvéolos. El sistema inmune de la vaca reacciona con una respuesta inflamatoria y ocurren cambios en la composición de la leche:

El agente infectante, conduce a la generación de signos quimiotácticos que estimulan la migración de las células blancas sanguíneas y, mayoritariamente, de leucocitos polimorfonucleares, desde la circulación periférica al interior de la glándula mamaria. Los mácrofagos, que representan el tipo celular predominante en la leche de animales sanos, son los responsables de iniciar el proceso inflamatorio, al liberar una serie de sustancias activas o mensajeros que estimulan respuestas similares entre otras células del sistema inmune, para culminar en la migración de leucocitos maduros desde la sangre y la médula ósea hasta la glándula mamaria. Al llegar a ella, los leucocitos van a procurar ingerir y matar a las bacterias invasoras. Este proceso, conocido con el nombre de fagocitosis, determina la producción y liberación de otros compuestos farmacológicamente activos que causan una inflamación adicional.

En la leche, se produce la proteólisis, hecho relacionado con el deterioro de la ubre enferma, incrementando la cantidad de proteasas endógenas, especialmente aquellas del sistema plasmina-plasminógeno. El plasminógeno es una molécula enzimáticamente inactiva y circula por el cuerpo de esa manera hasta que los activadores lo rompen y convierten en plasmina, proteínasa, que actúa precipitando las caseínas, proteínas de la leche, y en consecuencia, provocando la formación de coágulos (tabla 2).

Tabla 2. Respuesta inmune de la vaca frente la acción de los microorganismos.

| ACCIÓN | LOCALIZACIÓN | CONSECUENCIAS | MECANISMOS DE DEFENSA |
|---|---|---|---|
| Penetración | Canal del pezón | Multiplicación del patógeno. | Barrera natural: esfínter del pezón |
| Multiplicación | Cisterna del pezón | Activación plasminógeno.<br>Cambios en la composición de la leche. | Respuesta inmune:<br>Específicos: anticuerpos.<br>Inespecíficos: leucocitos. |
| Colonización | Cisterna del pezón | Plasminógeno se convierte en plasmina. | Aumento de permeabilidad sanguínea.<br>Colonización del alveolo. |
| Extensión | Alvéolos | Inflamación de la ubre. | Formación de coágulos.<br>Inhibición de producción de leche. |

Las consecuencias patológicas de la inflamación son fundamentalmente el daño tisular, y la alteración de la función secretora. Los mecanismos de defensa del animal pueden eliminar con éxito la infección (curación natural) o, bien, la infección puede persistir, parcialmente controlada por las defensas del hospedador, durante un período de semanas, meses o, incluso, años (infección crónica). Las infecciones crónicas suelen desencadenar brotes repetidos de mastitis clínicas, cuando el equilibrio se decanta a favor del agente infeccioso. La frecuencia con la cual se desarrolla una mastitis clínica en una glándula infectada depende muy particularmente del tipo de patógeno.

B) Por vía descendente o hematógena, la utilizan los microorganismos que pueden causar enfermedad sistémica o tienen la propiedad de movilizarse por la sangre y, a través de los capilares mamarios, llegan a infectar la ubre (*Salmonella, Brucella, Mycobacterium tuberculosis*). Es decir, la infección llega al tejido mamario a partir de un foco infeccioso interno del organismo del animal (por ejemplo, foco tuberculoso).

- **Mecanismos de virulencia**

Como ya se ha comentado, la patogenia está basada en mecanismos que producen infección y desarrollan una enfermedad en el hospedador. Pero, en otras ocasiones, algunas cepas bacterianas emplean mecanismos más complejos denominados factores de virulencia, asociados a características bioquímicas, estructurales y genéticas que interactúan con el hospedador causando daño. Los efectos provocados por los factores de virulencia pueden diferir dependiendo del estado de lactación y la gravedad de las infecciones intramamarias (IIM). Durante el peri-parto y secado, las IIM afectan a la proliferación del epitelio mamario y, consecutivamente, modifican la composición de la leche, como se ha demostrado en los estudios realizados por Matthews et al. (1994b), donde *E.coli* emplea, como factor de virulencia, endotoxinas, *S.aureus* —toxinas, como hialuronidasas, y Gamma-toxinas—, que producen la ruptura del ácido hialurónico en oligosacáridos (Kumar et al., 2011), y *Strep.uberis,* que presenta la cápsula de ácido hialurónico impide la fagocitosis de los macrófagos (Ward et al., 2001), con el objetivo de inhibir la proliferación de MAC-T (línea celular epitelial mamaria bovina).

Aunque no todos los patógenos mamarios presenten factores de virulencia, algunas cepas bacterianas se encuentran asociadas a determinados factores que las permiten

mejorar su capacidad infectiva y colonizar otros ambientes. Por ejemplo, la presencia del factor CAMP (Hassan et al., 2000), la enzima activadora del plasminógeno (estreptoquinasa) que transforma el plasminógeno en plasmina evitando la fibrinolisis (Huang et al., 1989, Malke, 1993) o, en el caso de *Strep.uberis*, el factor PauA, proteína extracelular activadora del plasminógeno (Leigh, 1993, Leigh & Lincoln, 1997), y la capacidad de fijación a la lactoferrina mediante proteínas. La lactoferrina es una glicoproteína que se liga al hierro y a las MAC-T. El hierro es un compuesto necesario para el crecimiento de microorganismos, pero aunque *Strep.uberis* no tenga elevados requisitos de hierro para su supervivencia, utiliza esta glicoproteína para mejorar la adherencia a las MAC-T.

### 1.1.4. Diagnóstico de las mamitis infecciosas.

El ganadero necesita implantar en la explotación un programa de prevención de mamitis que le permita el seguimiento del estado sanitario del rebaño y, por tanto, un diagnóstico precoz de las mamitis, particularmente de las mamitis subclínicas.

Actualmente el diagnóstico de la etiología de la mamitis se lleva a cabo por técnicas bacteriológicas mediante cultivos específicos y técnicas moleculares (PCR). Estas últimas son técnicas que no se encuentran al alcance de todas las explotaciones, por lo que el uso de otros métodos de diagnóstico generales y asequibles, tales como el RCS que permitan al ganadero tener información mensual del estado de cada animal y del rebaño gracias a los datos que le facilita el control lechero, constituyen una importante herramienta de trabajo en los programas de selección de vacuno de leche. Así mismo, el ganadero dispone de herramientas como el CMT (California Mastitis Test) que permite estimar el RCS de una vaca sospechosa. Una vez detectada una posible infección en un cuarto, el ganadero puede optar por tratar o no esa mama. La efectividad del tratamiento es mayor si el ganadero conoce el agente causante de la infección; para ello tiene que tomar una muestra de leche del cuarto sospechoso de infección y llevarla a un laboratorio de mamitis.

A la importancia de este parámetro (RCS) como indicador de la salud mamaria y calidad de la leche, es necesario tener en cuenta los componentes que forman parte de los programas estándares de prevención de mamitis, como: limpieza de la máquina de ordeño, baño de pezones, tratamiento antibiótico al secado, eliminación de las vacas con infecciones crónicas, nutrición, higiene etc., con el objetivo de realizar un buen seguimiento

del estado de salubridad de la ubre (Neave et al., 1969, Schukken et al., 1990, Wilson et al., 1997, Wenz et al., 2007). El sistema de seguimiento del estado de salubridad de la ubre y de calidad de la leche mediante el uso de RCS, respalda el sistema desarrollado por DHIA (Dairy Herd Improvement Association) donde se relacionan los niveles de RCS con los niveles de producción de los animales y, en consecuencia, con la rentabilidad de la explotación. Para ello, se dividen los RCS de la leche en 10 categorías, desde el 0 al 9, denominando cada categoría con una puntuación lineal y reflejando las pérdidas aproximadas en la producción de leche y el impacto económico de la mamitis en la explotación lechera (tabla 3).

Tabla 3. Estimación de las pérdidas de leche en relación al RCS.

Fuente: Dairy Herd Improvement Association (Philpot, 1984).

| | | | | ESTIMACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE |
|---|---|---|---|---|
| PUNTUACIÓN LINEAL | CMT* (PUNTUACIÓN) | RCC (CS/ML) | PÉRDIDAS DE LECHE (%) | PERDIDAS VACA/AÑO (KG) |
| 0 | Negativo | 12500 | — | — |
| 1 | Negativo | 25000 | — | — |
| 2 | Negativo | 50000 | — | — |
| 3 | Negativo | 100000 | 3 | -180 |
| 4 | Trazas | 200000 | 6 | -360 |
| | | 300000 | 7 | -450 |
| 5 | 1 | 400000 | 8 | -540 |
| | | 500000 | 9 | -585 |
| | | 600000 | 10 | -630 |
| | | 700000 | | -675 |
| 6 | <2 | 800000 | 11 | -720 |
| | | 900000 | | -743 |
| | | 1000000 | 12 | -765 |
| | | 1200000 | >12 | -765 |
| 7 | | 1600000 | | >-900 |
| 8 | | 3200000 | | |
| 9 | | 6400000 | | |

Basado en 14000-15000 libras media/vaca/año (6300-6750 kg media/vaca/año).
Calculo de la puntuación lineal a partir de RCS = 200000 cs/ml.

**Interpretación del test CMT*:**

Negativo - No evidencia de precipitados en leche.
Trazas - Finos precipitados que desaparecen.
1 (ligeramente positivo) - Distintos precipitados.
2 (positivo) - mezcla espesa con formación de gel.

A la hora de establecer un límite en el recuento celular para valorar el estado de salubridad de la ubre y la magnitud de las pérdidas de producción se tuvieron en cuenta algunos factores que pueden influir en la vaca, el cuarto e incluso en el rebaño (Dohoo & Meek, 1982):

- **La inmunidad natural del individuo**. Un elevado número de células somáticas como linfocitos, macrófagos y PMN no son indicativos de enfermedad, sino que son consecuencia de las defensas naturales del individuo (Sordillo et al., 1997, Pillai et al., 2001). Para disminuir el error producido entre las células que pertenecen a la inmunidad natural del animal y las células generadas como respuesta a una infección, algunos autores limitan el recuento de células somáticas a nivel de cuarto en 200000-250000 cs/ml (Schepers et al., 1997, Schukken et al., 2003).
- **Momento de la lactación del animal.** En condiciones fisiológicas normales, el RCS es alto en los primeros días después del parto independientemente de que exista o no infección, y se mantiene durante 5 a 15 días. Una vez superado este periodo, el RCS desciende durante 2 a 3 semanas hasta alcanzar su mínimo e ir posteriormente aumentando tras el curso de la lactación (Hortet & Seegers, 1998, Bennedsgaard et al., 2003).
- **La edad de los animales**. Algunos autores han confirmado un aumento en el número de células somáticas (Schultz, 1977, Syrstad et al., 1979) en vacas con más de 1 parto que en vacas primerizas (Hortet & Seegers, 1998, Hagnestam-Nielsen et al., 2009), aunque este incremento se debe normalmente a la presencia de animales mayores con un historial de infecciones mamarias.
- **El estado de infección.** Los patógenos principales, tales como *Streptococcus* spp. o *Staphylococcus aureus*, son los que mayor respuesta inflamatoria producen y, por tanto, RCS más altos. Los valores de RCS en estados de infección por patógeno secundario como *C.bovis* y SCN, y en estados de no infección, aparecen a menudo solapados (Ward & Schultz, 1972, Timms & Schultz, 1987).
- **Otros factores ambientales,** tales como el sistema de ordeño y su manejo, la alimentación, el tipo de establo, los tratamientos de secado, la higiene de la ubre (Brander et al., 1975), y la estación del año, predominando altos RCS en los meses calurosos

principalmente en el verano (Nelson, 1969, Roussel, 1969, Dohoo & Meek, 1982). También existen variaciones en el RCS entre las distintas fracciones de leche durante el ordeño. Hay que tener presente que las células somáticas se unen a la fracción de grasa, por ello, al principio del ordeño la leche presenta bajos contenidos en grasa y los RCS son más bajos que sobre el conjunto del ordeño o al final del mismo. Otro posible factor son situaciones debidas al estrés que desencadenan un mayor número de casos de mamitis o procesos donde las infecciones subclínicas pasan a infecciones clínicas provocando un aumento en el RCS.

### 1.1.5. Antimicrobianos empleados en vacuno lechero.

La mamitis es una de las patologías infecciosas más frecuentes en el ganado vacuno lechero, siendo frecuente el uso de medicamentos antimicrobianos para su tratamiento. No es extraño que la mayor parte de los residuos detectados en la leche procedan de sustancias antimicrobianas, cuyo origen está relacionado con las terapias antibióticas empleadas en la glándula mamaria (hasta un 90 % de los casos), bien por tratamientos ligados a mamitis clínicas, o bien por tratamientos preventivos empleados en la fase de secado (Erskine et al., 2003).

Dadas las repercusiones que estos residuos tienen en la Salud Pública, en la Unión Europea se controla la presencia de residuos de sustancias antimicrobianas en la leche. Mediante el Real Decreto 1749/1998, de 31 de Julio, y sus correspondientes modificaciones, se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus derivados. Este Real Decreto lleva a efecto la transposición de la directiva 96/23/CEE del 29 de abril de 1996.

A lo largo de los años, la UE ha ido estableciendo los límites máximos de residuos permitidos en los tejidos de las diferentes especies de abasto, con fines de seguridad alimentaria, hasta recopilar recientemente toda esta información en un único Reglamento UE Nº 37/2010, con sus respectivas modificaciones, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación en lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. En la tabla 4 figuran estos límites en la leche en función de los antimicrobianos específicos usados en cada especie y con independencia de la vía de administración.

Otro Real Decreto, importante de destacar, 1728/2007 se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo, de tal forma que sólo podrá cargarse en las cisternas de transporte o descargarse en el centro lácteo, la leche que resulte negativa a las pruebas de detección de antimicrobianos.

Tabla 4. Límites máximos de residuos (LMR) antimicrobianos en leche, según reglamento (UE) 37/2010 con indicación de la especie ganadera.

| Sustancia | LMR | Leche | Sustancia | LMR | Leche |
|---|---|---|---|---|---|
| **Betalactámicos** | | | **Macrólidos** | | |
| Penicilina | 4 | Todas | Eritromicina | 40 | Todas |
| Ampicilina | 4 | Todas | Espiramicina | 200 | Vaca |
| Amoxicilina | 4 | Todas | Tilmicosina | 50 | Todas |
| Penetamato | 4 | Todas | Tilosina | 50 | Todas |
| Nafcilina | 30 | Vaca | Lincomicina | 150 | Todas |
| Cloxacilina | 30 | Todas | Pirlimicina | 100 | Vaca |
| Dicloxacilina | 30 | Todas | | | |
| Oxacilina | 30 | Todas | **Aminoglucósidos** | | |
| Cefacetrilo | 125 | Vaca | Gentamicina | 100 | Vaca |
| Cefalexina | 100 | Vaca | Kanamicina | 150 | Vaca |
| Cefalonio | 20 | Vaca | Neomicina | 1500 | Todas |
| Cefoperazona | 50 | Vaca | Espectinomicina | 200 | Oveja |
| Ceftiofur | 100 | Vaca | DH-Estreptomicina | 200 | Vaca |
| Cefquinoma | 20 | Vaca | | | |
| Cefapirina | 60 | Vaca | **Quinolonas** | | |
| Cefazolina | 50 | Vaca | Ciprofloxacina | - | - |
| | | | Danofloxacina | 30 | Todas |
| **Tetraciclinas** | | | Enrofloxacina | 100 | Todas |
| Doxiciclina | - | - | Flumequina | 50 | Todas |
| Clortetraciclina | 100 | Todas | Marbofloxacina | 75 | Vaca |
| Oxitetraciclina | 100 | Todas | | | |
| Tetraciclina | 100 | Todas | **Otros** | | |
| | | | Ácido clavulánico | 200 | Vaca |
| **Sulfonamidas** | | | Bacitracina | 100 | Vaca |
| Sulfadiacina | 100 | Todas | Baquiloprima | 30 | Vaca |
| Sulfadimetoxina | 100 | Todas | Cloranfenicol | 0 | Todas |
| Sulfadimina | 100 | Todas | Colistina | 50 | Todas |
| Sulfadoxina | 100 | Todas | Dapsona | 0 | Todas |
| Sulfanilamida | 100 | Todas | Novobiocina | 50 | Vaca |
| Sulfametazina | 100 | Todas | Rifaximina | 60 | Vaca |
| Sulfatiazol | 100 | Todas | Tianfenicol | 50 | Todas |
| Otras sulfonamidas | 100 | Todas | Trimetoprim | 50 | Todas |

| SUSTANCIA | LMR | LECHE |
|---|---|---|
| Clorsulón | 16 | Todas |

LMR : µg/Kg.

Con respecto a los fármacos empleadas en España para el tratamiento de las mamitis, Zorraquino et al. (2007) elaboraron un estudio para el entonces Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. En este estudio se realizó una encuesta a los equipos veterinarios

que trabajaban en los programas de calidad de leche y control de la mamitis a lo largo de toda la geografía española, con el objetivo de evaluar la frecuencia de uso de antimicrobianos en vacuno lechero y, a su vez, el riesgo de aparición de residuos en la leche en España. Los resultados de las encuestas mostraron que los antibióticos ß-lactámicos y los aminoglucósidos eran los grupos de antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de las mamitis, tanto en lactación como en el secado.

Estos resultados hacen reflexionar sobre el uso indiscriminado de los antibióticos ya que la presencia de residuos en los alimentos genera cepas resistentes de patógenos, problemas alérgicos, así como perjuicios a la industria alimentaria, sobre todo en la fabricación de productos fermentados.

Las estrategias para reducir el peligro de antibióticos en la leche se basaría en 4 puntos:

1. Seguir los programa de control de mamitis para reducir la tasa de infecciones.
2. Emplear las dosis correctas de los antibióticos, según la vía de administración, y respetar los tiempos de espera; apartar o marcar las vacas tratadas para evitar el ordeño regular durante el periodo de tratamiento y así, minimizar al máximo la posibilidad de que la leche de los animales tratados pueda llegar al tanque.
3. Reducir los tratamientos antibióticos preventivos no necesarios, como por ejemplo evitar el tratamiento sistemático de todas las vacas durante el periodo de secado, centrándose en vacas con episodios infecciosos durante la lactación.
4. Incrementar la efectividad de los tratamientos, intentando en la medida de lo posible no recurrir a productos de amplio espectro, sino previa identificación del patógeno causal, aplicando el antibiótico adecuado tras un antibiograma.

El antibiograma puede ser útil para orientar el tratamiento adecuado ante casos de mamitis clínicas, subclínicas o en el secado. Además, estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico.

Los métodos de análisis de la sensibilidad a antibióticos se dividen en métodos cualitativos y métodos cuantitativos. Los cuantitativos permiten determinar la Concentración Mínima

Inhibitoria (CMI), mientras que los cualitativos sólo permiten clasificar al microorganismo como resistente o sensible al antibiótico ensayado.

Existen diferentes pruebas de sensibilidad antibiótica, tales como: el método de dilución, método de Epsion test, métodos automatizados comerciales (Ilustración 1), pero el más utilizado es el método de difusión disco-placa (Ilustración 2) basado en el trabajo de Kirby-Bauyer y colaboradores (ver Anexo 3) y considerado uno de los métodos del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), que de forma indirecta o semi-cuantitativa y sencilla, permite conocer la sensibilidad *in vitro*, dado que el crecimiento bacteriano se detiene cuando la cantidad del antimicrobiano coincide con la concentración mínima inhibitoria (Washington, 1991). Estos métodos se aplican a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido, como Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia, Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. Además, con ligeras modificaciones, puede aplicarse a *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* spp.

### 1.1.6. El secado: periodo crítico para las infecciones mamarias.

En el manejo de la vaca lechera, existe un periodo dentro del ciclo productivo que es de vital importancia en la producción de leche, conocido como **periodo seco**. Su importancia radica en el impacto que ejerce sobre la producción de leche y en el desempeño reproductivo en la siguiente lactancia, lo cual se refleja de manera positiva o negativa en la rentabilidad de una explotación. La duración del período seco dentro del ciclo productivo debe oscilar entre 45 y 70 días. Este intervalo de tiempo es el resultado de investigaciones, en las cuales se demuestra que esta duración es suficiente para que ocurra de manera completa el proceso de involución y regeneración de la glándula mamaria (Oliver & Sordillo, 1988, Sordillo et al., 1997).

Desde la perspectiva de la salud de la ubre, el objetivo del manejo del secado es que las vacas alcancen una nueva lactación con una ubre sana y libre de infección. Durante el secado, la glándula mamaria es susceptible de contraer nuevas infecciones, muchas de las cuales persisten tras el parto y son causa de la mayoría de las infecciones encontradas al inicio de la siguiente lactación.

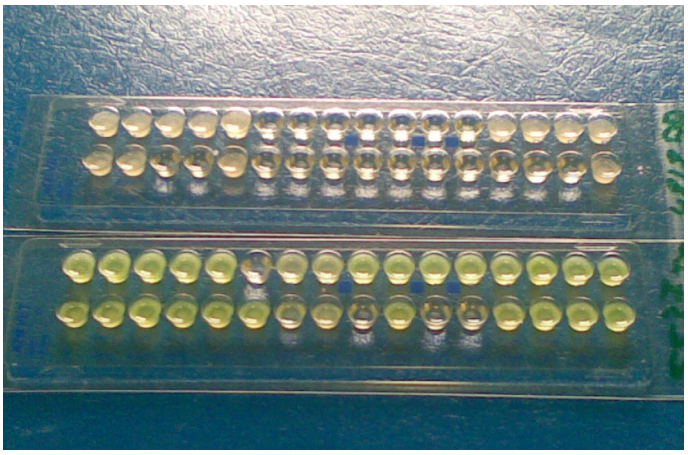


Ilustración 1. Antibiograma sistema ATB (bioMériux) de Pseudomonas aureginosa y *Strep.uberis*.

Fuente: Lucía Lavín-Alconero

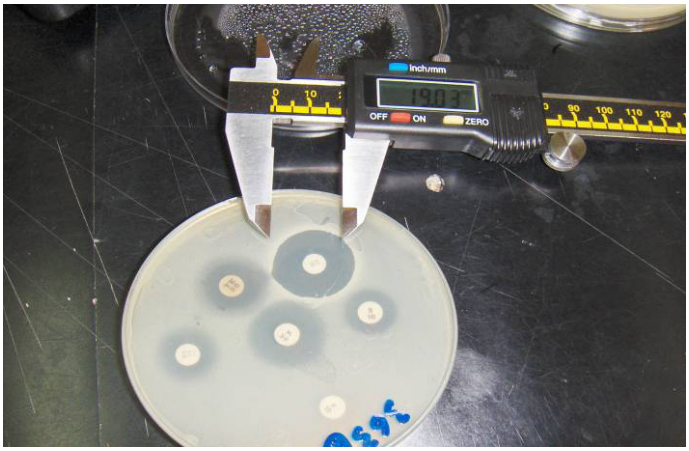


Ilustración 2. Halos de inhibición producidos por *Strep.uberis* al reaccionar con distintos antibióticos.

Fuente: Lucía Lavín-Alconero

### 1.1.7. Susceptibilidad de la ubre a la mamitis durante el secado.

Es un hecho constatado que las vacas secas, especialmente al principio del secado y en el periparto, tienen alta susceptibilidad para contraer nuevas infecciones (McDonald & Anderson, 1981, Oliver & Mitchell, 1983, Eberhart, 1986, Martin-Richard, 2001). Esto se asocia con el cese de las prácticas de higiene del ordeño, entre ellas: el lavado de las ubres, el baño de pezones y la propia extracción de la leche, todo ello contribuyendo al desarrollo de las bacterias en la ubre. Así mismo, durante este periodo, la piel de la ubre contiene una mayor población microbiana.

Al principio del periodo seco, cuando tiene lugar la involución de la glándula mamaria e incluso al final de la calostrogénesis, es el momento en que las bacterias tienen una mayor accesibilidad para penetrar en el canal del pezón (Cousins et al., 1980). Comalli et al. (1984) y McDonald et al. (1975) explican que el incremento en la presión intramamaria tras el cese en la producción de leche y acumulación de calostro, previo al inicio del parto, provoca una dilatación del canal facilitando la entrada de las bacterias por el canal del pezón hasta llegar a la cisterna de la ubre.

En relación a los mecanismos de defensa utilizados por la ubre ante la colonización de microorganismos, diversas investigaciones han demostrado un incremento en el número de leucocitos y un cambio en el porcentaje de las diferentes formas leucocitarias (linfocitos y PMN) que migran desde la parte distal de la cisterna de la ubre hasta la roseta de Fürstenberg durante los primeros 21 días tras la involución, por lo que, la susceptibilidad a una infección de la ubre es mayor antes de este periodo (Nickerson & Pankey, 1983). Existe pues, un máximo riesgo en las 2 primeras semanas, antes del secado, hasta que finaliza la involución de la glándula, y en las 2 últimas, antes del parto, hasta que se finaliza la calostrogénesis (Bradley & Green, 2004).

Oliver y Mitchell (1983), estudiando la susceptibilidad de las ubres a la infección durante el secado, el periparto y el inicio de la lactación, encontraron que el 7,5 % de los cuartos estudiados se infectaron en los primeros días del secado, de los cuales un 63 % continuó con la infección a lo largo del secado.

### 1.1.8. Repercusión de las infecciones mamarias producidas durante el secado en la siguiente lactación.

Se han llevado a cabo muchos estudios sobre la influencia del estado sanitario de las ubres durante el secado, tras el parto y sobre la incidencia de mamitis clínicas en la siguiente lactación (Eberhart, 1986, Green et al., 2007). El equipo de Green (Universidad de Aberdeen, Escocia) ha trabajado extensamente sobre estos aspectos. En sus trabajos encontraron que el aislamiento de *Strep.dysgalactiae*, *Ent.faecalis* y otros patógenos en muestras tomadas en el periodo de secado incrementaban el riesgo de sufrir infección clínica intramamaria durante la siguiente lactación, así como cuando daban positivos los cultivos de muestras tomadas al final del secado y tras el parto. El 60 % de las IIM adquiridas durante el secado aparecieron en las 2 primeras semanas de lactación y el 90 % dentro de los 150 días tras el parto (Green, 2003, Green et al., 2007).

Un estudio realizado por Green et al. (2002), en el que asociaron las mamitis clínicas surgidas durante una lactación con infecciones producidas durante el periodo seco anterior, mostró que los microorganismos obtenidos durante el periodo seco fueron: *Strep.dysgalactiae*, *Strep.uberis*, *Ent.faecalis*, SCN, *Serratia* spp., *E.coli* y *Klebsiella* spp., que se encontraron entre el día 8 y día 14 anterior al parto; posteriormente al parto se encontraron los siguientes microorganismos: *Strep.uberis*, SCN, *E.coli* y *Klebsiella* spp. Así mismo Bradley y Green (2001) describe que las infecciones encontradas en las etapas tardías del secado pueden persistir hasta el parto provocando mamitis clínicas en la nueva lactación.

### 1.1.9. Prevalencia de patógenos ambientales durante el secado.

Durante el periodo seco, la exposición de las vacas a patógenos contagiosos decrece mientras que se mantiene el riesgo de las IIM por patógenos ambientales (Eberhart, 1986). Jiménez Galán (2006), afirma que *Strep.uberis* es el microorganismo predominante durante el periodo de secado. En su estudio se lleva a cabo un seguimiento de las infecciones por *Strep.uberis,* con una prevalencia del 33 % en la granja estudiada, estando el 44 % de las vacas infectadas por este patógeno y mostrando recuentos superiores a 200000 cs/ml ya en el primer control, indicando una infección previa al parto, que se mantiene durante toda la lactación con altos RCS.

### 1.1.10. Curación durante el secado.

La tasa de curación durante el secado es más alta que durante la lactancia, eliminando infecciones existentes y otras nuevas que se producen al inicio del período seco. El tratamiento sistemático de todas las vacas del rebaño con antibióticos durante el secado forma parte de los programas de lucha contra la mamitis desde los años 70 en la mayor parte de los países Europeos. El tratamiento antibiótico es el método de control más eficaz en la lucha contra las infecciones mamarias, capaz de eliminar entre el 70 y el 90 % de las infecciones. Son formulaciones de liberación lenta que suministran antibióticos durante todo el periodo seco y presentan un tiempo de supresión largo, de unos 30-55 días. Con estos tratamientos se pretende eliminar las IIM presentes al inicio del secado y prevenir nuevas infecciones al final del periodo seco.

A pesar de que durante el secado la terapia con antibióticos reduce la tasa de nuevas infecciones en la mayor parte de este periodo, presenta una baja efectividad al final del mismo (Smith et al., 1985). A su vez, Eberhart, además de constatar que el tratamiento en el secado no es efectivo contra las infecciones en el periparto, es más concreto al afirmar que el tratamiento en el secado deja residuos y no es eficaz en el periparto (Eberhart, 1986).

En algunos países como EEUU se emplean los antibióticos junto a selladores internos para compensar el problema de la pérdida de efectividad del tratamiento antibiótico al final del periodo seco o si el secado dura más de lo esperado (Zadoks & Schukken, 2006), mientras que en otros, como en Dinamarca, el tratamiento sistemático en el secado está prohibido, En este país se entiende que la solución al problema de las mamitis durante el secado y tras el parto se debe buscar en el tratamiento selectivo de vacas que terminan la lactación con una infección y la realización de una buena rutina de secado y un buen manejo de las vacas durante este periodo (Vaarst, 2001). Por su parte, en Noruega abogan por la aplicación de una terapia en el secado selectiva más que una terapia sistemática con el mismo producto a todas las vacas del rebaño dentro del programa de control de mamitis en Noruega (Osterås et al., 1999).

Sol et al. (1994) llevaron a cabo un estudio para analizar los factores que influyen en la efectividad del tratamiento en el secado, encontrando que la probabilidad de cura desciende en cuartos con altos RCS, en función de la edad de la vaca, y en vacas con más de 1 cuarto infectado. A partir de los datos obtenidos en este estudio crearon un

modelo matemático de predicción de probabilidad de curación que, en función de la edad de la vaca, el número de cuartos infectados, el patógeno, el RCS predice el éxito de un tratamiento y la utilidad de su aplicación.

Huijps y Hogeveen (2007) emplearon un modelo matemático para el estudio del costo asociado al control de la mamitis alrededor del parto, valorando 3 supuestos: 1. Tratamiento sistemático de todas las vacas al secado; 2. Tratamiento selectivo y 3. Ningún tratamiento.

Como se observa en la tabla 5, los gastos medios por vaca son bastante similares en los 3 supuestos, aunque la variabilidad es mucho más baja en el modelo convencional basado en el tratamiento sistemático de todas las vacas, que en los otros 2 modelos, en los que las diferencias de gasto entre vacas es muy grande. En el caso de la aplicación de tratamiento selectivo, el 59 % de los costos están asociados a las mamitis clínicas que se inician durante el secado y periparto que se deben tratar al inicio de la lactación, costos que constituyen el 82 % del gasto total en el modelo de no tratamiento. Concluyen que la elección entre uno u otro sistema depende del manejo que lleve a cabo el ganadero para reducir el riesgo de infección durante el secado.

Tabla 5. Relación del coste con el tipo de tratamiento.

| | TRATAMIENTO SISTEMÁTICO AL SECADO | TRATAMIENTO SELECTIVO | NINGÚN TRATAMIENTO |
|---|---|---|---|
| VACAS TRATADAS | 100 % | 35 % | 0 % |
| IIM tras el parto | 7,48 % | 12,33 % | 19,28 % |
| Coste medio por vaca* | 15,60 (10,61-26,61) | 13,72 (4,86-29,41) | 18,02 (4,08-42,60) |
| Costes debidos al tratamiento de mamitis clínicas tras secado | 27 % | 59 % | 82 % |
| Costes debidos al tratamiento al secado | 65 % | 26 % | 0 % |

* La unidad monetaria es el euro.

## 1.2. IMPORTANCIA DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* Y SUS MÉTODOS DE ESTUDIO.

- **Historia y clasificación de *Streptococcus uberis***

Seeley (1951), realiza una revisión bibliográfica describiendo los hallazgos obtenidos por numerosos investigadores para denominar la especie *Strep.uberis*.

En 1928 se describe una especie asociada al género *Streptococcus* que provoca infecciones mamarias bovinas y cuyas propiedades discrepan de la especie *Streptococcus agalactiae*.

Durante los 4 años posteriores a la descripción de la especie desconocida, investigadores alemanes como Klimmer, Haupt y Roots en 1928, el austriaco Diernhofer en 1932 y el británico Edwards en 1932, clasificaron a este organismo como una especie distinta. Los alemanes trabajaron con 18 aislamientos procedentes de muestras de leche, a los cuales denominaron "Grupo II", y observaron las reacciones ante diferentes pruebas bioquímicas, como la fermentación de azúcares. Las bacterias "Grupo II" fermentaban la sacarosa y la salicina, pero no la rafinosa, presentaban crecimiento a 10 °C, y en un medio de lactosa, a un pH de 4,5 a 4,8 e hidrolizaban el hipurato. Así mismo, en la prueba del tornasol la leche tomaba un color enrojecido, lo cual indica la ausencia de reducción y coagulación, y la prueba de azul metileno fue "transitoriamente" positiva. En 1932, Edwards describe un "Grupo III" de estreptococos, que coincidía con las características descritas por Klimmer, Haupt y Roots, pero al que sometió a otras pruebas bioquímicas, como la fermentación de la inulina y el manitol, con resultado positivo, así como el crecimiento en glucosa a un pH de 4,5 a 4,8 y la hidrólisis de esculina.

En 1932 Diernhofer, examinó las cepas de la colección inglesa denominadas "Grupo III" y concluyó que presentaban las mismas características que las cepas aisladas a partir de muestras de leche en su laboratorio, denominando al organismo *Streptococcus uberis*, añadiendo la siguiente descripción: colonias con borde suave en el medio de cultivo, diplococos, test del tornasol con resultado gradualmente enrojecido sin presentar coagulación de la leche, la prueba del azul de metileno transitoriamente positiva, formación de ácido a partir de glucosa a pH 4,7, fermentación de lactosa, sacarosa, manitol e salicina pero no de rafinosa y glicerol, hidrólisis del hipurato y esculina positiva. Plastridge en 1936 comparó sus cepas de *Streptococcus* "Ba" con la cepa de *Streptococcus uberis* de

Diernhofer y obtuvo las mismas conclusiones por lo que, denominó al cultivo de *Streptococcus* "Ba" como *Strep.uberis*. A pesar de que muchos investigadores no coincidían en todas las características bioquímicas descritas para la especie de *Strep.uberis*, actualmente se utiliza el nombre de *Strep.uberis* propuesto por Diernhofer para denominar a la especie.

Por otro lado, las características serológicas de *Streptoccocus uberis* no aclaraban la situación. Hansen, en 1935, observó que las características serológicas de *Strep. uberis* se acercaban a las características serológicas de *Strep.agalactiae* y *Enterococcus* fecales, mientras que Plastridge y Williams en 1939 determinaron su cercanía al grupo E de Lancefield, más que a ningún otro grupo serológico, al igual que Jacob en 1947, que observó que las características serológicas de *Strep.uberis* tienen mayor afinidad con los miembros del grupo E.

Por tanto, la clasificación de *Strep.uberis* ha sido muy confusa debido a la variabilidad de las reacciones en algunos de los tests realizados. Estos problemas se solucionaron con los estudios de hibridación del ADN realizados por Garvie y Bramley (1979), donde identificaron dos genotipos el tipo I que denominaba *Strep.uberis* y el tipo II que denominaba *Strep.parauberis*, así identificaron 2 especies distintas de manera precisa. Otros autores como Willians y Collins (1990) analizaron los oligonucleótidos comprendidos en la región 16S del ADNr mediante RT-PCR y determinaron que ambos genotipos presentaban características filogenéticas distintas entre ellos y entre otras especies de *Streptococcos*. Así mismo, otros autores identifican mediante PCR regiones específicas del ADN que codifican para el gen 16S ADNr, el gen 23S ADNr y regiones de ADN intergénicas 16-23S ADNr para la identificación de *Strep.uberis* y *Strep.parauberis* de forma directa, rápida y sin resultados dudosos (Abdulmawjood & Lammler, 1999, Hassan et al., 2001, Khan et al., 2003).

### 1.2.1. Interés actual de *Streptococcus uberis* en España.

Múltiples estudios de ámbito nacional sobre la prevalencia de gérmenes aislados de infecciones mamarias bovinas muestran datos muy variables entre Comunidades Autónomas. A partir de datos obtenidos en grupos de trabajo de comunidades autónomas, como: País Vasco, Navarra, Andalucía, Castilla la Mancha, Asturias y Cataluña, se concluye que

*Strep.uberis* representa entre el 3,2 % y el 16 % del total de microorganismos aislados de muestras de leche recibidas en los correspondientes laboratorios durante 2001 (De prado et al., 2001).

En el congreso de G-Temcal del año 2006, el autor Jiménez Galán (2006) presentó los resultados obtenidos de 8 laboratorios españoles en los correspondientes departamentos de mamitis, encontrando que la prevalencia de este patógeno mamario también resultó variable entre comunidades, desde un 5,5 % en Cataluña hasta un 17,4 % en País Vasco y Navarra. En este trabajo se concluyó que el 69 % de los patógenos ambientales mamarios aislados de muestras de leche en España son *Streptococcus* spp., de los que en un 43,5 % las infecciones son producidas por *Strep.uberis*.

En el XII Congreso de Anembe de 2008, Esnal et al. (2008) presentaron los resultados referentes a la prevalencia de patógenos en las muestras de leche llegadas a su laboratorio procedentes de casos de mamitis clínicos y subclínicos, mostrando que las infecciones subclínicas por *Strep.uberis* representan el 8,09 %, mientras que el 10,32 % pertenecen a infecciones clínicas. A pesar de que estas cifras no reflejan la importancia cuantitativa de este patógeno, cuando aplican el índice de Patogenidad Clínica (IPC), que estima el potencial patógeno de cada microorganismo para inducir mamitis clínica, se encuentra que entre las especies más prevalentes son las Enterobacterias las que muestran un IPC más elevado, con 1,78 %, y entre los estreptococos, *Strep.agalactiae* y *Strep.uberis* son los que presentan mayor potencial clínico.

En Cantabria, se está llevando a cabo, desde hace 10 años, un programa de mejora de calidad de leche que abarca casi el 90 % de las explotaciones de leche de Cantabria. Entre los datos aportados en los informes anuales se incluye la etiología de los patógenos implicados en los procesos mamarios y, concretamente, *Strep.uberis* presenta una variación en su prevalencia desde 12,2 % para el año 2004 hasta 22,63 % para el año 2011. Estos datos se obtienen a partir de muestras de leche recogidas en cuartos donde hay vacas con mamitis clínica y subclínica. Datos más antiguos publicados en el 2002, muestran esta fluctuación en la prevalencia de *Strep.uberis*, desde un 10,2 % en 1998 a un 16,6 % en 2001 (García et al., 2002).

### 1.2.2. Tipo de transmisión de *Streptococcus uberis*.

El interés de los patógenos ambientales frente a los patógenos contagiosos se debe al hecho constatado de que tras años de aplicación del protocolo establecido para la lucha contra la mamitis, se ha reducido el número de infecciones por patógenos contagiosos (fundamentalmente, *Sthaphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*), mientras que han aumentado las infecciones por patógenos ambientales (*Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae, Escherichia coli* y otros), lo que ha puesto de manifiesto que estas medidas no son igualmente efectivas para todos ellos.

Autores de todo el mundo coinciden en que en los últimos años, dentro de los patógenos ambientales, *Strep.uberis* ha pasado a ser el patógeno aislado con más frecuencia en infecciones mamarias. Esto se debe principalmente a la ubicuidad de este patógeno, pudiéndose encontrar en el entorno de las vacas, y por tener una gran capacidad para sobrevivir y multiplicarse, tanto dentro como fuera de la ubre (Wieliczko et al., 2002, Zadoks et al., 2003, McDougall et al., 2004). Se han aislado cepas de *Strep.uberis* de zonas extramamarias como la piel de ubre, la piel del abdomen, los labios, los pezones, el tracto urogenital, las tonsilas, el recto, el rumen, los orificios nasales, los ojos, la piel del pecho, las heces etc. (Bramley, 1982) y, también, de otros lugares pertenecientes al entorno de las vacas, como las áreas de tránsito de las vacas, las cama, el pasto (Zadoks et al., 2005).

La variedad de cepas de *Strep.uberis* encontradas en muestras de leche infectada sugiere una selección al azar desde uno o varios focos de contaminación. Por lo que, un análisis de las focos medioambientales involucrados en la patogenidad de *Strep.uberis* en la ubre podrían facilitar el control de mamitis producidas a través del medioambiente (Zadoks & Schukken, 2006).

### 1.2.3. Identificación bioquímica y genética.

En los laboratorios de diagnóstico, de manera rutinaria, se aplican métodos de identificación fenotípica utilizando test bioquímicos sencillos o sistemas comerciales de identificación que requieren un periodo de 24-48 h para obtener resultados (ilustración 3). Es necesario resaltar que, los procedimientos comunes de identificación de cocos Gram

positivos, aislados de muestras de leche, son insuficientes y presentan, en ocasiones, resultados dudosos en la identificación de *Strep.uberis* (Devriese et al., 1999, Fortin et al., 2003).

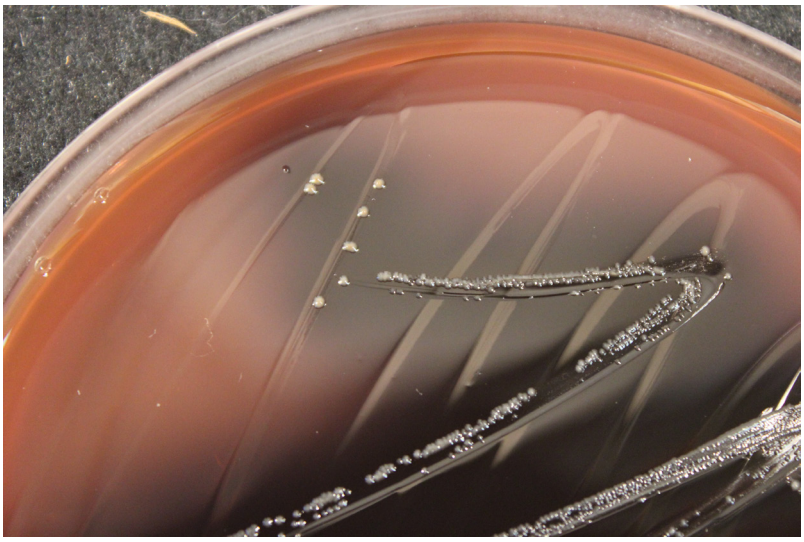


Ilustración 3. Colonias de *Strep.uberis* en el medio agar sangre tras 24 h de incubación.

Fuente: Lucía Lavín-Alconero.

Las técnicas moleculares han proporcionado una mayor rapidez de identificación de especies bacterianas, utilizando, entre otros, oligonucleótidos específicos de secuencia involucrados en la codificación de genes como en la región 16S ADNr, genes involucrados en la región 23S ADNr y en el espacio intragenético de 16S-23S ADNr con todo esto se ha permitido distinguir entre cepas bacterianas relacionadas (Busse et al., 1996, Forsman et al., 1997). En este sentido, Bentley (1991) y Bentley y Leigh (1995) demuestran que la variabilidad en la secuencia de la región V2 del 16S ADNr permite la diferenciación de 31 especies del género *Streptococcus* incluidos *Strep.uberis* y *Strep.parauberis*.

Francois et al. (2001), aplicaron la técnica RAPD para la identificación de cepas de *Strep.agalactiae*, *Strep.dysgalactiae* y *Strep.uberis,* y encontraron un fragmento común de ADN en todos los aislamientos de *Strep.agalactiae* estudiados, ausente en las otras especies. Estos resultados indican que las metodologías moleculares constituyen una herramienta eficaz para el diagnóstico y la investigación epidemiológica de estreptococos en el ganado bovino.

### 1.2.4. Tipificación molecular de *Streptococcus uberis*.

Como ya se ha comentado, *Strep.uberis* es una de las principales causas de mamitis que afecta no sólo en el ámbito nacional, sino, también, en numerosos países, como Australia (Phuektes et al., 2001), Brasil (Costa et al., 1998), Canadá (Sargeant et al., 1998b), Holanda (Barkema et al., 1999), Nueva Zelanda (Douglas et al., 2000) y Reino unido (Leigh, 1999). Es una bacteria difícil de controlar (Bramley, 1984, Leigh, 1999) debido a que su comportamiento epidemiológico no está del todo claro (Peeler et al., 2000, Phuektes et al., 2001). El principal reservorio es el medio-ambiente de las vacas e incluso zonas extramamarias del animal (Cullen & Little, 1969a, Bramley, 1982) , por lo que las infecciones pueden ocurrir en cualquier momento del ciclo vital de los animales, incluso en novillas (Robinson et al., 1985, Oliver, 1988), y, dado que estas últimas no han tenido relación con la sala ordeño, se descarta una transmisión vaca-vaca y considerándose como fuente de contaminación el medioambiente. Así que debido a la naturaleza medioambiental de *Strep.uberis* las prácticas empleadas para su control a través del protocolo de control y manejo no se consideran totalmente eficaces (Neave et al., 1969).

Sin embargo, gracias a la epidemiología molecular y a modelos de aproximación matemática, se pueden tener indicios sobre la emergencia de una transmisión contagiosa por parte de *Strep.uberis*. El conocimiento de los distintos genotipos existentes dentro de un mismo rebaño lechero unido a los estudios de tipificación pueden mostrar evidencias de una transmisión directa y la presencia de cepas predominantes en los rebaños (Baseggio et al., 1997, Phuektes et al., 2001).

Ruth Zadoks, de la Universidad de Edimburgo y especialista en epidemiología molecular veterinaria, es una defensora de la doble naturaleza de *Strep.uberis* como patógeno ambiental y contagioso. Así, en un trabajo publicado en 2003, aplicando la técnica RAPD, encontró una cepa predominante en cada explotación estudiada, resultando que el 80 % de las infecciones con síntomas clínicos estaban relacionadas con la cepa dominante, mientras que las infecciones subclínicas lo estaban con una variedad mayor de cepas. Así mismo, encontró la misma cepa en los distintos cuartos infectados por *Strep.uberis* de una misma vaca (Zadoks et al., 2003).

López-Benavides et al. (2007) estudiaron la variabilidad genética de *Strep.uberis* aplicando MLST (multilocus sequence typing), tanto sobre cepas aisladas en muestras de leche

de cuartos infectados como en cepas aisladas de muestras tomadas del medioambiente, encontrando una gran heterogeneidad: 39 *tipos* (ST) diferentes de cepas entre los 64 aislados medioambientales y 40 *tipos* (ST) entre los 58 aislados de 48 vacas infectadas, encontrando cepas aisladas del medioambiente como responsables de IIM.

Estos estudios parecen sugerir no sólo la transmisión vaca a vaca, sino también la infección de múltiples vacas a partir de una fuente ambiental común.

En un trabajo de McDougall et al. (2004) en el que se aplica PFGE (pulsed field gel electrophoresis) al estudio de infecciones por *Strep.uberis*, se muestra un alto grado de heterogeneidad dentro de las explotaciones estudiadas y entre explotaciones, no observándose ningún tipo predominante en las ubres. Los autores deducen que estos resultados podrían reflejar diferencias epidemiológicas de las infecciones por *Strep.uberis* entre los sistemas de producción, observándose que la fuente medioambiental es la predominante en los sistemas extensivos.

Los resultados de todos estos estudios ponen de manifiesto que la epidemiología de *Strep.uberis* plantea todavía muchos interrogantes sobre la vía de transmisión, contagiosa o ambiental, o sobre los factores implicados en la predominancia de cepas determinadas.

Por otra parte, las técnicas de epidemiología molecular pueden usarse para diferenciar entre procesos infecciosos persistentes y la introducción de un nuevo patógeno, y entre no curación y curación seguida de reinfección con un organismo diferente.

El grupo de Oliver llevó a cabo, en 1998, el seguimiento durante 2 años de 14 cuartos infectados por *Strep.uberis* (8 vacas) y 12 por *Strep.dysgalactiae* (6 vacas) con el objetivo de estudiar la persistencia de las infecciones por estos patógenos a lo largo de una lactación y de una lactación a otra. Algunas infecciones se diagnosticaron como persistentes, pues encontraron el mismo subtipo de una lactación a otra, mientras que en otras infecciones encontraron varios subtipos, lo que asociaron a nuevas infecciones (Oliver et al., 1998b).

McDougall et al. (2004), aplicando la técnica PFGE al estudio de infecciones por *Strep.uberis* a lo largo de una lactación, como se ha comentado, encontraron un alto grado de heterogeneidad en las cepas de *Strep.uberis* aisladas, lo cual hace improbable una transmisión contagiosa, interpretándose como infecciones producidas por procesos de curación-reinfección. Sólo en la mitad de las vacas y en el 50 % de los cuartos con

infección crónica se encontró el mismo tipo durante toda la lactación. Así mismo, sólo el 14 % de las vacas con más de 1 cuarto infectado presentaron el mismo tipo en todos los cuartos, lo cual sugería que la transmisión de la infección no se producía entre cuartos, sino que procedía del medioambiente.

Las IIM causadas por *Strep.uberis* pueden ser clínicas o subclínicas y pueden variar en su duración. Las infecciones subclínicas pueden pasar desapercibidas durante un largo periodo de tiempo y tienen la posibilidad de extenderse y persistir en el tiempo, posibilitando la transmisión mediante la máquina de ordeño (Hill, 1988, Peeler et al., 2000).

### 1.2.5. Factores de virulencia de *Streptococcus uberis*.

Como ya se ha comentado a lo largo de esta introducción, los patógenos mamarios se pueden clasificar, en función del tipo de transmisión, como: contagiosos, donde la transmisión es de vaca a vaca, o ambientales, donde el contagio se produce desde los reservorios medioambientales.

Los mecanismos de control y prevención desarrollados para erradicar patógenos mamarios, han obtenido resultados positivos en la eliminación de patógenos, como *Strep. agalactiae* o *S.aureus*, apoyándose en el uso de antibióticos y una higiene adecuada, el pre-dipping y el baño de pezones al final de cada ordeño, entre otros. Estos mecanismos evitan la colonización de los conductos galactóforos y del tejido mamario por patógenos mamarios (Neave et al., 1969), pero no son muy eficaces para infecciones mamarias producidas por patógenos ambientales, como *Strep.uberis*, debido a su alta prevalencia, sobre todo, en el medioambiente de la explotación (Bramley & Dodd, 1984). Esto supone una exposición continua de los animales al patógeno, presente en los reservorios medioambientales (Jasper et al., 1975), independientemente del ciclo reproductivo en el que se encuentren, ya sea el periodo de lactación o de secado (Cullen, 1969), resultando, por tanto, muy complicado su erradicación.

Las especies pertenecientes al género de los estreptococos representan un grupo muy numeroso que se ha adaptado a diversos hábitats, formando parte de la flora saprófita de la boca, la piel, el tracto intestinal y respiratorio de animales y humanos. La supervivencia de este grupo se debe a estrategias evasivas de las defensas del hospedador (Oliver et al., 1998a).

Para disminuir e incluso inactivar las defensas de la glándula mamaria, *Strep.uberis* ha desarrollado factores de virulencia y mecanismos de patogenia, algunos de los cuales se utilizan para evitar las defensas fagocíticas, mejorando su capacidad para adherirse a las células epiteliales y, así, colonizarlas para desarrollar una infección.

Los principales factores de virulencia del *Strep.uberis* estudiados durante los últimos años se desarrollan en los siguientes apartados:

**Factores extracelulares**

- Relacionados con la cápsula

Es uno de los mecanismos más importantes para las bacterias patógenas, ya que evita las funciones fagocíticas del hospedador. Para ello, algunas bacterias utilizan mecanismos como repulsión electrostática, mimetismo antigénico, enmascaramiento del antígeno, barreras físicas entre la bacteria y el fagocito, depleción de factores de opsonización y supresión de la actividad fagocítica (Densen & Mandell, 1980, Spitznagel, 1983, Speert et al., 1988).

Entre los factores de virulencia de *Strep.uberis* relacionados con la cápsula se encuentran la producción de hialuronidasas y la cápsula de ácido hialurónico (Schaufuss et al., 1989), que provocan una disminución en la proliferación de las MAC-T durante el periodo de preparto (Matthews et al., 1994b). En otros estudios se explica la acción de la cápsula como mecanismo antifagocítico, siendo destruidos el 48 % de los *Strep. uberis* encapsulados frente 75 % de los *Strep.uberis* no encapsulados (Almeida & Oliver, 1993). La cápsula de ácido hialurónico bloquea a los receptores Fc de la superficie de las células fagocíticas, por lo que se impide la opsonización de la bacteria (McNeil et al., 1989). El mecanismo de repulsión electrostática se debe a las cargas negativas que presenta la cápsula de ácido hialurónico y la membrana de los fagotitos, pero para ello se necesita la ausencia de anticuerpos IgG2 anticapsulares. La otra característica atribuida a la cápsula es el mimetismo antigénico.

En definitiva, el ácido hialurónico, presente en todos los mamíferos, no lo detecta rápidamente el sistema inmunológico del hospedador y ello proporciona el tiempo necesario a la bacteria para crecer, adherirse e invadir las células epiteliales mamarias (Almeida et al., 1996).

- Factor uberis

La reacción hemolítica provocada por algunas cepas de *Strep.uberis* es semejante a la producida por el factor CAMP de *Strep.agalactiae*. Estudios realizados por Skalka et al. (1980) y Lopes et al. (1995) informan que el factor uberis es químicamente semejante al factor CAMP, provocando la misma respuesta inmunogénica, hemolizando completamente los eritrocitos de la sangre de cordero añadida al medio de cultivo agar sangre, aunque difieran en su respuesta antigénica.

**Factores asociados a su actividad**

- Invasión

La capacidad de invasión de *Strep.uberis* de las células epiteliales mamarias en estudios realizados *in vivo,* responde a un mecanismo de protección frente a las defensas del hospedador y a la acción de antibióticos. Para ello, la bacteria se une a la superficie y a las estructuras celulares (Falkow et al., 1987). Aunque cada cepa *Strep.uberis* puede estar asociada a unos mecanismos de virulencia característicos, como la producción de ácido hialurónico, expresión de la cápsula, adherencia extracelular, etc., los microfilamentos son necesarios para la internalización de *Strep.uberis* en las células epiteliales mamarias, mientras que no se requieren de los microtúbulos para la infección. En los estudios realizados por Matthews et al. (1994a) se describe la siguiente secuencia temporal durante la invasión *in vivo*:

— A las 2 h: proximidad del *Strep.uberis* a las microvellosidades de las células epiteliales mamarias e invaginación de la bacteria en el citoplasma.

— A las 8 h: *Strep.uberis* y múltiples bacterias en el interior de las vacuolas de las células mamarias epiteliales.

— A las 24 h: aparición de las bacterias en el citoplasma para replicarse.

No se produce degeneración del tejido mamario como consecuencia de la internalización del microorganismo, pero sí afecta a las funciones celulares de secreción y como consecuencia se produce una disminución de la producción de leche.

- Activador del plasminógeno

La capacidad de las bacterias para degradar la leche depende de la presencia de la enzima caseolítica y la proteasa plasmina. La transformación del plasminógeno en plasmina se lleva a cabo por activadores del plasminógeno como, por ejemplo, la streptoquinasa presente en algunas especies de *Streptococcos*. El plasminógeno es una proteína sérica que participa en procesos fisiológicos de los mamíferos, tales como la degradación de las membranas extracelulares, la disolución de coágulos en la sangre (fibrinolisis) y las migraciones celulares. Se encuentra en la sangre de manera inactiva y para su activación necesita 2 enzimas: uroquinasa y el activador tisular del plasminógeno. Los factores de activación del plasminógeno estudiados para el *Strep.uberis* son el factor Pau A (Rosey et al., 1999), Pau B (Ward & Leigh, 2002) y Skc (Johnsen et al., 1999).

La activación del plasminógeno contribuye al incremento del contenido en aminoácidos libres durante el período de no lactación, lo que se traduce en un aumento en el crecimiento de *Strep.uberis* (Oliver, 1991).

- Expresión de proteínas de superficie

La expresión de proteínas de superficie en *Strep.uberis* está regulada por componentes extracelulares como el colágeno, la laminina y por las células mamarias epiteliales (Gilbert et al., 1997). La síntesis de estas proteínas es necesaria para comenzar la infección.

### 1.2.6. Metodos de estudio: La tipificación molecular aplicada a los estudios epidemiológicos.

**Historia y ventajas**

Riley (2004) define la epidemiología como el estudio de la distribución, de la determinación de salud y de enfermedad a través de métodos biológicos moleculares. Las técnicas moleculares se pueden utilizar para relacionar organismos emparentados y estudiar su descendencia evolutiva, así como método de estudio para conocer la transmisión y la determinación de una enfermedad. En esta tesis se lleva a cabo el estudio de la epidemiología molecular de las IIM causadas por *Strep.uberis*, definiéndola como la integración de técnicas de biología molecular al estudio de la epidemiología (Foxman & Riley, 2001). Los principales objetivos de la aplicación de la epidemiología molecular son: la identificación del microorganismo y sus reservorios, sus relaciones biológicas, sus

rutas de transmisión y la identificación de genes que confieren características específicas, como los factores de virulencia (Levin et al., 1999). La aplicación de técnicas moleculares permite distinguir entre procesos persistentes y la detección de nuevas infecciones (Oliver et al., 1998b, Döpfer et al., 1999), estudiar la virulencia de cepas (Smith et al., 1998), identificar posibles dianas para el desarrollo de vacunas (Leigh et al., 1999), e identificar las resistencia a antibióticos (Devriese & Hommez, 1975).

Es extenso el número de técnicas moleculares para la identificación de especies y cepas, pero se pueden clasificar en fenotípicas y genotípicas dependiendo del objetivo del estudio, ya sea para diferenciar características morfológicas, físicas o bioquímicas procedentes de la expresión de genes (fenotípico) o identificar mediante el estudio del material genético (genotipo). Los métodos fenotípicos incluyen susceptibilidad a antibióticos, serotipado, biotipado, fagotipado etc., y los métodos genotípicos incluyen técnicas de tipificación molecular que permiten analizar secuencias de ADN para obtener información de un gen concreto o, incluso, de todo el genoma.

### 1.2.7. Avances recientes en la investigación de la mamitis.

Muchos de los progresos recientes en nuestra comprensión sobre los patógenos bacterianos implicados en IIM se deben a la epidemiología molecular. Esta disciplina ha proporcionado un gran número de herramientas para un conocimiento más exacto de los patógenos, como se puede ver en la revisión de Zadoks y Schukken (2006). Los conceptos clásicos de patógenos ambientales y contagiosos han sido revisados en numerosas publicaciones respecto al uso de la tipificación molecular, observándose que algunos microorganismos clasificados tradicionalmente como contagiosos no demuestran una transmisión vaca a vaca (Zadoks et al., 2003, Munoz et al., 2007, Fournier et al., 2008). Se trata de cepas individuales cuyo comportamiento varía dependiendo del hospedador. Esta adaptación es decisiva para definir la patogenicidad de la bacteria y el tipo de mamitis, ya que no se vuelven a encontrar estas cepas en otros hospedadores o en otros casos de mamitis. Numerosos autores han descrito la adaptación al hospedador por parte de algunos patógenos mamarios, tales como: *Escherichia coli* (Dogan et al., 2006), *Staphylococcus aureus* (Herron-Olson et al., 2007), *Streptococcus agalactiae* (Bisharat et al., 2004), *Klebsiella* spp. (Munoz et al., 2007) y *Streptococcus uberis*. Se espera en los

próximos años, la identificación de muchos de los genes asociados y adaptados a la glándula mamaria del hospedador. Los progresos en el conocimiento del genoma bacteriano junto con el desarrollo de técnicas de caracterización molecular, permitirán una detección más rápida y exacta de los agentes causantes de la mamitis, utilizándose como herramientas de diagnóstico rutinario en el futuro.

### 1.2.8. Terminología molecular.

Las definiciones relacionadas a continuación son las utilizadas por el grupo de trabajo de tipificación molecular de la Sociedad de Salud y Epidemiología de América (Molecular typing working Group of Society for Healthcare Epidemiology of America) (Tenover et al., 1997), y por el grupo Europeo que estudia los marcadores epidemiológicos (European Study Group on Epidemiological markers) (Struelens, 1996).

- **Aislamiento:** conjunto de bacterias procedentes de un cultivo puro generado a partir de una única colonia aislada en placa e identificada a nivel de especie.
- **Cepa:** aislamiento o grupo de aislamientos que muestran características diferentes a otros aislamientos pertenecientes a la misma especie. Esta distinción puede ser fenotípica o genotípica.
- **Clon:** progenie derivada de un antecesor común y resultado de la replicación de ese antecesor.

Algunos de los términos citados se describen en la ilustración 4.

- **Reproducibilidad:** capacidad de los métodos de identificación para generar el mismo resultado cada vez que se aplique el método de identificación.
- **Poder discriminatorio:** capacidad del método de identificación para diferenciar cepas bacterianas.

### 1.2.9. Métodos moleculares.

Existen numerosos métodos moleculares que se pueden utilizar para el estudio epidemiológico. Los utilizados en esta tesis se basan principalmente en la amplificación de fragmentos específicos de ADN y en al restricción de los ácidos nucléicos, empleando endonucleasas con secuencias de reconocimiento determinada.

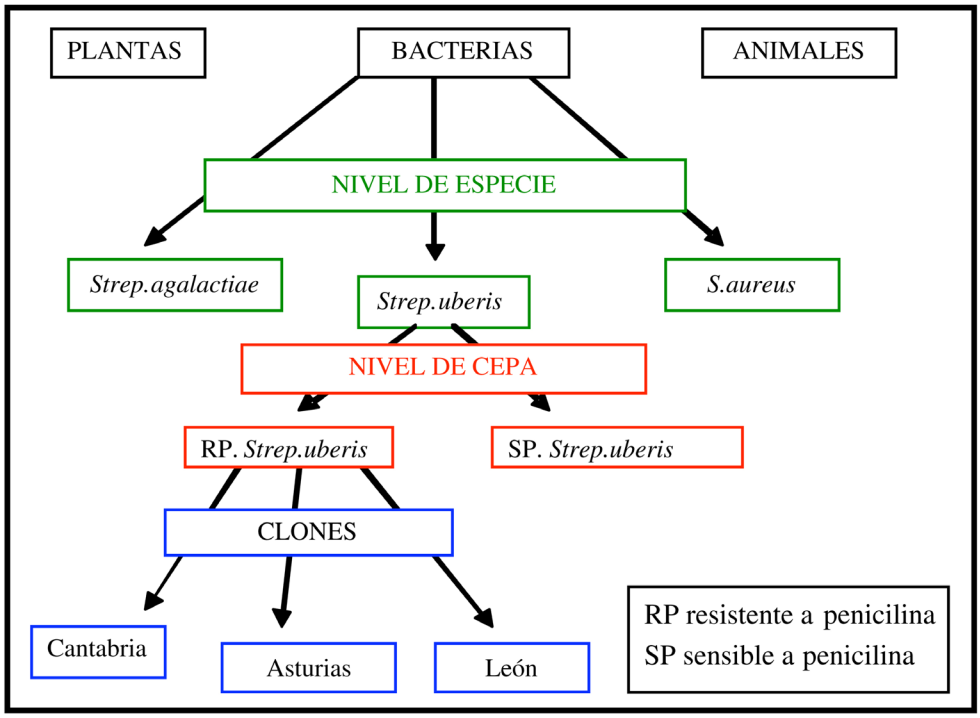



Ilustración 4. Representación del orden jerárquico especie, cepa y clon.

Los organismos bacterianos poseen endonucleasas de restricción que cortan el ADN por lugares específicos de reconocimiento. Las enzimas son utilizadas *in vivo* para cortar ADN extraño que puede haberse introducido en una bacteria. Muchas de estas enzimas se han purificado y se utilizan en técnicas de biología molecular. Dos cepas bacterianas diferentes tendrán distintos lugares de corte para una enzima de restricción concreta, en función de su secuencia genética, generando patrones electroforéticos diferentes.

Entre las técnicas más significativas basadas en el uso de enzimas de restricción, se encuentran las técnicas REA (restriction endonuclease analysis), RFLP (restriction fragment lenght polymorphism), PFGE (pulsed field gel electrophoresis) y Ribotipado.

En **la técnica REA** el número de fragmentos es muy grande, debido a que se digiere el ADN genómico del microorganismo, proporcionando información suficiente para distinguir aislamientos pertenecientes a una misma especie, pero la interpretación de los patrones de bandas es difícil (Denning et al., 1989). Como simplificación de este método, la **técnica RFLP** se basa en los polimorfismos genéticos que se observan, tras la restricción específica de un fragmento previamente amplificado, entre aislamientos. La diferenciación

está en relación con el número de bandas y el peso molecular de las mismas (Jayarao et al., 1992, Santos et al., 2008).

Las técnicas anteriormente descritas generan patrones genéticos complicados debido a la multitud de bandas generadas. Para facilitar la interpretación se utilizan enzimas de restricción que provocan cortes en lugares poco frecuentes, generándose fragmentos de ADN muy grandes, que la electroforesis convencional no puede separar. Para poder resolverlos, surge la **técnica de PFGE**: el ADN genómico se embebe en una matriz de agarosa, formando pequeños bloques en los que se realiza la restricción. Los fragmentos generados se separan mediante la variación periódica del campo eléctrico. La interpretación de los patrones electroforéticos es sencilla, la técnica es muy reproducible, altamente discriminativa y muestra las diferencias entre cepas debidos a cambios genéticos que se han producido en un periodo de tiempo cercano (Tenover et al., 1995). Actualmente es el método de elección en numerosos organismos dedicados a la vigilancia epidemiológica, como "The International Molecular Subtyping Network for Foodborne Diseases Surveillance (PulseNet International)", que agrupa organismos como centros de control y prevención de enfermedades, asociaciones de laboratorios de salud pública y agencias reguladoras de alimentos en todo el mundo (Swaminathan et al., 2006).

La técnica de **ribotipado** permite clasificar bacterias en función de los genes del ARN ribosomal mediante la digestión del ADN cromosómico y posterior hibridación con sondas específicas de cada cepa bacteriana, por lo que puede utilizarse para reflejar diferencias a nivel de especie y subespecie al comparar dichos patrones con bacterias conocidas.

En relación con las técnicas que amplifican los fragmentos de ADN para realizar estudios de tipo epidemiológico cabe destacar las siguientes:

**RAPD** (Randomly amplified polymorphic DNA): en esta técnica se utilizan cebadores que se unen a regiones no conocidas del ADN, es decir, la unión se produce al azar, dando lugar a fragmentos de bajo peso molecular. Las ventajas de esta técnica son que no es necesario conocer el genoma de la bacteria para comparar cepas bacterianas, su bajo coste y la rapidez de análisis; mientras que la mayor desventaja es la baja reproducibilidad y los problemas derivados de contaminaciones del ADN amplificado.

**REP-PCR** (Repetitive extragenic palindromic) basada en la amplificación de los fragmentos de ADN comprendidos entre los elementos repetitivos en el genoma bacteriano, generándose fragmentos de distinta longitud (Versalovic et al., 1991). Existe otro tipo de elementos denominados ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensos) (Hulton et al., 1991) y BOX (Mosaic repetitive elements) presente en bacterias Gram positivas, representando un conjunto de cluster formado por 3 subunidades de diferente peso molecular (Martin et al., 1992). Esta técnica permite discriminar entre descendientes de una misma cepa o cepas que están relacionadas en el tiempo, ya que las secuencias repetitivas se conservan a lo largo de un determinado periodo de tiempo.

**AFLP** (Amplified fragment length polymorphism) donde se amplifican determinadas secuencias conocidas del ADN que previamente ha sido cortado con enzimas de restricción. La mayor limitación de la técnica es que se requiere ADN purificado, junto con el uso de endonucleasas y la unión a adaptadores de alto coste, así como un equipo específico para la detección de los fragmentos amplificados (Vos et al., 1995).

2

# JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances observados a lo largo de los años en el control de la mamitis gracias a programas sanitarios implantados en todos los países, la infección mamaria sigue siendo el principal problema sanitario en explotaciones de ganado vacuno lechero y en muchos casos un factor limitante en la rentabilidad de las explotaciones.

El coste económico de la mamitis en una explotación es difícil de calcular pues hay que considerar tanto los costes directos como indirectos. Los costes directos hacen referencia a las pérdidas asociadas a la retirada de leche "mamítica", a los descuentos asociados al empeoramiento de la calidad de la leche que se entrega y conlleva problemas añadidos, ya que probablemente no pueda ser transformada en derivados lácteos, al incremento de los servicios veterinarios y terapia antibiótica; mientras que los costes indirectos hacen referencia a todos aquellos derivados de la disminución de la producción, la disminución del valor de la leche debido al aumento de células somáticas, así como los costes derivados del aumento de reposición y de los costes laborales, puesto que el manejo de animales enfermos conlleva mayor trabajo.

La mamitis es el resultado de la interacción de factores asociados a la vaca (estado inmunitario, edad, estado de lactación, raza, etc.), al agente causante (tipo de patógeno, virulencia, etc.) y al medio ambiente (asociadas al manejo general, higiene de las instalaciones, manejo específico durante el ordeño, etc.), existiendo distintos métodos de prevención y control de la enfermedad que se centran especialmente en el tipo de mamitis (clínica, subclínica o incluso crónica) e incluso en la vía transmisión (mamitis contagiosa o ambiental).

Actualmente, se ha generalizado un programa de control y prevención de la mamitis basado en diez puntos básicos:

1. Selección de las vacas por su actitud de ordeño.
2. Uso y mantenimiento apropiado del equipo de ordeño.
3. Buen diseño e higiene de los alojamientos ganaderos.
4. Aplicación de una buena rutina de ordeño.
5. Realización sistemática del baño de pezones después del ordeño.
6. Seguimientos periódicos del rebaño a través del recuento de células somáticas y test de California.
7. Tratamiento sistemático de las vacas al secado.
8. Tratamiento adecuado de los casos de mamitis clínica durante la lactación.
9. Sacrificio de las vacas enfermas crónicas y los animales que producen mamitis clínica de forma repetitiva.
10. Supervisión veterinaria.

La implantación en las explotaciones de un programa de prevención de la mamitis basado en esos diez puntos, donde el ganadero lleve a cabo realmente un seguimiento continuo del estado sanitario del rebaño y un diagnóstico precoz de las mamitis, particularmente de las mamitis subclínicas, constituye una base sólida para el control y disminución de infecciones mamarias.

Esto es posible gracias al control mensual a nivel de vaca que lleva a cabo el Control lechero. Desde 1979, AFCA (Asociación Frisona de Cantabria) gestiona el centro Autonómico de control lechero en la región autónoma, manejando información muy diversa y vital para la gestión de las ganaderías. Esta información es enviada al ganadero directamente o a la cooperativa a la que pertenece, bien por correo convencional o, desde 2006, vía on line, de forma que el productor tiene a su disposición datos sobre la producción, la calidad de la leche y el recuento de células somáticas de las muestras tomadas de todas las vacas en lactación en cada control mensual, lo que le permite tomar medidas sanitarias.

Uno de los pilares fundamentales en el programa de control de la mamitis es el tratamiento sistemático de todas las vacas durante el secado. Esta práctica se recomienda fundamentalmente por dos razones:

1. Curar las infecciones ya existentes y
2. Evitar que aparezcan nuevas infecciones.

La terapia antibiótica durante el secado y los programas de control han reducido significativamente la prevalencia de mamitis producidas por patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus agalactiae* pero ha sido menos efectiva en el caso de los patógenos ambientales como *Streptococus uberis, Enterococcus* spp., *Escherichia coli* y otros, etc., siendo *Strep.uberis* el más prevalente de los patógenos ambientales. Además hay que añadir que durante la etapa del secado los animales no reciben las mismas atenciones que las vacas en lactación, hecho que contrasta con el conocimiento de que en esta etapa, especialmente al principio del secado y en el periparto, los animales presentan una alta susceptibilidad para contraer nuevas infecciones.

*Streptococcus uberis* es un patógeno extraordinariamente versátil ya que puede afectar tanto a las vacas lactantes como a las secas, durante el pre-parto o durante la primeras etapas de la lactación, e incluso a novillas dando lugar a mamitis clínicas o subclínicas.

Las técnicas de tipificación molecular están contribuyendo a conocer la epidemiología de *Strep.uberis* así como sus mecanismos de patogenia y virulencia. Por su costo y la necesidad de contar con personal cualificado, estas técnicas moleculares no pueden utilizarse de manera rutinaria en la práctica veterinaria pero su aplicación en estudios epidemiológicos aporta conocimientos que contribuyen a mejorar los programas de control y prevención de enfermedades.

En el Centro de Investigación y Formación Agrarias (CIFA) de Muriedas se llevó a cabo un estudio sobre la dinámica de las infecciones mamarias en explotaciones de leche de producción ecológica en la que se empleaban terapias alternativas, fundamentalmente homeopatía. En dicho estudio, la identificación de los patógenos de mamitis se llevó a cabo mediante métodos convencionales de laboratorio basados en pruebas bioquímicas. Con la identificación bioquímica a nivel de especie no se podía asegurar al cien por cien que la cepa de un mismo patógeno, aislada antes y después del secado, o durante varios meses

a lo largo de la lactación, fuera la misma y, por tanto, se tratase de la misma infección mamaria. Así pues la aplicación de técnicas moleculares aplicadas a la tipificación de las cepas aisladas a lo largo del seguimiento de las infecciones permite diferenciar entre casos de persistencia de una infección y casos de curación-reinfección.

Así pues, entendemos que:

1. El manejo de los animales durante el secado constituye un punto esencial del control de las mamitis.
2. Los patógenos ambientales juegan un papel fundamental en las infecciones que se desarrollan alrededor del secado.
3. *Streptococcus uberis* se ha constituido como el patógeno ambiental que más interés despierta por su prevalencia y su ubicuidad en la granja.
4. La aplicación de la tipificación molecular es hoy en día imprescindible para abordar un estudio epidemiológico.

A partir de estas premisas, se plantearon como objetivos del estudio conocer la ecología y epidemiología de *Strep.uberis* en las explotaciones de ganado vacuno lechero, así como analizar el comportamiento de las infecciones mamarias debidas a este patógeno durante el secado, aplicando técnicas de tipificación molecular.

3

# OBJETIVOS

Aislamiento y caracterización de *Streptococcus uberis* procedentes de procesos infecciosos mamarios, durante el secado, y procedentes del medio ambiente.

1. Comparar tres métodos de identificación de *Streptococcus uberis* (test de pruebas bioquímicas convencional, sistema API 20 Strep y PCR para el gen 16S ADNr) a partir de cepas aisladas de muestras de leche procedente de casos clínicos y subclínicos de mamitis bovina.
2. Estudiar la dinámica de infecciones mamarias durante el secado producidas por *Streptococcus uberis* mediante seguimiento de procesos infecciosos antes del secado y después del parto.
3. Identificar los principales reservorios de *Streptococcus uberis* en el área de las vacas en lactación, en el área de las vacas secas y en el área de ordeño.

Aplicación de la tipificación molecular al estudio epidemiológico de *Streptococcus uberis*.

4. Diferenciar entre procesos infecciosos persistentes de una lactación a otra y procesos de curación-reinfección durante el secado y/o periparto, aplicando técnicas de tipificación molecular como electroforesis en campo pulsado (PFGE) y $GTG_5$-PCR.
5. Relacionar las cepas de *Streptococcus uberis* aisladas del interior de la ubre con las aisladas de los reservorios medio ambientales, profundizando en la

naturaleza ambiental o contagiosa de este patógeno, a la luz de los resultados epidemiológicos obtenidos.

6. Analizar sensibilidades y resistencias de las cepas de *Streptococcus uberis* aisladas de ubre y medio ambiente, frente a diferentes tipos de antibióticos, mediante el uso de antibiogramas y su relación con los resultados epidemiológicos obtenidos.

7. Detectar los factores de virulencia implicados en la patogenicidad de las cepas de *Streptococcus uberis* aisladas de ubre y medio ambiente, y relacionarlos con los resultados epidemiológicos obtenidos.

# 4

# AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* PROCEDENTE DE PROCESOS INFECCIOSOS MAMARIOS DURANTE EL SECADO Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES EN EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO LECHERO EN CANTABRIA

*Streptococcus uberis* es uno de los microorganismos, aislado en las granjas de vacuno lechero en Cantabria y en España de mayor prevalencia, en torno a un 20 % de los patógenos aislados de infecciones mamarias. Las mamitis producidas por este patógeno son difíciles de erradicar, porque por una parte este patógeno está presente en el entorno del animal, y, por otra parte, las infecciones producidas por *Strep.uberis* no responden correctamente a la terapia antibiótica.

En este capítulo se lleva a cabo el estudio de la dinámica de las infecciones mamarias por *Strep.uberis* durante el secado, punto crítico donde la exposición de las vacas a patógenos contagiosos decrece mientras que se mantiene el riesgo de las IIM por patógenos ambientales. Esta situación radica en la baja efectividad de los tratamientos durante el secado, a la hora de prevenir nuevas infecciones o curar las infecciones existentes.

La identificación de *Strep.uberis* como agente de mamitis se suele llevar a cabo mediante el empleo de métodos bioquímicos los cuales tienen sus limitaciones, debido a que en muchas ocasiones se obtienen resultados dudosos, de hecho en los laboratorios de rutina suele complementarse con sistemas de diagnóstico comerciales.

En consecuencia, los dos objetivos fundamentales de este capítulo son:

1. Aislar *Streptococcus uberis* a partir de muestras de leche y medioambientales y comparar diferentes técnicas para su identificación y caracterización.

2. Estudiar la dinámica de las infecciones por *Streptococcus uberis* durante el secado.

## 4.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 4.1.1. Características de las explotaciones en estudio.

Se seleccionaron cuatro explotaciones donde había constancia de una alta prevalencia de casos de mamitis por patógenos ambientales. La selección de las explotaciones se realizó, a partir de los datos obtenidos a través de una empresa veterinaria, que llevaba a cabo el programa de calidad de leche y control de mamitis[1] en 800 explotaciones de Cantabria desde hacía varios años.

Los rebaños se fueron incluyendo paulatinamente en el proyecto. La duración del periodo de estudio en cada ganadería dependía de las fechas de parto y número de animales en cada una, por lo que las fechas de incorporación y baja en el estudio variaron desde diciembre de 2009 a junio de 2011 (tabla 6).

Tabla 6. Número de infecciones por *Strep.uberis* en cada rebaño en el momento de su incorporación al proyecto.

| EXPLOTACIÓN | FECHA DE INCORPORACIÓN AL PROYECTO | N.° MEDIO DE VACAS EN LACTACIÓN | N.° CUARTOS INFECTADOS CON *STREPTOCOCCUS UBERIS* EN LA FECHA DE INCORPORACIÓN |
|---|---|---|---|
| 1 | Diciembre 2009 | 68 | 10 |
| 2 | Diciembre 2009 | 28 | 9 |
| 3 | Febrero 2010 | 64 | 8 |
| 4 | Junio 2010 | 90 | 6 |

#### 4.1.1.1. Manejo general en las explotaciones en estudio.

Las 4 explotaciones eran libres, con o sin patio, y con sala de ordeño, sin embargo, diferían en muchos otros aspectos como en el tamaño del rebaño y número de vacas en lactación (entre 28 y 90) o en el manejo de las vacas en lactación y de las vacas secas, que en algunos casos compartían local y manejo, y en otros no. Estas y otras características de las explotaciones incluidas en el estudio se recogen en la tabla 7.

[1] Programa de mejora de la calidad de la leche producida en Cantabria (Orden DES/22/99, de 6 de marzo de 2001).

Tabla 7. Instalaciones y manejo general de los animales en las 4 ganaderías durante el estudio.

| PARÁMETRO | EXPLOTACIÓN | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Tipo de estabulación | Libre | Libre | Libre | Libre |
| Áreas de la explotación | 56 cubículos<br>Sin patio<br>Comedero<br>Sala de ordeño | 50 cubículos<br>Sin patio<br>Comedero<br>Potrero<br>Sala de ordeño | 80 cubículos<br>Sin patio<br>Comedero<br>Sala de ordeño | 100 cubículos<br>Patio<br>Comedero<br>Sala de ordeño |
| Tipo de sala de ordeño | 14 plazas<br>Paralelo | 10 plazas<br>Espina de pescado | 12 plazas<br>Espina de pescado | 22 plazas<br>Espina de pescado |
| Régimen de salidas (a patio, a potrero, a parcela) | Estabulación permanente | Salida a potrero (primavera y verano) | Estabulación permanente | Salida a pastoreo todo el año |
| N.° de vacas | 64 | 20 | 65 | 91 |
| Manejo de las vacas secas | Establo aparte | Junto con las vacas en lactación en invierno | En las parcelas en verano, el resto del año en establo junto con las vacas lactación | En parcela aparte en primavera y verano. En Invierno en establo aparte |
| Momento del secado | 60 días antes de la fecha de parto prevista | 60 días antes de la fecha de parto prevista | 60 días antes de la fecha de parto prevista | 60 días antes de la fecha de parto prevista |
| Modo de secado | Secado brusco. Alimentación igual que vacas lactantes | Ordeños alternos al menos 5 días. Tras el secado cambio de alimentación | Secado brusco. Tras el secado cambio de alimentación | Secado brusco. Tras el secado cambio de alimentación |
| Manejo de las vacas antes del parto | Ninguno | 15 d antes del parto: una dieta con + energía y - fibra | 15 d antes del parto: una dieta con + energía y - fibra | 15 d antes del parto: una dieta con + energía y - fibra |
| Limpieza de las ubres durante el ordeño | Predipping]* + secado con papel de un solo uso por vaca | Predipping* + secado con paño común | Predipping* + secado con papel de un solo uso por vaca | Predipping* + secado con papel de un solo uso por vaca |
| Baño de pezones regular tras el ordeño | Sí | Sí | Sí | Sí |
| N.° y tipo de bebedero | 4 Bebederos comunes | 3 Bebederos comunes | 4 Bebederos comunes | 3 Individual automático |
| Material de cama | Paja + sulfato de cal | Lona + paja blanca troceada | Paja + sulfato de cal | Lona |
| Régimen de limpieza de las camas | Cambio de la paja y adición del sulfato de cal cada 2 días | Cambio de la paja con periodicidad variable | Cambio de la paja y adición del sulfato de cal cada 2 días | Limpieza diaria de la lona |

* Predipping: baño de pezones antes del ordeño.

El manejo sanitario de las mamitis en lactación y el tratamiento utilizado durante el secado no eran objetivos del estudio, por lo que estaba en manos de los responsables de cada explotación, de forma que los productos empleados fueron elegidos de acuerdo con el criterio del asesor veterinario.

Todas las ganaderías llevaban a cabo tratamientos contra las mamitis clínicas o las infecciones surgidas durante el periodo de lactación, aunque el criterio para aplicar o no un antibiótico en un caso concreto era diferente en cada una. Por otra parte, como es usual, cada explotación tenía un producto de elección para el tratamiento, tanto de las mamitis en lactación como para el secado, sin embargo, el conocimiento del patógeno causante de la infección (obtenido normalmente a través de los datos proporcionados por el equipo del proyecto) podía hacer modificar el antibiótico o asociación de antibióticos empleados.

En la tabla 8 se resume el manejo de las mamitis llevado a cabo en cada explotación durante el periodo de estudio y los antibióticos o asociaciones empleados con más frecuencia.

Tabla 8. Manejo sanitario de las mamitis en función de la explotación, durante el periodo estudio.

| EXPLOTACIÓN | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| Tratamientos durante la lactación | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Antibióticos incluidos en las formulaciones de los tratamientos más frecuentes | Cefalexina-kanamicina Amoxicilina-clavulánico | Penetamato Dihidro-estreptomicina Framicetina Ampicilina Dicloxacilina | Bencilpenicilina Dihidro-estreptomicina Ampicilina Dicloxacilina | Penetamato Dihidro-estreptomicina Framicetina Ampicilina Dicloxacilina |
| Tratamiento de todas las vacas al secado | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Antibióticos incluidos en las formulaciones de los tratamientos al secado | Penetamato iohidrato Penicilina benetamina Framicetina | Penetamato iohidrato Penicilina benetamina Framicetina | Penetamato iohidrato Penicilina benetamina Framicetina | Cefalonium dihidrato |
| Tiempo actuación del antibiótico durante el secado | 60 días | 60 días | 60 días | 50-60 días |
| Mantenimiento del equipo de ordeño | Revisión 1 vez al año | Revisión variable | Revisión variable | Revisión 1 vez al año |

#### 4.1.1.2. Protocolo de seguimiento de las infecciones.

En cada explotación se llevó a cabo el seguimiento del estado sanitario de las vacas que se encontraban en los 3 últimos meses de lactación y los 3 meses posteriores al parto registrando las posibles evoluciones del estado sanitario de cada cuarto a lo largo de los 6 controles mensuales que se llevaban a cabo, pudiendo el cuarto permanecer sano a lo largo de todo ese periodo o infectarse en cualquier momento por *Strep.uberis* u otro patógeno, lo cual se detectaría en el siguiente control, así mismo el estado del cuarto podía revertir en cualquier momento (con tratamiento o de forma espontánea) a lo largo del seguimiento.

Durante el periodo de estudio se analizaba junto con el ganadero el estado de gestación de todas las vacas, prestando atención a aquellas que iban acercándose al séptimo mes de gestación.

En cada control se tomaban muestras de cuarto (muestras foremilk: muestras de leche del principio del ordeño) de los cuatro pechos de cada vaca, las muestras de leche procedían del ordeño de la mañana o de la tarde, se recogían en frascos estériles de plástico, de 50 ml de capacidad y con tapón de rosca. Las muestras eran tomadas según se explica detalladamente a continuación:

- **Material requerido:**
  1. Tubos estériles de plástico con rosca, de 50 ml.
  2. Guantes de látex.
  3. Alcohol al 70 % (etílico o isopropílico) o toallas desinfectantes comerciales para frotar los pezones y secarlos.
  4. Jabón desinfectante comercial para limpiar los pezones antes del ordeño.
  5. Gradilla para los tubos de muestreo.
  6. Marcador indeleble para marcar los tubos con un código para la identificación de la muestra.
  7. Nevera con acumuladores de frío para transportar las muestras.

- **Protocolo de toma de muestras:**
  1. Identificación de los tubos.
     - Identificación de la vaca (número de crotal).
     - Ubicación anatómica del cuarto: DD (delantero derecho), DI (delantero izquierdo), TD (trasero derecho), TI (trasero izquierdo).

2. Limpieza de los pezones

Con el fin de obtener una muestra aséptica de leche, se limpiaban los pezones y piel de la zona adyacente de los restos de partículas de mayor tamaño como restos de cama, estiércol, etc. usando toallas de papel secas y desechables (una toalla para cada pecho).

Se utilizaban productos desinfectantes mediante un aplicador con forma de copa (para este baño desinfectante antes del ordeño se emplea el término anglosajón, pre-dipping), se aplicaban a todos los cuartos, se dejaban actuar durante 30 segundos, y finalmente se secaban con toallas de papel desechables.

3. Toma de la muestra

A continuación, antes de la toma de muestras, se desinfectaba la punta de pezón mediante toallitas desinfectantes. Se usaba una toallita por cada pezón, para evitar contaminación cruzada, comenzando por preparar los pezones más alejados del tomador de muestras, y terminando con los más cercanos al tomador (de lejos a cerca), para evitar contaminar los pezones al tocarlos inadvertidamente. En todo momento se intentaba que los pezones limpios no entrasen en contacto con la cola o patas sucias del animal.

La toma de muestras de leche se realizaba al contrario: iniciándose por los dos pezones más cercanos, seguida por los dos pezones más lejanos (de cerca a lejos, orden invertido al de la limpieza). Para recolectar la muestra, se descartaban los primeros 3 a 5 chorros de leche. Esos primeros chorros contienen altos niveles de bacterias que pueden producir cultivos con resultados erróneos. Se tomaba la tapa del tubo recolector y se mantenía sujeta con los dedos. Durante la recolección se acomodaba el tubo con cierto ángulo para prevenir que los contaminantes penetrasen dentro del tubo, y no permitir que el tubo tocase la punta del pezón.

Se tomaba un bote de 50 ml de muestra de leche que se colocaba en una nevera con acumuladores de frío para su traslado al laboratorio.

#### 4.1.1.3. Protocolo de toma de muestras medioambientales.

Como se resume en la tabla 9, se tomaron muestras medioambientales procedentes tanto del entorno de las vacas secas y de las vacas en lactación como del área de ordeño.

Tabla 9. Esquema de toma de muestras ambientales.

| ÁREA VACAS EN LACTACIÓN | ÁREA VACAS SECAS | ÁREA DE ORDEÑO |
|---|---|---|
| Pesebre | Pesebre | Pezonera |
| Material cama | Material cama | Suelo sala de ordeño |
| Agua bebedero | Agua bebedero | Manos ordeñador |
| Material pasillo | Material pasillo | Piel de ubre |
| Potrero | Potrero | — |

El material de muestreo era limpiado y esterilizado antes de cada nuevo uso. Cada muestra era tomada de forma diferente, empleando palas de diferente tamaño y material, frascos, bastoncillos o paños. Así mismo, para la recogida y traslado de las muestras se empleaban bolsas o frascos de diferentes tamaños.

Ilustración 5. Toma de muestras de bebedero (1). Toma de muestras de material de cama (2). Toma de muestras de estiércol del pasillo (3). Toma de muestras en el Área de las vacas secas (4).

Tabla 10. Protocolo de toma de muestras ambientales.

| MUESTRA | MATERIAL | MÉTODO | TIPO DE MUESTRA[1] |
|---|---|---|---|
| ÁREA VACAS EN LACTACIÓN | | | |
| Agua bebedero | Frasco ANACLIN 400 ml | 1 frasco/bebedero común<br>1 frasco 20 % bebederos automáticos | Individual/mixta |
| Material pasillo | Pala plástico (250 ml) | 1 pala por plaza<br>N.° puntos = 20 % n.° plazas | Mixta |
| Material cama | Mano con guantes | 2 puñados por cubículo<br>N.° cubículos = 20 % n.° plazas | Mixta |
| Pesebre | Pala plástico (250 ml) | 1 pala por plaza<br>N.° puntos = 20 % n.° plazas | Mixta |
| Suelo patio | Pala plástico (250 ml) | 1 pala por punto<br>N.° puntos = según área patio | Mixta |
| Tierra/potrero | Pala metálica (120 ml) | 1 pala por punto<br>N.° puntos = según área de la parcela/potrero | Mixta |
| ÁREA VACAS SECAS | | | |
| Agua bebedero | Frasco ANACLIN 400 ml | 1 frasco/bebedero común<br>1 frasco 20 % bebederos automáticos | Individual/mixta |
| Material pasillo | Pala plástico (250 ml) | 1 pala por plaza<br>N.° puntos = 20 % n.° plazas | Mixta |
| Material cama | Mano con guantes | 2 puñados por cubículo<br>N.° cubículos = 20 % n.° plazas | Mixta |
| Pesebre | Pala plástico (250 ml) | 1 pala por plaza<br>N.° punto s= 20 % n.° plazas | Mixta |
| Suelo patio | Pala plástico (250 ml) | 1 pala por punto<br>N.° puntos = según área patio | Mixta |
| Tierra/potrero | Pala metálica (120 ml) | 1 pala por punto<br>N.° puntos = según área de la parcela/potrero | Mixta |
| VACAS SECAS | | | |
| Piel de la ubre | Bastoncillo húmedo corto | 1 vez por punta de pezón y área adyacente (10 % vacas) | Individual |
| MUESTRAS DURANTE EL ORDEÑO | | | |
| Piel de la ubre vacas en ordeño | Bastoncillo húmedo corto | 1 vez por punta de pezón y área adyacente (10 % vacas) | Individual |
| Máquina ordeño (pezonera) | Bastoncillo húmedo corto | 1 vez por todo el interior de la pezonera | Individual |
| Suelo sala de ordeño | Paños estériles | 2 paños estériles (calcetines)<br>Recorrido pasillos sala de ordeño | Mixta |
| Manos/guantes manipulador (ordeñador) | Bastoncillo húmedo corto | 1 vez por palma de la mano hábil | Individual |

(1) Individual (muestra de un solo punto, 1 bebedero, 1 vaca). Mixta (unión de varias muestras de distintos puntos; bebederos individuales, material de cama de distintos cubículos).

Las muestras podían ser individuales (1 sólo bebedero o piel de ubre de 1 vaca) o estar constituidas por la toma de muestras en diferentes puntos (20 % de las camas; 20 % de los bebederos individuales), según un protocolo establecido (tabla 10). La naturaleza del material recolectado variaba en función del lugar de muestreo. Las zonas de tránsito (muestras de pasillo) estaban compuestas fundamentalmente de estiércol, el material de la cama variaba dependiendo de la explotación, encontrando paja o lona.

La recogida de muestras medioambientales se llevó a cabo estacionalmente. Los meses de invierno se corresponden con los meses de enero, febrero y marzo; los meses de primavera se corresponden con los meses abril, mayo y junio; los meses de Verano se corresponden con los meses de julio, agosto y septiembre; y los meses de Otoño se corresponden con los meses de octubre, noviembre y diciembre. La toma de muestras medioambientales se inició en invierno de 2010 y se finalizó en verano de 2011, llevándose a cabo los muestreos en todas las explotaciones en estudio según se iban incorporando al proyecto hasta completar los cuatro periodos estacionales.

### 4.1.2. Análisis de las muestras de leche.

#### 4.1.2.1. Análisis microbiológico.

Una vez que las muestras llegaban al laboratorio del CIFA (Laboratorio Agrícola - Centro de Investigación y Formación Agrarias. Gobierno de Cantabria), se homogeneizaban cuidadosamente y de cada muestra de leche se sembraban 10 µl por extensión en superficie en el medio agar sangre esculina (ASE) que contenía 0,3 g de esculina (Merck), 0,15 g de citrato férrico (Sigma), 12 g de TSA (Oxoid) y sangre de cordero al 5 %. Las placas se incubaban durante 24-48 h a 37 °C. En el análisis microbiológico se pretendía identificar cualquier patógeno mamario presente en la leche, para ello se empleaba el protocolo general para el diagnostico de infecciones mamarias según Laboratory Handbook on Bovine Mastitis by The National Mastitis Council (Hogan et al.,1999b), como se puede observar en la ilustración 14.

Como se describe en este manual los cultivos obtenidos a las 24 h de incubación que presentaban más de 3 colonias bacterianas diferentes se consideraron como muestras contaminadas y por tanto no se examinaban.

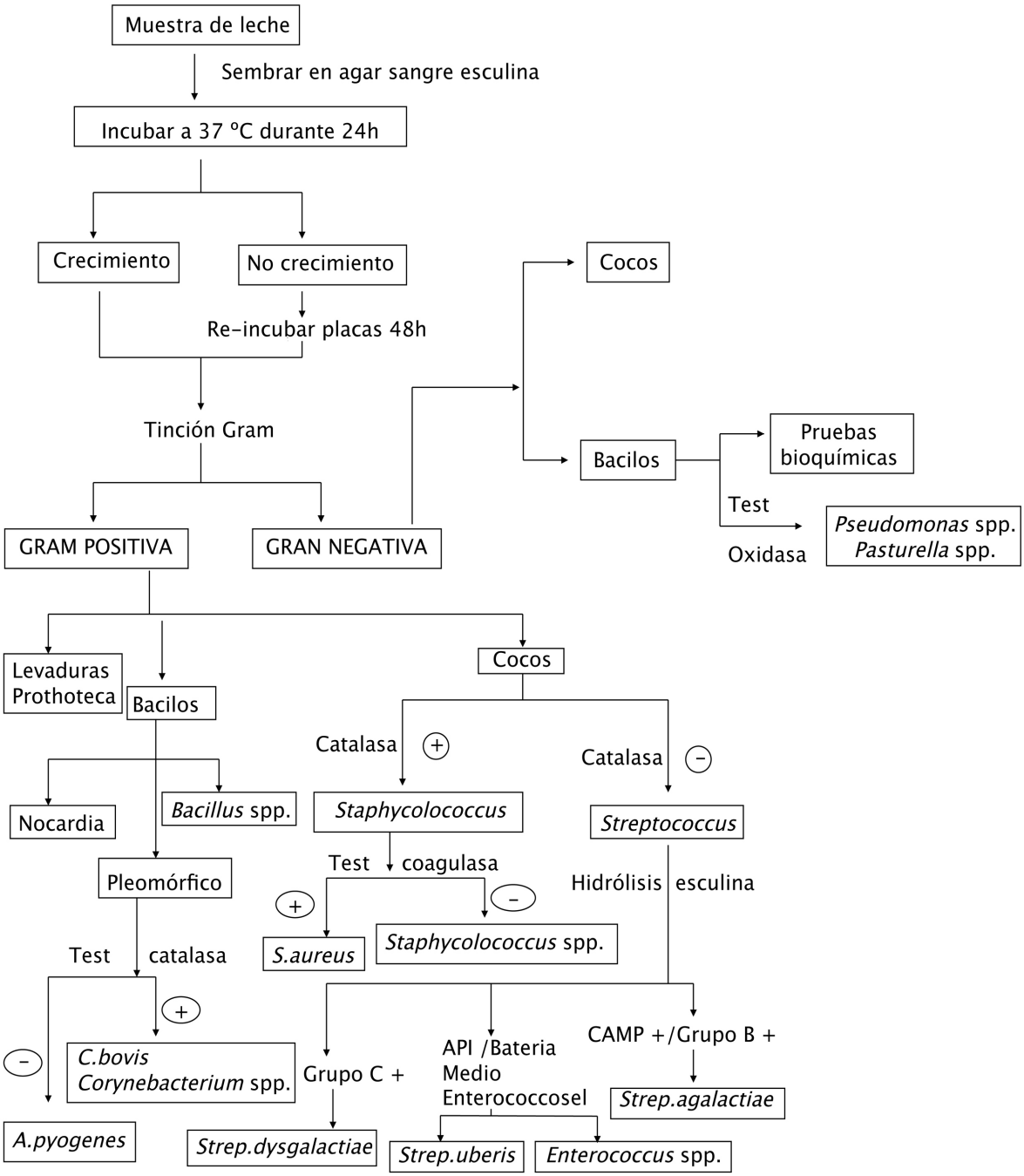



Ilustración 6. Protocolo general para el diagnóstico de infecciones mamarias.

Protocolo adaptado del manual de Laboratory Handbook.

Las colonias alfa hemolíticas, esculina positivas, catalasa negativas, y con aspecto de cocos Gram positivos al microscopio eran consideradas como presuntas cepas de *Strep.uberis*. Estos aislamientos de *Streptococcus uberis* se sembraban en medio Edwards

(Oxoid), y se incubaban a 37 °C durante 24 h, para conseguir un aislamiento puro, en las ocasiones en que no era posible la identificación inmediata de la colonia, tras la incubación en medio Edwards el aislado era almacenado a -80 °C en BHI con 40 % de glicerol para su posterior caracterización.

#### 4.1.2.2. Análisis del recuento de células somáticas (RCS).

Tras la siembra en el laboratorio del CIFA, las muestras eran llevadas al Laboratorio Interprofesional Lechero de Cantabria (LILC) donde se analizaban dentro de las 24-48 h posteriores a su recolección. En el caso de no poder realizar el RCS en 48 h posteriores a su recolección, se les añadía 0,3 ml de Azidiol. La determinación de parámetros físico-químicos y microbiológicos se llevó a cabo mediante el equipo COMBIFOSS FT 6000 (FOSS, Barcelona, España). De estos resultados sólo se ha incluido en el estudio el recuento de células somáticas, el resto de los datos como grasa, proteína, lactosa, extracto seco magro (E. S. M.), o el recuento de bacterias (Gérmenes/ml), sólo han tenido un valor informativo.

### 4.1.3. Análisis de las muestras medioambientales.

Las muestras medioambientales se procesaban dependiendo de la naturaleza del material analizado.

**PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

- **Material requerido:**
  - Tijeras estériles.
  - Bote de etanol 70 % para esterilizar material.
  - Filtros 45 µm y embudos estériles para el procesado de agua de bebedero.
  - Bolsas estériles Stomacher para el procesado de muestras.
  - Placas petri de 90 mm y 150 mm.
  - Arcón congelador (-80 °C/-20 °C).
- **Protocolo de preparación de las muestras de cama y pesebre:**
  - Cortar el material hasta obtener briznas de menos de 2 cm. Agitar enérgicamente el material hasta conseguir una muestra uniforme.

— Pesar una muestra representativa de 10 g.

— Cambiar de guantes en cada muestra.

- **Procesado de las muestras sólidas y semisólidas:**

  — Pesar 10 g del material sólido o semisólido.

  — Homogenizar muestra en la misma bolsa de muestreo.

- **Procesado de las muestras de agua de los bebederos:**

  — Filtrar entre 300 y 500 ml de la muestra de agua a través de un microfiltro millipore de 0,45 µm.

  — Transferir el filtro a una bolsa estéril.

- **Procesado de las muestras recogidas con paños estériles o bastoncillos:**

  — Colocar directamente en una bolsa estéril para su posterior tratamiento.

**ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO DE LAS MUESTRAS EN ESTREPTOCOCOS.**

Una vez preparada la muestra, el material o porción de material (10 g) se sumergía en 90 ml de caldo Brain Heart infusion (BHI; Oxoid) enriquecido con el suplemento selectivo para estreptococos (SR126E, Oxoid) para favorecer su crecimiento. A continuación, las muestras se agitaban durante 5 minutos a 10-15 r. p. m. y se incubaban a 37 °C durante 24 h.

Tras la incubación, se sembraban por agotamiento 100 µl de las muestras enriquecidas en medio de cultivo selectivo Edwards (Oxoid) y se incubaban a 37 °C durante 24 h.

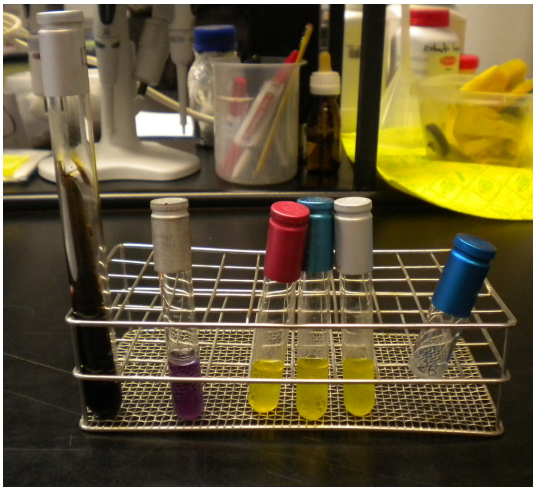
Al igual que en las muestras de leche, se consideraban colonias sospechosas de *Strep.uberis*, aquellas colonias alfa hemolíticas, esculina positivas, catalasa negativa, y con aspecto de cocos Gram positivos al microscopio. Los cultivos puros eran almacenados a -80 °C en BHI con 20 % de glicerol hasta su posterior análisis.

### 4.1.4. Caracterización de las cepas de *Streptococcus uberis* aisladas de muestras de leche y muestras medioambientales.

Las colonias sospechosas de *Strep.uberis,* obtenidas tanto de las muestras de leche como de las muestras medioambientales, se recuperaban a partir de los cultivos congelados mediante siembra en medio Edwards e incubación durante 24 h a 37 °C.

#### 4.1.4.1. Identificación bioquímica de los aislamientos sospechosos para *Strep.uberis.*

Los aislamientos cultivados en medio Edwards (Oxoid) se identificaban hasta el nivel de especie mediante la batería de pruebas bioquímicas propuesto por McDonald y McDonald (1976) con alguna modificación. El test utilizado incluye: tinción de Gram, producción de catalasa, test de CAMP, crecimiento en agar bilis-esculina (Oxoid), fermentación de carbohidratos en caldo de rojo fenol (BD Europe, Le pont de Claix, France) incluyendo un 1 % de azucares manitol (Difco), sorbitol (Difco) e inulina (Oxoid) respectivamente. Para la hidrólisis de la arginina se utilizó Moeller descarboxilasa (Difco) añadiendo 1 % de arginina (Merck) (ilustración 7).



Fuente: Lucía Lavín-Alconero

Ilustración 7. Determinación de un aislamiento de *Strep.uberis* mediante pruebas bioquímicas.

Tras someter a los aislamientos sospechosos de *Strep.uberis* a las 8 pruebas bioquímicas, se clasificaban como positivos, dudosos o negativos para *Strep.uberis*, en función de sus características (tabla 11).

Si el aislamiento presentaba un perfil dudoso se realizaba una segunda identificación con el sistema API 20 Strep (Biomériux, Madrid, España) que presenta 20 pruebas bioquímicas miniaturizadas (ilustración 8). Las reacciones se leían a las 4 y 24 h. El código del perfil obtenido se interpretaba con el software on line Apiweb (Biomériux, Madrid, España).

Tabla 11. Criterio de asignación para los aislamientos sospechosos identificados.

| REACCIONES | POSITIVO | DUDOSO | NEGATIVO |
|---|---|---|---|
| Bilis-esculina | Negro | Parcialmente negro | No se oscurece el medio |
| Arginina | Morado Intenso | Morado Claro | Amarillo o blanco |
| Manitol | Amarillo | Amarillo-rojizo | Rojo |
| Sorbitol | Amarillo | Amarillo-rojizo | Rojo |
| Inulina | Amarillo | Amarillo-rojizo | Rojo |
| Test catalasa | Producción de burbujas | Parcial producción de burbujas | No producción de burbujas |
| Test CAMP | Hemólisis en forma de flecha | Hemólisis leve | No hemólisis en forma de flecha |
| Tinción Gram | Violeta o azul oscuro | Tinción no clara | Rosa |

Fuente: Lucía Lavín-Alconero

Ilustración 8. Resultado colorimétrico de *Streptococcus uberis* tras someterse al test API 20 Strep.

- **Conservación de los aislamientos sospechosos.**

Los aislamientos sospechosos, identificados como positivos o dudosos para *Strep.uberis* por las pruebas bioquímicas anteriores, se cultivaban en BHI (Oxoid) y se incubaban a 37 °C durante 24 h hasta que el caldo presentaba aspecto turbio. A continuación, se añadía glicerol al 40 % y se conservaban a -80 °C en crioviales de 5 ml (Deltalab, Barcelona, España). Los aislamientos no diagnosticados como presuntos *Strep.uberis* no se consideraban para el estudio.

### 4.1.4.2. Caracterización por PCR de los aislamientos sospechosos para *Strep.uberis.*

Los aislamientos conservados a -80 °C se recuperaban en medio Edwards (Oxoid) para llevar a cabo su posterior caracterización por PCR.

La extracción del ADN se llevó a cabo mediante Instagene matrix (Biorad Laboratories, Hércules, CA, USA) según el protocolo descrito por el fabricante. Se amplificaba un fragmento de 445 pares de bases (bp), procedente de la región 16S ADNr, mediante los cebadores Ub-I 5´ CGCATGACAATAGGGTACA 3′ y Ub-II 5´ GCCTTTAACTTCAGACTTATCA 3´ descritos por Hassan at al. (2001). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador (eppendorf mastercycler personal) con las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos consecutivos de un proceso de desnaturalización del ADN a 95 °C durante 1 minuto, otra etapa a 58 °C durante 90 segundos donde se produce la hibridación de los cebadores al ADN y un proceso de elongación a 72 °C durante 60 segundos (Hassan et al., 2001). En cada tanda de muestras amplificadas, se utilizaba un control positivo, concretamente la cepa tipo de *Strep.uberis* procedente de la colección española de cultivos tipo (CECT994) y un control negativo que correspondía a una cepa de *Enterococcus faecalis* procedente de la colección del laboratorio, además de un blanco de reacción sin ADN.

Para cada reacción de PCR, con un volumen final de 25 µl, se utilizaban los siguientes reactivos: 1 preparado de PCR comercial que contiene la enzima liofilizada, Taq-polimerasa, BSA, Buffer de reacción y dexosinucleotidos trifosfato (dNTPs) (*Ready-to-go PCR beads*, GE Healthcare), 0,5 µl del cebador Ub-I, 0,5 µl de cebador Ub-II, 23 µl de agua estéril y 1 µl de la preparación de ADN. La concentración final de los cebadores fue de 1 µM.

Para comprobar que el fragmento del gen 16S ADNr de 445 pb había sido amplificado correctamente, el producto amplificado se resolvió en un gel de agarosa al 1,5 % (1,5 g de agarosa en 100 ml de tampón TAE 1 × (40 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA, ph 8,0) junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (Biotools, Madrid, España). La electroforesis se llevó a cabo a 6 V/cm durante 45 minutos. Posteriormente, el gel se teñía con SYBRgold® (Invitrogen, Life Technologies, SA, Madrid, España) en una dilución 1:10000 en tampón TAE 1 × durante 15 min., se colocaba sobre un transiluminador de luz ultravioleta Gel Logic Imaging system (Carestream Health, Woodbridge, CT, USA) y se tomaba una imagen utilizando el programa KODAK Molecular Imaging Software.

#### 4.1.4.3. Comparación de los 3 métodos de identificación de *Streptococcus uberis.*

Con el objetivo de definir un protocolo de actuación en la caracterización de *Strep. uberis*, se realizó una selección de un número pequeño de aislamientos obtenidos a partir de muestras de leche. Los aislamientos seleccionados se analizaron mediante los tests de pruebas bioquímicas (convencional y API 20 Strep) y PCR.

### 4.1.5. Definiciones asociadas a la dinámica de infecciones mamarias producidas por *Streptococcus uberis.*

A lo largo de este estudio se llevó a cabo el seguimiento del estado sanitario de las vacas que se encontraban en los 3 últimos meses de lactación y los 3 meses posteriores al parto, para lo cual se tomaban mensualmente muestras de leche de cuarto durante ese periodo. Nuestra intención era tener al menos 2 muestras de leche de cuarto antes del secado y 2 muestras de leche de cuarto después del parto, pero como esto no siempre era posible por diversas razones (baja de la vaca por venta o sacrificio; problemas reproductivos que interrumpían la gestación (abortos espontáneos) o pérdida de fertilidad por causas idiopáticas que impedían el inicio de la gestación; cuartos que durante el periodo de seguimiento habían sido tratados con antibióticos, lo que invalidaba la muestra), para interpretar los resultados se definieron los siguientes términos:

- **Seguimientos completos:** se refiere a los cuartos de los que se tienen datos de al menos 2 controles de los 3 previstos antes del secado y de dos controles de los 3 previstos después del parto.
- **Seguimientos incompletos o antes del secado:** se refiere a los cuartos que, por alguna razón, no cumplen esta condición, pero de los que se tiene al menos 2 muestras de leche de cuarto antes del secado.

En este sentido, hay que considerar que el aislamiento de *Strep.uberis* en un cuarto no se consideraba equivalente a cuarto infectado, de acuerdo con las siguientes definiciones:

- **Cuarto infectado:** aquel en el que se aislaba *Strep.uberis* en un control mensual y a la vez presentaba un alto recuento de células somáticas (>300000 cs/ml) o

en el que se aislaba *Strep.uberis* durante más de 1 control y al menos en uno de ellos presentaba un alto recuento de células somáticas (>300000 cs/ml).

- **Proceso infeccioso:** el proceso que se produce en aquellos cuartos en los que se detectaba infección por *Strep.uberis* en algún momento durante el periodo de seguimiento, antes del secado y después del parto.

### 4.1.6. Análisis de los datos.

Se generó una base de datos empleando el programa Access versión 2003. Se describieron los porcentajes de las variables cualitativas, y la relación entre las variables categóricas (cuartos DD, DI, TD, TI) se comprobó utilizando el test$^2$ o test de Fisher se consideraron diferencias significativas con una $p < 0,05$. Para el análisis de las variables cuantitativas como la variable Logaritmo de RCS, se evaluó el ajuste a la distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, empleando el test de la t de student o la prueba de Kruskal-Wallis, según los casos. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 17.0.

## 4.2. RESULTADOS.

### 4.2.1. Muestras de leche analizadas.

Se analizaron 3.086 muestras de cuarto obtenidas de 233 vacas pertenecientes a las 4 ganaderías en estudio, que se encontraban en diferentes estados de gestación, correspondientes a los meses previos al secado y meses posteriores al parto.

En la tabla 12 se puede observar la distribución del número de muestras de leche de cuarto que se han tomado durante el estudio por explotación, y por ubicación del cuarto. El número de muestras de cuarto tomadas es diferente en cada explotación pues dependía del número de vacas en lactación, que llegaron al secado durante el periodo de estudio. Aplicando una chi-cuadrado se demuestra que no existen diferencias significativas entre el número de muestras tomadas en cada cuarto (DD, DI, TD, TI) ($p < 0,001$).

Tabla 12. Distribución de las muestras de leche obtenidas en las 4 explotaciones por cuarto.

| TIPO DE MUESTRAS | EXPLOTACIÓN | | | | TOTAL |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| N.° Vacas | 66 | 32 | 79 | 56 | 233 |
| Total muestras de cuartos | 964 | 467 | 858 | 797 | 3086 |
| DD (delantero derecho) | 227 (23,5 %) | 117 (25 %) | 220 (25,6 %) | 200 (25,1 %) | 764 (24,8 %) |
| DI (delantero izquierdo) | 239 (24,8 %) | 112 (24 %) | 211 (24,6 %) | 195 (24,5 %) | 757 (24,5 %) |
| TD (trasero derecho) | 253 (26,2 %) | 119 (25,5 %) | 219 (25,5 %) | 200 (25,1 %) | 791 (25,6 %) |
| TI (trasero izquierdo) | 245 (25,4 %) | 119 (25,5 %) | 208 (24,2 %) | 202 (25,3 %) | 774 (25,1 %) |

- **Recuento de células somáticas de las muestras de cuarto.**

Para valorar el estado sanitario de las ubres a través del recuento de células somáticas, se estudió la variable Log RCS (tabla 13 e ilustración 9).

Tabla 13. Estadística descriptiva de la variable Log RCS en las 4 explotaciones en estudio.

| EXPLOTACIONES | N | MEDIA[1] ± (DE) (CÉLULAS/ML) | MEDIANA |
|---|---|---|---|
| 1 | 846 | 5,16a±0,79 (144544 cs/ml) | 5,15 |
| 2 | 386 | 5,34a±0,71 (218776 cs/ml) | 5,27 |
| 3 | 781 | 5,27a±0,82 (186209 cs/ml) | 5,20 |
| 4 | 666 | 5,03a±0,78 (107152 cs/ml) | 5,0 |

[1] Valores con distinta letra indican diferencias significativas.

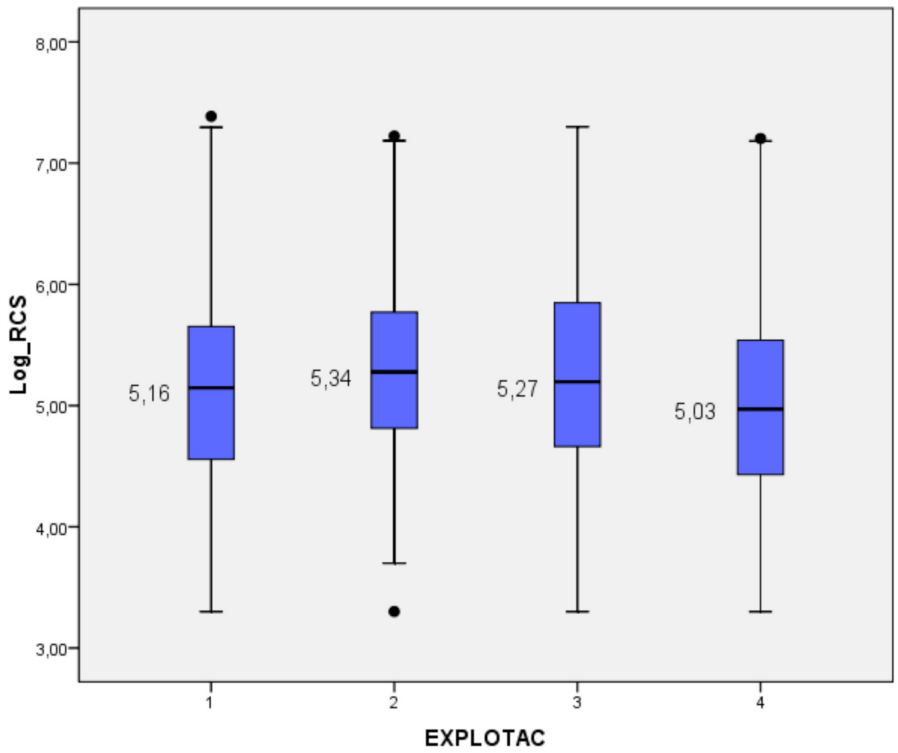



Ilustración 9. Representación de la distribución de los valores de Log RCS en las muestras tomadas por explotación.

Se llevó a cabo el recuento de células somáticas (RCS) en 3086 muestras de leche de cuarto tomadas a lo largo del periodo de estudio, de las que se dispone de los resultados de 2679 muestras. Las 407 muestras restantes (13,2 %) fueron consideradas como no válidas, bien porque llegaron deterioradas al LILC o bien porque el RCS estaba fuera del rango de acreditación del equipo.

Tras el análisis de la distribución de las muestras, su ajuste o no a una distribución normal, según el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) se deduce que la variable Log RCS no sigue una distribución normal (ilustración 10) por lo que para llevar a cabo el análisis de medias entre las explotaciones en estudio se aplicó el test de Kruskal-Wallis, no obteniéndose diferencias significativas entre la variable Log RCS en las 4 explotaciones, $p < 0,001$.

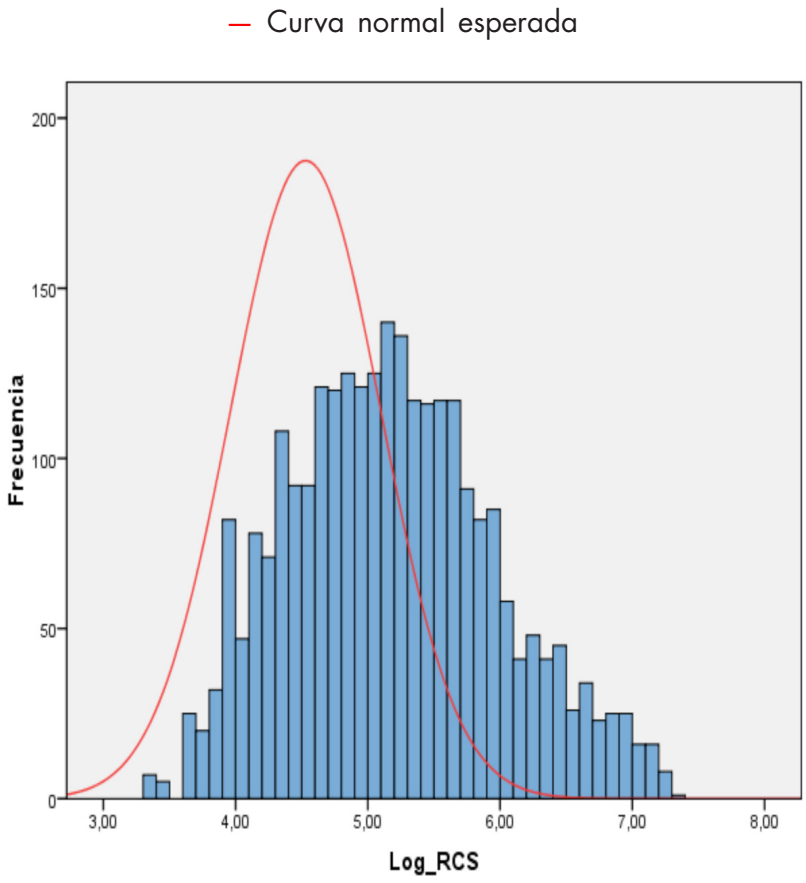



Ilustración 10. Distribución de la variable Log RCS y chequeo de la normalidad.

### 4.2.2. Patógenos mamarios aislados de muestras de leche.

Como ya se ha comentado en el apartado 4.1.2.1., la identificación de los patógenos mamarios se llevó a cabo según el protocolo general para el diagnóstico de infecciones mamarias del Laboratory Handbook on Bovine Mastitis by The National Mastitis Council (Hogan et al., 1999), basado en técnicas bioquímicas.

En el 34,4 % de las muestras de leche de cuarto analizadas no se aisló ningún patógeno (tabla 14). La relación de patógenos mamarios se presenta en la tabla 15, de donde se deduce que entre los patógenos aislados más del 50 % eran patógenos principales y entre éstos, *Strep.uberis* representaba el 50 % de las cepas identificadas. Entre los patógenos secundarios, *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) se aisló en

Tabla 14. Relación muestras analizadas.

| TIPO DE MUESTRA | N.º | FRECUENCIA % |
|---|---|---|
| Con crecimiento de algún patógeno | 1830 | 59,3 |
| Sin crecimiento | 1061 | 34,4 |
| Muestras no válidas[1] | 225 | 7,3 |
| TOTAL | 3086 | 100,0 |

[1] Muestras contaminadas o perdidas

Tabla 15. Patógenos mamarios aislados de las muestras e identificados mediante técnicas bioquímicas.

| PATÓGENO | N.º | FRECUENCIA % | TIPO DE PATÓGENO |
|---|---|---|---|
| *C.bovis* | 169 | 9,2 | PS[2] 45,5 % |
| *Corynebacterium* spp. | 132 | 7,2 | |
| *SCN*[1] | 532 | 29,1 | |
| *S.aureus* | 14 | 0,8 | PP[3] 54,5 % |
| *Strep.agalactiae* | 20 | 1,1 | |
| *Strep.dysgalactiae* | 17 | 0,9 | |
| *Strep.uberis* | 503 | 27,5 | |
| *Enterococcus* | 103 | 5,6 | |
| *Streptococcus* spp. | 178 | 9,7 | |
| *E.coli* | 34 | 1,9 | |
| *Proteus* spp. | 39 | 2,1 | |
| Enterobacteriaceae | 8 | 0,4 | |
| Otros Gram - | 15 | 0,8 | |
| Otros Gram + | 66 | 3,6 | |
| TOTAL | 1830 | 100,0 | — |

[1] SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativo.
[2] PS: Patógeno secundario.
[3] PP: Patógeno principal.

el 29,1 % de las muestras, representando el 64 % de los patógenos secundarios. Por otro lado, si la clasificación la planteamos respecto al modo de transmisión, los agentes infecciosos se dividen en patógenos contagiosos (donde *S.aureus* y *Strep.agalactiae* son los más representativos del grupo), que en este estudio presentan una frecuencia de 5 % entre los patógenos principales (18,3 % respecto al conjunto de patógenos), y patógenos ambientales (donde *Strep.uberis, Enterococcus* spp., *Strep.dysgalactiae, E.coli* son los más representativos del grupo) con una frecuencia cercana al 95 % (81,7 % respecto al conjunto de patógenos). En la ilustración 11, se pueden observar estas diferencias.

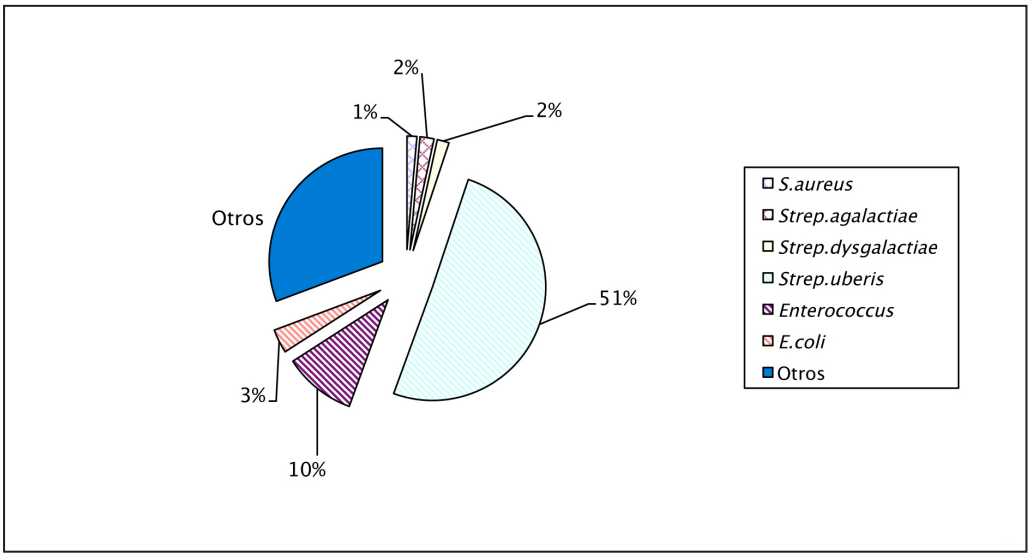



Ilustración 11. Distribución de patógenos principales (ambientales y contagiosos).

### 4.2.3. Comparación de los 3 métodos de identificación de *Streptococcus uberis*.

Con el fin de determinar la técnica más apropiada para la caracterización de *Strep.uberis*, se seleccionó un pequeño grupo de aislamientos obtenidos a partir de muestras de leche.

Para ello, se seleccionaron 154 muestras de leche de cuarto procedentes de 73 vacas en las que además de aislarse colonias sospechosas de *Streptococcus uberis* presentaban un recuento de células somáticas (RCS) superior a 300000 cs/ml, considerado en este estudio como el umbral de sospecha de infección mamaria.

De estas muestras, 110 (71,4 %) presentaron altos recuentos de células somáticas (>800.000 cs/ml) y 44 muestras (28,6 %) presentaron recuentos medios de células somáticas (300000 a 500000 cs/ml). Para el estudio comparativo se seleccionaron de manera

aleatoria 18 aislamientos sospechosos de *Strep.uberis* con alto recuento de células somáticas y 19 aislamientos sospechosos de *Strep.uberis* con recuento medio de células somáticas.

- **Test de pruebas bioquímicas convencionales.**

De los 37 aislamientos 12 (32,4 %) se identificaron como *Strep.uberis* con el perfil bioquímico esperado, es decir, aislamientos que presentaban tinción Gram positiva, catalasa negativa, fermentación de azucares (manitol, sorbitol e inulina), hidrólisis de bilis-esculina, arginina y esculina positiva (perfil I), mientras que en los 25 aislamientos restantes su identificación fue dudosa por diferentes razones: 18 (48,7 %) se identificaron como *Strep. uberis* dudosos debido a un resultado negativo en la prueba de hidrólisis de la arginina (perfil II); 6 (16,2 %), presentaban resultados negativos o dudosos para 2 de las pruebas bioquímicas: crecimiento en el medio agar bilis-esculina y en la hidrólisis de la arginina (perfil III); y solamente 1 aislamiento (2,7 %) presentó un perfil con resultado negativo para la hidrólisis de la arginina y para la fermentación del sorbitol (perfil IV); (tabla 16).

Tabla 16. Perfiles bioquímicos obtenidos al realizar el test bioquímico convencional.

| | **IDENTIFICADO COMO *STREP.UBERIS*** | **IDENTIFICACIÓN DUDOSA** | | |
|---|---|---|---|---|
| Perfil | I | II | III | IV |
| N | 12 | 18 | 6 | 1 |
| **PRUEBAS** | **RESPUESTA A LA PRUEBA** | | | |
| Bilis-esculina | + | + | +/- | + |
| Arginina | + | +/-* | +/-* | +/-* |
| Sorbitol | + | + | + | +/- |
| Manitol | + | + | + | + |
| Inulina | + | + | + | + |
| Tinción Gram | Cocos en cadena Gram + | Cocos Gram + | Cocos Gram + | Cocos Gram + |
| Catalasa | - | - | - | - |
| Esculina | + | + | + | + |

+/- perfiles dudosos, aquellos aislamientos que no presentan un viraje completo del medio.

- **Sistema de identificación API 20 Strep.**

El sistema API 20 Strep identificó 31 de los 37 aislamientos (83,7 %) como *Strep.uberis* con un porcentaje de fiabilidad del 99,9 %. Uno de los aislamientos se identificó como *Strep.uberis* con un porcentaje de fiabilidad entre 83-95 %. El resto de los aislamientos se identificaron como *Enterococcus durans*, *Aerococcus viridans*, *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae* (tabla 17).

El perfil numérico (7563730) correspondiente a *Strep.uberis* obtenido con el software on line Apiweb de Biomériux (Biomériux, Madrid, España) se observó en 14 de los 31 aislamientos identificados como *Strep.uberis*. Sin embargo, el resto de los aislamientos (18) presentaron diferentes perfiles bioquímicos, asociados también a *Strep.uberis*, pero los mismos resultados para algunas pruebas bioquímicas como: hidrólisis de la esculina (ESC), prueba de la fosfatasa alcalina (ALP) y la fermentación de los azúcares manitol (MAN), ribosa (RIB), lactosa (LAC), trehalosa (TRE) y arabinosa (ARA).

Según la experiencia obtenida, para una correcta identificación de *Strep.uberis* es necesario visualizar el sistema API 20 Strep a las 4 h para las pruebas enzimáticas y tras 24 horas de incubación para el completo viraje de los azúcares.

- **16S ADNr-PCR.**

El fragmento de 445 pb correspondiente al gen 16S ADNr, se amplificó por PCR en 34 aislamientos (91,8 %), mientras que 3 aislamientos no amplificaron esta región específica de *Streptococcus uberis* (tabla 17).

Tabla 17. Identificación de 37 aislamientos por tres técnicas.

| | MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | TEST BIOQUÍMICO CONVENCIONAL PERFILES | | | | API 20 STREP | | | PCR | |
| Aislamientos* | I | II | III | IV | 99,9 | 83-99 | Neg. | Pos. | Neg. |
| N1=18 | 7 | 8 | 2 | 1 | 14 | 1 | 3 | 16 | 2 |
| N2=19 | 5 | 10 | 4 | 0 | 17 | 0 | 2 | 18 | 1 |
| TOTAL | 12 | 18 | 6 | 1 | 31 | 1 | 5 | 34 | 3 |

* Clasificación de acuerdo con el RCS: N1 = (300000-500000 cs/ml); N2 = (>800000 cs/ml).

Tabla 18. Identificación de aislamientos mediante 3 técnicas.

| AISLAMIENTOS | PERFIL | API 20 STREP | API 20 STREP (%) | PCR | RCS (x1000) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | III | *Strep.agalactiae* | 0 | *Strep.uberis* | 303 |
| 2 | II | *Ent. durans* | 0 | *Strep.uberis* | 2937 |
| 3 | II | *Strep.uberis* | 83,4 | *Strep.uberis* | 1642 |
| 4 | III | *Ent.faecalis* | 86,8 | *Strep.uberis* | 463 |
| 5 | III | *Strep.uberis* | 99,8 | *Strep.uberis* | 336 |
| 6 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 301 |
| 7 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 468 |
| 8 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 469 |
| 9 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 472 |
| 10 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 834 |
| 11 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 5613 |
| 12 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 16855 |
| 13 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 395 |
| 14 | III | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 1064 |
| 15 | III | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 2278 |
| 16 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 340 |
| 17 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 444 |
| 18 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 446 |
| 19 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 465 |
| 20 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 471 |
| 21 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 8582 |
| 22 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 13880 |
| 23 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 307 |
| 24 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 310 |
| 25 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 351 |
| 26 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 353 |
| 27 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 360 |
| 28 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 960 |
| 29 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 2376 |
| 30 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 3019 |
| 31 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 3074 |
| 32 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 3757 |
| 33 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 7826 |
| 34 | I | *Strep.uberis* | 99,9 | *Strep.uberis* | 8010 |
| 35 | III | *Aerococcus viridans* | 0 | otros | 6446 |
| 36 | IV | *Gardnerella vaginalis* | 0 | otros | 878 |
| 37 | II | *Strep.uberis* | 99,9 | otros | 313 |

- **Comparación de los tres métodos de identificación.**

En la tabla 18 se presentan los resultados completos obtenidos en la identificación de los aislamientos mediante los 3 métodos: test bioquímico convencional, API 20 Strep y PCR.

En tabla 19, donde se hace un resumen de los resultados, se puede observar que los 12 aislamientos identificados como positivos para *Strep.uberis* por el test bioquímico convencional existe una total concordancia con los 2 métodos: API 20 Strep y PCR, mientras que en los 25 aislamientos identificados como dudosos por el test bioquímico convencional se obtienen resultados discordantes al analizar los aislamientos con las otras 2 técnicas. Se podría decir que dentro de los 18 aislamientos dudosos (perfil II), 2 aislamientos fueron identificados por API 20 Strep como *Enterococcus durans* y *Aerococcus viridans,* y PCR sólo identificó uno de ellos como negativo, concretamente al *Aerococcus viridans.* Un aislamiento, fue identificado por API 20 Strep como *Strep.uberis* con una probabilidad de 99,9 %, es dado como negativo por PCR; mientras que *Enterococcus durans* se identificó como positivo por PCR. De los 6 aislamientos identificados como dudosos (perfil III), dos de ellos fueron identificados como negativos por API 20 Strep que los identificó como *Ent.faecalis* y *Strep.agalactiae*, y a su vez, fueron identificados por PCR como positivos, los 4 restantes fueron identificados como positivos por ambos métodos. Por último, 1 de los aislamientos dudosos (perfil IV), fue identificado por API 20 Strep como *Gardnerella vaginalis*, y negativo a PCR.

Tabla 19. Cuadro comparativo de las identificaciones mediante los 3 métodos: Test bioquímico convencional, Sistema API 20 Strep y PCR.

| | TEST BIOQUÍMICO CONVENCIONAL | | API 20 STREP | | | PCR | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Pos. | Dudoso | 99,9 % | 83,4 % | Otros | Pos. | Neg. |
| Positivo | 12 | 0 | 12 | 0 | 0 | 12 | 0 |
| Dudoso | 25 | 18 | 15 | 1 | 2[1] | 16 | 2 |
| | | 6 | 4 | 0 | 2[2] | 6 | 0 |
| | | 1 | 0 | 0 | 1[3] | 0 | 1 |
| TOTAL | 37 | 25 | 31 | 1 | 5 | 34 | 3 |

[1] *Enterococcus durans* y *Aerococcus viridans.* [2] *Ent.faecalis* y *Strep.agalactiae.*
[3] *Gardnerella vaginalis,* Pos. = Identificación positiva a *Strep.uberis,* Neg. = negativo.

En base a los resultados obtenidos para la caracterización de *Strep.uberis*, se utilizó como criterio una combinación de 2 de las técnicas empleadas, considerando que los aislamientos pertenecían a dicha especie cuando las 8 pruebas de la técnica convencional presentaban un resultado acorde al perfil bioquímico de *Strep.uberis* o cuando al menos 6 de las 8 pruebas presentaban un resultado positivo y se confirmaba con la PCR para el gen 16S ADNr.

- **Comparación de los resultados obtenidos en la identificación de *Strep.uberis* mediante batería de pruebas bioquímicas y PCR en el conjunto de los datos.**

En el conjunto del proyecto, se aislaron un total de 661 cepas sospechosas de ser *Strep.uberis* (503 cepas aisladas de muestras de leche y 158 cepas aisladas de medio-ambiente), de las que el 85,3 % fueron confirmadas por PCR (tabla 20).

Tabla 20. Aislamientos identificados como *Streptococcus uberis* por pruebas bioquímicas frente a PCR, para el conjunto de los datos.

| MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN | | % AISLADOS IDENTIFICADOS COMO STREP.UBERIS | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | EXPLOTACIÓN | | | | | | | | TOTAL |
| | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | |
| | | UBRE | MEDIO-AMBIENTE | UBRE | MEDIO-AMBIENTE | UBRE | MEDIO-AMBIENTE | UBRE | MEDIO-AMBIENTE | |
| Batería pruebas bioquímicas | | 132 | 33 | 164 | 19 | 141 | 21 | 66 | 85 | 661 |
| PCR | confirmados | 116 (87,9 %) | 14 (42,4 %) | 145 (88,4 %) | 11 (57,9 5) | 134 (95 %) | 15 (71,42 %) | 62 (94 %) | 54 (63,5 %) | 551 (85,3 %) |
| | negativos | 6 | 19 | 16 | 8 | 5 | 6 | 4 | 31 | 95 (14,4 %) |
| | Perdidos* | 10 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | - |

* No revivificación tras el periodo de almacenamiento a -80 °C.

- **RCS según tipo de muestras.**

La relación de valores medios de recuentos de células en los cuartos infectados con *Strep.uberis*, los cuartos sin crecimiento de patógeno y los cuartos infectados por otros patógenos se pueden observar en la tabla 21.

Tabla 21. Relación RCS con el tipo de muestra.

| TIPO DE MUESTRA | N [1] | MEDIA [2] ± (DE) (CÉLULAS /ML) | MEDIANA |
|---|---|---|---|
| Sin crecimiento | 924 | 4,87c±0,71 (74131 cs/ml) | 4,80 |
| *Strep.uberis* | 355 | 5,76a±0,74 (575440 cs/ml) | 5,67 |
| Otros patógenos | 1369 | 5,25b±0,75 (177828 cs/ml) | 5,20 |

[1] N sólo corresponde a los cuartos que han podido ser analizados para RCS.
[2] Valores con distinta letra son diferentes estadísticamente.

Las muestras de leche tomadas de cuartos con *Strep.uberis* presentan una media superior al resto de las muestras analizadas (ilustración 12). Si aplicamos el test de Kruskal-Wallis, se obtienen diferencias significativas en el recuento de células somáticas por tipo de muestra, con una $p < 0,001$.

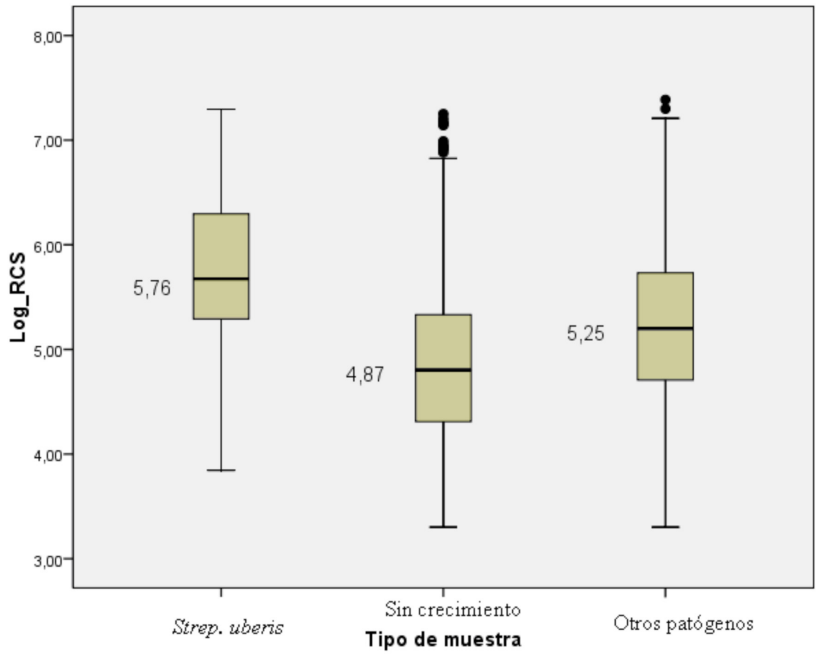



Ilustración 12. Representación de la distribución de los valores de Log RCS en función del tipo de muestra

### 4.2.4. Estudio de la dinámica de las infecciones mamarias por *Strep.uberis* durante el secado aplicando técnicas de diagnóstico a nivel de especie.

Aunque se aplicó el protocolo de seguimiento (apartado 4.1.1.2.) a todos los cuartos de todas las vacas que estaban dentro del periodo de estudio (3 meses antes del secado y 3 meses después del parto) sólo en 120 vacas (468 cuartos) fue posible el desarrollo normal del programa, y, dentro de ellas, sólo en 86 vacas (333 cuartos) fue posible un seguimiento completo (tabla 22).

Tabla 22. Estado sanitario de los cuartos antes y después del secado.

| TIPO DE SEGUIMIENTO | N.° CUARTOS | N.° Y % DE CUARTOS INFECTADOS POR *STREP.UBERIS* ANTES DEL SECADO | N.° Y % DE CUARTOS INFECTADOS POR *STREP.UBERIS* EN LOS CONTROLES POSTERIORES AL PARTO |
|---|---|---|---|
| Completo | 333 | 44 (13,2 %) | 32 (9,6 %) |
| Incompleto | 125 | 40 (32 %) | – |
| TOTAL SEGUIMIENTOS | 468 | 84 (18 %) | 32 (6,8 %) |

De la tabla 22 se deduce que de los 468 seguimientos iniciados (completos e incompletos) en el 18 % de los casos los cuartos estaban infectados por *Strep.uberis* antes del secado y de los 333 seguimientos completos sólo en el 9,6 % de los casos estaban infectados tras el parto.

Si analizamos de manera más pormenorizada los seguimientos completos (tabla 23), por una parte, de los 44 cuartos que llegaron al secado con infección por *Strep.uberis* el 66 % se curaron y el 34 % continuaron infectados, a pesar de haber sido tratados durante el secado. Mientras que por otra, de los 289 cuartos que llegaron sin infección por *Strep.uberis* al secado el 94,1 % permanecieron libres de este patógeno tras el mismo pero 5,9 % de los cuartos analizados se infectaron tras el secado y periparto.

El análisis de los procesos infecciosos completos en cada explotación (tabla 24), nos muestra que el número de cuartos que curan tras el secado es variable entre las explotaciones, fluctuando entre el 40 % y el 100 %. De la misma manera el porcentaje de cuartos sin infección por *Strep.uberis* que permanecen sin esta infección durante el secado es variable, fluctuando entre el 66,7 % y el 98,2 %.

Tabla 23. Evolución del estado sanitario de los cuartos antes y después del secado.

| EVOLUCIÓN DEL ESTADO SANITARIO DE LOS CUARTOS | N.º CUARTOS | PORCENTAJE (%) |
|---|---|---|
| Infectados al secado | 44 | 13,2 |
| — Cuarto infectado con *Strep.uberis*. Cuarto no infectado por este patógeno tras el secado | 29 | 66 |
| — Cuarto infectado con *Strep.uberis*. Cuarto continúa infectado tras secado | 15 | 34 |
| No infectados por *Strep.uberis* al secado | 289 | 86,8 |
| — Cuarto no infectado con *Strep.uberis*. Cuarto no infectado por este patógeno tras el secado | 272 | 94,1 |
| — Cuarto no infectado con *Strep.uberis*. Cuarto infectado por este patógeno durante el secado y periparto | 17 | 5,9 |
| TOTAL SEGUIMIENTOS | 333 | |

Tabla 24. Evolución del estado sanitario de los cuartos antes y después del secado por explotación.

| | EXPLOTACIONES | | | |
|---|---|---|---|---|
| Evolución del estado sanitario de los cuartos | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Infectados al secado | 11 | 10 | 16 | 7 |
| — Cuarto infectado con *Strep.uberis*. Cuarto no infectado por este patógeno tras el secado | 8 (72,7 %) | 4 (40 %) | 10 (62,5 %) | 7 (100 %) |
| — Cuarto infectado con *Strep.uberis*. Cuarto continúa infectado tras secado | 3 (27,3 %) | 6 (60 %) | 6 (37,5 %) | 0 (0 %) |
| No infectados por *Strep.uberis* al secado | 89 | 15 | 75 | 110 |
| — Cuarto no infectado con *Strep.uberis*. Cuarto no infectado por este patógeno tras el secado | 85 (95,5 %) | 10 (66,7 %) | 69 (92 %) | 108 (98,2 %) |
| — Cuarto no infectado con *Strep.uberis*. Cuarto infectado durante el secado y periparto | 4 (4,5 %) | 5 (33,3 %) | 6 (8 %) | 2 (1,8 %) |
| TOTAL SEGUIMIENTOS COMPLETOS | 100 | 25 | 91 | 117 |

### 4.2.5. *Strep.uberis* aislados de las muestras ambientales tomadas.

Para el conjunto de las explotaciones (tabla 25), en cerca del 30 % de las muestras medioambientales tomadas se aisló *Strep.uberis*, pero con diferencias importantes entre reservorios de forma que el porcentaje varía entre 0 % (pesebre vacas secas) al 80 % de aislamiento de *Strep.uberis* (potrero y material de pasillo de vacas en lactación).

Tabla 25. N.° de muestras ambientales tomadas en el conjunto de explotaciones y % de *Strep.uberis* aisladas de los distintos reservorios.

| FUENTE | ÁREA | N.° MUESTRAS TOMADAS | N.° MUESTRAS CON AISLAMIENTO DE *STREP.UBERIS*** | % DE MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO | |
|---|---|---|---|---|---|
| Bebedero | Vacas en lactación | 18 | 3 | 16,7 | 14,3 |
| | Vacas secas | 10 | 1 | 10 | |
| Material de cama | Vacas en lactación | 18 | 8 | 44,4 | 45,4 |
| | Vacas secas | 4 | 2 | 50 | |
| Material pasillo Estiércol | Vacas en lactación | 18 | 14 | 77,8 | 75 |
| | Vacas secas | 2 | 1 | 50 | |
| Pesebre | Vacas en lactación | 18 | 3 | 16,7 | 10,7 |
| | Vacas secas | 10 | 0 | 0 | |
| Potrero* | Vacas en lactación | 5 | 4 | 80 | 46,1 |
| | Vacas secas | 8 | 2 | 25 | |
| Suelo sala ordeño | | 18 | 5 | 27,8 | |
| Pezoneras | | 24 | 4 | 16,7 | |
| Ubres vacas en lactación | | 25 | 8 | 32 | |
| Manos | | 16 | 2 | 12,5 | |
| TOTAL | | 194 | 57 | 29,4 | |

* Zona exterior de descanso, con suelo de tierra.

** Cada muestra puede contener más de un aislamiento de *Strep.uberis*.

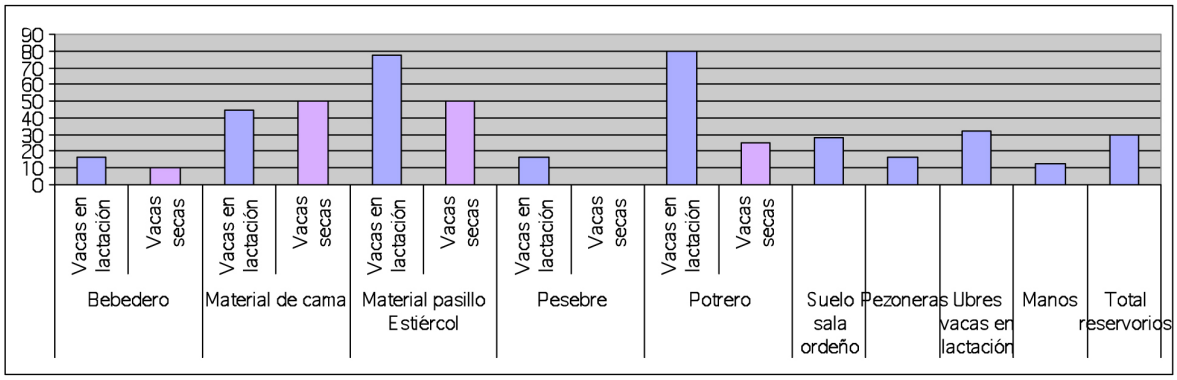



Ilustración 13. Porcentaje de aislamientos positivos de *Strep.uberis* por N.° muestras tomadas por reservorio.

Tabla 26. EXPLOTACIÓN 1. N.° de muestras ambientales tomadas y % de *Strep.uberis* aislados de los distintos reservorios.

| FUENTE [1] | ÁREA | N.° MUESTRAS TOMADAS | N.° MUESTRAS CON AISLAMIENTO DE *STREP.UBERIS*** | % DE MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO | |
|---|---|---|---|---|---|
| Bebedero | Vacas en lactación | 6 | 1 | 16,7 | 8,3 |
| | Vacas secas | 6 | 0 | 0 | |
| Material de cama | Vacas en lactación | 6 | 1 | 16,7 | 12,5 |
| | Vacas secas | 2 | 0 | 0 | |
| Material pasillo Estiércol | Vacas en lactación | 6 | 4 | 66,7 | 71,4 |
| | Vacas secas | 1 | 1 | 100 | |
| Pesebre | Vacas en lactación | 6 | 2 | 33,3 | 16,7 |
| | Vacas secas | 6 | 0 | 0 | |
| Potrero* | Vacas en lactación | – | – | – | 0 |
| | Vacas secas | 5 | 0 | 0 | |
| Suelo sala ordeño | | 6 | 0 | 0 | |
| Pezoneras | | 7 | 1 | 14,3 | |
| Ubres vacas en lactación | | 7 | 1 | 14,3 | |
| Manos | | 4 | 1 | 25 | |
| TOTAL | | 68 | 12 | 17,6 | |

* Zona exterior de descanso , con suelo de tierra.

[1] Explotación sin potrero

** Cada muestra puede contener más de un aislamiento de *Strep.uberis*.

De las 57 muestras con aislamiento positivo de *Strep.uberis* (tabla 25), donde cada muestra podía contener más de una colonia de *Strep.uberis*, se identificaron 158 aislamientos de *Strep.uberis* por pruebas bioquímicas, de los cuales 94 fueron positivos a la identificación por PCR. En la explotación 1, se identificaron 33 aislamientos de *Strep.uberis*, de los cuales 14 fueron positivos por PCR. En la explotación 2, se identificaron 19 aislamientos de los cuales 11 fueron positivos a PCR. En la explotación 3, se identificaron 21 aislamientos, de los cuales 15 fueron positivos por PCR. En la explotación 4, se identificaron 85 aislamientos de los cuales 54 fueron positivos a PCR (tabla 20).

Así, los principales reservorios donde se encontró *Strep.uberis* son las zonas de tránsito, esto es: los pasillos, principalmente constituidos por estiércol, tanto de las vacas secas como de las vacas en lactación, así como el potrero de las vacas en lactación y el material de las camas, tanto de las vacas secas como de las vacas en lactación y, en menor medida, en la piel de ubre de las vacas en lactación y en el suelo de la sala de ordeño como se puede observar en la ilustración 13.

Sin embargo, observamos diferencias entre el peso de cada reservorio en función de la explotación, así las camas son un foco importante de *Strep.uberis* en las explotaciones 2 y 4 y el bebedero en la explotación 4 (tablas 27 y 29). Curiosamente la explotación 4 es la única que presenta bebederos individuales automáticos (tabla 11).

Por otra parte, las explotaciones donde se ha aislado *Strep.uberis* en el 100 % y el 80 % de las muestras de cama tomadas, explotaciones 2 y 4 (ilustraciones 15 y 17), respectiva-mente,

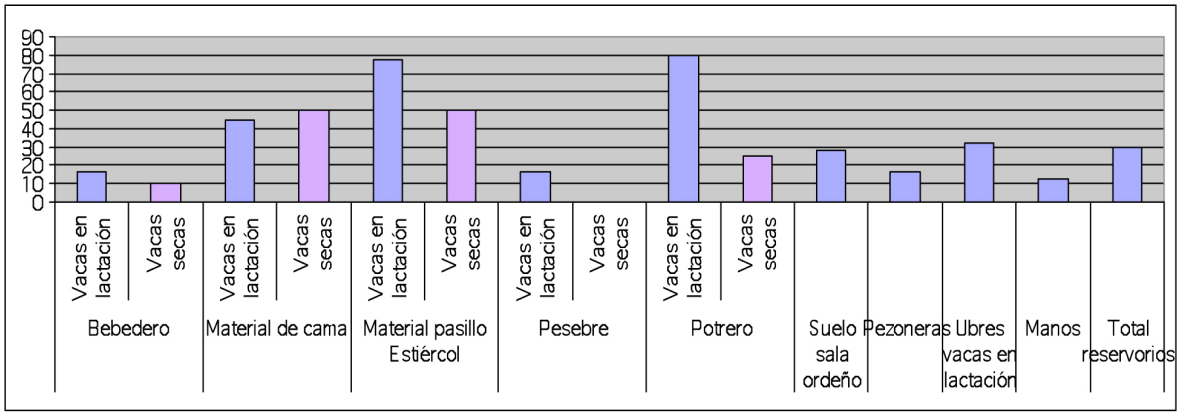



Ilustración 14. EXPLOTACIÓN 1. Porcentaje de aislamientos positivos de *Strep.uberis* por N.° muestras tomadas por reservorio.

Tabla 27. EXPLOTACIÓN 2. N.° de muestras ambientales tomadas y % de *Strep.uberis* aislados de los distintos reservorios.

| FUENTE | ÁREA [1] | N.° MUESTRAS TOMADAS | N.° MUESTRAS CON AISLAMIENTO DE *STREP.UBERIS*** | % DE MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO | |
|---|---|---|---|---|---|
| Bebedero | Vacas en lactación | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | Vacas secas | – | – | – | |
| Material de cama | Vacas en lactación | 4 | 4 | 100 | 100 |
| | Vacas secas | – | – | – | |
| Material pasillo Estiércol | Vacas en lactación | 4 | 4 | 100 | 100 |
| | Vacas secas | – | – | – | |
| Pesebre | Vacas en lactación | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | Vacas secas | – | – | – | |
| Potrero* | Vacas en lactación | 2 | 1 | 50 | 50 |
| | Vacas secas | – | – | – | |
| Suelo sala ordeño | | 4 | 1 | 25 | |
| Pezoneras | | 6 | 0 | 0 | |
| Ubres vacas en lactación | | 6 | 1 | 16,7 | |
| Manos | | 4 | 0 | 0 | |
| TOTAL | | 40 | 11 | 29,2 | |

* Zona exterior de descanso, con suelo de tierra.

[1] Vacas en lactación y secas en las mismas instalaciones.

** Cada muestra puede contener más de un aislamiento de *Strep.uberis*.

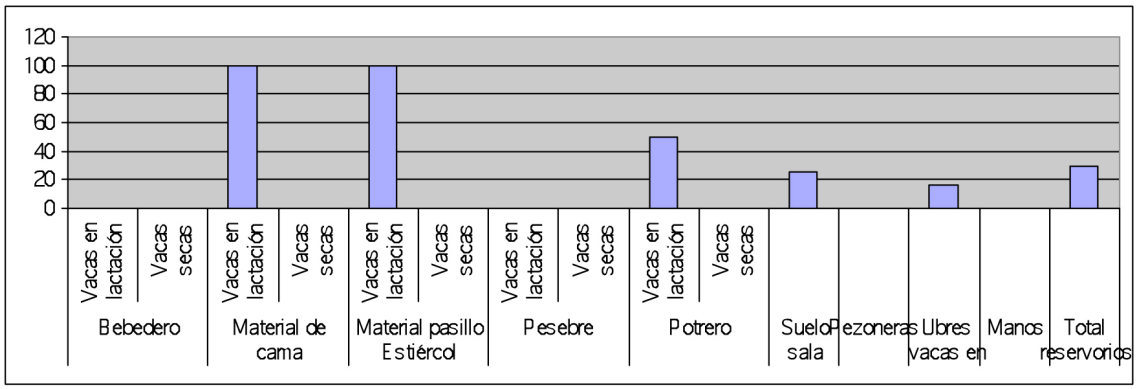



Ilustración 15. EXPLOTACIÓN 2. Porcentaje de aislamientos positivos de *Strep.uberis* por N.° muestras tomadas por reservorio.

Tabla 28. EXPLOTACIÓN 3. N.° de muestras ambientales tomadas y % de *Strep.uberis* aislados de los distintos reservorios.

| FUENTE | ÁREA | N.° MUESTRAS TOMADAS (1) | N.° MUESTRAS CON AISLAMIENTO DE *STREP.UBERIS*** | % DE MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO | |
|---|---|---|---|---|---|
| Bebedero | Vacas en lactación | 4 | 0 | 0 | 20 |
| | Vacas secas | 1 | 1 | 100 | |
| Material de cama | Vacas en lactación | 4 | 0 | 0 | 20 |
| | Vacas secas | 1 | 1 | 100 | |
| Material pasillo Estiércol | Vacas en lactación | 4 | 2 | 50 | |
| Pesebre | Vacas en lactación | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | Vacas secas | 3 | 0 | 0 | |
| Potrero* | Vacas en lactación | – | – | – | 66,7 |
| | Vacas secas | 3 | 2 | 66,7 | |
| Suelo sala ordeño | | 4 | 2 | 50 | |
| Pezoneras | | 5 | 1 | 20 | |
| Ubres vacas en lactación | | 6 | 2 | 33,3 | |
| Manos | | 4 | 0 | 0 | |
| TOTAL | | 43 | 11 | 25,6 | |

* Zona exterior de descanso, con suelo de tierra.

** Cada muestra puede contener más de un aislamiento de *Strep.uberis*.

(1) Vacas secas comparten establo con las vacas en lactación, excepto en verano (tabla 7).

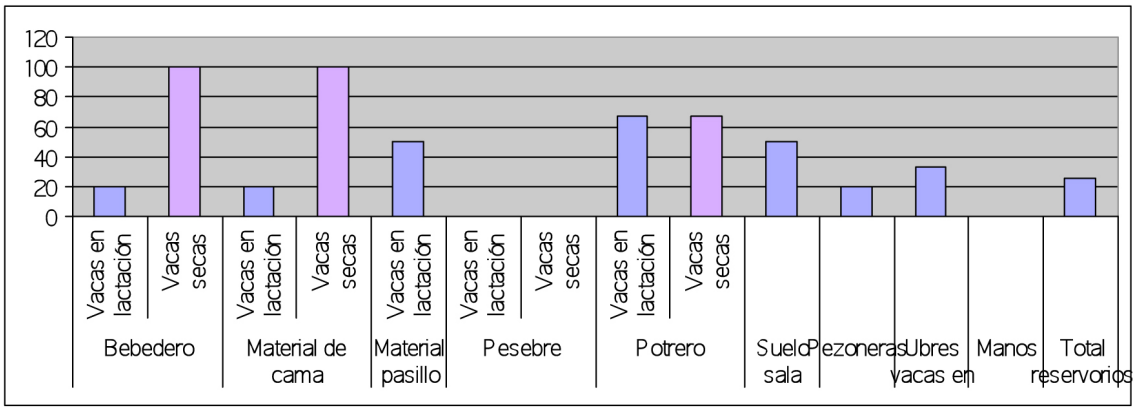



Ilustración 16. EXPLOTACIÓN 3. Porcentaje de aislamientos positivos de *Strep.uberis* por N.° muestras tomadas por reservorio.

Tabla 29. EXPLOTACIÓN 4. N.° de muestras ambientales tomadas y % de *Strep.uberis* aislados de los distintos reservorios.

| FUENTE | ÁREA [1] | N.° MUESTRAS TOMADAS | N.° MUESTRAS CON AISLAMIENTO DE *STREP.UBERIS*** | % DE MUESTRAS CON AISLAMIENTO POSITIVO | |
|---|---|---|---|---|---|
| Bebedero | Vacas en lactación | 4 | 2 | 50 | 50 |
| Material de cama | Vacas en lactación | 4 | 3 | 75 | 75 |
| Material pasillo Estiércol | Vacas en lactación | 4 | 4 | 100 | 100 |
| Pesebre | Vacas en lactación | 4 | 1 | 25 | 25 |
| Potrero* | Vacas en lactación | 3 | 3 | 100 | 100 |
| Suelo sala ordeño | | 4 | 2 | 50 | |
| Pezoneras | | 6 | 2 | 33,3 | |
| Ubres vacas en lactación | | 6 | 4 | 66,7 | |
| Manos | | 4 | 1 | 25 | |
| TOTAL | | 43 | 23 | 53,5 | |

* Zona exterior de descanso con suelo de tierra.

** Cada muestra puede contener más de un aislamiento de *Strep.uberis*.

[1] Vacas secas siempre en pastoreo.

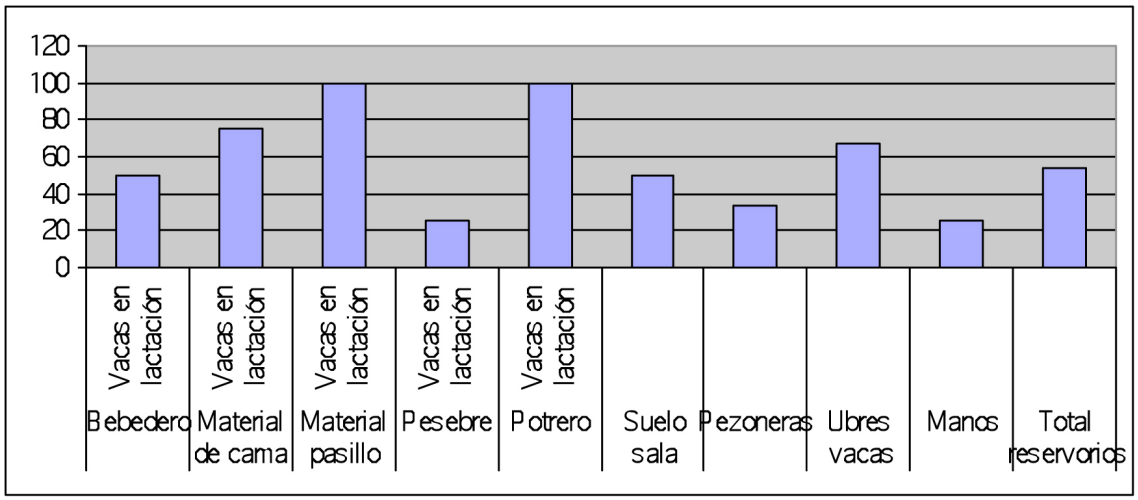



Ilustración 17. EXPLOTACIÓN 4. Porcentaje de aislamientos positivos de *Strep.uberis* por N.° muestras tomadas por reservorio.

sólo la explotación 2 tiene cama de paja, tipo de material que se asocia con la presencia de este patógeno.

En el conjunto de explotaciones, se aisló *Strep.uberis* en cerca del 30 % de las muestras medioambientales tomadas (ilustración 13). Pero observamos diferencias importantes entre explotaciones, con un porcentaje de aislamientos muy bajos en la explotación 1 (17,6 % de las muestras) (tabla 26), seguidos de los porcentajes de aislamiento 25,6% en la explotación 3 (tabla 28), 29,2% en la explotación 2 (tabla 27) y unos aislamientos superiores al 50 % en la explotación 4 (tabla 29).

## 4.3. DISCUSIÓN.

- **Recuentos de células somáticas**

Los recuentos de células somáticas medios obtenidos en el conjunto de las muestras de leche de cuarto fueron altos en consonancia con las condiciones experimentales por varias razones: 1ª las muestras fueron tomadas en explotaciones previamente seleccionadas por presentar problemas recurrentes de mamitis producidas por *Strep.uberis*, 2ª el periodo de estudio (3 meses antes del secado y 3 meses después del parto) corresponde con los 2 momentos de la curva de lactación donde la leche de la ubre presenta los RCS más altos. La relación entre el RCS en las muestras de leche de cuarto con el patógeno aislado de ese cuarto pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas en función del agente causal de la infección mamaria. El Log RCS medio en las muestras en las que se aisló *Strep.uberis* presentó un valor de 5,76 (575439 cs/ml), seguido de recuentos de 5,25 (177827 cs/ml) para las muestras con infecciones producidas por otros patógenos principales, y por último un recuento de 4,87 (74131 cs/ml) para las muestras en las que no se hallaba crecimiento. Se puede concluir que los cuartos infectados presentaron un recuento de células somáticas muy superior a los de los cuartos en los que no se aislaron patógenos y que, de forma general, la infección por *Strep.uberis* eleva estos recuentos en mayor medida que la infección por otros patógenos mamarios.

En estudios realizados en el CIFA, durante los años 2006-2009, sobre dinámica de las infecciones mamarias en explotaciones de leche de producción ecológica (Proyecto RTA2006-00132-C02_01), el RCS medio de las muestras de cuarto de las ganaderías

durante los 2 años de estudio fue de 5,04 (109647 cs/ml); valor inferior al encontrado en las muestras de cuarto de las explotaciones convencionales estudiadas en este proyecto debido, como ya se ha comentado, a que el RCS se incrementa al final de la lactación y al inicio de cada lactación, periodos objeto de seguimiento en este proyecto. Sin embargo, en dicho proyecto se encontró un recuento medio de 5,92 (831763 cs/ml), para el conjunto de cuartos infectados, valor superior al recuento medio obtenido en los cuartos infectados en las explotaciones en el presente trabajo, aún siguiendo el mismo criterio para diagnosticar una infección subclínica. En dicho estudio también se analizó el RCS por patógeno, encontrándose los recuentos medios más altos en Gram negativos y estreptococos, con un recuento medio de 5,93 (851138 cs/ml) para los cuartos infectados por *Strep.uberis*, cifra también superior al valor medio asociado a los cuartos en los que se aisló este patógeno en el estudio actual, así mismo, otros autores como Pantoja et al. (2009) estudiando el estado sanitario de 861 cuartos de 218 vacas, antes y después del secado, encuentran que las infecciones debidas a Gram-negativos y estreptococos son las que presentan unos mayores recuentos celulares tanto antes del secado —6,86 (7244359 cs/ml) y 5,19 (154881 cs/ml), respectivamente—, como en el primer control tras el parto —6 (1000000 cs/ml) y 5,52 (331131 cs/ml), respectivamente—.

- **Patógenos mamarios aislados de las muestras de leche.**

El porcentaje de patógenos principales (PP) aislados respecto a los patógenos secundarios (PS) es del 54,5 % y, entre los PP, *Strep.uberis* representa el 50 % de los aislamientos identificados. Los porcentajes de patógenos principales en los informes realizados en los programas de calidad de la leche en Cantabria, durante los años 2010 y 2011, son ligeramente superiores, representan el 80 % en 2010 y el 76,8 % en 2011 y, entre éstos, *Strep.uberis* representa porcentajes menores con respecto a nuestros datos, el 27 % de los aislamientos identificados en el 2010 (21,6% del total de patógenos) y el 29,5 % de los aislamientos identificados en el 2011 (22,6 % del total de patógenos). La explicación al hecho de que en dichos informes aparezcan porcentajes tan elevados de PP aislados respecto a los PS, en relación a los porcentajes obtenidos en nuestro proyecto, se debe a que las muestras que llegan al laboratorio, a través de particulares o veterinarios de

la consejería de Ganadería, Pesca y Desarrollo rural, proceden de vacas con síntomas clínicos o problemas de mamitis, y cuyo objetivo es diagnosticar los patógenos causantes de las infecciones mamarias para aplicar un tratamiento adecuado.

Por otra parte, la menor presencia de *Strep.uberis* dentro de los PP, respecto a los datos de esta memoria, se explica por la selección previa de explotaciones llevada a cabo.

Los estafilococos coagulasa negativo (SCN) son los patógenos secundarios (PS) aislados con más frecuencia (29,1 %, que representa el 63,9 % de los PS), seguidos de *Corynebacterium bovis* y *Corynebacterium* spp. (16,4 %). En este caso, estas cifras están en concordancia con los resultados aportados en los programas de calidad de la leche en Cantabria donde el porcentaje de aislados de SCN, 85 % de los patógenos secundarios durante el año 2010 y 72,6 % durante el año 2011, y de *Corynebacterium* spp., 15 % durante el año 2010 y 27,4 % durante el año 2011.

En España, Jiménez Galán presentó los resultados obtenidos en 8 laboratorios españoles sobre los aislamientos realizados en 2006, en los correspondientes departamentos de mamitis, encontrando que la prevalencia de *Strep.uberis* fue variable entre comunidades, desde un 5,5 en Cataluña hasta un 17,4 % en País Vasco y Navarra, con una media nacional de 12,4 % (Jiménez Galán, 2006). De este mismo trabajo se deduce que un 69 % de los patógenos ambientales aislados en infecciones mamarias son estreptococos tratándose en un 39 % de los casos de *Strep. uberis*. Un porcentaje alto pero inferior al obtenido en las explotaciones de nuestro proyecto, por las razones ya aducidas.

Bradley et al. (2007) estudiaron las mamitis clínicas y subclínicas ocurridas en 97 granjas de leche de Inglaterra y Gales durante un año. La incidencia de mamitis fue del 47 %. Los patógenos mamarios más frecuentemente aislados en 480 muestras de leche de cuarto, procedentes de mamitis clínicas, fueron *Strep.uberis* y *E.coli* aislados en el 48,5 % y 40,5 %, respectivamente, en relación al total de los PP aislados. En el análisis de las 464 muestras de leche de cuarto, procedentes de mamitis subclínicas, los patógenos más frecuentemente aislados fueron SCN en el 14,9 %, *Strep.uberis* en el 13,8 % y *C.bovis* en el 9,9 % de los casos. En este caso *Strep.uberis* representa el 56,6 % en relación a los PP aislados, valor muy semejante al encontrado por nosotros. Confirman, así mismo, la predominancia de los patógenos ambientales aislados de las muestras, tanto de mamitis

clínica como subclínica, apuntando la importancia de futuros estudios epidemiológicos para el control de los patógenos ambientales.

Petrovski et al. (2011) determinaron la distribución de PP causantes de mamitis procedentes de muestras de leche de cuarto, diagnosticadas por 5 laboratorios de Nueva Zelanda, durante 3 años. Se obtuvieron porcentajes de *Strep.uberis* (23,6 %), *Staphylococcus aureus* (23,5 %), SCN (7,2 %), *Strep.dysgalactiae* (6,2 %), *Bacillus* spp. (4 %) y coliformes (3,7 %). Tras evaluar estos datos subrayan el cambio en la prevalencia de los PP en los últimos 40 años, confirmando la presencia de un mayor porcentaje para patógenos ambientales frente a los patógenos contagiosos.

A la vista de estos datos, se confirma la importancia creciente del *Strep.uberis* dentro de la patología de las mamitis así como que, pese a la selección de explotaciones con prevalencia en *Strep.uberis* realizada en este trabajo, el porcentaje de aislamiento es similar al obtenido en trabajos publicados para poblaciones sin esta selección.

- **Comparación de los 3 métodos de identificación para *Streptococcus uberis.***

La identificación correcta de aislados bacterianos es una tarea muy compleja. Cuando los tests bioquímicos utilizados en los laboratorios de diagnóstico presentan identificaciones dudosas se suele recurrir a otros sistemas de identificación. En nuestro estudio, se emplearon adicionalmente el sistema API 20 Strep y la amplificación de ácidos nucléicos (PCR).

El test bioquímico sólo identificó con seguridad el 32 % de los presuntos aislamientos de *Strep.uberis*, el sistema API 20 Strep identificó el 83,8 % con un 99,9% de fiabilidad y la PCR identificó el 91,9 % de los presuntos aislamientos de *Strep.uberis* como *Strep. uberis*. Tras estos resultados, se definió un protocolo de actuación para identificar aislamientos de *Strep.uberis*, que consiste en la utilización de un test bioquímico convencional junto con la técnica PCR. La decisión de combinar ambas técnicas se debe a tres razones principales: por un lado, la batería de pruebas presenta resultados dudosos en un 68% pero presenta la ventaja que permite realizar una selección rápida de los aislamientos que no interesen. Por otro, el sistema API 20 Strep presenta limitaciones a la hora de identificar algunos estreptococos: perfiles bioquímicos incompletos para algunas especies, las cuales no están presentes en la base de datos *on line*, además del elevado coste de la galería de pruebas. Por último, la PCR permite identificar correctamente *Strep.uberis* sin presentar

los problemas anteriormente descritos, en menor tiempo y a un coste asequible para el ganadero.

Algunos autores han utilizado para identificar aislamientos de patógenos mamarios tests bioquímicos convencionales junto con el sistema API 20 Strep pero encontrando alguno de los problemas ya comentados.

Fortin et al. (2003) testaron un método de análisis basado en 7 pruebas: reacción enzimática de la aminopeptidasa (LAP), hidrólisis de la esculina (ESC), test de CAMP, fermentación de rafinosa (RAF) e inulina (INU), crecimiento en NaCl, hidrólisis del hipurato sódico (HIP), utilizando el sistema API 20 Strep para confirmar los resultados dudosos aportados por el test bioquímico convencional, surgiendo la dificultad por parte del API 20 Strep de identificar aislamientos de enterococos y lactococos, unido al elevado coste del sistema, no asequible para los ganaderos. En consonancia con nuestros resultados pues de los 3 casos de discordancia entre el API y PCR, en 2 casos (66,7%) el API clasificó el aislamiento dentro de alguna especie de enterococo mientras que la PCR lo identificó como *Strep.uberis*.

Jayarao et al. (1991a) emplearon los sistemas API 20 Strep y Vitek GPI para identificar estreptococos procedentes de mamitis bovina y compararon los resultados obtenidos con los test bioquímicos convencionales propuestos por McDonald y McDonald (1976). Identificaron correctamente un mayor número de estreptococos con el sistema API 20 Strep (96,5 %) y con el sistema Vitek GPI (94,4 %) que con los tests bioquímicos convencionales, y proponen estos sistemas comerciales como alternativa a los sistemas convencionales, a pesar de presentar limitaciones para identificar algunas de las especies de estreptococos, así las cepas positivas a rafinosa no son identificadas por el sistema API 20 Strep como *Strep.uberis*. Similares observaciones fueron realizadas por Poutrel y Ryniewicz (1984).

Hoshino et al. (2005) señalan algunas limitaciones a la hora de identificar estreptococos con el sistema API 20 Strep, debido a que sólo identifica aquellas especies incluidas en la base de datos y no diferencia entre los microorganismos *Strep.uberis* y *Strep.parauberis*. Ambos microorganismos presentan una morfología semejante en un análisis bioquímico convencional, aunque *Strep.parauberis* sea un patógeno menos frecuente como productor de infecciones mamarias (Pitkälä et al., 2008).

Devrise et al. (1999) utilizaron los tests bioquímicos convencionales previamente descritos por otros autores y el API 20 Strep, como método de confirmación de patógenos

mamarios. Aunque este último no pudo identificar algunas especies bacterianas, las cuales no estaban presentes en la base de datos API 20 Strep.

Otros autores desarrollan técnicas de PCR específicas, para identificar patógenos mamarios, obteniendo resultados precisos, en menor tiempo y a un coste asequible, en comparación con las técnicas bioquímicas.

Forsman et al. (1997) estudiaron las variaciones en la región de 16S-23S ADNr para identificar especies de estafilococos y estreptococos procedentes de casos de mamitis y obtuvieron resultados concluyentes y rápidos, empleando la técnica PCR, a diferencia de los tests convencionales.

Jayarao et al. (1992) demostraron la idoneidad de aplicar la técnica de PCR, específica para las regiones del gen 16S ADNr, para la identificación 12 especies de estreptococos: *Strep.uberis, Strep.parauberis, Strep.agalactiae, Strep.dysgalactiae, Strep.bovis, Strep.mitis, Strep.salivarius, Strep.Saccharolyticus, Ent.faecium, Ent.faecalis, Ent.avium y A.viridans*.

Abdulmawjood y Lammler (1999) identificaron correctamente aislamientos de estreptococos del grupo B de Lancefield, entre ellos *Strep.uberis* y *Strep.parauberis*, empleando PCR específica 16S ADNr. Ninguna de las cepas empleadas como control negativo presentó resultados positivos.

Bentley et al. (1995) amplificaron regiones del gen 16S ADNr para identificar especies de estreptococos: *Strep.uberis*, *Strep.parauberis* y *Strep.agalactiae*, mediante la técnica PCR. Se obtuvieron resultados discriminantes, y en poco tiempo, para la identificación de las especies, a diferencia de otras técnicas serológicas y bioquímicas donde obtenían resultados dudosos, especialmente en la identificación de *Strep.uberis* y *Strep.parauberis*.

Hassan et al. (2001) diferenciaron aislamientos de *Strep.uberis* de *Strep.parauberis* mediante la identificación del gen 16S ADNr, el gen 23S ADNr y el espacio intergénico 16S-23S ADNr por PCR. Los cebadores diseñados para identificar las regiones específicas del gen 16S y 23S ADNr permitieron la identificación de 67 aislamientos de *Strep.uberis* y 4 aislamientos de *Strep.parauberis*, de una manera rápida y sensible.

Estos resultados, obtenidos por diversos autores, indican que la PCR basada en amplificación especifica del 16S, es efectiva para la identificación de *Strep.uberis*, junto con los datos recogidos durante este trabajo, refuerzan la conclusión que un protocolo basado en un reducido número de pruebas, combinado con una PCR específica,

es una estrategia sencilla y económicamente viable para abordar la identificación de *Strep.uberis*.

- **Dinámica de las infecciones mamarias durante el secado.**

De los seguimientos llevados a cabo en las vacas en lactación, durante el periodo comprendido entre 3 meses antes del secado y 3 meses después del parto, se deduce que sólo el 13,2 % de los cuartos llegaron infectados al secado, esto es: la incidencia de mamitis al secado por *Strep.uberis* es del 13,2 % mientras que la incidencia de mamitis por *Strep.uberis* tras el parto es del 9,6 %, por tanto el porcentaje de cuartos infectados al secado es mayor que el porcentaje de cuartos infectados tras el parto, considerando éstos últimos como la suma de los cuartos que no han curado (34 %) más los cuartos que se han infectado durante el secado y periparto. Es interesante observar la existencia de diferencias importantes entre explotaciones, así en la explotación 2 el 40 % de los cuartos estaba infectado por *Strep.uberis* antes del secado y el 44 % lo estaba después del parto, asociado con la tasa de curación más baja (40 %); frente a este caso, la explotación 4 presenta una incidencia de infecciones por *Strep.uberis* antes del secado del 6 % y del 1,7 % después del parto, con una tasa de curación del 100%, por razones que se comentarán más adelante.

El porcentaje de cuartos que se infectaron con *Strep.uberis* tras el secado y periparto fue del 5,9 %, con diferencias muy importantes entre las 4 explotaciones en estudio. Si lo desglosamos por explotaciones, encontramos que los cuartos que llegaron sin infección por *Strep.uberis* al secado y fueron diagnosticados como infectados tras el secado fueron 4,5 % en la explotación 1, 33,3 % en la explotación 2, 8 % en la explotación 3 y 1,8 % en la explotación 4. Como se comentará más adelante, el alto porcentaje de nuevas IIM por este patógeno, tras el secado, en la explotación 2 está relacionado con el manejo llevado a cabo en esa explotación y la baja efectividad del tratamiento al secado al que ya se ha aludido.

Otros autores como Pantoja et al. (2009) estudiaron las IIM durante el periodo de secado y el riesgo de contraer infecciones subclínicas durante la lactación siguiente. Se incluyeron en el estudio 218 vacas, y se analizaron 804 cuartos de los cuales 102 presentaban IIM al secado, detectándose que el 89,2 % de los cuartos curan tras el secado (curación bacteriológica),

el 9,8 % de los cuartos presentan infección antes y después del secado, y el 6,4 % de los cuartos no infectados se infectan tras el secado, en nuestros resultados el 66 % curan tras el secado, el 34 % de los cuartos presentan infección antes y después del secado, y el 5,9 % se infectan tras el secado y periparto, las diferencias respecto a la curación se deben fundamentalmente a dos hechos: por una parte a que en nuestro estudio analizamos exclusivamente las IIM producidas por *Strep.uberis* y el equipo de Pantoja analiza todas las IIM encontradas durante el periodo de estudio, y por otra parte, los datos presentados se refieren a curación bacteriológica y en nuestro estudio un cuarto se define como infectado por *Strep.uberis* cuando se aísla éste y además presenta un RCS > 300000 cel/ml.

El 66 % de los cuartos que llegaban infectados por *Strep.uberis* al secado curaban tras este periodo y, como también se ha visto anteriormente, existen importantes diferencias en la tasa de curación entre explotaciones, así en la explotación 2 la tasa de curación es de sólo el 40 %, frente al 72,7, 62,5 y 100 % de las otras explotaciones. Estas diferencias están más ligadas al manejo que al tratamiento empleado, de hecho las explotaciones 1, 2 y 3 aplicaban el mismo tratamiento al secado con muy diferentes resultados. A una conclusión similar llegan Todhunter et al. (1995) que indican que la aparición de nuevas IIM por estreptococos ambientales se debe a muchos factores, algunos de ellos, la edad de la vaca, la estación del año, el estado de lactación del animal, pero, sobre todo, lo más importante son las prácticas de manejo empleadas, entre ellas la implantación de nuevas medidas de control en el periodo crítico (secado) para reducir la exposición a patógenos ambientales, conclusión que también se obtiene en nuestro estudio.

Del análisis del manejo llevado a cabo en cada explotación, con la limitación del número de explotaciones estudiadas, se podría deducir que las diferencias en la tasa de curación son debidas fundamentalmente a la falta de higiene en los alojamientos de las vacas secas, donde o no existe cambio periódico de las camas (explotación 2), o las vacas son mantenidas en parcelas con estiércol que apenas se limpian (explotaciones 2 y 3) e incluso puede influir la higiene a la hora de administrar los tratamientos antibióticos al secado. Por otra parte, el éxito aparente obtenido en la explotación 4, donde los datos reflejan que curan todas las vacas que llegan infectadas por *Strep.uberis* al secado, se debe a 2 estrategias de manejo: 1. A las vacas que habían presentado síntomas de mamitis durante la lactación, y continuaban infectadas al secado, se les administraba un

tratamiento al secado específico para este patógeno; al mes se limpiaba la ubre y se aplicaba un segundo tratamiento. 2. Si aun así no se conseguía la cura tras el secado, las vacas enfermas eran eliminadas del rebaño.

Las tasas de curación obtenidas en España, para el conjunto de los patógenos de mamitis, son superiores a los porcentajes aportados en nuestro proyecto para el *Strep. uberis*. Así, Escobal et al. (1999) estudiaron la eficacia de dos tratamientos al secado, en 269 vacas pertenecientes a 4 rebaños lecheros durante un año, y encontraron que el porcentaje de cuartos que continuaban infectados tras el secado era de sólo el 13,2 % (86/651), frente al 34 % obtenido en nuestro estudio para el *Strep.uberis*. De nuevo, la razón hay que buscarla en el patógeno de que se trata. Técnicos y clínicos en España y fuera del país destacan la baja respuesta a la terapia antibiótica del *Strep.uberis* (Echevarría, 2004, Oliver et al., 2004, Guijarro de la Cal, 2006, Jiménez Galán, 2006, Milne et al., 2007, Zadoks & Fitzpatrick, 2009).

- ***Streptococcus uberis* aislados de las muestras ambientales.**

De las muestras ambientales tomadas del entorno de las vacas en lactación y secas se han aislado *Strep.uberis* de bebederos, piel de la ubre, material de vaca, material del pasillo, pesebre en vacas en lactación, potrero, suelo de la sala de ordeño, pezoneras y manos del ordeñador. Estos datos concuerdan con los resultados publicados por otros autores internacionales, los cuales han encontrado aislamientos de *Strep.uberis* en numerosos reservorios ambientales, concretamente en material de camas, suelo, heces, labios, vulva y la piel adyacente a la glándula mamaria (Cullen and Little, 1969; Bramley, 1982; Epperson et al., 1993; López-Benavides et al., 2007). Cullen aísla 749 *Strep.uberis* de labios, vientre, piel de la ubre, pezón y leche de cuarto de 15 vacas, durante el periodo de lactación y en el periodo de secado, correlacionando la presencia o ausencia de este patógeno según la estación del año.

En nuestro estudio, los principales reservorios de *Strep.uberis* son las zonas de tránsito, pasillos fundamentalmente constituidos por estiércol, tanto en el área de las vacas secas como en lactación (se aisló *Strep.uberis* en el 75 % de las muestras tomadas), los potreros de las vacas en lactación (se aisló *Strep.uberis* en el 46,1 % de las muestras tomadas), y el material de cama, tanto en vacas secas como en lactación (se aisló *Strep.*

*uberis* en el 45,4 % de las muestras tomadas). Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, donde el porcentaje muestras ambientales de las que se aísla *Strep. uberis* es superior a un 40 %. Bramley (1982) examina 22 muestras de material de cama (paja), de 32 explotaciones, y aísla *Strep.uberis* en el 86,4 % de las muestras tomadas, y 41 muestras de heces, donde encuentra *Strep.uberis* en el 34,1 % de las muestras.

Zadoks et al. (2005) aíslan *Strep.uberis* en un 23 % de las muestras de heces tomadas, en un 42 % en agua de bebedero, en un 64 % en hierba de pastoreo y valores superiores al 85 % para las muestras obtenidas en los lugares de descanso de las vacas (tierra y plantas) y para las áreas de tráfico de las vacas. Los porcentajes de aislamiento obtenidos en las 4 ganaderías estudiadas varían dependiendo del reservorio analizado, es frecuente aislar *Strep.uberis* en el material de cama, en vacas secas como vacas en lactación, en las explotaciones 2 y 4. En la explotación 4 se aísla *Strep.uberis* en el 75 % de las muestras tomadas de las camas de vacas vacas en lactación, donde el material es inorgánico (lona) y en la explotación 2 se aísla *Strep.uberis*, en el 100 % de las muestras tomadas en vacas vacas en lactación, donde el material de cama es orgánico (paja).

El grado de contaminación de las camas varía en función del material de cama empleado (orgánico o inorgánico), el manejo (frecuencia de cambio de cama) o la adición de un determinado producto en la cama (superfosfato de cal). El material de cama ideal es aquel que tenga un origen inorgánico, por ejemplo, arena, piedra o lona, como es el caso de la explotación 4, que no favorece el crecimiento de microorganismos. Algunos autores han encontrado que el material de cama inorgánico evita el crecimiento de patógenos ambientales: coliformes y estreptococos (Bickert, 1999; Stowell, 2000). Así mismo, en los estudios de Hogan et al., de 1989 y 1999, se demuestra una disminución de nuevas infecciones mamarias producidas por patógenos ambientales por el uso de material inorgánico en la cama. En los resultados obtenidos en nuestro proyecto se pone de manifiesto la importancia del manejo, así se encuentra *Strep.uberis* en un 75 % de las muestras tomadas de cama inorgánica en la explotación 4 frente al encontrado en las explotaciones 1 y 3 con material de paja debido posiblemente a que en la explotación 4 no realizaban una limpieza eficaz del material orgánico (heces, orina, restos de pesebre…) que se depositaba sobre la lona, lógicamente la suciedad ligada a la falta de higiene y la humedad favorecen el crecimiento de microorganismos ambientales, sobre materiales

orgánicos, que alcanzan su máxima población tras 24 horas (Faull et al., 1983; Smith & Hogan, 1993).

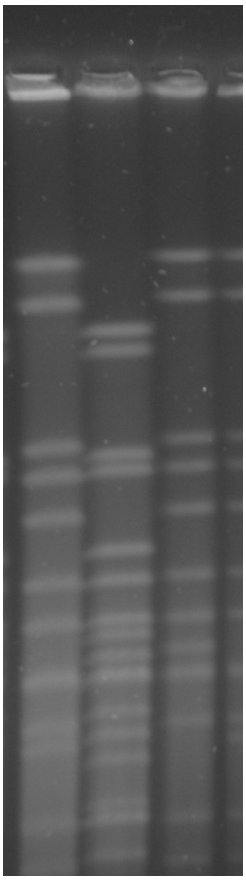
Por otro lado, el material de cama constituido por sustrato orgánico, como paja, heno o serrín permite la proliferación de microorganismos ambientales como coliformes y *Strep. uberis*, debido a la absorción por el material de heces, orina y demás desechos producidos por el animal unidos a condiciones ambientales del establo como la temperatura, humedad o la estación del año (Zehner et al., 1986; Hogan et al., 1989). Estudios realizados por Ward et al. (2002) avalan la teoría de que existe una relación directa entre las condiciones medioambientales de humedad, temperatura y pH con el crecimiento de los patógenos mamarios *Strep.uberis* y *E.coli*, favoreciendo su crecimiento los materiales orgánicos como la paja, temperaturas superiores a 15 °C y humedad >20 %, mientras que un pH alcalino inhibe su crecimiento en el interior de la paja pero no en la superficie de la paja.

El hecho de que en las explotaciones 1 y 3, con material de paja, se aislara *Strep. uberis* sólo en el 12,5 y 20 % de las muestras tomadas en ambas explotaciones, respectivamente, puede ser asociado a un buen manejo de las camas, es decir, cambio periódico del material y al empleo de aditivos, concretamente superfosfato de cal, cuya función es por un lado, desinfectar y por otro, reducir el contenido en agua, dificultando el crecimiento bacteriano y en consecuencia una disminución potencial/teórica de la incidencia de mamitis. Estos resultados coinciden con los publicados por autores como Hogan et al. (1997) donde llevaron a cabo una experiencia en la que realizaban un pre-tratamiento con productos alcalinos y fosfato de cal, de los materiales orgánicos, concretamente serrín, observando una disminución en el número de bacterias, Gram-negativas, coliformes, *Klebsiella* y estreptococos, y obteniendo niveles de $10^3$ ufc/g en aproximadamente 24 h (Hogan et al.,1997).

De hecho, en la explotación 2, también con material de paja, el porcentaje de muestras con aislamiento positivo es del 100 %; pero en este caso la higiene fue escasa (cambio poco habitual de la paja) y no empleaban superfosfato de cal.

# 5

# ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO MOLECULAR DE *STREPTOCOCCUS UBERIS* EN EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO EN CANTABRIA



En este momento, la investigación en el campo de las mamitis está dedicando un gran esfuerzo en conocer los reservorios medioambientales, la dinámica de la dispersión y de la transmisión de los microorganismos ambientales con el propósito de establecer medidas efectivas para el control de las infecciones mamarias provocadas por patógenos ambientales. Para abordar estos estudios epidemiológicos se está generalizando la aplicación de técnicas de tipificación molecular.

En un proyecto anterior desarrollado en el CIFA, sobre el manejo y la dinámica de las infecciones mamarias en ganaderías de producción ecológica (Proyecto RTA2006-00132-C02_01), se llevó a cabo el seguimiento sanitario a lo largo de la lactación de 168 vacas durante 2 años. Para la identificación de los patógenos mamarios se aplicaron los métodos convencionales que se emplean en los laboratorios de rutina de mamitis, basados en pruebas bioquímicas. Los resultados del estudio pusieron de manifiesto que muchos de los procesos infecciosos se prolongaban durante meses y que un 30 % de las infecciones que llegaban al secado continuaban en la lactación siguiente. En los datos obtenidos en el capítulo IV, 44 de los cuartos que llegaron al secado fueron diagnosticados como infectados por *Strep.uberis*, se deducía que el 66 % se curaron y el 34 % continuaron infectados, a pesar de haber sido tratados durante el secado. Con la identificación bioquímica a nivel de especie no es posible asegurar que la cepa de un mismo patógeno aislada antes y después del secado, o durante varios meses a lo largo de la lactación, fuera la misma y, por tanto, que se trate de la misma infección mamaria. Así pues se entendió que era necesario llevar la identificación microbiana hasta el nivel de cepa, de

forma que el seguimiento de las infecciones permitiera diferenciar entre persistencia y curación-reinfección.

En el capítulo IV de esta tesis se ha analizado la dinámica de las infecciones mamarias por *Strep.uberis* durante el secado, a partir de muestras de leche de cuarto, llevándose a cabo la identificación de los patógenos mediante pruebas bioquímicas y PCR. Así mismo, se aplicó este sistema de identificación para los aislamientos obtenidos de los reservorios ambientales. En este capítulo, se aplican técnicas de tipificación molecular tanto al estudio de la dinámica de las infecciones como al estudio epidemiológico en su conjunto, con los siguientes objetivos: 1) discriminar entre contaminación horizontal (transmisión vaca a vaca) y contaminación a partir de estos reservorios ambientales, 2) estudiar el comportamiento de las cepas de *Strep.uberis* en los cuartos infectados, antes y después del secado y 3) aportar información sobre el carácter ambiental o contagioso de *Strep.uberis,* considerado durante varias décadas como patógeno ambiental; objetivos imposibles de afrontar sin las técnicas moleculares.

## 5.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 5.1.1. TIPIFICACIÓN MOLECULAR.

- **Selección de cepas para el análisis de PFGE y $GTG_5$-PCR.**

Se seleccionaron las cepas de *Strep.uberis* pertenecientes a seguimientos completos e incompletos y, todas las cepas aisladas de muestras medioambientales.

#### 5.1.1.1. PFGE.

- **Preparación de DNA genómico.**

Los aislamientos caracterizados como *Strep.uberis* mediante PCR se incubaban en caldo BHI durante toda la noche a 37 °C. Los cultivos se ajustaban a una densidad óptica (DO) a 620 nm de 1 que equivale a una concentración aproximada de $10^9$ ufc/ml. Las células del cultivo previo se centrifugaban a 10000 x g durante 3 minutos, se lavaban con 1 ml de solución TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8.0) y se resuspendían en 200 µl de la misma solución. Las células de estreptococos se trataban con 10 µl de lisozima (20 mg/ml) durante 20 minutos a 55 °C y posteriormente se añadían 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml).

La suspensión de células se mezclaba con el mismo volumen de agarosa fundida de bajo peso molecular al 2,5 % en TE (Agarose LM; Pronadisa, Conda, Madrid, España) y se dispensaba en moldes de un volumen de 300 µl (ilustración 19) para la formación de pequeños bloques de agarosa. Cuando se solidificaban los bloques, se incubaban en un tampón de lisis celular (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8, Sarkosyl 1 %) durante 2-3 horas a 54 °C y se lavaban dos veces con 10 ml de agua destilada y solución TE. Los bloques de agarosa se conservaban con 5 ml de TE a 4 °C hasta su utilización.

- **Digestión del DNA genómico con endonucleasas de restricción.**

Los bloques se cortaban con un grosor de 1-2 mm y se incubaban en 300 µl de mezcla de restricción. Las digestiones se llevaban a cabo con 30U de *Sma*I (Takara Bio INC, Japón) a 25 °C durante 3 h, en una mezcla de reacción con 30 µl de tampón 10X, 12 µl de BSA 0,1 % y agua hasta completar el volumen final de 300 µl.

- **Electroforesis en campo pulsado.**

Los fragmentos de ADN se separaban por electroforesis mediante el sistema CHEF DR III (Bio-Rad) (ilustración 20). Para la realización de la electroforesis de campo pulsado, las muestras previamente digeridas se embebían en un gel de agarosa al 1,5 % con 0,5 × TBE (10 × TBE: 89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) y se sometían a

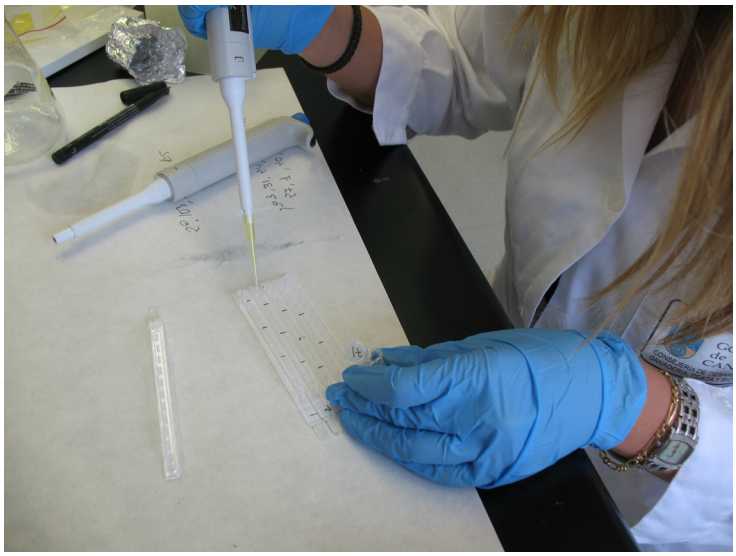


Ilustración 19. Preparación de plugs.

Ilustración 20. Cubeta de electroforesis del sistema CHEF DR III.

6 V/cm con un ángulo de 120° durante 20 h a 14 °C, con un pulso que se incrementaba de 1 s a 20 s. Los geles resultantes tras la electroforesis se teñían con Bromuro de Etidio, se visualizaban con un transiluminador UV y se documentaban con el sistema Digimage System (Major Science, Saratoga, California, EE. UU.). Se utilizaba como patrón de peso molecular el marcador "lambda ladder PFGE marker" (Bio-rad).

### 5.1.1.2. $GTG_5$-PCR.

- **Preparación de ADN.**

A partir del ADN extraído y utilizado previamente para la caracterización de los aislamientos sospechosos de *Strep.uberis* mediante PCR, se realizaba la cuantificación de ADN, de aquellos aislamientos confirmados por PCR, mediante el equipo Nanodrop 1000 versión 3.5.2. La concentración de ADN se estandarizaba hasta el valor de 100 ng/µl.

- **Preparación de los cebadores.**

Los oligonucleotidos se sintetizaban por Integrated DNA Technologies (Conda Lab, Madrid, España). El código y secuencia de $GTG_5$ desde 5´ a 3´ se describe a continuación: 5′ GTG GTG GTG GTG GTG 3′. Se preparaban a una concentración de 25 µM. La temperatura de hibridación de los cebadores de $GTG_5$ fue 40 °C.

- **Amplificación de ADN.**

Cada reacción de PCR, con un volumen final de 25 µl, contiene los siguientes reactivos: 10 µl de PCR Master-Mix 2,5 x (1,2 U Taq DNA Polymerase, KCl 50 Mm, Tris-HCl 30 Mm, Igepal-CA360 0,1 %, 200 µM de dNTP) (5PRIME, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), 2 µl de primer $GTG_5$, 1 µl de ADN bacteriano y 12 µl de agua. La amplificación se llevaba a cabo en el aparato de PCR (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburgo, Alemania) con la siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización de ADN a 95 °C durante 7 minutos, seguido de 30 ciclos consecutivos de desnaturalización a 90 °C durante 60 segundos, otro a 40 °C durante 1 minuto donde se produce la hibridación de los cebadores al ADN y un proceso de elongación a 65 °C durante 8 minutos. Después de los 30 ciclos de PCR, se produce una elongación final a 65 °C durante 16 minutos (Versalovic et al., 1991).

- **Electroforesis en gel de agarosa.**

Para visualizar los productos amplificados se cargaban 5 µl del producto amplificado y se separaba en un gel de agarosa al 1 % en tampón TAE 1 x (Tris base 40mM, ácido acético glacial 20mM, EDTA 1mM, pH 8,0) a 100 V durante 90 minutos. Los geles resultantes se teñían con Bromuro de Etidio y se digitalizaban con Digimage System (Major Science, Saratoga, California, EE. UU.). Se utilizaba un patrón de 1000 pb (Biotools, Madrid, España) como marcador de peso molecular.

### 5.1.2. Test de susceptibilidad antibiótica.

- **Selección de cepas para el test de susceptibilidad antibiótica.**

La selección de las cepas de *Strep.uberis* se realizó en función de los resultados obtenidos en la técnica de PFGE, que se consideró como método de referencia de tipificación.

Se tomaban las cepas que pertenecían a seguimientos completos y a los "cluster" predominantes de las muestras aisladas del medioambiente.

- **Fundamento.**

Para identificar la sensibilidad de las cepas de *Strep.uberis* se utilizaba el test de susceptibilidad de Kirby-Bauer. Se usaban los siguientes discos antibióticos (Mast Group Ltd, Merseyside, UK) pertenecientes a los siguientes grupos: Aminocumarinas (Novobiocina

30 µg; $NO_{30}$), Aminoglucósidos (Gentamicina 10 µg; $GM_{10}$, Kanamicicina 30 µg; $K_{30}$, Estreptomicina 25 µg; $S_{25}$), Cefalosporinas-lactámicos (Cefazolina 30; $KF_{30}$), Glicopéptidos (Vancomicina 30 µg; $VA_{30}$), Lincosamidas (Lincomicina 2 µg; $L_2$), Penicilina-lactámicos (Penicilina G 5i.u; $PG_5$), Quinolonas (ácido nalidixico 30 µg; $NA_{30}$), Tetraciclinas (Tetraciclina 30 µg; $T_{30}$), Macrólidos (Eritomicina 15 µg; $E_{15}$).

- **Cultivo de *Streptococcus uberis.***

Las cepas seleccionadas de *Strep.uberis* se cultivaban en medio Edwards (Oxoid) a 37 °C durante 24 h. Se tomaban 3-5 colonias del cultivo puro de *Strep.uberis* y se cultivaban en caldo de BHI a 37 °C durante 2-6 horas hasta conseguir una turbidez equivalente a $10^8$ ufc/ml.

- **Inoculación de las cepas en las placas de cultivo y dispensación de los discos antibióticos.**

Las suspensiones bacterianas se inoculaban (0,5 ml) sobre la superficie de placas de agar Mueller-Hinton (Oxoid) con un pH 7,2-7,4 y se repartían homogéneamente en la placa. Se dispensaban los discos antibióticos en cada placa de cultivo y se incubaban a 37 °C durante 18-24 h.

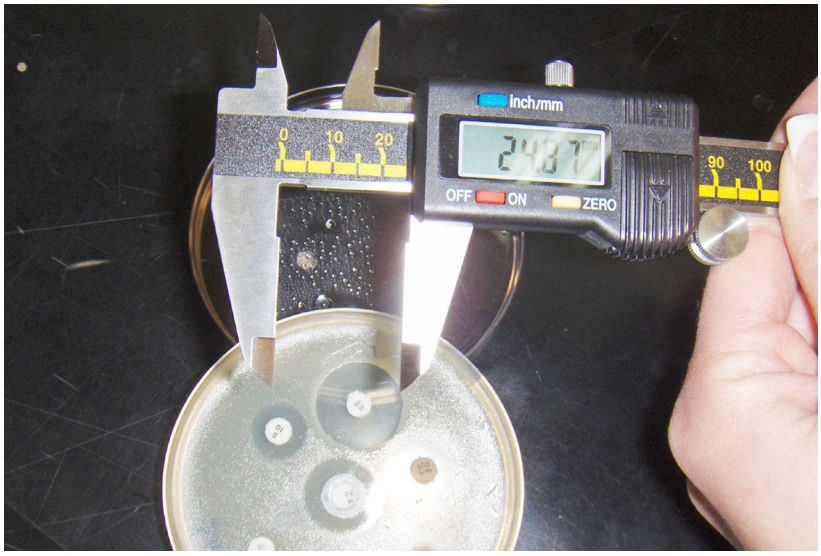



Ilustración 21. Medición de los halos de inhibición.

- **Interpretación de los resultados del test de susceptibilidad antibiótica.**

Tras la incubación los diámetros de la zona de inhibición se medían en milímetros (mm) con un calibre como se muestra en la ilustración 21. La interpretación de los resultados se dividió en 3 categorías: Resistente (R), Intermedio (I) y Sensible (S) según los parámetros estándar del test de susceptibilidad de Kirby-Bauer (ver Anexo 3).

### 5.1.3. Detección de genes de virulencia en la cepas de *Streptococcus uberis*.

- **Selección de cepas para la detección de factores de virulencia.**

Se seleccionaron las cepas de *Strep.uberis* de los "cluster" predominantes procedentes de muestras de medioambiente y de muestras de leche con un recuento superior a 600000 cs/ml (5,78 log RCS/ml).

- **Identificación de los genes de virulencia mediante PCR.**

Las cepas seleccionadas se sembraban en medio Edwards (Oxoid) para la recuperación de colonias y se analizaban mediante PCR, para ello, los factores de virulencia que se amplificaban fueron los siguientes: HasA, HasB, HasC, GapC, Ibp, OppF, PauA/PauB, Skc, Sua (Tabla 30). Las secuencias de oligonucleótidos se obtuvieron de los autores Reinoso et

Tabla 30. Características de los factores de virulencia.

| FACTORES DE VIRULENCIA | OBJETIVO | FUNCIÓN |
|---|---|---|
| HasA | Producir la cápsula de ácido hialurónico | Evasión de defensas del hospedador |
| HasB | | |
| HasC | | |
| GapC | Codificar la proteína GAPDH* | Evasión de defensas del hospedador e invasión |
| OppF | Codificar proteínas involucradas en el transporte activo de solutos | Proliferación |
| PauA/PauB | Activar el plasminógeno | Colonización |
| Sck | | |
| Ibp | Adherir e invadir las células epiteliales mamarias | Invasión |
| Sua | | |

* Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

al. (2011). Los cebadores se sintetizaron por Integrated DNA Technologies (Conda LAB, Madrid, España).

La extracción del ADN se llevó a cabo mediante Instagene matrix (Biorad Laboratories, Hércules, CA, EE. UU.) según el protocolo descrito por el fabricante. Se amplificaban fragmentos que comprendían entre 200 pb y 1200 pb, dependiendo el factor de virulencia analizado, la amplificación se llevó a cabo en el termociclador (eppendorf mastercycler personal), y se comprobaron al menos 2 veces, con las siguientes condiciones: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 24 ciclos consecutivos de un proceso de desnaturalización del ADN a 94 °C durante 30 segundos, la temperatura de hibridación de los cebadores al ADN variaba entre 50 a 59 °C, dependiendo del cebador, durante 30 segundos y un proceso de elongación a 72 °C durante 30 segundos. Después de los 24 ciclos de PCR, se produce una elongación final a 72 °C durante 5 minutos

Para cada reacción de PCR, con un volumen final de 25 µl, se utilizaban los siguientes reactivos: 10 µl de PCR MasterMix 2,5 x (1,2 U Taq DNA Polymerase, KCl 50 Mm, Tris-HCl 30 Mm, Igepal-CA360 0,1 %, 200 µM de dNTP) (5PRIME, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), 1 µl de cada cebador y 1 µl de ADN bacteriano. La concentración final de los cebadores fue de 1 µM.

Para comprobar que el fragmento, de cada factor de virulencia, había sido amplificado se separaba el producto amplificado en un gel de agarosa al 1 % en tampón TAE 1 × (Tris base 40mM, ácido acético glacial 20mM, EDTA 1mM, pH 8,0) junto con un marcador de peso molecular de 100 pb o 1000 pb (Biotools, Madrid, España) dependiendo del factor de virulencia analizado. La electroforesis se llevó a cabo a 120 V durante 1 h y 30 minutos. Posteriormente, los geles resultantes se teñían con Bromuro de Etidio y se digitalizaban con Digimage System (Major Science, Saratoga, California, EE. UU.).

Se utilizó como control positivo la cepa de referencia de *Strep.uberis* CECT 994 y como control negativo la cepa de *Listeria monocytogenes* CIP 103575.

### 5.1.4. Análisis de los datos.

Para el análisis de los perfiles de restricción, que se obtuvieron por las técnicas de tipificación, se utilizó el software GelCompar versión 6.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Las bandas se asignaron automáticamente por el programa y se corrigieron

manualmente. La homología de los perfiles se calculó con el índice de Dice, aplicando un 5 % de tolerancia y un 2 % de nivel de optimización.

El agrupamiento jerárquico de los patrones obtenidos, es decir, la construcción de los fenogramas, se realizó con el método UPGMA (unweighted pair group method with average). La interpretación de los patrones de bandeo se realizó según los criterios descritos por Tenover et al. (1995) que considera un porcentaje de similitud (punto de corte) de más de un 85 % para denominar dos cepas iguales y teniendo en consideración la topología de los dendogramas (Goering, 2004).

La relación entre las variables categóricas (cepas procesos infecciosos/cepas medio-ambientales) se comprobó utilizando el test $X^2$ o test de Fisher, se consideraron diferencias significativas con una $p < 0,05$.

## 5.2. RESULTADOS.

- **Resultados obtenidos del análisis de las cepas por PFGE y $GTG_5$-PCR en el conjunto de las explotaciones.**

En el análisis de las cepas mediante PFGE se digirió el ADN con la enzima de restricción *Sma*I que generó de 6 a 16 fragmentos de ADN con un rango comprendido entre 5 Mkb y 60 Mkb, mientras que para el análisis de las cepas mediante $GTG_5$-PCR se amplificó el ADN con cebadores $GTG_5$ y se generaron de 3 a 9 fragmentos de ADN con un tamaño de 15 kb a 600 kb.

Se analizaron 218 cepas de *Strep.uberis* por ambas técnicas: a) con la técnica PFGE, se tipificaron 127 cepas con origen de ubre y 91 cepas con origen medioambiental, b) con la técnica $GTG_5$-PCR, se tipificaron 124 cepas con origen de ubre y 94 cepas con origen medioambiental. Aunque exista diferencia en el número de cepas tipificadas, en las 4 explotaciones, se analizaron el mismo número de cepas de *Strep.uberis* (218) por ambos métodos. Las diferencias en el número de cepas tipificadas, por ambos métodos, se debe a los problemas asociados a cada una de las técnicas.

La aplicación del criterio de Tenover identifica perfiles principales con un porcentaje de similitud superior al 85 %, y dentro de estos se identificaron visualmente pulsotipos o perfiles

de bandas distintos, considerando estos últimos como la misma unidad genética. En nuestro estudio, aplicamos este criterio en la técnica PFGE, se identificaron 27 perfiles principales, los cuales presentaron un porcentaje de similitud al 85 %, y dentro de estos se identificaron visualmente 40 pulsotipos distintos basándose en criterios de agrupamiento (anexo 1). Con la técnica $GTG_5$-PCR se identificaron 11 perfiles principales de bandeo, los cuales presentaron un porcentaje de similitud al 85 %, y dentro de estos se identificaron visualmente 15 perfiles secundarios distintos basándose en criterios de agrupamiento (anexo 2).

Los resultados anteriormente comentados se resumen en la tabla 31.

Tabla 31. Número de perfiles obtenidos del análisis de las cepas por PFGE y $GTG_5$-PCR por explotación y origen.

| GRANJAS | RELACIÓN DE PULSOTIPOS OBTENIDOS MEDIANTE PFGE | | | | RELACIÓN DE PERFILES OBTENIDOS MEDIANTE $GTG_5$-PCR | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N.° DE CEPAS AISLADAS Y TIPIFICADAS | | N.° DE PULSOTIPOS PRINCIPALES DISTINTOS (1) | N.° DE PULSOTIPOS SECUNDARIOS DISTINTOS (1) | N.° DE CEPAS AISLADAS Y TIPIFICADAS | | N.° DE PERFILES PRINCIPALES DISTINTOS (1) | N.° DE PERFILES SECUNDARIOS DISTINTOS (1) |
| | UBRE | MEDIO AMBIENTE | | | UBRE | MEDIO AMBIENTE | | |
| 1 | 38 | 13 | 8 | 8 | 36 | 14 | 7 | 4 |
| 2 | 31 | 11 | 11 | 13 | 29 | 11 | 9 | 6 |
| 3 | 46 | 15 | 18 | 15 | 48 | 15 | 6 | 5 |
| 4 | 12 | 52 | 20 | 20 | 11 | 54 | 5 | 7 |
| Total | 127 | 91 | 27 | 40 | 124 | 94 | 11 | 15 |
| | 218 | | | | 218 | | | |

(1) Las explotaciones comparten pulsotipos.

### 5.2.1. Dinámica de las infecciones mamarias durante el secado, aplicando técnicas de tipificación: PFGE y $GTG_5$-PCR.

- **Seguimiento de las infecciones mamarias.**

Se llevó a cabo el seguimiento de 15 procesos infecciosos completos, de los cuales un 73,3 % de los cuartos sometidos a seguimiento presentaban pulsotipos distintos a lo largo de la infección (tabla 32), mientras que, por la técnica $GTG_5$-PCR se analizaron 14 procesos infecciosos completos (en uno de ellos no se consideró el análisis completo, ya que una de las cepas no se pudo tipificar)de los cuales un 93 % de las cuartos sometidos a seguimiento

Tabla 32. Pulsotipos generados mediante PFGE durante los procesos infecciosos producidos por *Strep.uberis*.

| GRANJAS [1] | IDENTIFICACIÓN DE LAS VACAS | CUARTOS[2] | CONTROLES ANTES SECADO | | | CONTROLES DESPUÉS SECADO | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | B3 |
| 1 | 6 | DD | 10A | —[3] | — | 10A | — | — |
| 1 | 6 | DI | — | — | 10A | 10A | 10A | — |
| 1 | 7 | TI | 10A | 17 | — | 10A | 10A | 10A |
| 2 | 12 | TD | 10A | — | 10A | — | — | 10A |
| 2 | 13 | DD | 13B | 13B | 10B | 13B | — | — |
| 2 | 17 | DI | 13B | SM[4] | — | 10B | — | — |
| 2 | 17 | TD | 11A | SM | 10B | 13B | — | — |
| 2 | 17 | TI | 10B | SM | 23 | 10A | — | — |
| 3 | 18 | DD | 9A | 9A | SM | SM | — | 23 |
| 3 | 18 | DI | 9A | — | — | 10A | 22 | 10A |
| 3 | 20 | DD | — | SM | 13B | 8A | 10A | 10A |
| 3 | 21 | DD | 10A | 10A | 8A | SM | 5A | SM |
| 3 | 21 | TI | 16B | 9A | 6A | — | 10A | SM |
| 3 | 23 | DD | SM | — | 8A | — | — | 8A |
| 3 | 25 | DD | — | 8A | — | 23 | 10B | 10B |

(1) Procesos infecciosos completos analizados en las granjas estudiadas.
(2) DD (cuarterón derecho); DI (cuarterón izquierdo); TD (cuarterón derecho); TI (cuarterón izquierdo)
(3) – Aislamiento negativo de *Strep.uberis*
(4 SM (Sin muestra)

presentaban perfiles de bandas distintos a lo largo de la infección (tabla 33); en total se analizaron 50 cepas por campo pulsado y 49 cepas mediante $GTG_5$-PCR.

Así mismo, se analizaron las 53 cepas aisladas de 21 procesos infecciosos incompletos, donde el seguimiento antes del secado no se pudo completar después del parto, y donde el agente causal era *Strep.uberis,* mediante PFGE y 53 cepas aisladas de 22 procesos infecciosos incompletos analizados por $GTG_5$-PCR, de los cuales el 71,4 % de los cuartos sometidos a seguimiento presentaban diferente pulsotipo según la técnica PFGE y el 41 % de los cuartos sometidos a seguimiento presentaban diferentes perfiles según la técnica $GTG_5$-PCR (tabla 34) siendo 5A, 8A, 10A, 10B y 13B los pulsotipos predominantes, tanto en los procesos infecciosos completos como incompletos, obtenidos con la técnica PFGE, y 1A,

Tabla 33. Perfiles generados mediante $GTG_5$-PCR durante los procesos infecciosos producidos por *Strep.uberis*.

| GRANJAS [1] | IDENTIFICACIÓN DE LAS VACAS | | CONTROLES ANTES SECADO | | | CONTROLES DESPUÉS SECADO | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | CUARTOS[2] | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | B3 |
| 1 | 6 | DD | 4A | —[3] | — | 8A | — | — |
| 1 | 6 | DI | — | — | 8A | 8A | 8A | — |
| 1 | 7 | TI | 8A | 8A | — | 8A | 8B | 8B |
| 2 | 12 | TD | 8B | — | 8B | — | —- | 1A |
| 2 | 13 | DD | 8B | 8B | 8B | 7 | — | — |
| 2 | 17 | DI | 6 | SM[4] | — | 8B | — | — |
| 2 | 17 | TD | 5 | SM | 8B | 8B | — | — |
| 2 | 17 | TI | 6 | SM | 4A | 8A | — | — |
| 3 | 18 | DD | 8A | 1A | SM | SM | — | 8B |
| 3 | 18 | DI | 8A | — | — | 4A | 4A | 8B |
| 3 | 20 | DD | — | SM | 8B | 8A | 8A | 8A |
| 3 | 21 | DD | 8A | 4A | 4A | SM | 8A | SM |
| 3 | 21 | TI | 8B | 8B | 4A | — | 8B | SM |
| 3 | 23 | DD | SM | — | X[5] | — | — | 1A |
| 3 | 25 | DD | — | 8A | — | 8B | 4A | 8B |

[1] Procesos infecciosos completos analizados en las granjas estudiadas.
[2] DD (cuarterón derecho); DI (cuarterón izquierdo); TD (cuarterón derecho); TI (cuarterón izquierdo)
[3] – Aislamiento negativo de *Strep.uberis*
[4] SM (Sin muestra)
[5] X (cepa no tipable)

Tabla 34. Perfiles de bandas obtenidos durante los procesos infecciosos incompletos.

| PFGE | | | | $GTG_5$-PCR | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GRANJAS | PROCESOS INFECCIOSOS* | PULSOTIPOS DIFERENTES** | | GRANJAS | PROCESOS INFECCIOSOS* | PULSOTIPOS DIFERENTES** | |
| | N | N | % | | N | N | % |
| 1 | 7 | 2 | 28,6 | 1 | 7 | 3 | 42,9 |
| 2 | 4 | 4 | 100 | 2 | 4 | 2 | 50 |
| 3 | 7 | 6 | 85,7 | 3 | 8 | 3 | 37,5 |
| 4 | 3 | 3 | 100 | 4 | 3 | 1 | 33,3 |
| Total | 21 | 15 | 71,4 | Total | 22 | 9 | 41 |

* Cuartos infectados por *Strep.uberis* (de los que se aislaron al menos dos cepas a lo largo de la infección).
** Diferente pulsotipo durante la infección.

3, 4A, 4B, 8A y 8B los pulsotipos predominantes, tanto en los procesos infecciosos completos como incompletos, obtenidos con la técnica $GTG_5$-PCR.

- **Análisis de los procesos infecciosos antes y después del secado, con y sin aplicación de técnicas de tipificación molecular.**

En las tablas 35 y 36 se analiza la evolución de los procesos infecciosos completos, teniendo en cuenta el estado del cuarto y la cepa aislada en el último control antes del secado y el primer control después del parto, con y sin aplicación de las técnicas de

Tabla 35. Análisis de la evolución de los procesos infecciosos con los datos de la tipificación molecular (pulsotipos generados por PFGE) o sin esta herramienta.

| CASO[1] | | SEGUIMIENTO DEL PROCESO INFECCIOSO | | INTERPRETACIÓN | |
|---|---|---|---|---|---|
| GRANJA | VACA | ÚLTIMO CONTROL ANTES DEL SECADO | PRIMER CONTROL DESPUÉS DEL PARTO | TIPIFICACIÓN MEDIANTE PFGE | SIN TIPIFICACIÓN |
| | | A3 | D1 | | |
| 1 | 6 | — | 10A | Nueva infección | Nueva infección |
| 1 | 6 | 10A | 10A | No curación | No curación |
| 1 | 7 | — | 10A | Nueva infección | Nueva infección |
| 2 | 12 | 10A | — | Curación | Curación |
| 2 | 13 | 10B | 13B | Curación-reinfección | No curación |
| 2 | 17 | — | 10B | Nueva infección | Nueva infección |
| 2 | 17 | 10B | 13B | Curación-reinfección | No curación |
| 2 | 17 | 23 | 10A | Curación-reinfección | No curación |
| 3 | 18 | — | 10A | Nueva infección | Nueva infección |
| 3 | 20 | 13B | 8A | Curación-reinfección | No curación |
| 3 | 21 | 6A | — | Curación | Curación |
| 3 | 23 | 8A | — | Curación | Curación |
| 3 | 25 | — | 23 | Nueva infección | Nueva infección |

| PROCESO | | PFGE | SIN TIPIFICACIÓN |
|---|---|---|---|
| Infectado - sano[2] | | 3 (37,5%) | 3 (37,5%) |
| Infectado - infectado | No curación[3] | 1 (12,5%) | 5 (62,5%) |
| | Curación - reinfección[4] | 4 (50%) | |
| % curación tras el TT | | 87,5% | 37,5% |

[1] No se han incluido 2 de los 15 procesos: no había muestra antes o después del secado.
[2] Sin infección por *Strep.uberis*
[3] Misma cepa antes y después del secado
[4] Distinta cepa antes y después del secado

Tabla 36. Análisis de la evolución de los procesos infecciosos con los datos de la tipificación molecular (perfiles de banda generados por $GTG_5$-PCR) o sin esta herramienta.

| CASO (1) | | SEGUIMIENTO DEL PROCESO INFECCIOSO | | INTERPRETACIÓN | |
|---|---|---|---|---|---|
| GRAN-JA | VACA | ÚLTIMO CONTROL ANTES DEL SECADO | PRIMER CONTROL DESPUÉS DEL PARTO | TIPIFICACIÓN MEDIANTE PFGE | SIN TIPIFICACIÓN |
| | | A3 | D1 | | |
| 1 | 6 | - | 10A | Nueva infección | Nueva infección |
| 1 | 6 | 10A | 10A | No curación | No curación |
| 1 | 7 | - | 10A | Nueva infección | Nueva infección |
| 2 | 12 | 10A | - | Curación | Curación |
| 2 | 13 | 10B | 13B | Curación-reinfección | No curación |
| 2 | 17 | - | 10B | Nueva infección | Nueva infección |
| 2 | 17 | 10B | 13B | Curación-reinfección | No curación |
| 2 | 17 | 23 | 10A | Curación-reinfección | No curación |
| 3 | 18 | - | 10A | Nueva infección | Nueva infección |
| 3 | 20 | 13B | 8A | Curación-reinfección | No curación |
| 3 | 21 | 6A | - | Curación | Curación |
| 3 | 23 | 8A | - | Curación | Curación |
| 3 | 25 | - | 23 | Nueva infección | Nueva infección |

| PROCESO | | $GTG_5$-PCR | SIN TIPIFICACIÓN |
|---|---|---|---|
| Infectado – sano [2] | | 2 (28,6%) | 2 (28,6%) |
| Infectado - infectado | No curación (3) | 2 (28,6%) | 5 (71,4%) |
| | Curación – reinfección[4] | 3 (42,9%) | |
| % curación tras el TT | | 5 (71,4%) | 2 (28,6%) |

[1] No se han incluido 3 de los 15 procesos: en 2 procesos no había muestra antes o después del secado y en 1 proceso no se pudo tipificar la cepa.
[2] Sin infección por *Strep.uberis*
[3] Misma cepa antes y después del secado
[3] Distinta cepa antes y después del secado

tipificación molecular. De dichas tablas se deduce la existencia de importantes diferencias en la interpretación de la evolución de la infección con o sin tipificación, así aplicando técnicas de identificación convencional a nivel de especie se entendería que en el 62,5 % y 71,4% de los casos no existe curación tras el secado, mientras que aplicando técnicas de tipificación molecular, PFGE y $GTG_5$-PCR, no existe curación en el 12,5 % y 28,6 % de los casos. El concepto de curación queda en entredicho, como se discute más adelante.

### 5.2.2. Análisis de los datos epidemiológicos.

- **Perfiles de bandas obtenidos según su origen.**

Con la técnica PFGE se observa que sólo el 23 % de los pulsotipos son exclusivos de ubre mientras que el 42 % de los pulsotipos incluyen a cepas aisladas del medioambiente y de las muestras de leche (ilustración 22). El análisis mediante $GTG_5$-PCR muestra un mismo porcentaje de los perfiles de bandas (27 %) exclusivos de ubre y exclusivos del medioambiente y, por tanto, casi la mitad de los perfiles de bandas (46 %) tienen un origen mixto (ilustración 23).

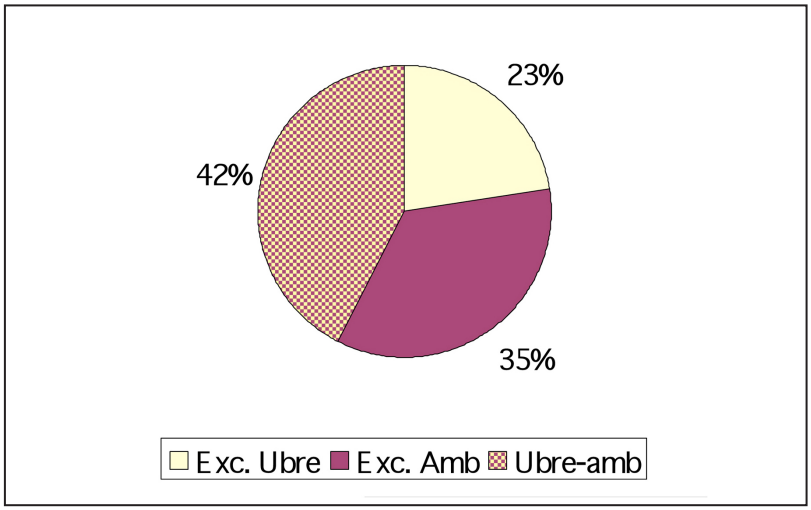



Ilustración 22. Porcentajes de los pulsotipos aislados según su origen.

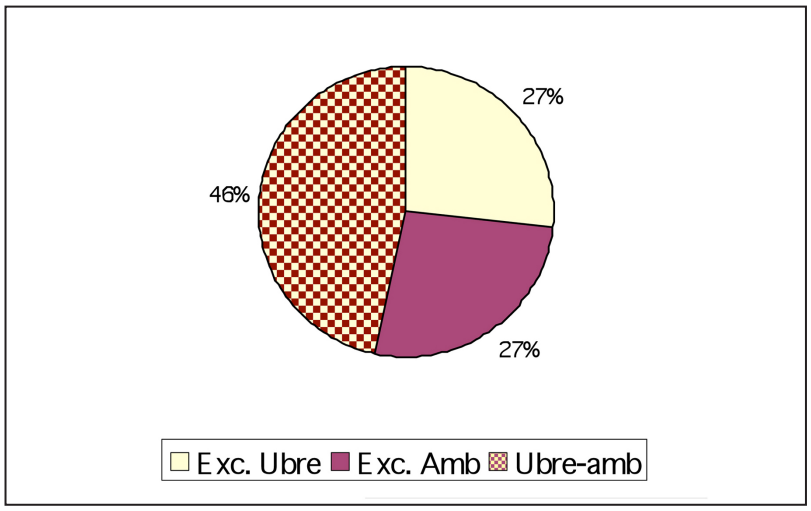



Ilustración 23. Porcentajes de los perfiles de bandas ($GTG_5$-PCR) aislados según su origen.

- **Perfiles de bandas obtenidos en las ganaderías estudiadas: Heterogeneidad de los perfiles de bandeo obtenidos.**

La técnica que aporta una mayor diversidad genética, en referencia al número de perfiles principales y perfiles secundarios, es PFGE presentando 27 perfiles principales (> 85 % de

Tabla 37. Pulsotipos encontrados en las cepas aisladas de ubre y medioambiente, analizados por PFGE, por explotación.

| PERFILES | EXPLOTACIONES | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | | 1A | | 1A 1B |
| 2 | 2 | | | |
| 3 | | | | 3 |
| 4 | | | 4A 4B | 4A 4B |
| 5 | | | 5A | 5A 5B |
| 6 | | | 6A | 6A 6B |
| 7 | | | | 7 |
| 8 | 8A 8B | 8A 8B | 8A | 8A |
| 9 | 9A | 9B | 9A 9B | 9A 9B |
| 10 | 10A 10B | 10A 10B | 10A 10B | 10A 10B |
| 11 | | 11A 11B | | |
| 12 | 12B | 12A 12B | | 12A |
| 13 | 13B | 13B | 13A 13B | 13A 13B |
| 14 | | | 14 | 14 |
| 15 | | | | 15 |
| 16 | | | 16A 16B | 16A |
| 17 | 17B | | 17B | 17A |
| 18 | | 18A 18B | 18A | 18A 18B |
| 19 | | | 19 | 19 |
| 20 | 20 | | 20 | 20 |
| 21 | | | | 21 |
| 22 | | 22 | 22 | |
| 23 | | 23 | 23 | |
| 24 | | | 24 | |
| 25 | | 25 | 25 | |
| 26 | | | 26 | |
| 27 | | | | 27 |
| Total pulsotipos principales | 8 | 13 | 15 | 20 |
| Total pulsotipos | 10 | 16 | 23 | 28 |

similitud) y 40 pulsotipos frente a 11 perfiles principales (> 85 % de similitud) y 15 perfiles secundarios obtenido mediante $GTG_5$-PCR. Si desglosamos estos datos por explotación, se obtiene una media de 14 perfiles de bandas principales distintos por explotación, y una media de 19,3 pulsotipos distintos por explotación, mediante PFGE (tabla 37), mientras que la media de perfiles de bandeo distintos obtenidos por explotación con la técnica $GTG_5$-PCR es de 3,8 para los perfiles principales y 4,8 para los perfiles secundarios (tabla 38).

Tabla 38. Perfiles de bandas encontrados en las cepas aisladas de ubre y medioambiente, analizados por $GTG_5$-PCR, por explotación.

| PERFILES | EXPLOTACIONES | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | | 1A | 1A | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | 4A | 4A | 4A | 4A |
| 5 | | 5 | | |
| 6 | | 6 | | |
| 7 | 7 | 7 | | |
| 8 | 8A 8B | 8A 8B | 8A 8B | 8A 8B |
| 9 | | | | 9A |
| 10 | | | | |
| 11 | | | | |
| Total perfiles principales | 3 | 6 | 3 | 3 |
| Total perfiles secundarios | 4 | 7 | 4 | 4 |

- **Concordancia entre las cepas aisladas en las distintas explotaciones.**

Según la técnica PFGE se observa que el 37,5 % de los pulsotipos son exclusivos de una explotación, mientras que un 20 % de los pulsotipos son comunes a 3 y 4 de las explotaciones (ilustración 24). Por otra parte, la técnica $GTG_5$-PCR permite observar que el 33,3 % de los perfiles de bandas son exclusivos de una explotación, sólo un 6,7 % de los perfiles de bandas son comunes a 3 de las explotaciones y más de un 25 % de los perfiles de bandas son comunes a las 4 explotaciones (ilustración 25).

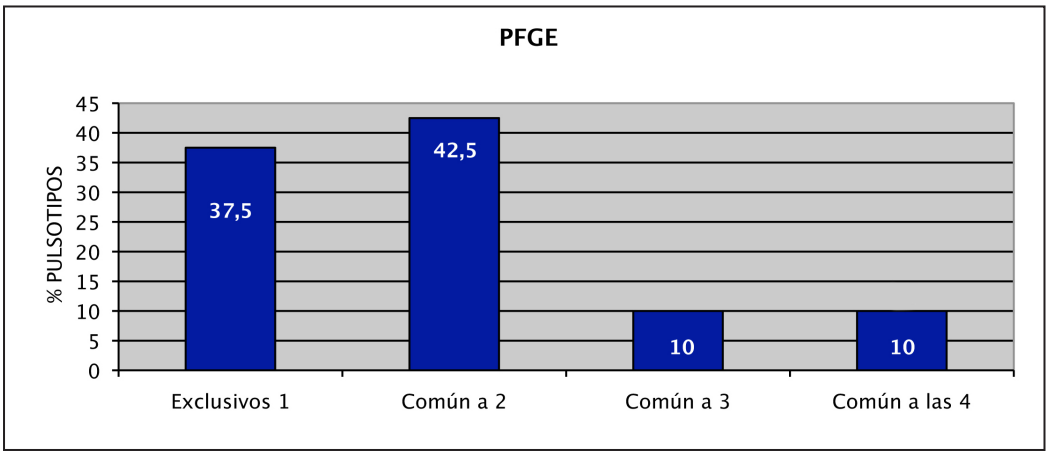



Ilustración 24. Representación de los pulsotipos comunes en las ganaderías estudiadas según PFGE.

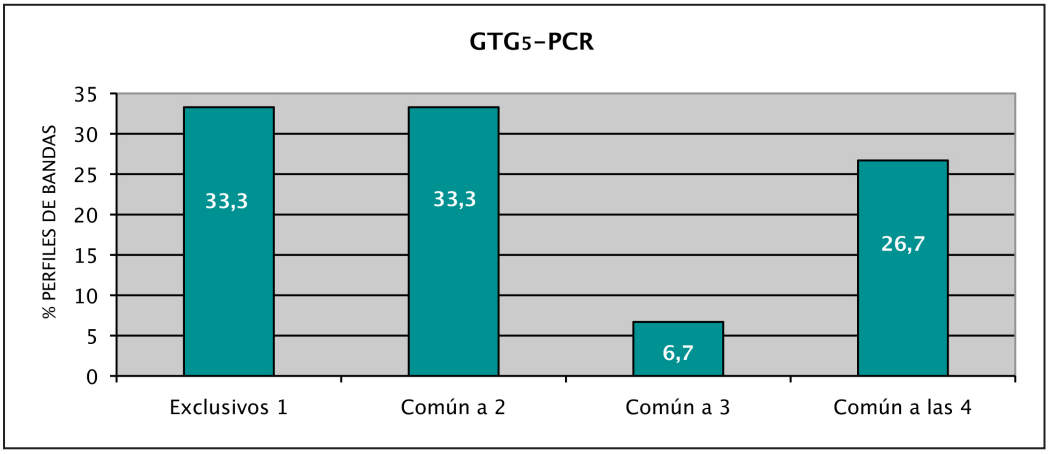



Ilustración 25. Representación de los perfiles de bandas comunes en las ganaderías estudiadas según $GTG_5$-PCR.

- **Perfiles de bandas predominantes en ubre y predominantes en medioambiente obtenidos según la técnica de tipificación PFGE y la técnica $GTG_5$-PCR.**

Se estudiaron los perfiles de bandas predominantes en medioambiente y ubre, por explotación, considerando como tales aquellos que constituyen más de un 10 % de las cepas aisladas en cada explotación (tablas 39 y 40). En dichas tablas se observa, en las cepas analizadas por PFGE, concordancia en el pulsotipo 10A entre los pulsotipos predominantes de las cepas aisladas de ubre y las aisladas de medioambiente, y una concordancia total entre los perfiles de bandas predominantes, analizados por $GTG_5$-PCR, en ambos orígenes.

Así mismo se deduce que los perfiles predominantes obtenidos por PFGE se encuentran en las cepas aisladas fundamentalmente del material del pasillo (estiércol) y en las camas y los perfiles predominantes obtenidos por la técnica $GTG_5$-PCR se corresponden con cepas aisladas del material del pasillo (estiércol), suelo de la sala de ordeño y en las camas (tablas 39 y 40).

Tabla 39. Pulsotipos predominantes (1) obtenidos por PFGE aislados de muestras de leche y muestras medioambientales por explotación.

| | | GRANJAS | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | 2 | | 3 | 4 | |
| Pulsotipos distintos | | 10 | | 16 | | 23 | 28 | |
| N.° de cepas aisladas y tipificadas | | 51 | | 42 | | 60 | 65 | |
| Cepas predominantes | | 10A 10B 8A | | 10A 10B 13B 18B | | 10A 8A | 10A 13A 16A 5A | |
| Ubre | | 10A 10B | | 10A 13B 10B | | 10A 8A | 10A 16A 5A | |
| Ambiente | | 10A | 8A | 10A | 18B | 10A | 10A | 13A |
| Área lactación | Material cama | | X | X | X | | X | X |
| | Pesebre | | X | | | | X | |
| | Bebedero | | X | | | | | |
| | Estiércol pasillo | | | X | X | X | X | X |
| Área ordeño | Pezonera | X | | | | | | |
| | Suelo sala | | | | | | | X |
| | Guantes ordeñador | | X | | | | | |
| | Piel ubre | | | | | | X | X |
| Área secado | Material cama | | | | | X | | |
| | Estiércol pasillo | X | | | | X | | |
| | Pesebre | | | | | | | |
| | Bebedero | | | | | | | |

(1) Pulsotipos que constituyen más de un 10 % de las cepas aisladas en la explotación.

Tabla 40. Perfiles predominantes (1) obtenidos por la técnica $GTG_5$-PCR aislados de muestras de leche y muestras medioambientales por explotación.

| | | GRANJAS | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | 2 | | 3 | | | 4 | | |
| Perfiles de bandas distintos | | 8 | | 11 | | 7 | | | 8 | | |
| N.° de cepas tipificadas | | 50 | | 40 | | 63 | | | 65 | | |
| Cepas predominantes | | 8A 8B | | 8A 8B 4A | | 8A 8B 4A | | | 8A 8B 4A | | |
| Ubre | | 8A 8B | | 8B 4A 8A | | 8A 8B 4A | | | 8A 8B 4A | | |
| Ambiente | | 8A | 8B | 8B | 4A | 8A | 8B | 4A | 8A | 8B | 4A |
| Área lactación | Material cama | | X | X | X | | | | X | X | |
| | Pesebre | X | | | | | | | | X | |
| | Bebedero | | | | | | | | X | | X |
| | Estiércol pasillo | X | X | X | X | X | | X | X | X | X |
| Área ordeño | Pezonera | X | | X | | | X | | X | | |
| | Suelo sala | | | | | | X | X | X | X | X |
| | Guantes ordeñador | X | | | | | | | | | |
| | Piel ubre | | | | X | | | | X | X | X |
| Área secado | Material cama | | | | | | X | | | | X |
| | Estiércol pasillo | | X | | | X | X | | | | |
| | Pesebre | | | | | | | | | | |
| | Bebedero | | | | | X | | | | | |

Perfiles de banda que constituyen más de un 10 % de las cepas aisladas en la explotación.

### 5.2.3. Test de susceptibilidad antibiótica.

Se seleccionaron 80 cepas de *Strep.uberis*, 50 cepas procedentes de procesos infecciosos completos y 30 cepas predominantes procedentes del medioambiente con un origen mixto (tabla 41), y se realizaron antibiogramas para 11 antibióticos pertenecientes a diferentes grupos de antibióticos.

Tabla 41. Distribución de pulsotipos de las cepas analizadas mediante antibiograma, según su origen.

| CEPAS SELECCIONADAS PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE ANTIBIOGRAMAS | | | |
|---|---|---|---|
| Cepas | 80 | ORIGEN DE LA CEPA | |
| | | INFECCIÓN MAMARIA | MEDIOAMBIENTE |
| | | 50 | 30 |
| Pulsotipos | 1A,1B,5A,5B,6A,8A,9A,10A,10B,13A,13B,16A,16B,22,23 | 1A,1B,5A,6A,8A,9A,10A,10B,13B,16A,16B,22,23 | 5B,8A,9A,10A,10B,13A |

- **Patrones de susceptibilidad según origen.**

Si comparamos la susceptibilidad antibiótica de las cepas procedentes de procesos infecciosos completos frente a las cepas aisladas del medioambiente, se observan diferencias significativas en el porcentaje de cepas resistentes y sensibles respecto a los antibióticos Cefalotina, Eritromicina y Lincomicina mientras que para el resto de los antibióticos no se observan diferencias significativas en función del origen (tabla 42). Existe un mayor porcentaje de cepas medioambientales resistentes a los antibióticos: Estreptomicina, Tetraciclina, Penicilina G,

Tabla 42. Comparación de los patrones de resistencia antibiótica de las cepas de *Strep.uberis* en función de la procedencia.

| GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS | ANTIBIÓTICOS | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO AMBIENTALES | | SIG. EST. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NO.[1] | % | NO.[1] | % | |
| Aminoglicósidos | Kanamicina | 26 | 52 | 13 | 43,3 | NS |
| | Estreptomicina | 32 | 64 | 25 | 83,3 | NS |
| | Gentamicina | 19 | 38 | 11 | 36,7 | NS |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | 27 | 54 | 22 | 73,3 | NS |
| Penicilinas-lactámicos | Penicilina G | 13 | 26 | 13 | 43,3 | NS |
| Quinolonas | Acido nalidixico | 49 | 98 | 30 | 100 | NS |
| Cefalosporinas-lactámicos | Cefalotina | 21 | 42 | 22 | 73,3 | * |
| Glycopéptidos | Vancomicina | 19 | 38 | 18 | 60 | NS |
| Macrolidos | Eritromicina | 25 | 50 | 22 | 73,3 | * |
| Aminocuraminas | Novobiocina | 42 | 84 | 29 | 96,7 | NS |
| Licosamidas | Lincomicina | 17 | 34 | 20 | 66,7 | * |

NO.[1] N.º de cepas de *Strep.uberis*.
NS. Diferencias no significativas.
* Diferencias significativas p<0,05.

Tabla 43. Comparación de los patrones de sensibilidad antibiótica de las cepas de *Strep.uberis* en función de la procedencia.

| GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS | ANTIBIÓTICOS | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO AMBIENTALES | | SIG. EST. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NO.[1] | % | NO.[1] | % | |
| Aminoglicósidos | Kanamicina | 18 | 36 | 14 | 46,7 | NS |
| | Estreptomicina | 14 | 28 | 3 | 10 | NS |
| | Gentamicina | 25 | 50 | 14 | 46,7 | NS |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | 15 | 30 | 6 | 20 | NS |
| Penicilinas-lactámicos | Penicilina G | 18 | 36 | 6 | 20 | NS |
| Quinolonas | Acido nalidixico | 0 | 0 | 0 | 0 | NS |
| Cefalosporinas-lactámicos | Cefalotina | 27 | 54 | 7 | 23,3 | * |
| Glycopéptidos | Vancomicina | 30 | 60 | 12 | 40 | NS |
| Macrolidos | Eritromicina | 18 | 36 | 2 | 6,7 | * |
| Aminocuraminas | Novobiocina | 7 | 14 | 0 | 0 | NS |
| Licosamidas | Lincomicina | 20 | 40 | 3 | 10 | * |

NO.[1] N.º de cepas de *Strep.uberis*.
NS. Diferencias no significativas.
* Diferencias significativas p<0,05.

Tabla 44. Comparación de los patrones de resistencia intermedia antibiótica de las cepas de *Strep.uberis* en función de la procedencia.

| GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS | ANTIBIÓTICOS | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO AMBIENTALES | | SIG. EST. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | NO.[1] | % | NO.[1] | % | |
| Aminoglicósidos | Kanamicina | 6 | 12 | 3 | 10 | NS |
| | Estreptomicina | 4 | 8 | 2 | 6,7 | NS |
| | Gentamicina | 6 | 12 | 5 | 16,7 | NS |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | 8 | 16 | 2 | 6,7 | NS |
| Penicilinas-lactámicos | Penicilina G | 19 | 38 | 11 | 36,7 | NS |
| Quinolonas | Acido nalidixico | 1 | 2 | 0 | 0 | NS |
| Cefalosporinas-lactámicos | Cefalotina | 2 | 4 | 1 | 3,3 | NS |
| Glycopéptidos | Vancomicina | 1 | 2 | 0 | 0 | NS |
| Macrolidos | Eritromicina | 7 | 14 | 6 | 20 | NS |
| Aminocuraminas | Novobiocina | 1 | 2 | 1 | 3,3 | NS |
| Licosamidas | Lincomicina | 13 | 26 | 7 | 23,3 | NS |

NO.[1] N.º de cepas de *Strep.uberis*.
NS. Diferencias no significativas.
* Diferencias significativas p<0,05.

Cefalotina, Vancomicina, Eritromicina, Novobiocina y Lincomicina mientras que el mayor porcentaje de cepas de procesos infecciosos son sensibles a los antibióticos: Kanamicina, Estreptomicina, Tetraciclina, Penicilina G, Cefalotina, Vancomicina, Eritromicina, Novobiocina y Lincomicina. Al comparar los patrones de susceptibilidad intermedia de las cepas de *Strep.uberis* procedentes de procesos infecciosos completos frente a las cepas aisladas del medioambiente, se obtienen resultados semejantes, no se encuentran diferencias significativas en ninguno de los casos analizados (tabla 43 y 44).

- **Patrones de susceptibilidad según pulsotipos.**

Tanto los pulsotipos como las cepas presentaron patrones de susceptibilidad antibiótica muy variados, excepto para un grupo de 11 cepas de *Strep.uberis* (7 cepas de origen ambiental y 4 cepas de procesos infecciosos completos) que presentó un patrón resistente para los 11 antibióticos y otro grupo, de 2 cepas distintas pertenecientes a un mismo proceso infeccioso completo, que presentó un patrón sensible para los 10 antibióticos.

Tabla 45. Pulsotipos obtenidos por porcentaje de resistencia a antibióticos.

| PERFIL DE RESISTENCIA AL 80-100 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | | PERFIL DE RESISTENCIA AL 50-80 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | | PERFIL DE RESISTENCIA AL 20-50 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | | PERFIL DE RESISTENCIA A <20 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N[1] | PULSOTIPOS | N[1] | PULSOTIPOS | N[1] | PULSOTIPOS | N[1] | PULSOTIPOS |
| 10 | 10A | 16 | 10A | 8 | 10A | 1 | 10A |
| 2 | 10B | 1 | 10B | 2 | 10B | 1 | 10B |
| 2 | 13A | 4 | 13A | | | | |
| 2 | 13B | 4 | 13B | | | | |
| 3 | 8A | 4 | 8A | 3 | 8A | | |
| 1 | 6A | | | | | | |
| 1 | 16A | | | | | | |
| 2 | 9A | 4 | 9A | | | | |
| 1 | 5B | | 5B | | | | |
| | | 2 | 23 | 1 | 23 | | |
| | | 1 | 22 | | | | |
| | | 1 | 16B | | | | |
| | | | | 1 | 5A | | |
| | | | | 1 | 11A | | |
| | | | | 1 | 17B | | |
| 24 | | 37 | | 17 | | 2 | |

N[1] número de cepas de *Strep.uberis*

Si calculamos el número de cepas resistentes entre el 100 % y el 80 % de los antibióticos, entre el 80 % y el 50 % de los antibióticos, entre el 50 % y el 20 % de los antibióticos y menor del 20 %, y analizamos los pulsotipos correspondientes a cada cepa obtenemos que el pulsotipo más común para las cepas resistentes a antibióticos es: 10A, seguido del pulsotipo 8A (tabla 45), y para las cepas sensibles a antibióticos coincide este pulsotipo 10A, siendo el más común, seguido del pulsotipo 8A (tabla 46).

Tabla 46. Pulsotipos* obtenidos por porcentaje de sensibilidad a antibióticos.

| PERFIL DE SENSIBILIDAD AL 80-100 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | | PERFIL DE SENSIBILIDAD AL 50-80 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | | PERFIL DE SENSIBILIDAD AL 20-50 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | | PERFIL DE SENSIBILIDAD A <20 % DE LOS ANTIBIÓTICOS | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N[1] | PULSOTIPOS | N[1] | PERFILES | N[1] | PULSOTIPOS | N[1] | PULSOTIPOS |
| 3 | 10A | 9 | 10A | 14 | 10A | 3 | 10A |
| | | 2 | 10B | 1 | 10B | 1 | 10B |
| | | 1 | 22 | | | | |
| | | 3 | 23 | | | | |
| | | | | 4 | 13A | | |
| | | | | 4 | 13B | 2 | 13B |
| | | | | 1 | 16B | | |
| 1 | 8A | 2 | 8A | 4 | 8A | | |
| | | | | 4 | 9A | | |
| | | 1 | 17B | | | | |
| | | 1 | 5A | | | | |
| | | | | 1 | 11A | | |
| 4 | | 19 | | 33 | | 6 | |

N[1] número de cepas de *Strep.uberis*.

* 18 cepas no son sensibles a ningún antibiótico.

- **Patrones de susceptibilidad en el conjunto de los datos.**

El test de susceptibilidad antibiótica revela que más de un 50 % de las cepas de *Strep. uberis* son resistentes a los siguientes antibióticos Kanamicina, Estreptomicina, Tetraciclina, ácido nalidíxico, Cefalotina, Eritromicina y Novobiocina como se muestra en la ilustración 26. Mientras que el 50 % de las cepas de *Strep.uberis* son sensibles Gentamicina y Vancomicina (ilustración 27). En cuanto a los resultados del test de susceptibilidad intermedia se observa

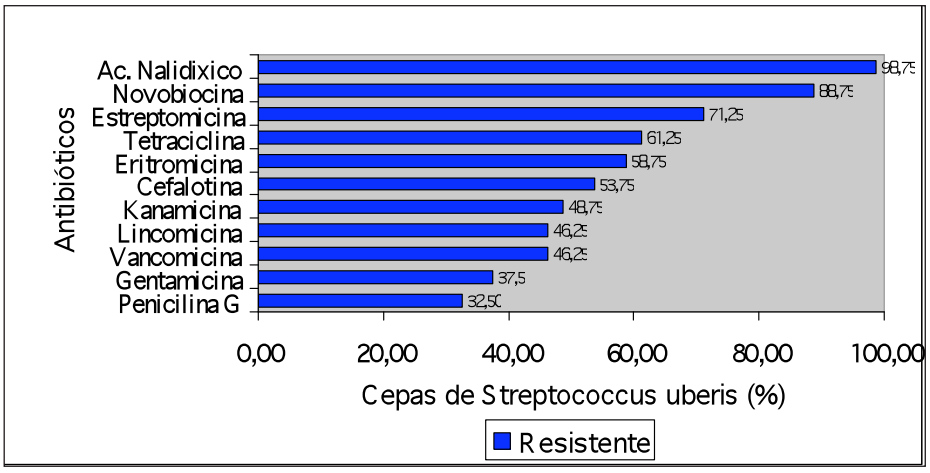



Ilustración 26. Porcentaje de cepas de *Strep.uberis* resistentes por antibióticos.

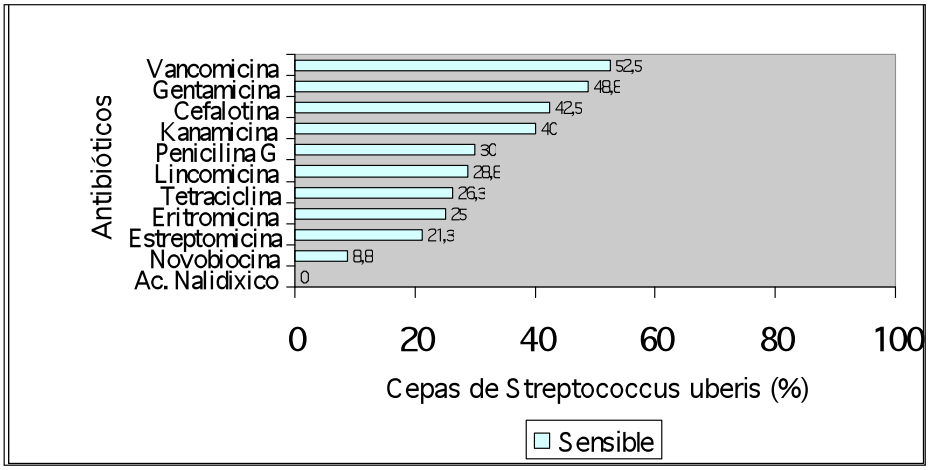



Ilustración 27. Porcentaje de cepas de *Strep.uberis* sensibles por antibióticos.

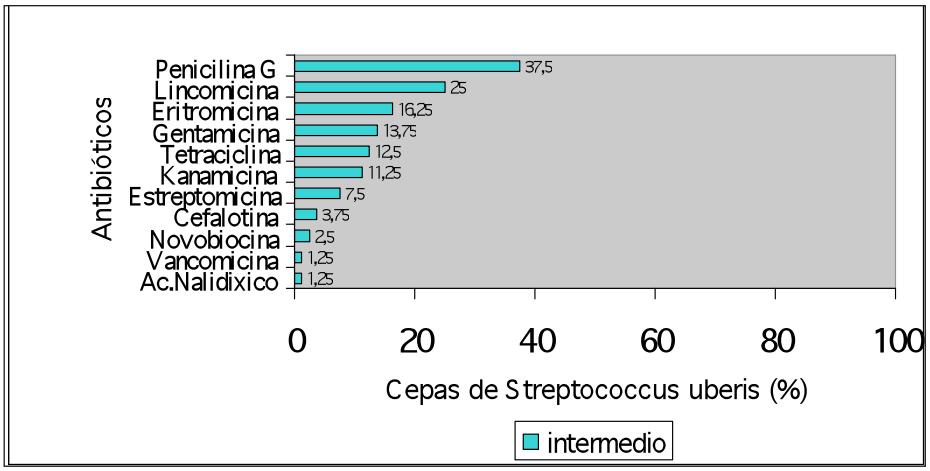



Ilustración 28. Porcentaje de cepas de *Strep.uberis* intermedio por antibióticos.

Tabla 47. Patrones de susceptibilidad antibiótica según perfiles para las cepas de *Strep.uberis* procedentes de procesos infecciosos completos y medioambiente.

| | RESISTENTE | | | | | INTERMEDIO | | | | | SENSIBLE | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | |
| ANTIBIÓTICOS | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) |
| Kanamicina | 26 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>16A<br>16B<br>6A<br>8A<br>9A | 13 | 10A<br>10B<br>13A<br>5B<br>8A | 39<br>(48,75) | 6 | 10A<br>10B<br>9A | 3 | 10A<br>13A<br>9A | 9<br>(11,25) | 18 | 23<br>1A<br>1B<br>5A<br>8A<br>9A | 14 | 10A<br>13A<br>8A | 32<br>(40) |
| Estreptomicina | 32 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>16A<br>16B<br>6A<br>8A<br>9A | 25 | 10A<br>13A<br>8A<br>9A | 57<br>(71,25) | 4 | 10A<br>10B<br>11A | 2 | 10A<br>5B | 6<br>(7,5) | 14 | 23<br>10A<br>10B<br>17B<br>5A<br>8A<br>9A | 3 | 10A<br>8A | 17<br>(21,3) |
| Gentamicina | 19 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>16A<br>6A<br>8A<br>9A | 11 | 10A<br>10B<br>13A<br>8A | 30<br>(37,50) | 6 | 23<br>10A<br>10B | 5 | 10A<br>5B<br>8A | 11<br>(13,75) | 25 | 23<br>10A<br>10B<br>11A<br>13B<br>16B<br>17B<br>5A<br>8A<br>9A | 14 | 10A<br>13A<br>8A<br>9A | 39<br>(48,8) |
| Tetraciclina | 27 | 10A<br>10B<br>11A<br>13B<br>16A<br>17B<br>5A<br>6A<br>8A<br>9A | 22 | 10A<br>10B<br>13A<br>5B<br>8A<br>9A | 49<br>(61,25) | 8 | 10A<br>10B<br>13B<br>16B<br>8A | 2 | 10A<br>8A | 10<br>(12,5) | 15 | 22<br>23<br>10A<br>13B<br>8A<br>9A | 6 | 10A<br>13A | 21<br>(26,3) |

Tabla 47. Patrones de susceptibilidad antibiótica según perfiles para las cepas de *Strep.uberis* procedentes de procesos infecciosos completos y medioambiente (continuación).

| | RESISTENTE | | | | | INTERMEDIO | | | | | SENSIBLE | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | |
| ANTIBIÓTICOS | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) |
| Penicilina G | 13 | 10A<br>11A<br>13B<br>16A<br>6A<br>8A<br>9A | 13 | 10A<br>10B<br>13A<br>5B<br>8A | 26<br>(32,5) | 19 | 23<br>10A<br>10B<br>13B<br>16B<br>8A<br>9A | 11 | 10A<br>13A<br>8A<br>9A | 30<br>(37,5) | 18 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>17B<br>5A<br>8A | 6 | 10A<br>13A<br>8A | 24<br>(30) |
| Ac. Nalidixico | 49 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>16A<br>16B<br>17B<br>5A<br>6A<br>8A<br>9A | 30 | 10A<br>13A<br>5B<br>8A<br>9A | 79<br>(98,75) | 1 | 11A | 0 | | 1<br>(1,25) | 0 | | 0 | | 0<br>0 |
| Cefalotina | 21 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>16A<br>17B<br>6A<br>8A<br>9A | 22 | 10A<br>10B<br>13A<br>5B<br>8A | 43<br>(53,75) | 2 | 10A<br>13B | 1 | 8A | 3<br>(3,75) | 27 | 23<br>10A<br>10B<br>11A<br>13B<br>16B<br>5A<br>8A<br>9A | 7 | 10A<br>13A<br>9A | 34<br>(42,5) |
| Vancomicina | 19 | 10A<br>10B<br>13B<br>16A<br>16B<br>6A<br>8A<br>9A | 18 | 10A<br>10B<br>13A<br>5B<br>8A<br>9A | 37<br>(46,25) | 1 | 11A | 0 | | 1<br>(1,25) | 30 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>17B<br>5A<br>8A<br>9A | 12 | 10A<br>13A<br>8A | 42<br>(52,5) |

Tabla 47. Patrones de susceptibilidad antibiótica según perfiles para las cepas de *Strep.uberis* procedentes de procesos infecciosos completos y medioambiente (continuación).

| | RESISTENTE | | | | | INTERMEDIO | | | | | SENSIBLE | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | | CEPAS PROCESOS INFECCIOSOS | | CEPAS MEDIO-AMBIENTE | | |
| ANTIBIÓTICOS | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) | N1 | P2. | N1 | P2. | T3. ( %) |
| Eritromicina | 25 | 23<br>10A<br>10B<br>11A<br>13B<br>16A<br>16B<br>6A<br>8A<br>9A | 22 | 10A<br>10B<br>13A<br>5B<br>8A<br>9A | 47<br>(58,75) | 7 | 23<br>10A<br>8A | 6 | 10A<br>13A | 13<br>(16,25) | 18 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>17B<br>5A<br>8A | 2 | 10A | 20<br>(25) |
| Novobiocina | 42 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>16A<br>16B<br>5A<br>6A<br>8A<br>9A | 29 | 10A<br>10B<br>13A<br>5B<br>8A<br>9A | 71<br>(88,75) | 1 | 10A | 1 | 10A | 2<br>(2,5) | 7 | 23<br>10A<br>10B<br>11A<br>17B<br>8A | 0 | | 7<br>(8,8) |
| Lincomicina | 17 | 23<br>10A<br>16A<br>16B<br>5A<br>6A<br>8A<br>9A | 20 | 10A<br>10B<br>13A<br>8A | 37<br>(46,25) | 13 | 10A<br>10B<br>11A<br>13B<br>8A | 7 | 10A<br>13A<br>5B<br>8A<br>9A | 20<br>(25) | 20 | 22<br>23<br>10A<br>10B<br>13B<br>17B<br>8A | 3 | 10A | 23<br>(28,8) |

N[1] número de cepas de
P[2]. perfiles de pulsotipos.
T[3]. total de cepas de *Strep.uberis*.

que menos del 40 % de las cepas analizadas presentan susceptibilidades intermedias a estos 11 antibióticos (ilustración 28). Los patrones de susceptibilidad en el conjunto de los datos se pueden observar en la tabla 47.

### 5.2.4. Detección de genes de virulencia en las cepas de *Streptococcus uberis*.

Se estudio la distribución de nueve genes asociados con la virulencia en 24 cepas de *Strep.uberis,* según la selección previamente descrita, 20 cepas procedentes de infecciones mamarias y 4 cepas procedentes del medioambiente.

La técnica de PCR identificó los 9 genes asociados con la virulencia denominados *has*A, *has*B, *has*C, *gap*C, *ibp*, *opp*F, *pau*A/*pau*B, *skc* y *sua*. Cada gen de virulencia se visualizó como una única banda con un peso molecular comprendido entre 200 pb y 1200 pb. Para la interpretación de los resultados se utilizaron 2 patrones de ADN de 100 pb y de 1000 pb.

La distribución de los genes asociados con la virulencia de cepas de *Strep.uberis* se muestra en la tabla 48 e ilustración 29. El factor de virulencia más común, se encuentra en todas las cepas de *Strep.uberis* analizadas, es el factor GapC (100 %). El factor *opp*F se encontró en 23 cepas (95,8 %), el factor *sua* se encontró en 22 cepas (91,7 %), los factores HasA y HasB se encontraron en 21 cepas (87,5 %), los factores PauA/PauB se encontraron

Tabla 48. Distribución de los factores de virulencia en las cepas de *Strep.uberis* analizadas.

| GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA | N1 | % |
|---|---|---|
| HasA | 21 | 87,5 |
| HasB | 21 | 87,5 |
| HasC | 0 | 0 |
| GapC | 24 | 100 |
| Ibp | 0 | 0 |
| OppF | 23 | 95,8 |
| PauA/PauB | 18 | 75 |
| Skc | 18 | 75 |
| Sua | 22 | 91,7 |

N[1] número de cepas de *Strep.uberis*.

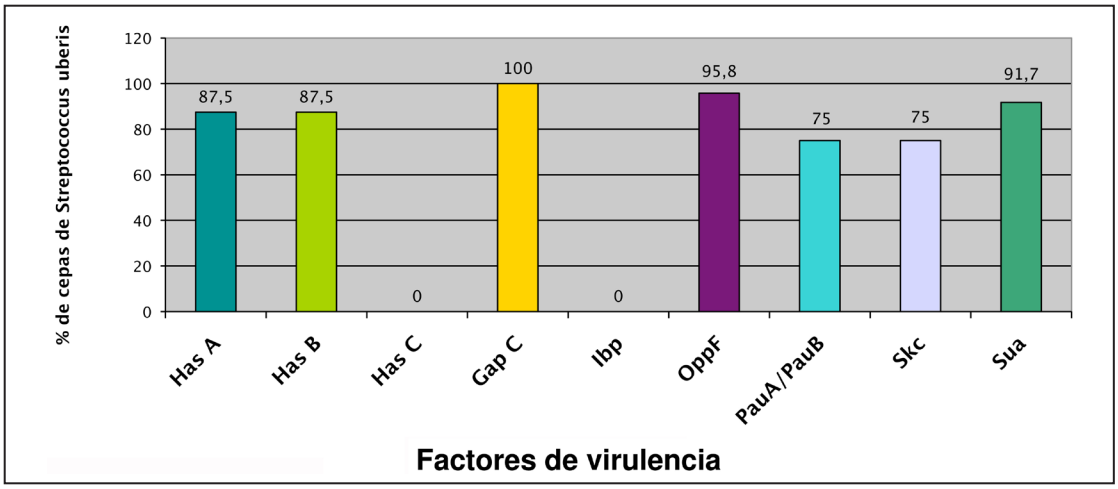



Ilustración 29. Representación de los genes de virulencia asociados a 24 cepas de *Strep.uberis*.

en 18 cepas (75 %), mientras que los factores HasC y Ibp no se encontraron en ninguna de las cepas de *Strep.uberis* analizadas (ilustración 29).

- **Perfiles de virulencia según pulsotipos.**

Los perfiles de virulencia encontrados en las cepas de *Strep.uberis* analizadas son 8, denominados con las letras A hasta H, entre los cuales el mayoritario corresponde al perfil A (7 factores de virulencia) con un total de 14 cepas de *Strep.uberis* con los siguientes pulsotipos: 10A 13B 8A 16A, seguido del perfil E y H (6 factores de virulencia) con un total

Tabla 49. Perfiles de virulencia detectados en las 24 cepas de *Strep.uberis* en función de su pulsotipo.

| | | | FACTORES DE VIRULENCIA | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Has | | | OTROS | | | | | |
| N.° CEPAS | PULSOTIPO | PERFIL | A | B | C | GapC | Ibp | OppF | PauA/PauB | Skc | Sua |
| 14 | 10A 13B 8A 16A | A | + | + | - | + | - | + | + | + | + |
| 2 | 10A | B | - | - | - | + | - | + | + | - | + |
| 1 | 10A | C | - | - | - | + | - | + | - | + | - |
| 1 | 16A | D | + | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 2 | 10A | E | + | + | - | + | - | + | + | - | + |
| 1 | 13B | F | + | + | - | + | - | + | - | - | + |
| 1 | 8A | G | + | + | - | + | - | - | - | - | + |
| 2 | 10A 8A | H | + | + | - | + | - | + | - | + | + |

de 2 cepas de *Strep.uberis*, respectivamente, y presentan el pulsotipo: 10A, para el perfil E, y 10A y 8A ,para el perfil H, mientras que el perfil minoritario es el C (3 factores de virulencia) con un sola cepa de *Strep.uberis,* y de nuevo con el pulsotipo 10A.

Si analizamos el pulsotipo 10A encontramos 16 cepas que presentan hasta 5 perfiles de virulencia distintos, esta variabilidad ocurre en el resto de los pulsotipos mayoritarios el pulsotipo 8A (3 cepas) que presentan 2 perfiles de virulencia distintos; el pulsotipo 13B (1 cepa) y el pulsotipo 16A (1 cepa) que presentan 2 perfiles de virulencia diferentes (tabla 49).

- **Factores de virulencia según origen.**

Si comparamos los factores de virulencia de las cepas aisladas de los procesos infecciosos frente a los de las cepas aisladas del medioambiente, se obtienen diferencias no significativas (tabla 50).

Tabla 50. Comparación de los factores de virulencia presentes en las cepas de *Strep.uberis* en función de la procedencia.

| FACTOR DE VIRULENCIA | ORIGEN DE LAS CEPAS DE *STREP.UBERIS* | | | | SIG. ESTADÍSTICA |
|---|---|---|---|---|---|
| | INFECCIÓN MAMARIA | | MEDIOAMBIENTE | | |
| | N1 | % | N | % | |
| HasA | 18 | 90 | 3 | 75 | NS |
| HasB | 18 | 90 | 3 | 75 | NS |
| HasC | 0 | 0 | 0 | 0 | NS |
| GapC | 20 | 100 | 4 | 100 | NS |
| Ibp | 0 | 0 | 0 | 0 | NS |
| OppF | 19 | 95 | 4 | 100 | NS |
| PauA/PauB | 15 | 75 | 3 | 75 | NS |
| Skc | 15 | 75 | 3 | 75 | NS |
| Sua | 18 | 90 | 4 | 100 | NS |

N[1] número de cepas de *Strep.uberis*.
NS No hay diferencias significativas p > 0,05.

- **Perfiles de virulencia según su origen.**

Si analizamos el conjunto de las cepas de *Strep.uberis* según sus perfiles, pulsotipos y su origen, se observa, por un lado, que las cepas aisladas del medioambiente presentan el pulsotipo 10A mientras que las cepas responsables de provocar infecciones mamarias presentan los mismos pulsotipos 13B 8A 16A y también 10A, con independencia del perfil de virulencia asociado (tabla 51) y, por otro lado, los perfiles que presentan un mayor número de genes de virulencia son el A y el H (tabla 49) donde se encuentran 3 de las 4 cepas de *Strep.uberis* aisladas del medioambiente junto con 13 de las 20 cepas de *Strep. uberis* aisladas de infecciones mamarias.

Tabla 51. Pulsotipos asociados a los perfiles de virulencia según el origen de las cepas.

| PERFILES | ORIGEN Y PERFILES DE LAS CEPAS DE *STREP.UBERIS* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | INFECCIÓN MAMARIA | | MEDIOAMBIENTE | |
| | N[1] | PULSOTIPO | N[1] | PULSOTIPO |
| A | 12 | 10A 13B 8A 16A | 2 | 10A |
| B | 1 | 10A | 1 | 10A |
| C | 1 | 10A | — | — |
| D | 1 | 16A | — | — |
| E | 2 | 10A | — | — |
| F | 1 | 13B | — | 10A |
| G | 1 | 8A | — | 10A |
| H | 1 | 8A | 1 | 10A |

N[1] número de cepas de *Strep.uberis*

## 5.3. DISCUSIÓN.

En esta tesis se llevo a cabo el estudio epidemiológico de *Streptococcus uberis*, relacionando las cepas aisladas de las infecciones mamarias y del medio ambiente. El análisis de cepas de *Strep.uberis* se ha llevado a cabo por 2 técnicas moleculares, PFGE y $GTG_5$-PCR, para aportar información epidemiológica sobre las cepas de *Strep.uberis* y comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas.

Analizando las cepas de *Strep.uberis* aisladas en los procesos infecciosos completos de los cuartos sometidos a seguimiento, antes y después del secado, se observan perfiles de bandeo muy heterogéneos. Empleando la técnica PFGE se observa que en un 73,3 % de los cuartos sometidos a seguimiento se aíslan cepas con perfiles de bandas distintos, antes y después del secado. Sólo en el 26,7 % de los cuartos sometidos a seguimiento se encuentran cepas iguales filogenéticamente (pertenecientes al mismo pulsotipo). En el caso de los procesos infecciosos incompletos de los cuartos sometidos a seguimiento, antes del secado, sucede una situación semejante donde el 71,4 % de los cuartos, sometidos a seguimiento, presentan cepas con perfiles de bandas distintos a lo largo del proceso infeccioso y el 28,6 % de los cuartos presentan cepas iguales.

Estos datos indican que existen procesos de curación-reinfección entre los controles mensuales realizados y una duración media muy baja de las infecciones mamarias, producidas por *Strep.uberis*, aproximadamente 40 días, teniendo en cuenta que este método de cálculo puede estar subestimado, dado que algunas infecciones estaban establecidas antes del periodo de estudio y otras han podido continuar después.

Mientras que, empleando la técnica $GTG_5$-PCR, se observa que un porcentaje mayor, un 93 % de los cuartos sometidos a seguimiento, antes y después del secado, presentan cepas con perfiles de bandas distintos y sólo el 7 % de los cuartos presentan cepas iguales. Al analizar los procesos incompletos de los cuartos sometidos a seguimiento, antes del secado, la situación cambia por completo el 41 % de los cuartos presentan cepas con perfiles de bandas distintos, es decir, un 59 % de los cuartos presentan cepas iguales. De nuevo volvemos a concluir lo mismo que con la técnica PFGE, existen procesos de curación-reinfección entre los controles mensuales realizados siendo la duración media de las infecciones similar, en torno a 45 días.

Por tanto, el seguimiento de los procesos infecciosos mamarios mediante técnicas de tipificación molecular (resultados presentados en las tablas 32 y 33) nos presenta las infecciones como procesos en los que se suceden distintas cepas de un mismo patógeno (en este caso *Strep.uberis*), que interpretamos como procesos de curación-reinfección.

En apartado 4.2.4 del capítulo IV de los 44 cuartos que llegaron al secado, diagnosticados como infectados por *Strep.uberis* por métodos convencionales, se deducía que el 66 % se curaron y el 34 % continuaron infectados, a pesar de haber sido tratados durante el secado. Es decir, en un estudio epidemiológico convencional se deduce el porcentaje de fallos del tratamiento al secado en función del porcentaje de casos en los que encontramos el cuarto infectado antes y después del secado, con la aplicación de técnicas de tipificación molecular se discrimina entre no curación (misma cepa) y curación-reinfección (distinta cepa) por lo que la tasa de curación es mayor.

Analizando los 13 y 12 seguimientos completos de cuartos, antes y después del parto, con PFGE y $GTG_5$-PCR, respectivamente, tablas 35 y 36, la tasa de curación o de "éxito" de un tratamiento se valoraría de una manera diferente en función de las herramientas de diagnóstico: con métodos convencionales se hablaría de tan sólo un 37,5% de casos de curación de una infección por *Strep.uberis* tras el tratamiento al secado frente a un 87,5% de casos de curación (distinta cepa antes y después, curación-reinfección) con PFGE (tabla 35); o hablaríamos de un 28,6% de casos de curación tras el tratamiento al secado frente a un 71,4% de casos de curación (distinta cepa antes y después, curación-reinfección) con $GTG_5$-PCR (tabla 36).

La gran variabilidad de cepas aisladas a lo largo de la mayoría de las infecciones conduce a hablar de una baja duración de las infecciones (alrededor de 40 días) y a admitir la existencia de una media de casi 2 re-infecciones por el mismo patógeno (*Strep.uberis*) entre los 3 meses antes y los 3 meses después del secado. Esto podría sugerir, siguiendo la misma lógica, que en los casos donde encontramos la misma cepa, antes y después del secado o en la misma lactación, se podría tratar también de casos de curación seguidos de reinfección por la misma cepa, en muchos casos se trata de cepas predominantes en ubre y medioambiente.

En el capítulo IV se observaba que la tasa de nuevas infecciones al secado (cuartos sin infección por *Strep.uberis* al secado que se encontraban infectados en el primer control tras el parto) era de 5,9 %; en los 13/12 casos sometidos a seguimiento mediante técnicas de tipificación (tablas 34 y 35) observamos 5 casos con nueva IIM tras el parto que si los

sumamos a los 3/4 casos de curación-reinfección pone de relieve una alta tasa de nuevas infecciones tras el secado y periparto. A nivel práctico un tratamiento al secado que no previene la reinfección no es, en ningún caso, un tratamiento efectivo. Muchos autores han observado que las vacas secas, especialmente al principio del secado y en el periparto, tienen alta susceptibilidad para contraer nuevas infecciones (Oliver et al., 1983, Martín-Richard, 2001), sin embargo, también se ha constatado que a pesar de que la terapia al secado con antibióticos reduce la tasa de nuevas infecciones durante la mayor parte del periodo de secado no tiene efecto en la prevención de infecciones al final del periodo de secado (Smith et al., 1985). En nuestro estudio, en los 13/12 procesos seleccionados sometidos a seguimiento y tipificación, se observa que en el 69,2 % y 66,7 % de los casos encontramos un nueva infección en el primer control tras el parto (5 nuevas IIM + 4 re-infecciones de 13 casos con PFGE y 5 nuevas IIM + 3 re-infecciones de 12 casos con $GTG_5$-PCR).

También cabe señalar las diferencias en la tasa de curación que se obtienen en función de la técnica de tipificación molecular aplicada, PFGE o $GTG_5$-PCR, tanto para un ganadero, para un veterinario, como para la industria farmacéutica es importante la diferencia entre hablar de un 90 y un 70 % de curación a un tratamiento, así mismo un tratamiento al secado que no previene la reinfección no es, en ningún caso, un tratamiento efectivo; sin embargo, con ambas metodologías, la "inefectividad" del tratamiento, tal y como se ha comentado arriba, es muy similar del 74,2 % y el 75 %, respectivamente (5 nuevas IIM + 4 re-infecciones + 1 no curación, de 13 casos, con PFGE y 5 nuevas IIM + 3 re-infecciones + 1 no curación, de 12 casos, con $GTG_5$-PCR).

Si analizamos la variabilidad de los perfiles de bandas según su origen obtenemos que, según la técnica PFGE, sólo el 23 % de los pulsotipos son exclusivos de ubre, el 35 % de los pulsotipos son exclusivos de medioambiente y el 42% de los pulsotipos incluyen a cepas aisladas del medioambiente y de las muestras de ubre. Porcentajes semejantes se obtienen con la técnica $GTG_5$-PCR donde el 27 % de los perfiles de bandas son exclusivos de ubre y exclusivos de medioambiente, respectivamente, y el 46 % incluyen a cepas aisladas del medioambiente y de las muestras de ubre.

En base a estos resultados se puede concluir que las 2 técnicas permiten una diferenciación de las cepas en función del origen, pero la técnica de PFGE presenta una mayor discriminación de las cepas. El criterio que se ha seguido, en este trabajo, para

considerar 2 cepas semejantes filogenéticamente es más exigente que los criterios utilizados, habitualmente, por otros autores.

El hecho de que alrededor del 45 % de los perfiles de bandas tengan origen mixto, esto es, incluyan cepas aisladas tanto del medioambiente como de las muestras de ubre sugiere una transmisión medioambiental de cepas de *Strep.uberis* a partir de los reservorios.

Los datos obtenidos por otros investigadores al aplicar técnicas moleculares para analizar la duración de las infecciones y la variabilidad de cepas de *Strep.uberis* durante la lactación y el secado, arrojan resultados semejantes a los presentados en nuestro estudio. Es el caso de McDougall et al. (2004), que aplicaron la técnica PFGE en 5 rebaños de Nueva Zelanda. La toma de muestras de leche se realizó cada 28 días y, obtuvieron que el 50 % de los cuartos presentaban cepas con perfiles de bandas distintos, un total de 173 perfiles de bandas distintos identificados a partir de 234 aislamientos de *Strep.uberis*, y una duración media de las infecciones de 16 días, deduciendo que las infecciones se deben a procesos de curación-reinfección. Algunas de las conclusiones de este trabajo concuerdan con las nuestras.

Del mismo modo Oliver et al. (1998), aplicando una técnica de PCR basada en la amplificación aleatoria del ADN analizaron 12 seguimientos completos en 8 vacas infectadas por *Strep.uberis* antes y después del secado. Concluyendo que existe un fallo en la curación durante el secado, en 4 de los casos (33,3%) no hay curación durante el secado (aparece la misma cepa) y en 8 de los casos (66,7%) existen procesos de curación durante el secado pero seguidos de una reinfección con otra cepa distinta. Estas conclusiones coinciden con nuestros resultados donde los cuartos infectados por *Strep.uberis* se curan y se reinfectan con cepas distintas. En nuestro caso el 73,3% de los cuartos empleando la técnica PFGE y en el 93% de los cuartos empleando la técnica $GTG_5$-PCR.

Otros autores internacionales investigaron la epidemiología de *Strep.uberis*, aplicando PFGE en ganaderías de leche; Wang et al. (1999) estudiaron 6 granjas donde *Strep.uberis* fue el patógeno más prevalente, entre el 60 % y 80 % de los 134 estreptococos aislados de 73 vacas, y obtuvieron patrones de bandeo muy heterogéneos, 74 pulsotipos distintos, y además los aislamientos de diferentes vacas presentaban perfiles de bandas distintos, lo que les lleva a sostener una transmisión medioambiental. Baseggio et al. (1997) analizaron cepas de *Strep.uberis* procedentes 46 vacas localizadas en 10 granjas diferentes, que presentaban 21 perfiles de bandas distintos.

La aplicación de una u otra técnica de tipificación influye en la heterogeneidad de cepas que se pueden encontrar en los estudios epidemiológicos. Así, en este estudio encontramos 40 pulsotipos distintos, obtenidos mediante PFGE, frente a 15 perfiles secundarios distintos obtenidos por la técnica $GTG_5$-PCR en los 218 aislados de *Strep.uberis*.

Sin embargo, otros autores, aplicando otras técnicas moleculares basadas en PCR como la técnica REF empleada por Jayarao et al. (1991) en su estudio, obtienen 17 perfiles distintos a partir de 42 cepas de *Strep.uberis* aisladas de 17 vacas procedentes de 2 granjas, o como la técnica de PCR empleada por Jarayao et al. (1992) en estudios posteriores, presentando una todavía mayor diversidad aplicando de nuevo la técnica REF, 12 perfiles distintos en 22 cepas de *Strep.uberis* aisladas de 9 vacas. Estos resultados no coinciden con los perfiles principales (11) y secundarios (15), obtenidos en nuestro estudio, aplicando la técnica $GTG_5$-PCR que como ya se comento tiene una menor capacidad de discriminación que PFGE. Aunque la diversidad es variable entre uno u otro estudio y no siempre se utilizan los mismos criterios para la definición de pulsotipos, las conclusiones son semejantes.

Algunos autores han deducido una transmisión contagiosa de *Strep.uberis* (62 cepas distintas en 138 aislamientos de *Strep.uberis* y entre 10-26 pulsotipos distintos por explotación, en las 4 ganaderías en estudio) al encontrar idénticas cepas en diferentes cuartos de las mismas o distintas vacas sugirieren una transmisión directa, entre cuartos infectados y no infectados, durante el proceso de ordeño (Phuektes et al., 2001). En nuestro estudio si bien se aislaron cepas idénticas en diferentes cuartos infectados de la misma vaca (tablas 32 y 33, vacas 6, 17, 18, 21), sin embargo, la separación temporal en nuestro caso podría indicar que la vía de transmisión es medioambiental.

En el mismo contexto, Zadoks et al. (2001) diseñaron un estudio longitudinal en una granja de vacas lecheras en Holanda donde apareció un brote producido por *Strep.uberis*. Durante este brote, el número de vacas infectadas fue utilizado para predecir, con cierta exactitud, el número de nuevas infecciones que aparecían posteriormente al muestreo. La eficacia de estas predicciones sugiere que la transmisión de la infección por *Strep.uberis* es de tipo contagioso. Aunque los mismos autores indican que el aumento en el número de casos tras el brote podría reflejar la exposición al medio ambiente, contaminado a su vez por la leche de las propias vacas infectadas.

Otro aspecto importante es la heterogeneidad entre las cepas aisladas en las distintas explotaciones, se observa que sólo el 37,5 % de los pulsotipos son exclusivos de una

explotación, mientras que el 42,5 % de los pulsotipos son comunes a 2 explotaciones y el resto de los pulsotipos, son comunes a 3 e incluso a 4 de las explotaciones. Resultados similares se han encontrado por la técnica $GTG_5$-PCR en el caso de perfiles exclusivos de una explotación (33,3 %), mientras que el 6,7 % de los perfiles son comunes a 3 explotaciones y el 25 % de los perfiles son comunes a 4 explotaciones. Las explicaciones a estos resultados pueden ser varias: por un lado, 3 de nuestras explotaciones compartían veterinario que, de alguna manera no dilucidada, ha podido actuar como vector de transmisión y, por otro lado, la compra y venta de ganado en la feria comarcal podría ser otro factor de transmisión.

En la bibliografía consultada, se muestran resultados contradictorios a los obtenidos en nuestro estudio, como los resultados publicados por Douglas et al. (2000) que comparan 342 cepas de *Strep.uberis* aisladas en 15 granjas de Nueva Zelanda con 1 cepa de *Strep. uberis* aislada en una granja de EE. UU. aplicando PFGE y obteniendo que el 33 % de los perfiles de bandas son distintos entre cuartos de un mismo animal y totalmente distintos entre las ganaderías estudiadas, en contraposición a nuestros resultados donde mas del 60% de los perfiles de bandas son compartidos entre ganaderías.

Phuektes et al. (2001) obtuvieron 62 cepas distintas en 138 aislamientos de *Strep. uberis* en 4 granjas estudiadas. Al comparar la variabilidad de cepas obtenidas en las distintas explotaciones mediante PFGE observan que no existen cepas comunes entre las explotaciones y, dentro de cada explotación, encuentran cepas predominantes asociadas a casos de mamitis clínicas en 2 de las 4 explotaciones.

Los perfiles de bandas generados por PFGE y $GTG_5$-PCR muestran que los perfiles predominantes obtenidos en ubre y medioambiente son los mismos. Con esto se sugiere que puede existir una transmisión de las cepas de *Strep.uberis* entre el medioambiente y el interior de la ubre.

Algunos autores, como Cullor (2006) informan de la predominancia de cepas de *Strep. uberis* en 5 explotaciones y relacionan esta predominancia con el modo de transmisión. En una de las granjas, se pudieron caracterizar dos cepas distintas de *Strep.uberis* encontradas en un gran número de animales. En la segunda explotación, en 19 de 23 casos (83 %) se demostró que la causante de la infección era una misma cepa de *Strep.uberis* y en la tercera explotación 10 de las 14 vacas eran infectadas por la misma cepa de *Strep.uberis*. Las cepas responsables de las mamitis no se encontraron en las camas de los animales, lo que sugiere a los autores una transmisión contagiosa en base a la predominancia de una determinada cepa.

Zadoks et al. (2005) analizaron 266 aislamientos de *Strep.uberis*, de muestras ambientales, muestras de heces y muestras de leche de cuarto, empleando la técnica de ribotipado, y detectaron 48 ribotipos distintos, de los cuales 35 (73%) eran exclusivos de una fuente: 23 ribotipos fueron aislados exclusivamente del medioambiente de las vacas (suelo, agua de bebedero, hierba, pasillos, moscas, pesebre), 7 en las heces y 5 ribotipos fueron aislados exclusivamente de las muestras de leche analizadas. Los 13 ribotipos restantes (27%) tuvieron origen mixto: 7 ribotipos fueron comunes y predominantes en muestras ambientales, muestras de heces y muestras de leche y 6 estaban presentes en dos de los tipos de muestra (4 en medio ambiente y heces y 2 en medio ambiente y leche). Nuestros resultados son similares, por una parte y con la técnica PFGE, el 58% de los pulsotipos son bien exclusivos de ubre o bien exclusivos de medioambiente y, por otra parte, se encuentran 5 pulsotipos predominantes (10A, 10B, 8A, 13A y 16A) y comunes a cepas aisladas del medioambiente y de ubre, así mismo con la técnica $GTG_5$-PCR se encuentran 3 perfiles de bandas predominantes (8A, 8B y 4A) y comunes a ubre y medioambiente.

Como resumen de los datos obtenidos cabe indicar que las evidencias sugieren una transmisión medioambiental basada en: 1.— la alta heterogeneidad en las cepas aisladas a lo largo de los procesos infecciosos, 2.— la mitad de los pulsotipos son comunes entre ubre y medioambiente y 3.— los pulsotipos predominantes en ubre lo son también en medioambiente.

El análisis de las cepas mediante antibiogramas nos puede aportar información adicional sobre los tratamientos más efectivos en un determinado momento en la granja en estudio. Las prácticas de manejo y las diferencias de tratamiento entre las distintas ganaderías varían los niveles de exposición de las cepas presentes a los antibióticos asociada a la frecuencia de uso y el tipo de antibiótico. En el estudio, un porcentaje elevado (77,1 %) de las cepas analizadas presentan más de un 50 % de resistencias a antibióticos pertenecientes a la familia de aminoglicósidos (Kanamicina y Estreptomicina), cefalosporinas (cefalotina) y casi un 40 % de las cepas presentan una respuesta intermedia a la penicilina G.

Por tanto, la presencia de resistencias elevadas o patrones intermedios de susceptibilidad antibiótica puede ser provocada por la utilización prolongada de antibióticos de amplio espectro o por la combinación de los mismos antibióticos del grupo de los beta-lactámicos para los tratamientos. A estas mismas conclusiones llegó el grupo de Pillar et al. (2009) que presentaron los resultados obtenidos al aplicar el test de susceptibilidad antibiótica in vitro,

administrando la combinación antibiótica Kanamicina-Cefalexina, para patógenos productores de IIM. Sólo el 7,6 % de las 66 cepas de *Strep.uberis* analizadas son sensibles a Kanamicina (en nuestro caso el 40 % de las cepas analizadas son sensibles), el 100 % son sensibles a Cefalexina y el 98,5 % son sensibles a la combinación de ambos antibióticos. Las conclusiones aportadas son que el uso de antibióticos incrementa el desarrollo de resistencias por parte de los patógenos y aunque, el uso de la combinación de los antibióticos Kanamicina-Cefalexina proporcione ventajas en el campo veterinario puede provocar cambios en los patrones de resistencia antibiótica de algunas bacterias, como parecen sugerir nuestros resultados.

El grupo de Kalmus et al. (2011) estimó la distribución de los patógenos mamarios y sus resistencias a antibióticos en Estonia durante 1 año. *Strep.uberis* fue la bacteria que más se aisló entre todas las muestras de mamitis clínicas analizadas. Todos los estreptococos fueron susceptibles a ampicilina, penicilina y cefalotina, excepto un aislamiento de *Strep.uberis*, en contraposición a nuestros resultados donde el mayor porcentaje de aislamientos de *Strep. uberis* presenta una resistencia intermedia a la penicilina (30 %) y resistencia (53,75 %) a la cefalotina. Sin embargo, en nuestro trabajo, de la tabla 8 del capítulo IV se deduce que, en las mamitis aparecidas durante la lactación, las 4 explotaciones emplean beta-lactámicos y aminoglicósidos, y en los tratamientos al secado exclusivamente beta-lactámicos, lo cual no se refleja demasiado bien en las resistencias encontradas en las cepas aisladas de las infecciones en esas explotaciones pues, aunque los porcentajes de cepas resistentes son muy altos para casi todos los grupos de antibióticos, no lo son especialmente para estos 2 grupos. Aminoglicósidos (52 % Kanamicina, 64 % Estreptomicina, 38 % Gentamicina) y Beta-lactámicos (26 % Penicilina G y 42 % Cefalotina) frente a la Novobiocina para el que el 84 % de las cepas presentan resistencia "in vitro" o para el ácido nalidixico (98 % de las cepas). En cualquier caso, no se han ensayado los productos concretos empleados en estas explotaciones, estos son: penetamato y cefalonium, ambos beta-lactámicos.

Si comparamos la susceptibilidad antibiótica, entre las cepas aisladas de procesos infecciosos y las aisladas del medio ambiente, no se observan diferencias significativas entre los patrones de susceptibilidad antibiótica en función de su procedencia excepto en el caso de los antibióticos cefalotina, eritromicina y lincomicina en las que sí se encuentran diferencias significativas, entre las cepas procedentes de procesos infecciosos y las cepas medioambientales, que curiosamente presentan mayor resistencia. Una posible explicación sería el hecho de que

las cepas seleccionadas del medio ambiente pertenecían a pulsotipos predominantes tanto en medioambiente como en ubre, mientras que las cepas procedentes de las infecciones mamarias pertenecían a pulsotipos más variados (predominantes y no predominantes).

Aunque en este estudio no se abordo la detección de genes de resistencia antibiótica la existencia de genes de resistencia a algunos antibióticos, como Eritromicina y Lincomicina, ha sido demostrada por los autores Schmitt-van de Leemput y Zadoks (2007) que analizaron cepas de *Strep.uberis*, procedentes de casos de mamitis clínicas, mediante métodos fenotípicos y genotípicos. De 55 aislamientos de *Strep.uberis*, 12 fueron resistentes fenotípicamente a los antibióticos eritromicina, espiramicina y pirlimicina y presentaron el gen de resistencia *erm*B (resistencia a macrólidos), 4 fueron resistentes fenotípicamente a pirlimicina y presentaron el gen de resistencia *lin*B (resistencia a lincosamidas), 17 fueron resistentes fenotípicamente a espiramicina pero no detectaron genes de resistencia. No se detectaron genes *mef*A (resistencia a macrólidos) en ninguno de los 55 aislamientos de *Strep.uberis*.

En la distribución de los patrones de susceptibilidad a los 11 antibióticos analizados, según perfiles, se obtiene que efectivamente los pulsotipos 10A y 8A son los que aparecen con mayor frecuencia, lógicamente son los más predominantes, y los que presentan mayor variabilidad en cuanto a la susceptibilidad antibiótica, lo que sugiere que la predominancia de estos pulsotipos no esta relacionada con la resistencia/sensibilidad a antibióticos.

Las resistencias observadas en las cepas analizadas, como ya se ha comentado, se podría asociar a la presencia de mecanismos intrínsecos de la bacteria (genes de resistencia en plásmidos o cromosoma, etc.), aunque no lo hemos comprobado en el proyecto.

Phuektes et al. (2001) observaron la predominancia de una cepa, más resistente a la terapia antibiótica que otras cepas, pese a que es sensible "in vitro". El equipo concluye que la resistencia de esta cepa a un tratamiento antibiótico podría ser resultado de la capacidad de esta de adherirse e invadir las células del hospedador y persistir intracelularmente.

Es posible que la predominancia de una cepa particular en una explotación determinada asociada a un proceso infeccioso crónico pudiera ser resultado de su virulencia, así mismo que existan estas diferencias entre cepas, procedentes tanto de procesos infecciosos como de cepas procedentes del medioambiente.

En nuestro estudio se encuentra, que todas las cepas de *Strep.uberis* seleccionadas presentan al menos 3 de los 9 genes asociados a su virulencia analizados. El patrón más

frecuente fue has A+ has B+ has C- gap C+ ibp- oppF+ pau A/B+ sck+ sua+. Estos genes de virulencia están involucrados en la producción de la cápsula de ácido hialurónico para evadir las defensas del hospedador, en la capacidad de la bacteria para colonizar, internalizarse y consecutivamente de proliferar en la glándula mamaria, estas funciones sugieren que algunas cepas, al presentar diferentes patrones, son más virulentas que otras, y tienen una mayor probabilidad de provocar infección por eso son más predominantes en las explotaciones. Esta hipótesis es apoyada por el equipo de Reinoso et al. (2011) que analizaron 78 cepas de *Strep.uberis*, procedentes IIM en ganado vacuno lechero, examinando 11 genes de virulencia empleando la técnica de PCR. El análisis puso de manifiesto una gran variabilidad en los patrones de virulencia (58 patrones distintos en las 78 cepas), así como que todas cepas de *Strep.uberis* que producían infección presentaban alguno de los factores de virulencia analizados. En el trabajo concluían en que el perfil de virulencia podía determinar que algunas cepas fueran más virulentas que otras, aunque tampoco se debe soslayar la importancia de los factores asociados al hospedador.

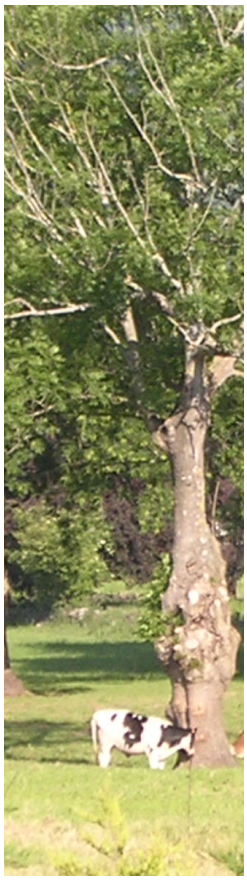
Otros estudios, como los realizados por Phuektes et al. (2001), relacionan la predominancia de una determinada cepa con la virulencia, al observar la prevalencia de una cepa al producir infecciones clínicas continuadas entre los cuartos infectados por esta cepa y otros cuartos infectados por otras cepas distintas.

En nuestro estudio, las cepas incluidas en este análisis de factores de virulencia correspondían a pulsotipos predominantes y, sin embargo, presentaban una gran variabilidad en el patrón de virulencia, por lo que se puede concluir que esta predominancia no va ligada a un patrón u otro de virulencia.

En nuestro estudio, aunque el número de cepas analizadas es pequeño para apreciar diferencias significativas en función de su origen, se aprecia una mayor presencia de factores de virulencia en las cepas procedentes de infecciones mamarias que en las procedentes del medioambiente.

# 6

# CONCLUSIONES



—Para identificar aislamientos de *Strep.uberis* de muestras de leche de cuarto de ubres infectadas se propone un protocolo útil, sencillo y viable económicamente consistente en una batería de 8 pruebas bioquímicas convencionales una PCR específica, aplicable para su identificación rutinaria en los laboratorios de diagnostico de mamitis.

—Aplicando métodos de identificación bioquímica a nivel de especie al estudio de las infecciones mamarias debidas a *Strep.uberis,* se confirma la dificultad de su erradicación durante el secado, que se traduce en una tasa de curación del 66 % tras el tratamiento con antibiótico, así como la existencia de diferencias importantes entre explotaciones, asociada más al manejo que al antibiótico empleado.

—Los principales reservorios de *Strep.uberis* son las zonas de tránsito, pasillos fundamentalmente constituidos por estiércol, tanto en el área de las vacas secas como en lactación, los potreros de las vacas en lactación, y el material de cama, tanto en vacas secas como en lactación.

—El seguimiento de los procesos infecciosos mamarios mediante técnicas de tipificación molecular nos presenta las infecciones como procesos en los que se suceden distintas cepas de un mismo patógeno (en este caso *Strep.uberis*), que interpretamos como procesos de curación-reinfección. La gran variabilidad de las cepas aisladas a lo largo de las infecciones, tanto durante la lactación, como antes y después del parto, modifica los conceptos clásicos de curación y duración de las infecciones.

—Respecto al carácter ambiental o contagioso del *Strep.uberis,* de los datos obtenidos en este estudio, se deduce su carácter ambiental basado en la elevada heterogeneidad

de las cepas aisladas a lo largo de los procesos infecciosos, en que las cepas predominantes en ubre también los son en medioambiente, así como, que casi el 50 % de las cepas se aislaron indistintamente en ubre y medioambiente.

—Ni los patrones de sensibilidad antibiótica ni los perfiles de virulencia de las cepas varía en función de su origen, así mismo, la predominancia de los pulsotipos en las explotaciones no esta relacionada con la resistencia/sensibilidad a antibióticos ni con los patrones de virulencia.

—Las 2 técnicas de tipificación molecular (PFGE y $GTG_5$-PCR) aplicadas en este proyecto, son válidas a la hora de enfrentar un estudio epidemiológico, con ambas técnicas se llega a conclusiones similares respecto a la epidemiología de *Strep.uberis*, ambas permiten diferenciar cepas según su origen, sin embargo, la PFGE es más discriminatoria, aunque la tipificación por $GTG_5$-PCR requiere un equipamiento más sencillo y de mayor implantación en los laboratorios de diagnóstico.

7

# BIBLIOGRAFÍA

Abdulmawjood, A. and C. Lammler. 1999. Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for the identification of *streptococci* of Lancefield group B. Res Vet Sci 67(2):159-162.

Almeida, R. A., D. A. Luther, S. J. Kumar, L. F. Calvinho, M. S. Bronze, and S. P. Oliver. 1996. Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. Zentralbl Veterinarmed B 43(7):385-392.

Almeida, R. A. and S. P. Oliver. 1993. Antiphagocytic effect of the capsule of *Streptococcus uberis*. Zentralbl Veterinarmed B 40(9-10):707-714.

Barkema, H. W., Y. H. Schukken, T. J. Lam, M. L. Beiboer, G. Benedictus, and A. Brand. 1999. Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. J Dairy Sci 82(8):1643-1654.

Baseggio, N., P. D. Mansell, J. W. Browning, and G. F. Browning. 1997. Strain differentiation of isolates of *streptococci* from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. Mol Cell Probes 11(5):349-354.

Bedolla, C. C. y. C. V. H. 2003. Agentes causantes de Mamitis bovina. Cuatro vientos. No 38. UMSNH. pp. 27-29.

Bennedsgaard, T. W., C. Enevoldsen, S. M. Thamsborg, and M. Vaarst. 2003. Effect of mastitis treatment and somatic cell counts on milk yield in Danish organic dairy cows. J Dairy Sci 86(10):3174-3183.

Bentley, R. W. and J. A. Leigh. 1995. Determination of 16S ribosomal RNA gene copy number in *Streptococcus uberis*, *S.agalactiae*, *S.dysgalactiae* and *S.parauberis*. FEMS Immunol Med Microbiol 12(1):1-7.

Bentley, R. W., J. A. Leigh, and M. D. Collins. 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. Int J Syst Bacteriol 41(4):487-494.

Bickert, W. G. 1999. Building and Remodeling Freestall Housing for Cow Comfort. Western Canadian Dairy Seminar 1999 Proceedings.

Bisharat, N., D. W. Crook, J. Leigh, R. M. Harding, P. N. Ward, T. J. Coffey, M. C. Maiden, T. Peto, and N. Jones. 2004. Hyperinvasive neonatal group B *streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. J Clin Microbiol 42(5):2161-2167.

Bradley, A. J. and M. J. Green. 2001. Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. Vet Rec 148(22):683-686.

Bradley, A. J. and M. J. Green. 2004. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20(3):547-568.

Bradley, A. J., K. A. Leach, J. E. Breen, L. E. Green, and M. J. Green. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet Rec 160(8):253-257.

Bramley, A. J. 1982. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. I. Isolation from bovine faeces and from straw bedding of cattle. J Dairy Res 49(3):369-373.

Bramley, A. J. 1984. *Streptococcus uberis* udder infection–a major barrier to reducing mastitis incidence. Br Vet J 140(4):328-335.

Bramley, A. J. and F. H. Dodd. 1984. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control–progress and prospects. J Dairy Res 51(3):481-512.

Bramley, J. A. 1996. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th Edition. National Mastitis Council, Madison, WI.

Brander, G. C., J. H. Watkins, and R. P. Gard. 1975. A large scale mastitis control programme in Somerset. Vet Rec 97(16):300-304.

Busse, H. J., E. B. Denner, and W. Lubitz. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. J Biotechnol 47(1):3-38.

Comalli, M. P., R. J. Eberhart, L. C. Griel, and H. Rothenbacher. 1984. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. Am J Vet Res 45(11):2236-2242.

Costa, E. O., A. R. Ribeiro, E. T. Watanabe, and P. A. Melville. 1998. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. Zentralbl Veterinarmed B 45(2):65-71.

Cousins, C. L., T. M. Higgs, E. R. Jackson, F. K. Neave, and F. H. Dodd. 1980. Susceptibility of the bovine udder to bacterial infection in the dry period. J Dairy Res 47(1):11-18.

Cullen, G. A. 1969. Isolation of *Str. uberis* from lactating and non-lactating cows. Br Vet J 125(3):145-149.

Cullen, G. A. and T. W. Little. 1969. Isolation of *Streptococcus uberis* from the rumen of cows and from soil. Vet Rec 85(5):115-118.

Cullor, J. 2006. *Streptococcus uberis* ecology in housed cows. NMC Annual meeting proceedings.

De prado, A. L., E. Calvet, J. M. Echevarria, L. M. Jiménez, A. Jubert., R. Ortega, A. Palomino, J. M. Saellas. 2001. Prevalencia de gérmenes aislados en infecciones mamarias bovinas. Séptimo congreso Internacional de la asociación Nacional de especialistas en Medicina Bovina de España. ANEMBE, Oviedo, España.

Denning, D. W., C. J. Baker, N. J. Troup, and L. S. Tompkins. 1989. Restriction endonuclease analysis of human and bovine group B streptococci for epidemiologic study. J Clin Microbiol 27(6):1352-1356.

Densen, P. and G. L. Mandell. 1980. Phagocyte strategy vs. microbial tactics. Rev Infect Dis 2(5):817-838.

Devriese, L. A. and J. Hommez. 1975. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. Res Vet Sci 19(1):23-27.

Devriese, L. A., J. Hommez, H. Laevens, B. Pot, P. Vandamme, and F. Haesebrouck. 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. Vet Microbiol 70(1-2):87-94.

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

Dogan, B., S. Klaessig, M. Rishniw, R. A. Almeida, S. P. Oliver, K. Simpson, and Y. H. Schukken. 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. Vet Microbiol 116(4):270-282.

Dohoo, I. R. and A. H. Meek. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. Can Vet J 23(4):119-125.

Douglas, V. L., S. G. Fenwick, D. U. Pfeiffer, N. B. Williamson, and C. W. Holmes. 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. Vet Microbiol 75(1):27-41.

Döpfer, D., H. W. Barkema, T. J. Lam, Y. H. Schukken, and W. Gaastra. 1999. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. J Dairy Sci 82(1):80-85.

Echeberria, J. M. 2004. *Streptococcus uberis*: un problema creciente. MG Mundo ganadero 15(162): 27-29.

Eberhart, R. J. 1986. Management of dry cows to reduce mastitis. J Dairy Sci 69(6):1721-1732.

Epperson, W. B., K. H. Hoblet, K. L. Smith, J. S. Hogan, and D. A. Todhunter. 1993. Association of abnormal uterine discharge with new intramammary infection in the early postpartum period in multiparous dairy cows. J Am Vet Med Assoc 202(9):1461-1464.

Erskine, R. J., S. Wagner, and F. J. DeGraves. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. Vet Clin North Am Food Anim Pract 19(1):109-138, vi.

Escobal, I., García, M., Esnal, A., Marco, J. C. 1999. Eficacia del cefalonium (cepravin®) en el control de la infección mamaria del ganado vacuno lechero en el periodo seco. Med Vet 16(5):247-259.

Esnal A., J. C. M., I. Escobal, A. B. Extramiana, M. Elorriaga. 2008. Caracterización etiológica de las mamitis bovinas en España y diferencias en la distribución de los patógenos mamarios en función

de la presentación clínica o subclínica. Décimo tercero congreso Internacional de la Asociación Nacional de especialistas en medicina bovina de España. ANEMBE, Salamanca, España.

Falkow, S., P. Small, R. Isberg, S. F. Hayes, and D. Corwin. 1987. A molecular strategy for the study of bacterial invasion. Rev Infect Dis 9 Suppl 5:S450-455.

Faull, W. B., J. R. Walton, A. J. Bramley, and J. W. Hughes. 1983. Mastitis in a large, zero-grazed dairy herd. Vet Rec 113(18):415-420.

FIL. 1967. Citado por Marco, M., L. Romero, y M. Romero. 1992. Etiología. En: Amorena, B., R. Balsega, y J. C. Marco (Eds.) Mamitis ovina I. Ovis, 21:25-43.

FIL. 1973. Parte II. Principes de lutte contre les mammites. Bulletin Annuel. Monographie sur la mammite bovine, Bélgica.

Forsman, P., A. Tilsala-Timisjärvi, and T. Alatossava. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. Microbiology 143 (Pt 11):3491-3500.

Fortin, M., S. Messier, J. Paré, and R. Higgins. 2003. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. J Clin Microbiol 41(1):106-109.

Fournier, C., P. Kuhnert, J. Frey, R. Miserez, M. Kirchhofer, T. Kaufmann, A. Steiner, and H. U. Graber. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. Res Vet Sci 85(3):439-448.

Foxman, B. and L. Riley. 2001. Molecular epidemiology: focus on infection. Am J Epidemiol 153(12):1135-1141.

Francois, S., A. Limansky, I. Toresani, G. Ebner, A. Viale, E. Sutich. 2001. Caracterización de *Streptococcus* causantes de mamitis bovina en Argentina, mediante métodos fenotípicos y genotípicos. Vet. Méx 32(4):305-309.

García, J. A., C. Cima de Villa, E. Ruiz, J. Navarro. 2002. Los programas de mejora de la calidad de la leche en Cantabria. Frisona Española 127:102-105.

Garvie, E. I. and A. J. Bramley. 1979. *Streptococcus bovis*–an approach to its classification and its importance as a cause of bovine mastitis. J Appl Bacteriol 46(3):557-566.

Gilbert, F. B., D. A. Luther, and S. P. Oliver. 1997. Induction of surface-associated proteins of *Streptococcus uberis* by cultivation with extracellular matrix components and bovine mammary epithelial cells. FEMS Microbiol Lett 156(1):161-164.

Goering, R. V. (2004). Pulsed-Field Gel Electrophoresis. En Molecular Microbiology: Diagnostics Principles and Practice (Persing, D.H. et el eds.) Chapter 15. pp 185-196. ASM Press Washington DC. EE.UU.

Green, E. K. S., Robertson, J. F., Allan, E. J. 2003. The effects of different dry cow therapy treatments on milk quality in a dairy herd undergoing organic conversion. Proceedings of the British Mastitis Conference. pp. 127-129.

Green, M. J., A. J. Bradley, G. F. Medley, and W. J. Browne. 2007. Cow, farm, and management factors during the dry period that determine the rate of clinical mastitis after calving. J Dairy Sci 90(8):3764-3776.

Green, M. J., L. E. Green, G. F. Medley, Y. H. Schukken, and A. J. Bradley. 2002. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. J Dairy Sci 85(10):2589-2599.

Guijarro de la Cal, R. 2006. *Streptococcus uberis*: la nueva amenaza para la calidad de la leche en el vacuno lechero. Albéitar 95: 44-45.

Hagnestam-Nielsen, C., U. Emanuelson, B. Berglund, and E. Strandberg. 2009. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. J Dairy Sci 92(7):3124-3133.

Hassan, A. A., A. Abdulmawjood, A. O. Yildirim, K. Fink, C. Lämmler, and R. Schlenstedt. 2000. Identification of *streptococci* isolated from various sources by determination of cfb gene and other CAMP-factor genes. Can J Microbiol 46(10):946-951.

Hassan, A. A., I. U. Khan, A. Abdulmawjood, and C. Lämmler. 2001. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. J Clin Microbiol 39(4):1618-1621.

Herron-Olson, L., J. R. Fitzgerald, J. M. Musser, and V. Kapur. 2007. Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*. PLoS One 2(10):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(3):400-404.

Hogan, J. S., V. L. Bogacz, L. M. Thompson, S. Romig, P. S. Schoenberger, W. P. Weiss, and K. L. Smith. 1999a. Bacterial counts associated with sawdust and recycled manure bedding treated with commercial conditioners. J Dairy Sci 82(8):1690-1695.

Hogan, J. S., R. N. González, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, K. L. Smith. 1999b. Laboratory Handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council.

Hogan, J. S. and K. L. Smith. 1997. Bacteria counts in sawdust bedding. J Dairy Sci 80(8):1600-1605.

Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, D. A. Todhunter, P. S. Schoenberger, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, and B. L. Brockett. 1989. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. J Dairy Sci 72(1):250-258.

Hortet, P. and H. Seegers. 1998. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. Vet Res 29(6):497-510.

Hoshino, T., T. Fujiwara, and M. Kilian. 2005. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic *streptococci* isolated from bacteremic patients. J Clin Microbiol 43(12):6073-6085.

Huang, T. T., H. Malke, and J. J. Ferretti. 1989. Heterogeneity of the streptokinase gene in group A *streptococci*. Infect Immun 57(2):502-506.

Huijps, K. and H. Hogeveen. 2007. Stochastic modeling to determine the economic effects of blanket, selective, and no dry cow therapy. J Dairy Sci 90(3):1225-1234.

Hulton, C. S., C. F. Higgins, and P. M. Sharp. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other *enterobacteria*. Mol Microbiol 5(4):825-834.

Jain, N. C. 1979. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J Dairy Sci 62(1):128-134.

Jasper, D. E., J. D. Dellinger, and R. B. Bushnell. 1975. Herd studies on coliform mastitis. J Am Vet Med Assoc 166(8):778-780.

Jayarao, B. M., J. J. Doré, and S. P. Oliver. 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. J Clin Microbiol 30(9):2235-2240.

Jayarao, B. M., S. P. Oliver, K. R. Matthews, and S. H. King. 1991a. Comparative evaluation of Vitek gram-positive identification system and API Rapid Strep system for identification of *Streptococcus* species of bovine origin. Vet Microbiol 26(3):301-308.

Jayarao, B. M., S. P. Oliver, J. R. Tagg, and K. R. Matthews. 1991b. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions. Epidemiol Infect 107(3):543-555.

Jiménez Galán, L. M. 2006. Situación de la mamitis bovina por *Streptococcus uberis* en España: incidencia y control. XXII jornada sobre calidad de la leche.G-TEMCAL., Barcelona, España.

Johnsen, L. B., K. Poulsen, M. Kilian, and T. E. Petersen. 1999. Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. Infection and Immunity 67(3):1072-1078.

Kalmus, P., B. Aasmäe, A. Kärssin, T. Orro, and K. Kask. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. Acta Vet Scand 53:4.

Khan, I. U., A. A. Hassan, A. Abdulmawjood, C. Lämmler, W. Wolter, and M. Zschöck. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J Vet Sci 4(3):213-224.

Kumar, R., B. R. Yadav, and R. S. Singh. 2011. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. J Biosci 36(1):175-188.

Leigh, J. A. 1993. Activation of bovine plasminogen by *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol Lett 114(1):67-71.

Leigh, J. A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? Vet J 157(3):225-238.

Leigh, J. A., J. M. Finch, T. R. Field, N. C. Real, A. Winter, A. W. Walton, and S. M. Hodgkinson. 1999. Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. Vaccine 17(7-8):851-857.

Leigh, J. A. and R. A. Lincoln. 1997. *Streptococcus uberis* acquires plasmin activity following growth in the presence of bovine plasminogen through the action of its specific plasminogen activator. FEMS Microbiol Lett 154(1):123-129.

Levin, B. R., M. Lipsitch, and S. Bonhoeffer. 1999. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. Science 283(5403):806-809.

Lopes, M. F., V. L. Merquior, J. M. Peralta, and L. M. Teixeira. 1995. Partial characterization of the cohemolytic factor produced by *Streptococcus uberis* and comparison with the CAMP-factor. FEMS Immunol Med Microbiol 12(3-4):205-212.

Lopez-Benavides, M. G., J. H. Williamson, G. D. Pullinger, S. J. Lacy-Hulbert, R. T. Cursons, and J. A. Leigh. 2007. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. J Dairy Sci 90(12):5558-5566.

Malke, H. 1993. Polymorphism of the streptokinase gene: implications for the pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis. Zentralbl Bakteriol 278(2-3):246-257.

Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, and R. Hakenbeck. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Res 20(13):3479-3483.

Martin-Richard, M., M. González Fernández de Castro, M., Gómez Leira, M. A., García Alba, M. 2001. Plan de control de mamitis subclínicas en el postparto. VII Congreso Internacional de la asociación de medicina nacional de especialistas en medicina bovina de España. ANEMBE, Oviedo, España.

Matthews, K. R., R. A. Almeida, and S. P. Oliver. 1994a. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. Infect Immun 62(12):5641-5646.

Matthews, K. R., J. J. Rejman, J. D. Turner, and S. P. Oliver. 1994b. Proliferation of a bovine mammary epithelial cell line in the presence of bacterial virulence factors. J Dairy Sci 77(10):2959-2964.

McDonald, J. S. 1975. Radiographic method for anatomic study of the teat canal: characteristics related to resistance to new intramammary infection during lactation and the early dry period. Cornell Vet 65(4):492-499.

McDonald, J. S. and A. J. Anderson. 1981. Experimental infection of bovine mammary glands with *Streptococcus uberis* during the nonlactating period. Am J Vet Res 42(3):465-467.

McDonald, T. J. and J. S. McDonald. 1976. *Streptococci* isolated from bovine intramammary infections. Am J Vet Res 37(4):377-381.

McDougall, S., T. J. Parkinson, M. Leyland, F. M. Anniss, and S. G. Fenwick. 2004. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. J Dairy Sci 87(7):2062-2072.

McNeil, J. D., O. W. Wiebkin, L. G. Cleland, and J. L. Skosey. 1989. The effects of hyaluronic acid on macrophage Fc receptor binding and phagocytosis are independent of the mode of depolymerization. Free Radic Res Commun 6(4):227-233.

Milne, M. H., A. M. Biggs, D. C. Barrett, F. J. Young, S. Doherty, G. T. Innocent, and J. L. Fitzpatrick. 2005. Treatment of persistent intramammary infections with *Streptococcus uberis* in dairy cows. Vet Rec 157(9):245-250.

Munoz, M. A., F. L. Welcome, Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks. 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. J Clin Microbiol 45(12):3964-3971.

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

Nelson, F. E., H. Tranmal, J. D. Schuh, T. N. Wegner, and G. H. Stott. 1969. Criteria of abnormal milk from individual quarters during a period of high temperature. J Dairy Sci 913(52):912-913.

Nickerson, S. C. and J. W. Pankey. 1983. Cytologic observations of the bovine teat end. Am J Vet Res 44(8):1433-1441.

Oliver, S. P. 1988. Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. Am J Vet Res 49(11):1789-1793.

Oliver, S. P. 1991. Growth of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* species in bovine mammary secretions during the nonlactating and peripartum periods following intramammary infusion of lipopolysaccharide at cessation of milking. Zentralbl Veterinarmed B 38(7):538-544.

Oliver, S. P., R. A. Almeida, and L. F. Calvinho. 1998a. Virulence factors of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. J vet med b infect dis vet public health 45(8):461-471.

Oliver, S. P., R. A. Almeida, B. E. Gillespie, S. J. Headrick, H. H. Dowlen, D. L. Johnson, K. C. Lamar, S. T. Chester, and W. M. Moseley. 2004. Extended ceftiofur therapy for treatment of experimentally-induced *Streptococcus uberis* mastitis in lactating dairy cattle. J Dairy Sci 87(10):3322-3329.

Oliver, S. P., B. E. Gillespie, and B. M. Jayarao. 1998b. Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. FEMS Microbiol Lett 160(1):69-73.

Oliver, S. P. and B. A. Mitchell. 1983. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. J Dairy Sci 66(5):1162-1166.

Oliver, S. P. and L. M. Sordillo. 1988. Udder health in the periparturient period. J Dairy Sci 71(9):2584-2606.

Osterås, O., V. L. Edge, and S. W. Martin. 1999. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. J Dairy Sci 82(6):1221-1231.

Pantoja, J. C., C. Hulland, and P. L. Ruegg. 2009. Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. Prev Vet Med 90(1-2):43-54.

Peeler, E. J., M. J. Green, J. L. Fitzpatrick, K. L. Morgan, and L. E. Green. 2000. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. J Dairy Sci 83(11):2464-2472.

Petrovski, K. R., N. B. Williamson, N. Lopez-Villalobos, T. J. Parkinson, and I. G. Tucker. 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(6):317-322.

Philpot, W. N. 1984. Economics of mastitis control. Vet Clin North Am Large Anim Pract 6(2):233-245.

Phuektes, P., P. D. Mansell, R. S. Dyson, N. D. Hooper, J. S. Dick, and G. F. Browning. 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. J Clin Microbiol 39(4):1460-1466.

Pillai, S. R., E. Kunze, L. M. Sordillo, and B. M. Jayarao. 2001. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. J Dairy Sci 84(6):1413-1420.

Pillar, C. M., L. Goby, D. Draghi, P. Grover, and C. Thornsberry. 2009. Evaluating the in vitro susceptibility of bovine mastitis pathogens to a combination of kanamycin and cefalexin: Recommendations for a disk diffusion test. J Dairy Sci 92(12):6217-6227.

Pitkälä, A., J. Koort, and J. Björkroth. 2008. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. J Dairy Sci 91(10):4075-4081.

Poutrel, B. and H. Z. Ryniewicz. 1984. Evaluation of the API 20 Strep system for species identification of *streptococci* isolated from bovine mastitis. J Clin Microbiol 19(2):213-214.

Reinoso, E. B., M. C. Lasagno, S. A. Dieser, and L. M. Odierno. 2011. Distribution of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. FEMS Microbiol Lett 318(2):183-188.

Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, and J. Lagacé. 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J Clin Microbiol 39(7):2584-2589.

Riley, L. W. 2004. Molecular epidemiology of infectious diseases. Principles and practices. Chapter 1. pp 1-5. ASM Press Washington DC. EE.UU.

Robinson, T. C., E. R. Jackson, and A. Marr. 1985. Factors involved in the epidemiology and control of *Streptococcus uberis* and coliform mastitis. Br Vet J 141(6):635-642.

Rosey, E. L., R. A. Lincoln, P. N. Ward, R. J. Yancey, and J. A. Leigh. 1999. PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol Lett 178(1):27-33.

Roussel, J. D., Ortego, J. D.,Gholson, J. H., Frye, J. B. 1969. Effect of thermal stress on the incidence of abnormal milk. Page 912. Vol. 52.

Santos, O. C., E. M. Barros, M. A. Brito, M. O. C. Bastos, K. R. Dos Santos, and M. Giambiagi-Demarval. 2008. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the *gro*EL gene. Vet Microbiol 130(1-2):134-140.

Sargeant, J. M., Y. H. Schukken, and K. E. Leslie. 1998a. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: progress and outlook. J Dairy Sci 81(6):1545-1554.

Sargeant, J. M., H. M. Scott, K. E. Leslie, M. J. Ireland, and A. Bashiri. 1998b. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. Can Vet J 39(1):33-38.

Schaufuss, P., R. Sting, W. Schaeg, and H. Blobel. 1989. Isolation and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus uberis*. Zentralbl Bakteriol 271(1):46-53.

Schepers, A. J., T. J. Lam, Y. H. Schukken, J. B. Wilmink, and W. J. Hanekamp. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J Dairy Sci 80(8):1833-1840.

Schmitt-Van de Leemput, E. and R. N. Zadoks. 2007. Genotypic and phenotypic detection of macrolide and lincosamide resistance in *Streptococcus uberis*. J Dairy Sci 90(11):5089-5096.

Schukken, Y. H., J. Buurman, A. Brand, D. van der Geer, and F. J. Grommers. 1990. Population dynamics of bulk milk somatic cell counts. J Dairy Sci 73(5):1343-1350.

Schukken, Y. H., D. J. Wilson, F. Welcome, L. Garrison-Tikofsky, and R. N. Gonzalez. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet Res 34(5):579-596.

Schultz, L. H. 1977. Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. J Am Vet Med Assoc 170(10 Pt 2):1244-1246.

Seeley, H. W. 1951. The physiology and nutrition of *Streptococcus uberis*. J Bacteriol 62(1):107-115.

Skalka, B., J. Smola, and J. Pillich. 1980. Comparison of some properties of the CAMP-factor from *Streptococcus agalactiae* with the haemolytically latent active exosubstance from *Streptococcus uberis*. Zentralbl Veterinarmed B 27(7):559-566.

Smith, K. L. 1983. Mastitis control: a discussion. J Dairy Sci 66(8):1790-1794.

Smith, K. L. and J. S. Hogan. 1993. Environmental mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 9(3):489-498.

Smith, K. L., D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1985. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. J Dairy Sci 68(2):402-417.

Smith, T. H., L. K. Fox, and J. R. Middleton. 1998. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. Journal of the American Veterinary Medical Association 212(4):553-+.

Sol, J., O. C. Sampimon, J. J. Snoep, and Y. H. Schukken. 1994. Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical staphylococcal mastitis with antibiotics. J Dairy Sci 77(1):75-79.

Sordillo, L. M., K. Shafer-Weaver, and D. DeRosa. 1997. Immunobiology of the mammary gland. J Dairy Sci 80(8):1851-1865.

Speert, D. P., S. D. Wright, S. C. Silverstein, and B. Mah. 1988. Functional characterization of macrophage receptors for in vitro phagocytosis of unopsonized *Pseudomonas aeruginosa.* J Clin Invest 82(3):872-879.

Spitznagel, J. K. 1983. Microbial interactions with neutrophils. Rev Infect Dis 5 Suppl 4:S806-822.

Stowell RR. 2000. Sand for bedding. Dairy Housing and Equipment Systems: Managing and Planning for Profitability, Camp Hill, PA. Natural Resource, Agric., and Engineering Service. pp. 226-234.

Struelens, M. J. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin Microbiol Infect 2(1):2-11.

Swaminathan, B., P. Gerner-Smidt, L. K. Ng, S. Lukinmaa, K. M. Kam, S. Rolando, E. P. Gutiérrez, and N. Binsztein. 2006. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. Foodborne Pathog Dis 3(1):36-50.

Syrstad, O., I. Røn, and J. Wiggen. 1979. [Factors affecting cell counts in milk from individual cows (author's transl)]. Nord Vet Med 31(3):114-121.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, and R. V. Goering. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol 18(6):426-439.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33(9):2233-2239.

Timms, L. L. and L. H. Schultz. 1987. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. J Dairy Sci 70(12):2648-2657.

Todhunter, D. A., K. L. Smith, and J. S. Hogan. 1995. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. J Dairy Sci 78(11):2366-2374.

Vaarst, M. 2001. Proceedings of British Mastitis Conference.Mastitis in Danish Organic dairying. Institute for animal health/milk development council. pp. 1-12.

Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 19(24):6823-6831.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, and M. Kuiper. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23(21):4407-4414.

Wang, S. M., M. A. Deighton, J. A. Capstick, and N. Gerraty. 1999. Epidemiological typing of bovine *streptococci* by pulsed-field gel electrophoresis. Epidemiol Infect 123(2):317-324.

Ward, G. E. and L. H. Schultz. 1972. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. J Dairy Sci 55(10):1428-1431.

Ward, P. N., T. R. Field, W. G. Ditcham, E. Maguin, and J. A. Leigh. 2001. Identification and disruption of two discrete loci encoding hyaluronic acid capsule biosynthesis genes *has*A, *has*B, and *has*C in *Streptococcus uberis*. Infect Immun 69(1):392-399.

Ward, P. N. and J. A. Leigh. 2002. Characterization of PauB, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. J Bacteriol 184(1):119-125.

Ward, W. R., J. W. Hughes, W. B. Faull, P. J. Cripps, J. P. Sutherland, and J. E. Sutherst. 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(7):199-206.

Washington, J. A. 1991. Functions and activities of the Area Committee on Microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clin Microbiol Rev 4(2):150-155.

Wenz, J. R., S. M. Jensen, J. E. Lombard, B. A. Wagner, and R. P. Dinsmore. 2007. Herd management practices and their association with bulk tank somatic cell count on United States dairy operations. J Dairy Sci 90(8):3652-3659.

White, L. J., Y. H. Schukken, T. J. Lam, G. F. Medley, and M. J. Chappell. 2001. A multispecies model for the transmission and control of mastitis in dairy cows. Epidemiol Infect 127(3):567-576.

Wieliczko, R. J., J. H. Williamson, R. T. Cursons, S. J. Lacy-Hulbert, and M. W. Woolford. 2002. Molecular typing of *Streptococcus uberis* strains isolated from cases of bovine mastitis. J Dairy Sci 85(9):2149-2154.

Williams, A. M. and M. D. Collins. 1990. Molecular taxonomic studies on Streptococcus uberis types I and II. Description of S*treptococcus parauberis* sp. nov. J Appl Bacteriol 68(5):485-490.

Wilson, D. J., H. H. Das, R. N. Gonzalez, and P. M. Sears. 1997. Association between management practices, dairy herd characteristics, and somatic cell count of bulk tank milk. J Am Vet Med Assoc 210(10):1499-1502.

Zadoks, R. and J. Fitzpatrick. 2009. Changing trends in mastitis. Ir Vet J 62 Suppl 4:S59-70.

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

Zadoks, R. N., B. E. Gillespie, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, S. P. Oliver, and Y. H. Schukken. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. Epidemiol Infect 130(2):335-349.

Zadoks, R. N. and Y. H. Schukken. 2006. Use of molecular epidemiology in veterinary practice. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice 22(1):229-+.

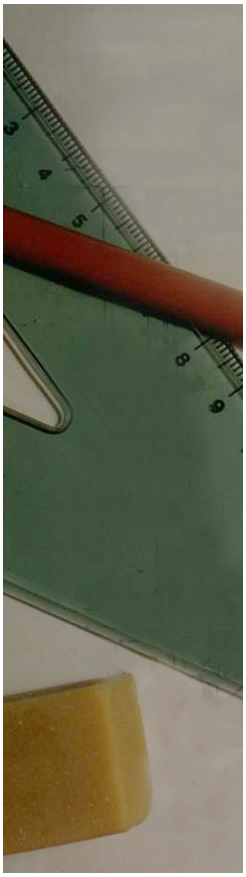
Zadoks, R. N., L. L. Tikofsky, and K. J. Boor. 2005. Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. Vet Microbiol 109(3-4):257-265.

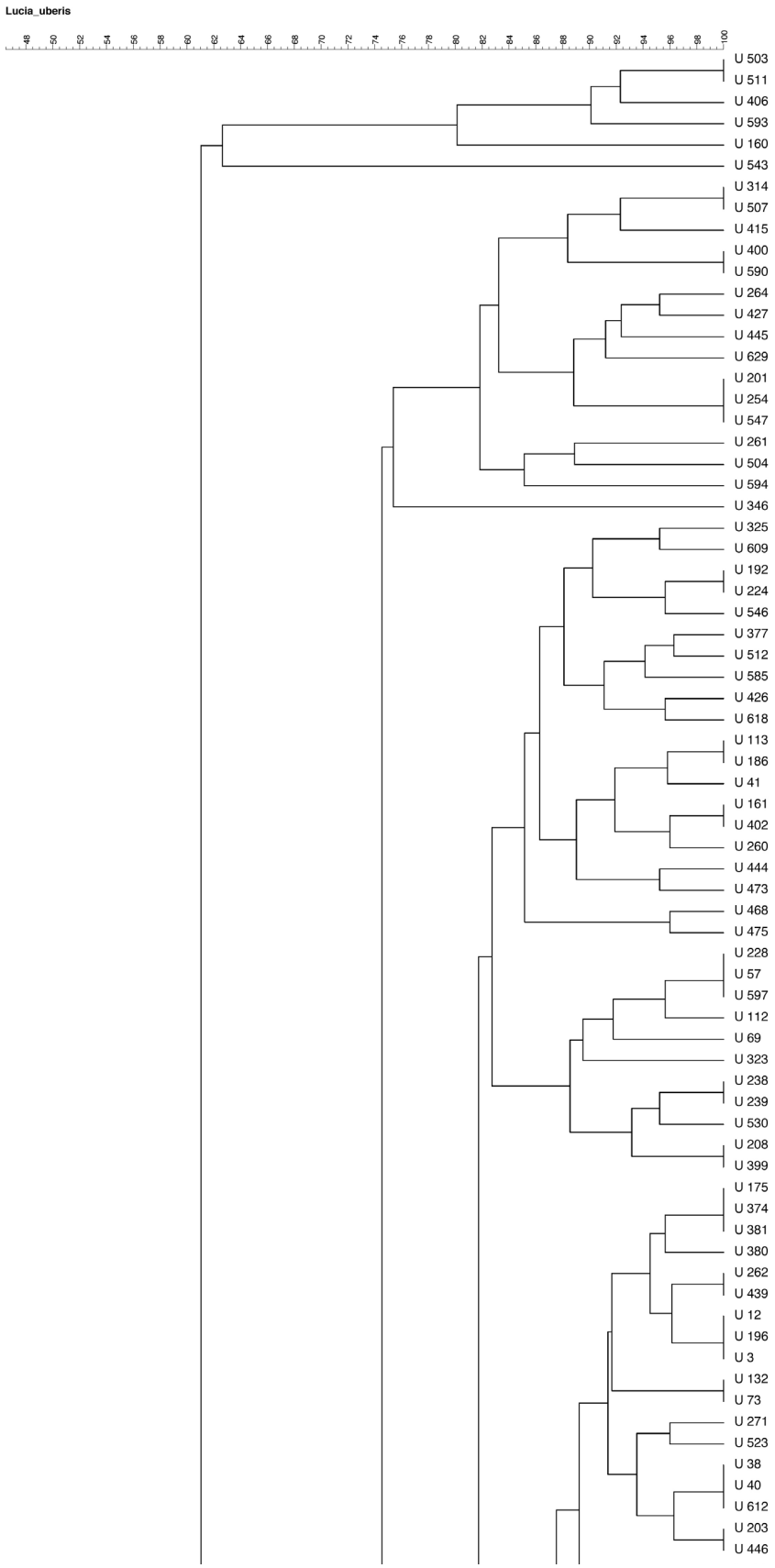
Zehner, M. M., R. J. Farnsworth, R. D. Appleman, K. Larntz, and J. A. Springer. 1986. Growth of environmental mastitis pathogens in various bedding materials. J Dairy Sci 69(7):1932-1941.

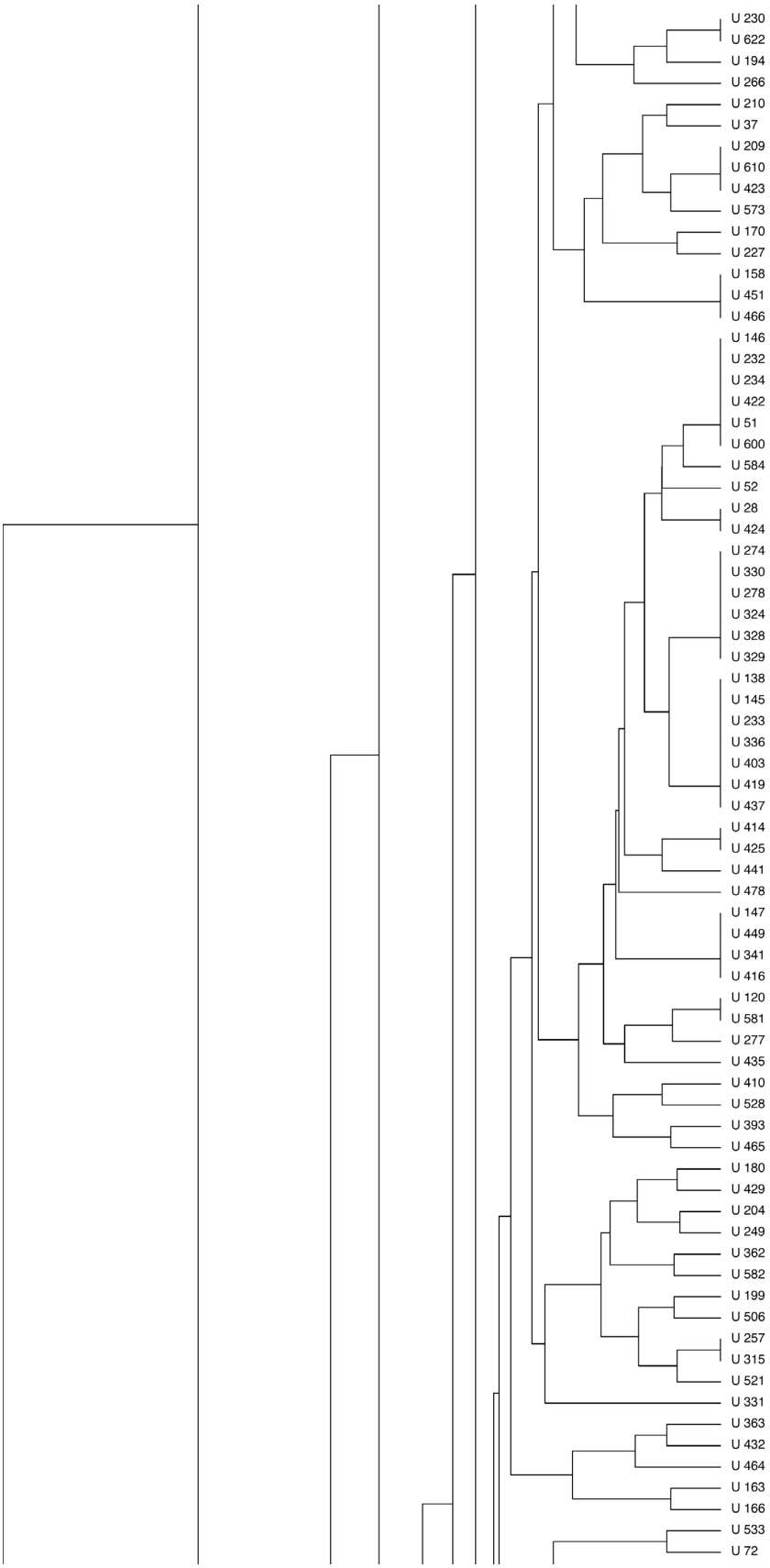
Zorraquino, M. A., M. I. Berruga, M. P. Molina. 2007. "Investigación de campo de los antibióticos (principio activo-formulación) utilizados en vacuno de leche en España y patología tratada". Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

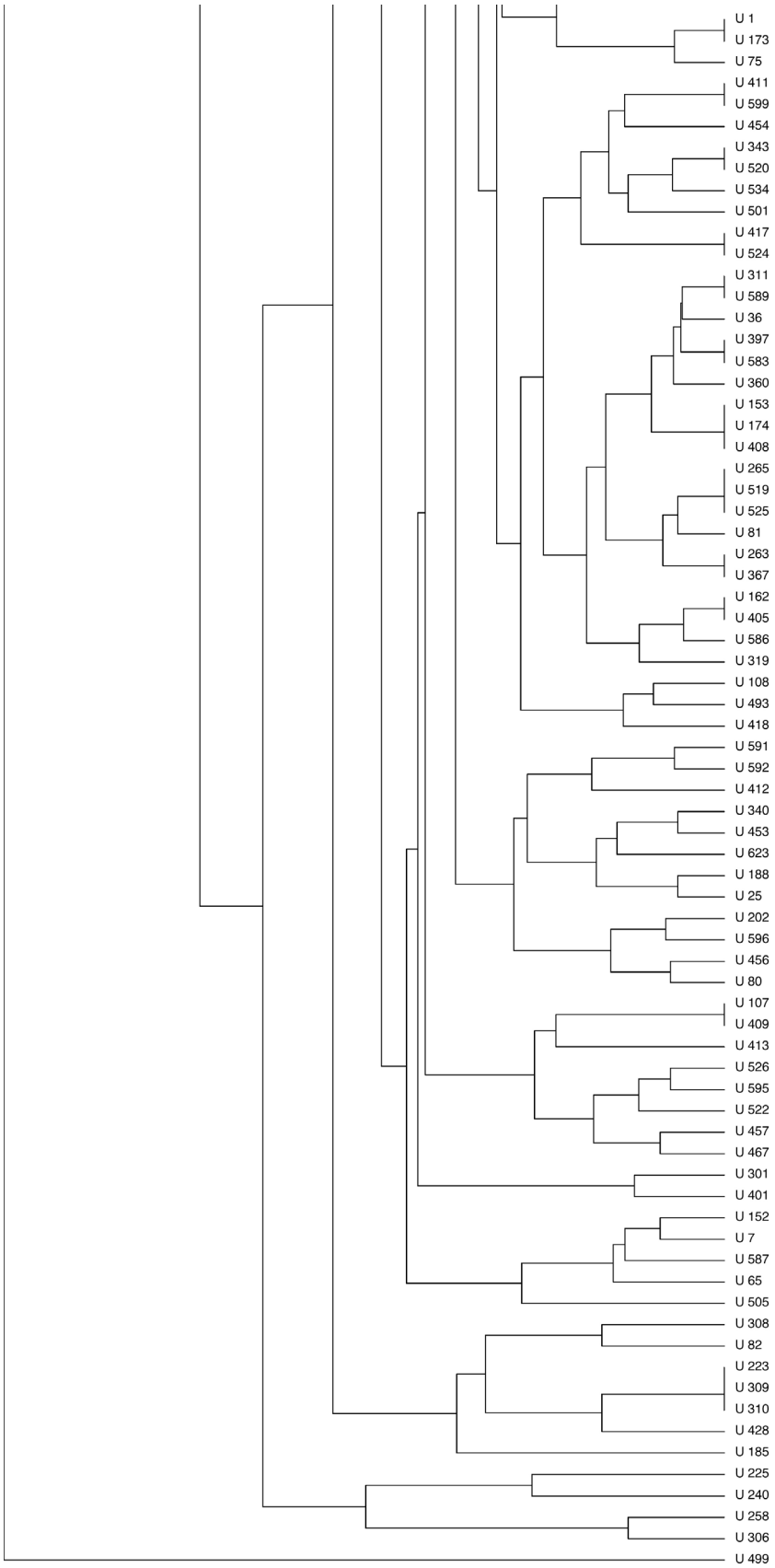
# 8

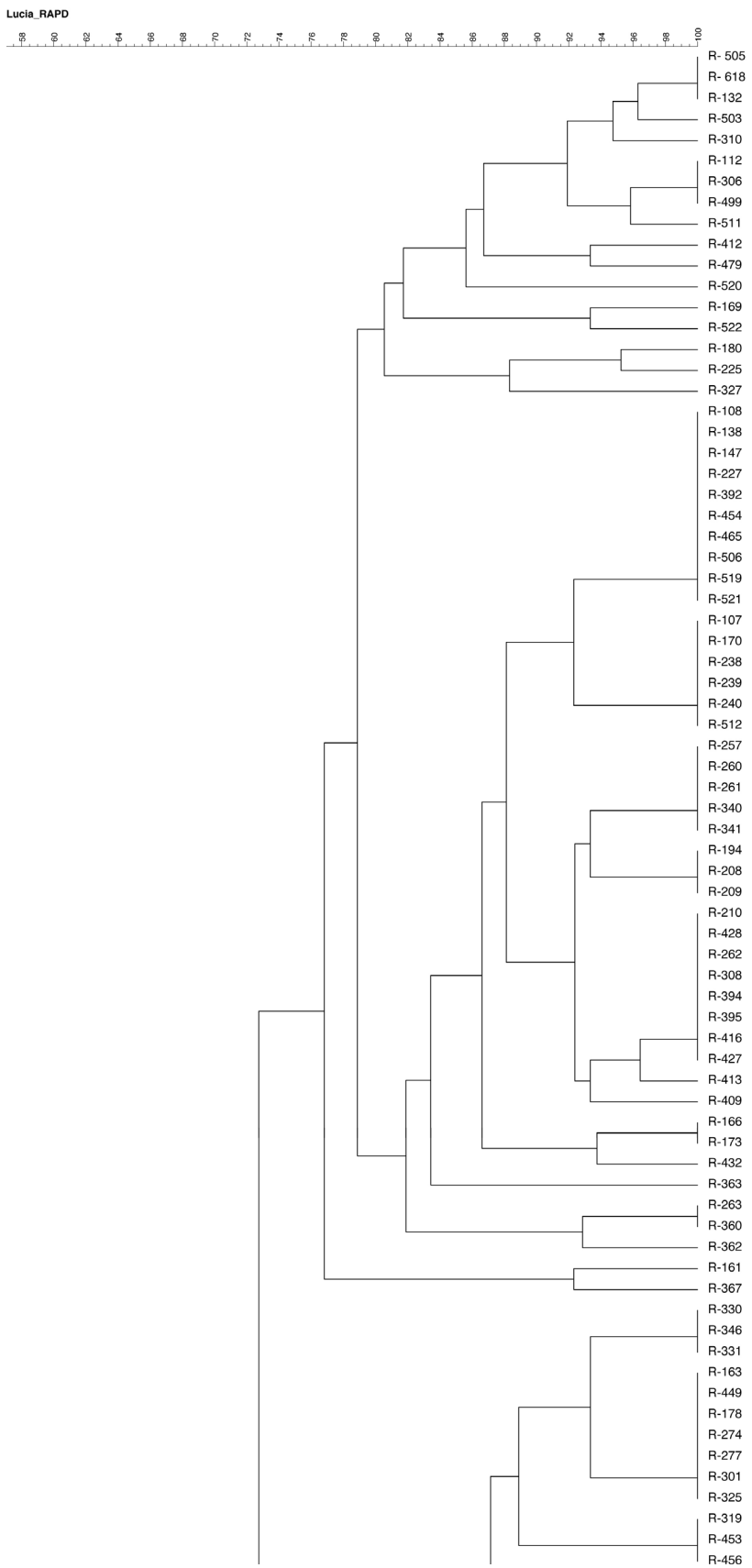
# ANEXOS

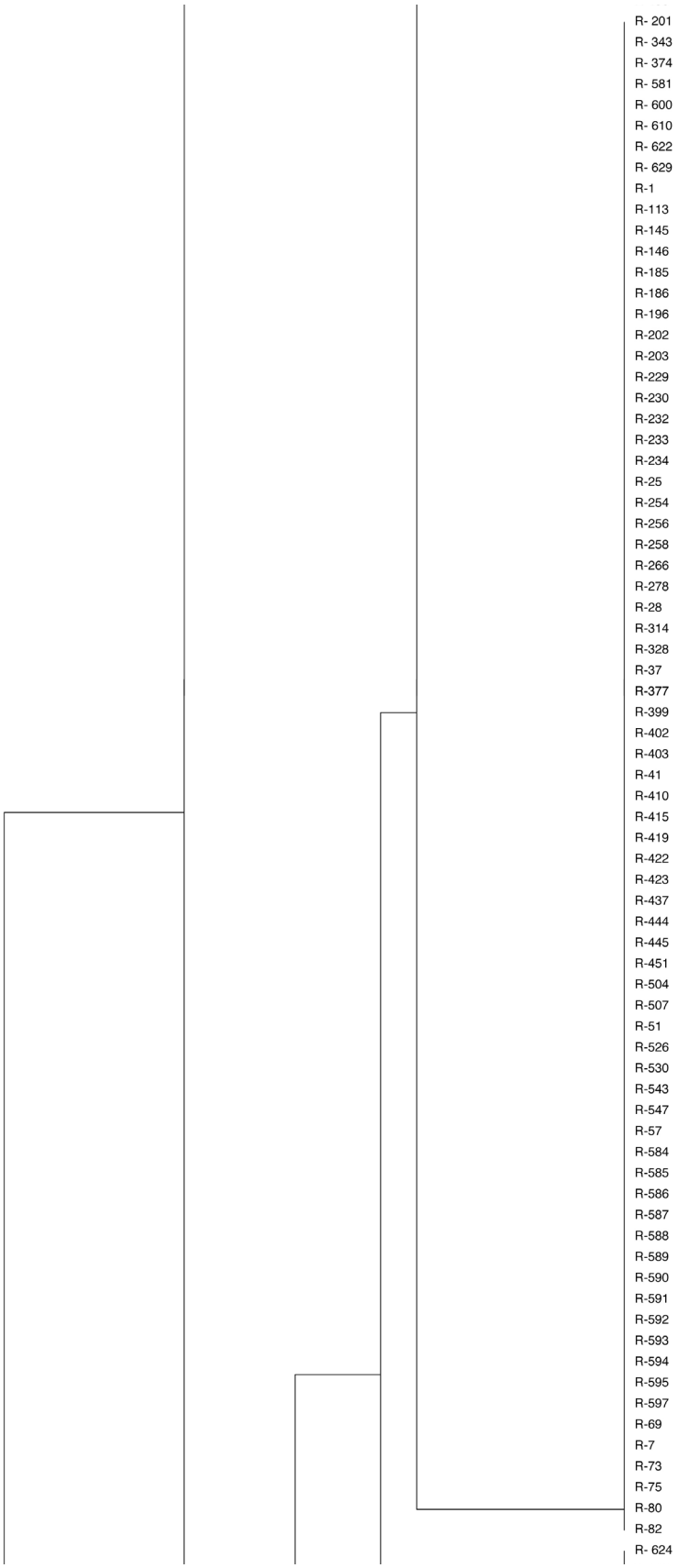


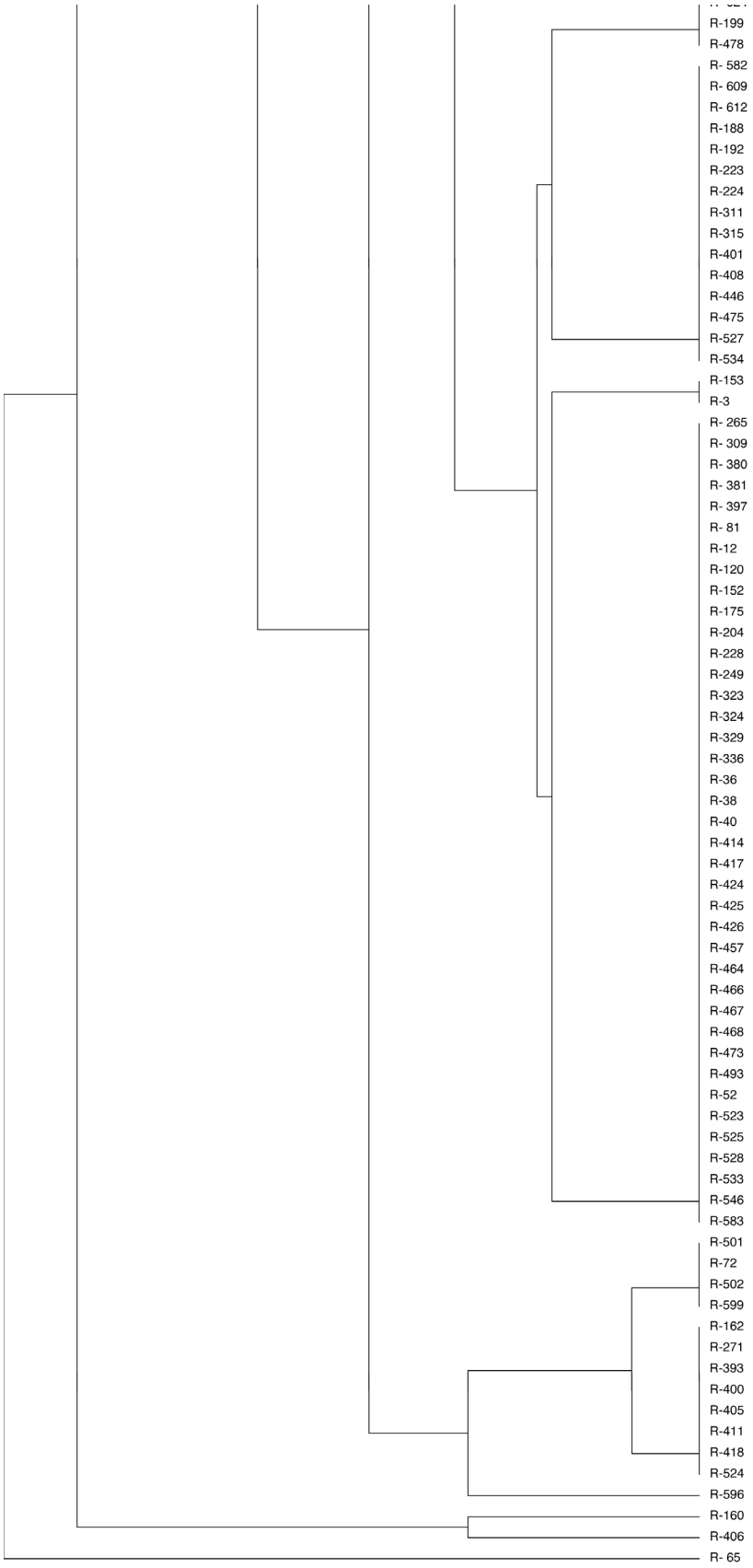

Lucia_uberis
48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94 96 98 100
U 503
U 511
U 406
U 593
U 160
U 543
U 314
U 507
U 415
U 400
U 590
U 264
U 427
U 445
U 629
U 201
U 254
U 547
U 261
U 504
U 594
U 346
U 325
U 609
U 192
U 224
U 546
U 377
U 512
U 585
U 426
U 618
U 113
U 186
U 41
U 161
U 402
U 260
U 444
U 473
U 468
U 475
U 228
U 57
U 597
U 112
U 69
U 323
U 238
U 239
U 530
U 208
U 399
U 175
U 374
U 381
U 380
U 262
U 439
U 12
U 196
U 3
U 132
U 73
U 271
U 523
U 38
U 40
U 612
U 203
U 446


U 230
U 622
U 194
U 266
U 210
U 37
U 209
U 610
U 423
U 573
U 170
U 227
U 158
U 451
U 466
U 146
U 232
U 234
U 422
U 51
U 600
U 584
U 52
U 28
U 424
U 274
U 330
U 278
U 324
U 328
U 329
U 138
U 145
U 233
U 336
U 403
U 419
U 437
U 414
U 425
U 441
U 478
U 147
U 449
U 341
U 416
U 120
U 581
U 277
U 435
U 410
U 528
U 393
U 465
U 180
U 429
U 204
U 249
U 362
U 582
U 199
U 506
U 257
U 315
U 521
U 331
U 363
U 432
U 464
U 163
U 166
U 533
U 72


U 1
U 173
U 75
U 411
U 599
U 454
U 343
U 520
U 534
U 501
U 417
U 524
U 311
U 589
U 36
U 397
U 583
U 360
U 153
U 174
U 408
U 265
U 519
U 525
U 81
U 263
U 367
U 162
U 405
U 586
U 319
U 108
U 493
U 418
U 591
U 592
U 412
U 340
U 453
U 623
U 188
U 25
U 202
U 596
U 456
U 80
U 107
U 409
U 413
U 526
U 595
U 522
U 457
U 467
U 301
U 401
U 152
U 7
U 587
U 65
U 505
U 308
U 82
U 223
U 309
U 310
U 428
U 185
U 225
U 240
U 258
U 306
U 499


Lucia_RAPD
58
60
62
64
66
68
70
72
74
76
78
80
82
84
86
88
90
92
94
96
98
100
R- 505
R- 618
R-132
R-503
R-310
R-112
R-306
R-499
R-511
R-412
R-479
R-520
R-169
R-522
R-180
R-225
R-327
R-108
R-138
R-147
R-227
R-392
R-454
R-465
R-506
R-519
R-521
R-107
R-170
R-238
R-239
R-240
R-512
R-257
R-260
R-261
R-340
R-341
R-194
R-208
R-209
R-210
R-428
R-262
R-308
R-394
R-395
R-416
R-427
R-413
R-409
R-166
R-173
R-432
R-363
R-263
R-360
R-362
R-161
R-367
R-330
R-346
R-331
R-163
R-449
R-178
R-274
R-277
R-301
R-325
R-319
R-453
R-456


R- 201
R- 343
R- 374
R- 581
R- 600
R- 610
R- 622
R- 629
R-1
R-113
R-145
R-146
R-185
R-186
R-196
R-202
R-203
R-229
R-230
R-232
R-233
R-234
R-25
R-254
R-256
R-258
R-266
R-278
R-28
R-314
R-328
R-37
R-377
R-399
R-402
R-403
R-41
R-410
R-415
R-419
R-422
R-423
R-437
R-444
R-445
R-451
R-504
R-507
R-51
R-526
R-530
R-543
R-547
R-57
R-584
R-585
R-586
R-587
R-588
R-589
R-590
R-591
R-592
R-593
R-594
R-595
R-597
R-69
R-7
R-73
R-75
R-80
R-82
R- 624


R-199
R-478
R- 582
R- 609
R- 612
R-188
R-192
R-223
R-224
R-311
R-315
R-401
R-408
R-446
R-475
R-527
R-534
R-153
R-3
R- 265
R- 309
R- 380
R- 381
R- 397
R- 81
R-12
R-120
R-152
R-175
R-204
R-228
R-249
R-323
R-324
R-329
R-336
R-36
R-38
R-40
R-414
R-417
R-424
R-425
R-426
R-457
R-464
R-466
R-467
R-468
R-473
R-493
R-52
R-523
R-525
R-528
R-533
R-546
R-583
R-501
R-72
R-502
R-599
R-162
R-271
R-393
R-400
R-405
R-411
R-418
R-524
R-596
R-160
R-406
R- 65

www.microrao.com

# Zone of inhibitions for various antibiotics – Kirby Bauer Disk Diffusion

**Compiled by**
**Sridhar Rao P.N**
**Assistant Professor**
**Department of Microbiology**
**JJM Medical College**
**Davangere 577004**

| ANTIBIOTIC/ CONTENT (µg) | RESISTANT (in mm) | INTERMEDIATE (in mm) | SENSITIVE (in mm) |
|---|---|---|---|
| **AMIKACIN (Ak)** 10,30 | 14 | 15-16 | 17 |
| **AMOXYCILLIN (Am)** 30 | | | |
| Hemophilus, Staphylococci | 19 | - | 20 |
| Other | 13 | 14-17 | 18 |
| **AMOXYCLAV (Ac)** 30,10,25 | | | |
| Hemophilus, Staphylococci | 19 | 20 | - |
| Other | 13 | 14-17 | 18 |
| **AMPICILLIN (A)** 10,25 | | | |
| Gram -ve enteric organism | 13 | 14-16 | 17 |
| Staphylococci | 28 | - | 29 |
| Hemophilus | 18 | 19-21 | 22 |
| Streptococci | 18 | 19-25 | 26 |
| Enterococci | 16 | - | 17 |
| **AMPICILLIN-SULBACTAM (As)**10 | | | |
| GN Enteric bacilli, Staphylococci | 11 | 12-14 | 15 |
| Hemophilus | 19 | - | 20 |
| **AZITHROMYCIN (At)** 15 | | | |
| Hemophilus | - | - | 12 |
| Other | 13 | 14-17 | 18 |
| **AZLOCILLIN (Az)** 30,75 | 17 | - | 18 |
| **AZTREONAM (Ao)** 30 | | | |
| GN Enterics, Pseudomonas | 15 | 16-21 | 22 |
| Hemophilus | - | - | 26 |
| **BACITRACIN (B)** 10,8,2,1 Units | 8 | 9-12 | 13 |

© Sridhar Rao P.N

www.microrao.com

| | | | |
|---|---|---|---|
| **CARBENICILLIN (Cb)** 100 | | | |
| Gram negative bacilli | 19 | 20-22 | 23 |
| Pseudomonas | 13 | 14-16 | 17 |
| **CEFACLOR (Cj)** 30 | | | |
| Streptococci | 22 | 23-25 | 26 |
| Hemophilus, others | 14 | 15-17 | 18 |
| **CEFAMANDOLE (Cef)** 30 | 14 | 15-17 | 18 |
| **CEFAZOLIN (Cz)** 30 | 14 | 15-17 | 18 |
| **CIFIXIME (Cfx)** 5 | | | |
| GN Enteric bacilli | 15 | 16-18 | 19 |
| Hemophilus | - | - | 21 |
| Pneumococci | - | - | - |
| **CEFOPERAZONE (Cs)** 75 | 15 | 16-20 | 21 |
| **CEFOPERAZONE-SULBACTAM(Cfs)** | 15 | 16-20 | 21 |
| **CEFPROZIL (Cfz)** 30 | | | |
| GN Enteric bacilli, Staphylococci | 14 | 15-17 | 18 |
| Pneumococci | - | - | - |
| **CEFTAZIDIME (Ca)** 30,10 | | | |
| Hemophilus | - | - | 26 |
| Others | 14 | 15-17 | 18 |
| **CEFTIZOXIME (Ck)** 30 | | | |
| Streptococci, others | 14 | 15-19 | 20 |
| Neisseria | - | - | 38 |
| Hemophilus | - | - | 26 |
| **CEFTRIAXONE (Ci)** 30,10 | | | |
| Hemophilus | - | - | 26 |
| Other Streptococci | 24 | 25-26 | 27 |
| Neisseria | - | - | 35 |
| Other | 13 | 14-20 | 21 |
| **CEFUROXIME (Cu)** 30 | | | |
| Neisseria | 25 | 26-30 | 31 |
| Hemophilus | 16 | 17-19 | 20 |
| Other | 14 | 15-17 | 18 |
| **CEPHADROXIL (Cq)** 30 | 14 | 15-17 | 18 |
| **CEPHALEXIN (Cp)** 30 | | | |
| **CEFALORIDINE (Cr)** 5,10,30 | 14 | 15-17 | 18 |
| **CEPHALOTHIN (Ch)** 30 | 14 | 15-17 | 18 |
| **CEPHOTAXIME (Ce)** 30,10 | | | |
| Hemophilus | - | - | 26 |
| Other Streptococci | 25 | 26-27 | 28 |

© Sridhar Rao P.N

www.microrao.com

| | | | |
|---|---|---|---|
| Neisseria | - | - | 31 |
| Other | 14 | 15-22 | 23 |
| **CEFOXITIN (Cn)** 30 | | | |
| Neisseria | 23 | 24-27 | 28 |
| Other | 14 | 15-17 | 18 |
| **CHLORAMPHENICOL (C)** 10,25,50 | | | |
| Hemophilus | 25 | 26-28 | 29 |
| Streptococci | 20 | - | 21 |
| Other | 12 | 13-17 | 18 |
| **CHLORTETRACYCLINE (Ct)** 30 | 14 | 15-18 | 19 |
| **CIPROFLOXACIN (Cf)** 5,10,30 | | | |
| Hemophilus | - | - | 21 |
| Neisseria | 27 | 28-35 | 36 |
| Other | 15 | 16-20 | 21 |
| **CLARITHROMYCIN (Cw)** 15 | | | |
| Streptococci | 16 | 17-20 | 21 |
| Staphylococci | 13 | 14-17 | 18 |
| Hemophilus | 10 | 11-12 | 13 |
| **CLINDAMYCIN (Cd)** 2,10 | | | |
| Staphylococci | 14 | 15-20 | 21 |
| Streptococci | 15 | 16-18 | 19 |
| **CLOXACILLIN (Cx)** 5,10,30 | 19 | - | 20 |
| **COLISTIN (Cl)** 10,25,50 | 8 | 9-10 | 11 |
| **CO-TRIMOXAZOLE (Co)** 25 | | | |
| Streptococci | 15 | 16-18 | 19 |
| Other | 10 | 11-15 | 16 |
| **DEMECLOCYCLINE (D)** 30 | 14 | 15-18 | 19 |
| **DICLOXACILLIN (Dc)** 1 | 10 | - | 13 |
| **DOXYCYCLINE (Do)** 10,30 | 12 | 13-15 | 16 |
| **ERYTHROMYCIN (E)** 5,10,15 | | | |
| Staphylococci | 13 | 14-22 | 23 |
| Streptococci | 15 | 16-20 | 21 |
| **FURAZOLIDONE (Fr)** 50 | | | |
| **GENTAMICIN (G)** 10,30,50 | 12 | 13-14 | 15 |
| **IMIPENEM (I)** 10 | | | |
| Hemophilus | - | - | 16 |
| Other | 13 | 14-15 | 16 |
| **KANAMYCIN (K)** 1,30 | 13 | 14-17 | 18 |

© Sridhar Rao P.N

www.microrao.com

| | | | |
|---|---|---|---|
| **LINCOMYCIN (L)** 2,10,15 | 9 | 10-14 | 15 |
| **LOMEFLOXACIN (Lo)** 30 | | | |
| Hemophilus | - | - | 22 |
| Neisseria | - | - | 36 |
| Other | 18 | 19-21 | 22 |
| **METHICILLIN (M)** 5,10,30 | 9 | 10-13 | 14 |
| **MINOCYCLINE (Mi)** 30 | 14 | 15-18 | 19 |
| MOXALACTAM | | | |
| **NALIDIXIC ACID (Na)** 30 | 13 | 14-18 | 19 |
| **NEOMYCIN (N)** 10,30 | 12 | 13-16 | 17 |
| **NETILMICIN (Nt)** 10,30 | 12 | 13-14 | 15 |
| **NITROFURANTOIN (Nf)** 100-300 | 14 | 15-16 | 17 |
| **NORFLOXACIN (Nx)** 5,10 | 12 | 13-16 | 17 |
| **NOVOBIOCIN (Nv)** 5,30 | 17 | 18-21 | 22 |
| **OFLOXACIN (Of)** 2,5 | | | |
| Hemophilus | - | - | 16 |
| Streptococci | 12 | 13-15 | 16 |
| Neisseria | 24 | 25-30 | 31 |
| Other | 12 | 13-15 | 16 |
| **OLEANDOMYCIN (Ol)** 15 | 11 | 12-16 | 17 |
| **OXACILLIN (Ox)** 1 | | | |
| Staphylococci | 10 | 11-12 | 13 |
| Pneumococci | 19 | - | 20 |
| Streptococci | - | - | 20 |
| **OXYTETRACYCLINE (O)** 30 | 14 | 15-18 | 19 |
| **PEFLOXACIN (Pf)** 5 | | | |
| **PENICILLIN-G (P)** 0.5-10 UNITS | | | |
| Staphylococci | 28 | - | 29 |
| Enterococci | 14 | - | 15 |
| Other Streptococci | 19 | 20-27 | 28 |
| Neisseria | 26 | 27-46 | 47 |
| **PIPERACILLIN (Pc)** 30-100 | | | |
| Pseudomonas | 17 | - | 18 |
| Gram negative bacilli | 17 | 18-20 | 21 |
| **POLYMYXIN-B (Pb)** 10-300 UNIT | 8 | 9-11 | 12 |
| PRISTINOMYCIN (Pm) 15 | | | |
| **RIFAMPICIN (R)** 2,15,30 | | | |
| Streptococci | 16 | 17-18 | 19 |
| Other | 16 | 17-19 | 20 |

© Sridhar Rao P.N

www.microrao.com

| | | | |
|---|---|---|---|
| **ROXITHROMYCIN (Ro)** | | | |
| **SISOMYCIN (Ss)** | | | |
| **SPARFLOXACIN (Sc)** 5 | | | |
| Staph,Strepto, Enteric | 15 | 16-18 | 19 |
| Neisseria,Hemophilus | - | - | - |
| **SPECTINOMYCIN (Se)** 100 | 14 | 15-17 | 18 |
| **STREPTOMYCIN (S)** 10,25 | 11 | 12-14 | 15 |
| **SULPHAMETHOXAZOLE (Sx)** | | | |
| **SULPHASOMIDINE (So)** 300 | 12 | 13-16 | 17 |
| TEICOPLANIN 30 | 10 | 11-13 | 14 |
| **TETRACYCLINE (T)** 1,2,10,30 | | | |
| Hemophilus | 25 | 26-28 | 29 |
| Streptococci | 18 | 19-22 | 23 |
| Pneumococci | 17 | 18-21 | 22 |
| Neisseria | 30 | 31-37 | 38 |
| Other | 14 | 15-18 | 19 |
| **TICARCILLIN (Ti)** 75 | | | |
| Pseudomonas | 14 | - | 15 |
| Gram negative bacilli | 14 | 15-19 | 20 |
| **TOBRAMYCIN (Tb)** 10,30 | 12 | 13-14 | 15 |
| **TRIMETHOPRIM (Tr)** 5,10,25 | 10 | 11-15 | 16 |
| **TRIPLE SULPHAS (S3)** 300 | 12 | 13-16 | 17 |
| **VANCOMYCIN (V)** 5,10,30 | | | |
| Enterococci | 14 | 15-16 | 17 |
| Staphylococci | - | - | 15 |
| Streptococci | - | - | 17 |
| Pneumococci | - | - | 16 |
| | | | |

© Sridhar Rao P.N