

Asociación entre el perfil de patógenos causantes de mastitis y prácticas de ordeño en hatos lecheros en Puerto Rico^{1,2}

Mónica X. Toledo-Villafañe³, Jaime E. Curbelo-Rodríguez^{3*,4},
Marcela G. Marrero³, Luis Viera-González⁴, Enrique Martínez-
Loarte⁴, Suzika Pagán-Riestra⁴, Angélica Alvarado-Narváez⁴,
Luis Rodríguez-Rosado⁴, Raúl Pérez-Rodríguez⁴
y Aníbal Ruiz-Lugo⁴

J. Agric. Univ. P.R. 105(2):243-261 (2021)

RESUMEN

La asociación entre el perfil de patógenos causantes de mastitis en muestras de leche del tanque de almacenamiento y las prácticas de ordeño fueron evaluadas entre hatos con alta (n=15) y baja (n=14) calidad de leche. La categorización por calidad de leche se estableció a partir del recuento de células somáticas (RCS) y el recuento bacteriano (RB) según los datos de calidad de leche generados por la Oficina de la Reglamentación de la Industria Lechera de Puerto Rico durante los meses de agosto a septiembre de 2016. El perfil de los patógenos se determinó usando la prueba molecular *PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit* mientras que las prácticas de ordeño empleadas en cada hato se determinaron a través de un cuestionario cumplimentado presencialmente. El análisis estadístico fue realizado con un PROC TTEST para determinar diferencias en los promedios del RCS y RB entre los grupos y tablas de contingencia para calcular la asociación entre las prácticas de ordeño y el perfil de patógenos causantes de mastitis según la categoría por calidad de leche. Diferencias entre los grupos de baja y alta calidad de leche fueron reportadas ($P < 0.001$) para los promedios del RCS ($1,029,285 \pm 76,879$ vs. $212,667 \pm 13,954$ cél/mL) y RB ($139,928 \pm 47,474$ vs. $4,440 \pm 580.6$ UFC/mL), respectivamente. Se detectaron diferencias entre las prácticas de ordeño en los hatos lecheros con alta y baja calidad ($P < 0.05$). Los patógenos causantes de mastitis con mayor prevalencia en hatos lecheros con leche de baja calidad fueron *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* spp., con 92.9%, 71.4%, 57.1%, y 35.7%, respectivamente. Mientras que *Serratia marcescens* tuvo una mayor prevalencia, con 40% en hatos con leche de alta calidad ($P < 0.05$). El incrementar el conocimiento de los ordeñadores acerca de la influencia que tiene cada práctica de ordeño sobre la calidad de la leche es imperante para que los hatos lecheros produzcan leche de calidad.

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 25 de noviembre de 2020.

²Este estudio fue financiado en parte por fondos provistos por el Departamento de Agricultura de Puerto Rico, proyecto Z-030.

³Departamento de Ciencia Animal, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. *Autor para correspondencia: jaimee.curbelo@upr.edu

⁴Servicio de Extensión Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

Palabras clave: mastitis, prácticas de ordeño, patógenos causantes de mastitis

ABSTRACT

Association between the profile of mastitis-causing pathogens and milking practices in dairy herds in Puerto Rico

The association between the profile of mastitis-causing pathogens in milk samples from bulk tanks and milking practices was evaluated among herds with high ($n = 15$) and low ($n = 14$) milk quality. Milk quality grades were based on the somatic cell count (SCC) and the bacterial count (BC), according to milk quality data generated by the Dairy Industry Regulation Office of Puerto Rico during the months of August and September, 2016. The pathogen profile was determined using the PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit molecular test, while the milking practices used in each herd were determined through a questionnaire completed in person. The statistical analysis was performed with a PROC TTEST to determine differences in SCC and BC averages between the groups and contingency tables to calculate the association between milking practices and the profile of mastitis-causing pathogens, according to milk quality grade. Differences between dairy herds of low and high milk quality were reported ($P < 0.001$) for the averages of SCC ($1,029,285 \pm 76,879$ vs. $212,667 \pm 13,954$ cells/mL) and BC ($139,928 \pm 47,474$ vs. $4,440 \pm 580.6$ CFU/mL), respectively. Differences were detected between milking practices among dairy herds with high and low milk quality ($P < 0.05$). The most prevalent pathogens causing mastitis in dairy herds with low milk quality were *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella* spp., with 92.9%, 71.4%, 57.1%, and 35.7%, respectively. Meanwhile, *Serratia marcescens* was the most prevalent in herds with high milk quality reaching 40% ($P < 0.05$). Increasing milkers' knowledge about the influence that each milking practice has on milk quality is imperative for dairy herds to produce high quality milk.

Key words: mastitis, milking practices, mastitis pathogens

INTRODUCCIÓN

Durante el año fiscal 2016-17, la Industria Lechera de Puerto Rico aportó \$880.2 millones (23.9%) al Ingreso Bruto Agrícola (Departamento de Agricultura, 2020). Aun siendo la principal industria agrícola de Puerto Rico, enfrenta varios retos, entre ellos la mastitis. La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a cualquier agente extraño que accede al tejido estéril de la glándula mamaria (Pol y Ruegg, 2007). Según la Oficina de la Reglamentación de la Industria Lechera de Puerto Rico (Departamento de Agricultura, 2014), para el año fiscal 2013-2014, la leche cruda decomisada por incumplimiento con los parámetros de calidad de leche, como el recuento de células somáticas (RCS) y el recuento bacteriano (RB), representó pérdidas de \$322,088 para la industria lechera de Puerto Rico. Al considerar el impacto de la mastitis sobre la producción de leche, el efecto es mayor. Kvapilik et al. (2014) reportaron que vacas que producen leche

con RCS entre 400,000 a 800,000 cél/mL producen 10% menos leche que vacas libres de mastitis (< 200,000 RCS/mL). En 2019, la producción anual de leche en Puerto Rico alcanzó los 220,513,581 litros y el promedio del RCS de todos los hatos lecheros de Puerto Rico durante el mismo año fiscal fue de 385,026 cél/mL (Departamento de Agricultura, 2019). Por ende, considerando un 5% de pérdida de producción de leche atribuida a los elevados RCS, se estima que 11,025,678 litros de leche no fueron producidos por las vacas en 2019 a causa de la mastitis. Atribuyendo un promedio de \$0.79 pagado por litro, el valor de la leche no producida sería equivalente a \$ 8,710,286 durante el año en cuestión. De modo que la prevención de mastitis en los hatos lecheros representa un beneficio de importancia económica en la producción de leche.

Las prácticas de manejo recomendadas para prevenir la mastitis se enfocan principalmente en reducir la exposición de la glándula mamaria a patógenos causantes de la enfermedad. Además, la identificación del agente etiológico de mastitis es de gran importancia para determinar el tipo de mastitis (e.g., ambiental o contagiosa), las prácticas de manejo asociadas a la fuente de contagio y determinación del tratamiento efectivo. Los métodos tradicionales para la identificación del agente causante de mastitis están generalmente basados en medios de cultivos bacterianos en platos petri. Investigaciones muestran que pruebas moleculares como la “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR, por sus siglas en inglés) presentan mayor especificidad y sensibilidad, generando resultados más rápido comparado a cultivos bacterianos tradicionales (Hogan et al., 2010). Además, estudios locales han reportado una limitada capacidad de detección de patógenos causantes de mastitis en cuartos mamarios con mastitis subclínica utilizando cultivos bacterianos tradicionales (Curbelo-Rodríguez et al., 2018). El objetivo de esta investigación fue determinar la asociación entre el perfil de patógenos causantes de mastitis cuantificados mediante prueba molecular (PCR) y las prácticas de manejo en hatos lecheros de Puerto Rico con alta y baja calidad de leche. La hipótesis de esta investigación es que la presencia de patógenos ambientales estará relacionada con hatos con baja calidad de leche, por lo contrario, patógenos contagiosos serán más prevalentes en hatos con alta calidad de leche. Además, se espera que los patógenos prevalentes se relacionen con las frecuencias con las que se emplean las prácticas de manejo recomendadas para la prevención y control de mastitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos de calidad de leche generados por la ORIL durante los meses de agosto a septiembre de 2016 se utilizaron para seleccionar el

5% de los hatos lecheros con RCS y RB más bajos (alta calidad; n=15) y el 5% con los más altos (baja calidad; n=14). En coordinación con los inspectores de la ORIL, se recolectó (1 de noviembre de 2016) una muestra de leche del tanque de almacenamiento de cada hato lechero participante, la cual fue congelada para posterior análisis bacteriológico. El promedio de vacas lactantes de los hatos evaluados fue de 140.4, con un mínimo de 35 y máximo de 310.

La identificación molecular de patógenos causantes de mastitis se realizó utilizando un “*real-time PCR kit*” (*PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit*; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.)⁵ en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez. Este kit identifica 15 patógenos causantes de mastitis incluyendo: *Corynebacterium (C.) bovis*, *Enterococcus (Entero.)* spp. (incluyendo *Entero. faecalis* y *Entero. faecium*), *Escherichia (E.) coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma* spp., *Prototheca* spp., *Serratia marcescens*, *Staphylococcus (S.) aureus*, *Staphylococcus* spp. (incluyendo a *S. aureus* y todas especies relevantes de *Staphylococcus* que arrojan positivo a la prueba de coagulasa), *Streptococcus (Strep.) agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis*, *Trueperella pyogenes* y/o *Peptoniphilus indolicus* y levaduras. El *PathoProof Complete-16* categoriza la expresión genética relativa del patógeno como baja, moderada o alta, según la cantidad de ciclos requeridos para detectar la señal fluorescente emitida por la sonda durante la reacción en cadena de la polimerasa. Esto indirectamente representa la densidad bacteriana original en la muestra analizada.

Se diseñó un cuestionario para determinar la asociación entre las prácticas de manejo para el control de mastitis durante el ordeño y los patógenos causantes de mastitis entre los grupos experimentales. Este cuestionario fue completado presencialmente durante el ordeño en cada vaquería participante por los agrónomos del Programa Educativo de Agricultura en Ganado Lechero del Servicio de Extensión Agrícola, Universidad de Puerto Rico-Mayagüez.

Análisis Estadístico

Para determinar las posibles diferencias en los promedios del RCS y RB entre los grupos experimentales, se realizó un PROC TTEST en SAS (University Edition). Se generaron correlaciones simples entre el RCS, RB y tamaño del hato a través de un PROC CORR. La asociación

⁵Los nombres de compañías y de marcas registradas solo se utilizan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

entre la expresión relativa de los patógenos causantes de mastitis y las respuestas de los cuestionarios asociadas a las prácticas de manejo (i.e., nunca, a veces y siempre) según los grupos experimentales se evaluó usando tablas de contingencia (CHI-SQUARE). El criterio de significancia estadística se consideró a un valor $P < 0.05$ y la tendencia a un valor $P \geq 0.05$ y $P < 0.10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación entre prácticas de manejo para el control de mastitis en hatos con alta o con baja calidad de leche

El estudio incluyó muestras de tanque provenientes de 29 hatos lecheros, representando el 10.6% de la población total de hatos lecheros bovinos en Puerto Rico para el año 2016. Se encontraron diferencias entre los grupos de baja y alta calidad ($P < 0.001$) para los promedios del RCS ($1,029,285 \pm 76,879$ vs. $212,667 \pm 13,954$ cél/mL) y RB ($139,928 \pm 47,474$ vs. $4,440 \pm 580.6$ UFC/mL), respectivamente.

La correlación entre el RCS y el RB fue de 0.60 ($P < 0.001$), sugiriendo el impacto importante que tiene la mastitis sobre la calidad de la leche. El tamaño del hato (cantidad de vacas en ordeño) tuvo una correlación de -0.37 con el RCS ($P = 0.057$), mientras que el RB tendió a correlacionar con dicho parámetro (-0.35; $P = 0.067$). Este fenómeno ha sido documentado anteriormente (Oleggini et al., 2001). El aumentar el tamaño del hato usualmente genera un beneficio económico por el efecto de dilución de gastos fijos, permitiendo a los ganaderos invertir en nuevas tecnologías asociadas con un mejor manejo del ordeño. Sin embargo, Archer et al. (2013) indicaron que aumentar el tamaño del hato reducía el tiempo disponible por vaca para manejar la mastitis. En general, los productores de leche se benefician por la economía asociada a menores inversiones por unidad de producción, generada por el aumento en el tamaño del hato y las mejoras en la eficiencia laboral (Bailey et al., 1997). Esto recalca la necesidad de llevar a cabo una planificación efectiva al momento de aumentar el número de animales en el hato, considerando el manejo del ordeño.

Las prácticas de manejo para minimizar la mastitis y su relación con la calidad de leche fueron evaluadas y se presentan en el Cuadro 1. Hatos que no usaban antibióticos como parte de los procedimientos para horrar las vacas al principio del periodo horro tendían a poseer baja calidad de leche ($P = 0.083$), lo que concuerda con otros estudios reportados (Macmillan et al., 1983; Tiwari et al., 2018). El incorporar el

CUADRO 1.—Relación entre la frecuencia de prácticas de manejo para el control de mastitis y la calidad de leche del hato (Grupo= alta o baja calidad).

Práctica de Manejo	Grupo ¹	Frecuencia			Valor-P
		Nunca	A veces	Siempre	
¿Implementa la terapia de vaca horra a vacas destinadas al horro?	Alta Calidad	0	0	15	0.083
	Baja Calidad	1	3	10	
¿Cuán frecuente se limpia la sala de espera?	Alta Calidad	—	0	15	0.058
	Baja Calidad	—	3	11	
¿Utiliza una rutina de ordeño consistente?	Alta Calidad	0	2	13	0.042
	Baja Calidad	1	7	6	
¿Utiliza guantes desechables durante el ordeño?	Alta Calidad	4	1	10	0.018
	Baja Calidad	11	0	3	
¿Utiliza servilletas individuales por cuarto? ²	Alta Calidad	3	2	10	0.044
	Baja Calidad	5	6	3	
¿El personal que realiza el ordeño es capacitado regularmente?	Alta Calidad	0	6	8	0.040
	Baja Calidad	5	5	4	

¹Alta calidad (n=15) representa el 5% de los hatos lecheros con RCS y RB más bajos, y Baja calidad (n=14) el 5% con RCS y RB más altos

²El uso de un paño limpio por vaca se consideró como satisfactorio a esta premisa.

tratamiento de vaca horra reduce la incidencia de nuevos casos de mastitis durante el horro y posteriormente durante la lactación (Tiwari et al., 2018).

Por otra parte, el no llevar a cabo una rutina diaria de higienización de la sala de espera tendió a asociarse con hatos dentro del grupo de baja calidad de leche ($P = 0.058$). La exposición de la ubre a la materia orgánica acumulada en la sala de espera incrementa el riesgo de contraer mastitis ambiental, especialmente cuando las prácticas de higiene durante el ordeño no son adecuadas (Ruegg, 2006). Hatos donde no se observó una rutina consistente de higiene durante el ordeño tenían mayores RCS y RB, relativo a los hatos donde se mantuvo una rutina de ordeño constante ($P = 0.042$). El no implementar consistentemente las prácticas de higiene recomendadas puede afectar el proceso de la preparación de la ubre y ocasionar un aumento en la cantidad de leche residual, aumentando así la incidencia de mastitis (Blowey y Edmondson, 2010). Además, el no utilizar guantes desechables durante el ordeño estuvo asociado con hatos con baja calidad de leche ($P = 0.018$). Esta práctica ha sido reportada como un indicador de altos RB (Cortinhas et al., 2018). Otra práctica de manejo que estuvo asociada con la calidad de leche en los hatos evaluados fue el uso de servilletas individuales por cuarto de la glándula mamaria ($P = 0.044$). El secado individual disminuye la carga bacteriana en la piel de los pezones ayudando a reducir la propagación de bacterias entre pezones de la misma vaca y disminuyendo el RB en la leche del tanque de almacenaje (Pankey, 1989; Ruegg, 2006).

Por último, hatos lecheros donde regularmente se capacita al personal de ordeño sobre prácticas recomendadas de higiene durante el ordeño y el protocolo para una adecuada preparación de la ubre presentaban mejor calidad de leche ($P = 0.040$) que aquellos que no empleaban esta práctica. El incrementar la percepción y conciencia de los ordeñadores acerca de la influencia que tiene cada práctica de ordeño sobre la calidad de la leche y el bienestar del animal es imperante para que los hatos lecheros estén en cumplimiento con los parámetros de calidad de leche (Múnere-Bedoya et al., 2017).

Prevalencia de patógenos causantes de mastitis en muestras de tanque de los hatos lecheros evaluados

La prevalencia de los patógenos causantes de mastitis en muestras de tanque de los 29 hatos lecheros evaluados se presenta en la Figura 1. Los patógenos causantes de mastitis con mayor prevalencia fueron: *Strep. agalactiae*, *Strep. uberis* y *Staphylococcus* spp., con 82.7, 82.7 y 65.5%, respectivamente. Tal prevalencia es mucho más elevada a la

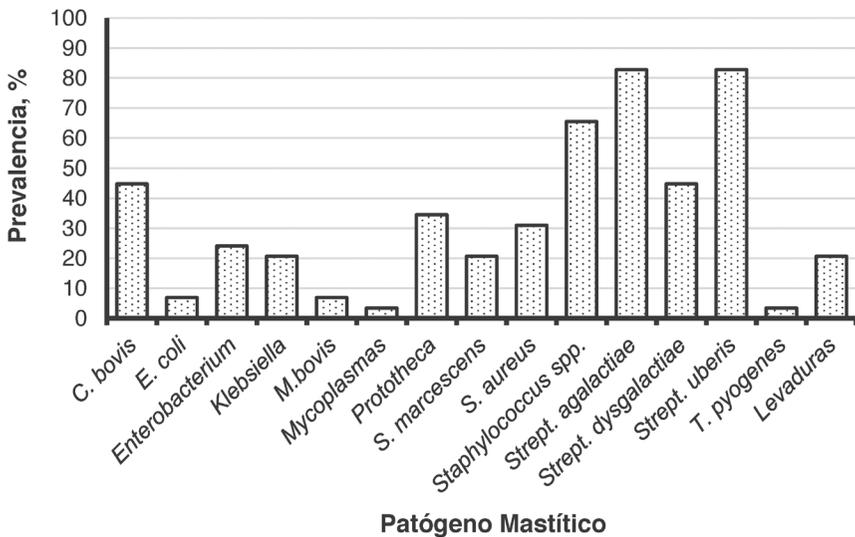


FIGURA 1. Prevalencia de patógenos causantes de mastitis en muestras de tanque de los hatos lecheros evaluados.

reportada en otras investigaciones (Unnerstad et al., 2009). Sin embargo, la prevalencia de *Strep. agalactiae* fue significativamente menor en los hatos con alta calidad de leche (Figura 2). *Streptococcus agalactiae* es un patógeno contagioso, y por ende se transmite de vaca a vaca exclusivamente a través de la leche (Carvalho-Castro et al., 2017), particularmente durante el ordeño o al alimentar becerras con leche mastítica sin pasteurizar. La mastitis causada por *Strep. agalactiae* comúnmente se manifiesta de manera subclínica, por lo que el no realizar pruebas periódicas para determinar el RCS y el agente etiológico resultará en infecciones persistentes, lo que podría explicar la alta prevalencia encontrada en hatos de baja calidad de leche. Por otra parte, la prevalencia de los patógenos ambientales *Strep. uberis* y *Staphylococcus spp.* fue similar entre ambos grupos experimentales (Figura 2). La prevalencia de *Strep. uberis* y *Staphylococcus spp.* en los 29 hatos evaluados fue substancialmente mayor (82.9 y 65.5% vs. 11.10 y 6.11%, respectivamente) que los reportados en estudios previos (Unnerstad et al., 2009). Otro estudio, realizado en el trópico (i.e., Tailandia), ha reportado una prevalencia de *Staphylococcus spp.* de hasta 59.0% (Pumipuntu et al., 2019). Ambos patógenos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente del animal. Es por esto que los hatos que no llevan a cabo una buena higiene de las estructuras de alojamiento y/o que no desinfectan los pezones adecuadamente antes del ordeño son más propensos a experimentar casos de mastitis ambiental.

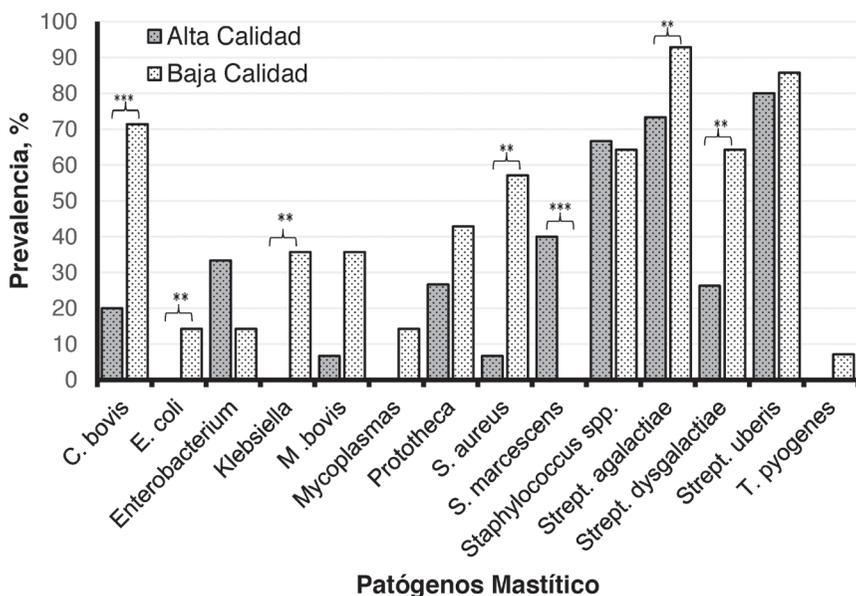


FIGURA 2. Prevalencia de patógenos causantes de mastitis en muestras de tanque entre hatos de alta calidad (n=15) y baja calidad (n=14) de la leche. *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$.

Relación entre la categorización de calidad de leche del hato, prácticas de manejo para minimizar la mastitis y la frecuencia relativa de patógenos causantes de mastitis en muestras de tanque de almacenamiento

Se evaluó la expresión relativa de los patógenos causantes de mastitis según la categorización de calidad de la leche de tanque (Cuadro 2) y las prácticas de manejo para el control de mastitis (Cuadro 3). El *PathoProof Complete-16* categoriza la expresión genética relativa del patógeno como baja, moderada o alta, según la cantidad de ciclos requeridos para detectar la señal fluorescente emitida por la sonda durante la reacción en cadena de la polimerasa. Esto indirectamente representa la densidad bacteriana original en la muestra analizada.

Hatos que no incorporan prácticas de higiene durante el ordeño son más susceptibles a desarrollar mastitis contagiosa. Los patógenos contagiosos causantes de mastitis generalmente infectan cuartos saludables durante el ordeño, a través de la leche (Hogan et al., 2010). El *C. bovis* es un patógeno Gram-positivo considerado contagioso. El mismo se detectó con mayor prevalencia en hatos con baja calidad de leche, relativo a hatos con alta calidad (71.4 vs. 20%; $P = 0.005$; Figura 2). De hecho, en el presente estudio, hatos que incorporaron en sus protocolos de ordeño el uso de guantes desechables, servilletas

CUADRO 2.—Relación entre la Expresión Relativa¹ de patógenos causantes de mastitis en la leche de tanque de almacenamiento y la calidad de la leche del hato (Grupo=alta o baja calidad).

<i>P</i> = 0.005					
<i>Corynebacterium bovis</i>					
Expresión Relativa					
Grupo	No-detección	Baja	Moderada	Alta	Total
Alta Calidad	12	3	–	–	15
Baja Calidad	4	10	–	–	14
Total	16	13	–	–	29

<i>P</i> = 0.039					
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
Expresión Relativa					
Grupo	No-detección	Baja	Moderada	Alta	Total
Alta Calidad	15	0	0	–	15
Baja Calidad	9	4	1	–	14
Total	24	4	1	–	29

<i>P</i> = 0.030					
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Expresión Relativa					
Grupo	No-detección	Baja	Moderada	Alta	Total
Alta Calidad	14	1	0	0	15
Baja Calidad	6	4	2	2	14
Total	20	5	2	2	29

<i>P</i> = 0.081					
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>					
Expresión Relativa					
Grupo	No-detección	Baja	Moderada	Alta	Total
Alta Calidad	11	4	0	–	15
Baja Calidad	5	7	2	–	14
Total	16	11	2	–	29

<i>P</i> = 0.041					
Levaduras					
Expresión Relativa					
Grupo	No-detección	Baja	Moderada	Alta	Total
Alta Calidad	14	1	–	–	15
Baja Calidad	8	5	–	–	13
Total	22	6	–	–	28

¹Basado en la prueba molecular PCR (PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit)

individuales por cuarto y uso apropiado del “pre-dip”, presentaron menor expresión relativa de *C. bovis* (Cuadro 3). El uso del “pre-dip” no es una práctica común para el control de patógenos mastíticos con-

CUADRO 2.—(Continuación) *Relación entre la Expresión Relativa¹ de patógenos causantes de mastitis en la leche de tanque de almacenamiento y la calidad de la leche del hato (Grupo= alta o baja calidad).*

<i>P</i> = 0.008					
<i>Serratia marcescens</i>					
Expresión Relativa					
Grupo	No-detección	Baja	Moderada	Alta	Total
Alta Calidad	9	6	–	–	15
Baja Calidad	14	0	–	–	14
Total	23	6	–	–	29

<i>P</i> = 0.0144					
<i>Streptococcus agalactiae</i>					
Expresión Relativa					
Grupo	No-detección	Baja	Moderada	Alta	Total
Alta Calidad	4	9	2	0	15
Baja Calidad	1	3	7	3	14
Total	5	12	9	3	29

¹Basado en la prueba molecular PCR (PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit)

tagiosos (Hogan et al., 2010). Sin embargo, debido a que *C. bovis* coloniza la piel del pezón, el desinfectar el mismo con el “pre-dip” pudiera reducir su población y por ende la incidencia de mastitis causada por *C. bovis* (Hogan et al., 2010). El rol de *C. bovis* como agente etiológico de mastitis debe priorizarse en el manejo de mastitis ya que, aunque varios autores lo consideran un patógeno menor (Bexiga et al., 2011), su alta prevalencia en hatos lecheros y su asociación con elevados RCS en el presente estudio, son indicadores de su relevancia como patógeno causante de mastitis.

Staphylococcus aureus es considerado uno de los patógenos contagiosos causantes de mastitis más importantes mundialmente (Monistero et al., 2018). En el presente estudio, *S. aureus* estuvo asociado con hatos de baja calidad de leche, detectándose en el 57.1% de las muestras de leche de dicho grupo (Cuadro 2), presentando una prevalencia más alta a la reportada en estudios previos (32.34%; Sağlam et al., 2017). De hecho, donde único se observó una expresión relativa alta (n = 2) y moderada (n = 2) para *S. aureus* fue en los hatos que pertenecían al grupo de baja calidad. Una característica particular de *S. aureus* es su relación con casos de mastitis subclínica, lo cual dificulta su control en hatos lecheros. Consiguientemente, para su control, el uso de pruebas rutinarias para determinar el RCS acompañadas con prácticas apropiadas de higiene durante el ordeño son claves. Hatos con alta prevalencia de *S. aureus* corren

CUADRO 3.—*Expresión Relativa*¹ de patógenos causantes de mastitis según las prácticas de manejo para el control de mastitis utilizadas.

<i>Corynebacterium bovis</i>				
	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	
Nunca	5	10	-	15
A veces	1	0	-	1
Siempre	10	3	-	13
Total	16	13	-	29
<i>P</i> = 0.045				
<i>Corynebacterium bovis</i>				
	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	

<i>Corynebacterium bovis</i>				
	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	
Nunca	4	4	-	8
A veces	2	6	-	8
Siempre	10	3	-	13
Total	16	13	-	29
<i>P</i> = 0.042				
<i>Corynebacterium bovis</i>				
	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	

<i>Corynebacterium bovis</i>				
	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	
Nunca	2	2	-	4
A veces	1	6	-	7
Siempre	12	5	-	17
Total	15	13	-	28

¹Basado en la prueba molecular PCR (PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit)²El uso de un paño limpio por vaca se consideró como satisfactorio a esta premisa

CUADRO 3.—(Continuación) *Expresión Relativa*¹ de patógenos causantes de mastitis según las prácticas de manejo para el control de mastitis utilizadas.

<i>Corynebacterium bovis</i>				
¿Aplica el “pre-dip” en pezones limpios?	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	
Nunca	4	0	—	4
A veces	6	2	—	8
Siempre	17	0	—	17
Total	27	2	—	29
<i>P</i> = 0.060				
<i>Streptococcus uberis</i>				
¿Lleva registros de tratamientos de casos de mastitis?	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	
Nunca	1	13	—	14
A veces	0	3	—	3
Siempre	4	6	—	10
Total	5	22	—	27
<i>P</i> < 0.001				
<i>Escherichia coli</i>				
¿Se lava la sala de espera luego de cada ordeño?	Expresión Relativa			Total
	No-detección	Baja	Moderada	
Nunca	—	—	—	—
A veces	1	2	—	3
Siempre	25	0	—	25
Total	26	2	—	28

¹Basado en la prueba molecular PCR (PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit)

²El uso de un paño limpio por vaca se consideró como satisfactorio a esta premisa

CUADRO 3.—(Continuación) *Expresión Relativa*¹ de patógenos causantes de mastitis según las prácticas de manejo para el control de mastitis utilizadas.

		<i>Escherichia coli</i>		
		Expresión Relativa		
¿Utiliza un “pre-dip” comercial para desinfectar los pezones?		No-detección	Baja	Moderada
Nunca		4	0	—
A veces		5	2	—
Siempre		17	0	—
Total		26	2	28

		<i>Escherichia coli</i>		
		Expresión Relativa		
¿Realiza la práctica del despunte durante la preparación de la ubre?		No-detección	Baja	Moderada
Nunca		1	1	—
A veces		3	1	—
Siempre		23	0	—
Total		27	2	29

¹Basado en la prueba molecular PCR (PathoProof™ Mastitis Complete-16 Kit)

²El uso de un paño limpio por vaca se consideró como satisfactorio a esta premisa.

alto riesgo de perder animales por descarte involuntario, ya que la tasa de recuperación de casos subclínicos persistentes es muy baja (Gomes y Henriques, 2016).

Aunque el número de casos positivos a *Strep. agalactiae* fue similar entre los hatos con pobre y alta calidad de leche (13 vs. 11; Cuadro 2), la expresión relativa fue mayor en los hatos con baja calidad ($P = 0.014$). Esto podría significar que, aunque su prevalencia sea alta en todos los hatos, aquellos hatos que realizan prácticas de ordeño para minimizar la mastitis mantienen un control aparente de los casos de mastitis causados por *Strep. agalactiae*. La expresión relativa, al ser un indicador indirecto de la cantidad de células microbianas en la muestra de leche analizada, pudiera ser un indicador de la cantidad de cuartos infectados al momento de la colección de muestras. Similar a *S. aureus*, *Strep. agalactiae* es un patógeno mastítico contagioso, el cual se dispersa a otras vacas exclusivamente a través de la leche y se manifiesta generalmente de manera subclínica, por lo que hatos donde no realizan monitoreo regular del RCS habitualmente experimentan mayor prevalencia de estos patógenos.

Streptococcus dysgalactiae es considerado como un patógeno contagioso y ambiental (Lundberg et al., 2014), debido a que ha sido aislado de leche proveniente de cuartos con mastitis, así como de otros fluidos como mucosa vaginal y nasal, y material orgánico. La prevalencia de *Strep. dysgalactiae* en los hatos con pobre calidad de leche fue mayor que en los hatos con alta calidad (64.3 vs. 26.7%; $P = 0.081$; Cuadro 2). La alta prevalencia de este patógeno coincide con estudios previos que lo colocan como uno de los patógenos más prevalentes en hatos lecheros (Østeras et al., 2006). *Strep. dysgalactiae* generalmente se expresa de manera clínica, lo que hace relativamente fácil identificar y remover del ordeño estos casos. Sin embargo, debido a su alta ubicuidad, la erradicación de este patógeno es compleja, lo que podría explicar su alta prevalencia.

Los patógenos ambientales con potencial de causar mastitis están presentes prácticamente en todo el entorno de las vacas. Abundan especialmente en áreas donde los animales se conglomeran por periodos prolongados (e.g., estructuras de alojamiento, camas, sala de espera y ordeño). Este grupo de patógenos es liberado al ambiente a través del excremento y fluidos corporales, e incluyen coliformes, tales como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *E. coli*, pseudomonas, *Proteus*, *Serratia* spp., levaduras y *Prototheca* spp., entre los más comunes (Smith et al., 1985).

Streptococcus uberis se detectó en una alta prevalencia en ambos grupos evaluados (Figura 2). Sin embargo, independientemente de la clasificación por calidad, hatos que nunca ($n = 13$) o a veces ($n = 3$)

llevaban registros de los casos de mastitis representaron el 72.7% de los hatos donde se detectó *Strep. uberis* ($P = 0.085$; Cuadro 3). Este hallazgo resalta la importancia de mantener un historial de los casos de mastitis y su progreso, aun en hatos donde la mastitis está controlada. Llevar a cabo registros de los casos de mastitis como parte del manejo de prevención de mastitis podría aumentar la detección de infecciones en etapas tempranas y consecuentemente, reducir la pérdida económica por concepto de la leche no producida por la glándula mamaria, mientras se mejora el bienestar animal.

Escherichia coli es uno de los patógenos ambientales causantes de mastitis más importantes en los hatos lecheros, particularmente en su manifestación clínica (Herry et al., 2017). Aunque su prevalencia en los hatos estudiados fue de 6.89% (Figura 1), los únicos hatos donde se detectó *E. coli* pertenecían al grupo de baja calidad de leche. Las prácticas que estuvieron asociadas con la presencia de este patógeno incluyeron la higiene de la sala de espera ($P < 0.001$), uso del “pre-dip” ($P = 0.040$) y el despunte durante la preparación de la ubre ($P < 0.009$; Cuadro 3). Estas prácticas están relacionadas con el control de coliformes, grupo que incluye a *E. coli*, los cuales generalmente abundan en las heces de mamíferos, lo que pudiera explicar su relación con la higiene de la sala de espera y el uso del “pre-dip”. Debido a que los casos de mastitis bovina causados por *E. coli* generalmente son clínicos, el realizar el despunte apropiadamente ayudará al ordeñador a detectar estos casos.

La prevalencia de levaduras fue mayor ($P = 0.041$) en hatos de pobre calidad en comparación con los hatos con alta calidad de leche (38.5 vs. 6.7%, respectivamente). Organismos como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* son comúnmente encontrados en agua estancada, suelo, plantas y material orgánico en descomposición (Yeo et al., 1988). Los mismos tienen la particularidad de contaminar cánulas, jeringuillas y componentes del equipo de ordeño, por lo que la utilización y desinfección apropiada de este equipo reducirá la incidencia de este tipo de mastitis en los hatos lecheros.

Serratia marcescens es otro patógeno ambiental ampliamente distribuido en el entorno del animal, específicamente en el suelo, excremento de las vacas, plantas y agua (Chen et al., 2017). También se ha aislado de material orgánico utilizado en camas, de la sala de ordeño y, peculiarmente, de la solución del “pre-dip” (Friman et al., 2019). Inesperadamente, *S. marcescens* se detectó con mayor prevalencia en hatos de alta calidad de leche (40.0 vs. 0.0 %, $P = 0.008$; respectivamente). Debido a la naturaleza ubicua de *S. marcescens*, es común que en hatos donde se implementa un ordeño adecuado, la prevalencia de patógenos contagiosos sea baja mientras que la de los ambientales aumente. De

hecho, Friman et al. (2019) reportaron que los hatos donde se aislaron brotes con *S. marcescens* llevaban a cabo prácticas de higiene adecuadas en el ordeño y ambiente del hato.

CONCLUSIONES

Se encontraron asociaciones positivas entre varias prácticas recomendadas del ordeño y la calidad de leche producida en estos hatos, resaltando la importancia de estas prácticas para controlar la prevalencia de patógenos causantes de mastitis. Los patógenos detectados con mayor prevalencia en los hatos con baja calidad de leche fueron principalmente de origen ambiental e incluyeron a *C. bovis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Strep. dysgalactiae* y levaduras. Inesperadamente, *Serratia marcescens* tuvo mayor prevalencia en hatos con alta calidad de leche. Los patógenos contagiosos causantes de mastitis con mayor prevalencia fueron *Strep. agalactiae* y *S. aureus*, los cuales debido a su naturaleza subclínica presentaron una mayor expresión relativa comparados con los demás patógenos contagiosos. El incrementar el conocimiento de los ordeñadores acerca de la influencia que tiene cada práctica de ordeño sobre la calidad de la leche es imperante para que los hatos lecheros produzcan leche de calidad.

LITERATURA CITADA

- Archer, S.C., F. Mc Coy, W. Wapenaar y M.J. Green, 2013. Association of season and herd size with somatic cell count for cows in Irish, English, and Welsh dairy herds. *The Veterinary Journal* 196(3): 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.004>
- Bailey, K., D. Hardin, J. Spain, J. Garrett, J. Hoehne, R. Randle, R. Ricketts, B. Stevens y J. Zulovich, 1997. An economic simulation study of large-scale dairy units in the Midwest. *J. Dairy Sci.* 80: 205-214.
- Bexiga, R., M.T. Koskinen, J. Holopainen, C. Carneiro, H. Pereira, K.A. Ellis y C.L. Vilela, 2011. Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *Journal of Dairy Research* 78(1): 49-55. <https://doi.org/10.1017/S0022029910000725>
- Blowey, R. y P. Edmondson, 2010. Mastitis Control in Dairy Herds. 2nd Edition, *CAB International, Cambridge*, 55. <https://doi.org/10.1079/9781845935504.0000>
- Carvalho-Castro, G.A., J.R. Silva, L.V. Paiva, D.A. Custódio y R.O. Moreira, 2017. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds Brazilian. *Braz J Microbiol.* 48(3): 551-559. doi:10.1016/j.bjm.2017.02.004
- Chen, S., J. Blom, y E.D. Walker, 2017. Genomic, physiologic, and symbiotic characterization of *Serratia marcescens* strains isolated from the mosquito *Anopheles stephensi*. *Frontiers in Microbiology* 8:1483. Doi: 10.3389/fmicb.2017.01483
- Cortinhas, C.S., B.G. Botaro, S.N. de Macedo y M.V. dos Santos, 2018. Herd characteristics and management practices associated with bulk tank milk quality of dairy herds in southeastern Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 50(7): 1605-1610. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1601-z>
- Curbelo-Rodríguez, J.E., A.D. Almeida-Montenegro, G. Ortiz-Colón, H.L. Sánchez-Rodríguez y E. Jiménez-Cabán, 2018. Termografía infrarroja como herramienta para la detección de mastitis subclínica en ganado lechero bovino. *ALPA* 26(1-2).

- Departamento de Agricultura, 2014. Oficina para la Reglamentación de la Industria Lechera. Informe Anual Año Fiscal 2012-2013.
- Departamento de Agricultura, 2019. Oficina para la Reglamentación de la Industria Lechera. Informe Anual.
- Departamento de Agricultura, 2020. Estadísticas Agrícolas. Ingreso Bruto de la Agricultura de Puerto Rico.
- Friman, M.J., M.H. Eklund, A.H. Pitkälä, P.J. Rajala-Schultz y M.H.J. Rantala, 2019. Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica* 61(1): 54. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>
- Gomes, F. y M. Henriques, 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Curr. Microbiol.* 72: 377-382. doi: 10.1007/s00284-015-0958-8.
- Herry, V., C. Gitton, G. Tabouret, M. Répérant, L. Forge, C. Tasca, F. B. Gilbert, E. Guitton, C. Barc, C. Staub, D. G. E. Smith, P. Germon, G. Foucras, y P. Rainard, 2017. Local immunization impacts the response of dairy cows to *Escherichia coli* mastitis. *Scientific Reports* 7(1): 3441. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03724-7>.
- Hogan, J.S., R.N. Gonzalez, R.J. Harmon, S.C. Nickerson, S.P. Oliver, J.W. Pankey, M.T. Koskinen, G.J. Wellenberg, O.C. Sampimon, J. Holopainen, A. Rothkamp, L. Salmikivi, W. van Haeringen, T.J. Lam y S. Pyörälä, 2010. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J. Dairy Sci.* 93: 5707-5715.
- Kvapilík, J., O. Hanus, J. Syruček, M. Vyletlova-Klimesova y P. Roubal, 2014. The economic importance of the losses of cow milk due to mastitis: A meta-analysis. *Bulg. J. Agric. Sci.* 20: 1483-1497.
- Lundberg, Å., A. Nyman, H.E. Unnerstad y K.P. Waller, 2014. Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 56(1): 80.
- Macmillan, K.L., G.F. Duirs y D.M. Duganzich, 1983. Association between dry cow therapy, clinical mastitis, and somatic cell count score with milk and fat production in ten New Zealand dairy herds. *J. Dairy Sci.* 66 (2): 259-265.
- Monistero, V., H. Graber, C. Pollera, P. Cremonesi, B. Castiglioni, E. Bottini, Ceballos-Marquez, L. Lasso-Rojas, V. Kroemker, N. Wentz, I.M. Petzer, C. Santisteban, J. Runyan, M. Veiga dos Santos, B. Alves, R. Piccinini, V. Bronzo, M. Abbassi, M. Said y P. Moroni, 2018. *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: Genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. *Toxins* 10(6): 247. <https://doi.org/10.3390/toxins10060247>
- Múnica-Bedoya, O.D., L.D. Cassoli, P.F. Machado y M.F. Cerón-Muñoz, 2017. Influence of attitudes and behavior of milkers on the hygienic and sanitary quality of milk. *PLoS one.* 12(9): e0184640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184640>
- Oleggini, G.H., L.O. Ely y J.W. Smith, 2001. Effect of region and herd size on dairy herd performance parameters. *J. Dairy Sci.* 84(5): 1044-1050. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74564-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74564-X)
- Østeras, O., L. Sølverød y O. Reksen, 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey - Effect of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *J. Dairy Sci.* 89: 1010-1023.
- Pankey, J.W., 1989. Hygiene at milking time in the prevention of bovine mastitis. *British Veterinary J.* 145(5): 401-409. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(89\)90047-X](https://doi.org/10.1016/0007-1935(89)90047-X)
- Pol, M., y R.L. Ruegg 2007. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 90(1): 262-273.
- Pumpuntu, N., W. Tunyong, N. Chantratita, P. Diraphat, P. Pumisat, N. Sookrung, W. Chaicumpa y N. Indrawattana, 2019. *Staphylococcus* spp. associated with subclinical bovine mastitis in central and northeast provinces of Thailand. *PeerJ.* 7, e6587. <https://doi.org/10.7717/peerj.6587>
- Ruegg, P.L., 2006. Basic epidemiologic concepts related to assessment of animal health and performance. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice.* <https://doi.org/10.1007/s10967-007-1128-7>

- Sağlam, A.G., M. Şahin, E. Çelik, Ö. Çelebi, D. Akça y S. Otlu, 2017. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World*. 10(12): 1481-1485. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1481-1485>.
- Smith, K., D. Todhunter y P. Schoenberger, 1985. Environmental mastitis: Cause, prevalence, prevention. *J Dairy Sci*. 68(6): 1531-1553. doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)80993-0
- Tiwari, S., T.K. Mohanty, T.K. Patbandha, A. Kumaresan, M. Bhakat, S. Gautam, A. Kumari, N. Kumar y R.K. Baithalu, 2018. Effect of dry cow therapy on incidence of clinical mastitis, milk yield and composition in crossbred cows. *Indian Journal of Animal Research* 52(2): 291-295. <https://doi.org/10.18805/ijar.11170>
- Unnerstad, H.E., A. Lindberg, K.P. Waller, T. Ekman, K. Artursson, M. Nilsson- Öst y B. Bengtsson, 2009. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology* 137(1-2): 90-97.
- Yeo, S.G., K.Y. Chung y H.T. Cho, 1988. Prevalence of yeasts in bovine mammary gland infections and teat cups of milking machines. *Korean J. Vet. Res.* 28(2): 361-363.