



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus*
ASOCIADAS A MASTITIS BOVINA SUBCLÍNICA AISLADAS EN DOS
TAMBOS DE URUGUAY.**

Rosario de los Santos

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2012



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Posgrados

**CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus*
ASOCIADAS A MASTITIS BOVINA SUBCLÍNICA EN DOS TAMBOS DE
URUGUAY.**

Rosario de los Santos

Silvana Carro

Director de Tesis

Pablo Zunino

Co-director

2012

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Andrés D. Gil Rodríguez; DMV, MSc, PhD.
Facultad de Veterinaria. Universidad de la República**

**Edgardo Giannechini; DMV, MSc.
Facultad de Veterinaria. Universidad de la República**

**Márcia Jantzen; DMV, MSc, PhD.
Universidade Federal de Pelotas. Brasil**

2012

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

En esta hoja va el Informe del Tribunal

Agradecimientos

A los doctores Pablo Zunino y Andrés Gil. Brillantes en lo intelectual son además excepcionalmente amables, pacientes y generosos.

Para Elsa, Celia y Cecilia

Tabla de contenidos

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Importancia de la producción lechera en Uruguay.....	3
Mastitis.....	4
Evolución del concepto.....	4
Definición.....	5
Clasificación.....	5
Etiología.....	6
Staphylococcus aureus y mastitis.....	6
Factores de virulencia.....	8
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos particulares.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Duración del ensayo y establecimientos utilizados.....	13
Recolección de las muestras de leche.....	13
Determinación de la prevalencia de mastitis subclínica.....	13
Aislamientos e Identificación.....	14
Cepas bacterianas.....	14
Test de catalasa.....	14
Test de coagulasa.....	15
Test de DNAsa.....	15
Test de Voges-Proskauer.....	15
Test de oxidasa.....	15
Test de cápsula.....	15
Formación de limo.....	16
Formación de biofilm.....	16
Hemólisis.....	16
Hemaglutinación.....	16
Autoagregación.....	17
Susceptibilidad antibiótica.....	17
Datos agrometeorológicos.....	18
Análisis estadístico de los datos.....	18
Resultados.....	20
Muestras de leche.....	20
Identificación bacteriana.....	23
Origen de los aislamientos.....	24
Producción de limo y presencia de cápsula.....	25
Formación de biofilm.....	26
Autoagregación.....	28
Hemaglutinación.....	29
Susceptibilidad antibiótica.....	31
Correlación entre parámetros agroclimáticos y aislamientos en igual	

período de tiempo.....	33
DISCUSION.....	34
Importancia del momento y la duración de la prueba.....	35
Prevalencia de mastitis subclínicas.....	35
Factores climáticos.....	36
Prevalencia de las mastitis subclínicas. Distribución de los CMT por grado a lo largo del estudio.....	37
Aislamiento e identificación de las cepas.....	40
Cápsula.....	42
Biofilms y producción de limo.....	42
Autoagregación.....	43
Hemaglutinación.....	44
Resistencia antibiótica.....	44
CONCLUSIÓN.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

Lista de figuras

Figura 1.....	21
Figura 2.....	23
Figura 3.....	26
Figura 4.....	28

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la prevalencia mensual y su evolución a lo largo de un año, de mastitis subclínica (MSC), en dos tambos comerciales ubicados en la cuenca lechera del Uruguay (Sur) e identificar y caracterizar cepas de *Staphylococcus aureus* asociados a ella obtenidos de la leche de vacas afectadas que mostraran trazas, 1, 2 o 3 de California Mastitis Test (CMT). Fueron ensayados los tests de coagulasa, hemólisis, la presencia de la cápsula, la formación de limo, la producción de biofilm, la autoagregación, la hemaglutinación y la susceptibilidad a los antibióticos en las cepas de *S. aureus* aisladas.

La prevalencia de la MSC a lo largo del estudio fue baja y no se correlacionó con los meses o las variables climáticas. El número de *S. aureus* aislados (20) de 508 muestras de leche fue menor que lo descrito en informes de otros autores y corresponde al 3,93% de las mismas. La mayoría de ellos se obtuvieron a partir de muestras que presentaron una puntuación de resultado de la prueba de CMT de 1. La formación de cápsula, limo, biofilms y la autoagregación convergen en la capacidad de adherencia bacteriana y la posibilidad de persistencia en la glándula mamaria y probablemente contribuyen a la cronicidad de la infección e incluso la colonización de las instalaciones y equipo de ordeño del tampo. La resistencia antimicrobiana encontrada con respecto a un conjunto de antibióticos comúnmente utilizados en los establecimientos fue baja.

La evaluación de factores de virulencia de los aislamientos de *S. aureus* en el contexto de la MSC en los establecimientos lecheros pueden ser útiles para el desarrollo de acciones precisas y tratamientos para el control de la mastitis y mejorar la salud animal y la producción de leche en los rodeos lecheros bovinos.

SUMMARY

The aim of this work was to assess the prevalence and evolution along a year of subclinical mastitis (SCM) in two commercial farms located in a dairy area of Uruguay (South) and to identify and characterize associated *Staphylococcus aureus* strains obtained from milk of lactating affected cows showing traces, 1, 2 or 3 California Mastitis Test (CMT) score. Coagulase, hemolysis, presence of capsule, slime formation, biofilm production, autoaggregation, haemagglutination and antibiotic susceptibility were assessed in the case of the *S. aureus* isolated strains.

Prevalence of SCM along the study was low and did not correlate with months or climatic variables. The number *S. aureus* isolated (20) of 508 milk samples was low compared to previous reports (corresponding to 3,93% of milk samples) and most of them were obtained from samples that showed a CMT score result of 1. Formation of capsule, slime, biofilms and the

occurrence of bacteria aggregation in all the tested strains converge in the bacterial ability of adherence and persistence in the mammary gland and probably contribute to the further chronicity of the infection and even the colonization of dairy installations. Resistance against a set of commonly used antibiotics was low.

The evaluation of virulence factors of *S. aureus* isolates in the context of subclinical mastitis in dairy farms may be useful to develop precise actions and treatments to control mastitis and to improve animal health and milk production in dairy bovine herds.

INTRODUCCIÓN

Importancia de la producción lechera en Uruguay

La lechería, por su producción de carácter permanente y en contacto diario con el mercado, su escala reducida y una mayor ocupación de fuerza de trabajo fue contemplada como una herramienta para poblar el campo y combinar la ganadería extensiva con la agricultura y la granja. Fue la primera forma de explotación ganadera dependiente del mercado interno (Montaño, 2011), por lo que su desarrollo fue considerado favorable para la limitación de la dependencia de los ganaderos respecto de los frigoríficos (Bertino & Tajam, 2000).

A partir del aumento del consumo de leche en la capital del país, en los años veinte surgen las primeras pasteurizadoras que, junto con los abastecedores de leche de la cuenca lechera de Montevideo fueron conformando una “agroindustria lechera” (Borbonet, 2001).

Su importancia intensificó la conciencia de la necesidad de una política lechera que se constituiría sobre la base de la fijación del precio de la leche.

La lechería se expandió también en torno a las capitales departamentales, configurando un conjunto de cuencas lecheras con establecimientos familiares de reducidas dimensiones y bajos niveles de productividad. La evolución fue haciendo desaparecer gradualmente al tambo urbano y hacia 1913, el 65% de la leche consumida por Montevideo provenía de los tambos rurales.

El precio de la leche era alto, debido a la intervención de numerosos comisionistas y al atraso en las técnicas de producción. El tambo típico contaba con cien vacas, de las que se obtenían tres litros diarios por cabeza. Las condiciones de higiene en que se efectuaba el ordeño y la conservación de la leche hasta su traslado eran deficientes. El consumo de leche de Montevideo alcanzaba 70.000 litros diarios mientras que el del Interior era algo mayor (Bertino & Tajam, 2000).

El Censo Ganadero de 1937 señala un débil crecimiento de la lechería. Desde 1937 y vinculado a la creación de CONAPROLE (1935), cuando la información disponible se vuelve más continua y confiable, se constata un fuerte crecimiento de la producción de leche (Borbonet, 2001), que se desacelera en los años de la Segunda Guerra Mundial, con la fuerte sequía de 1943 y la epidemia de fiebre aftosa que le siguió, para retomar luego un fuerte crecimiento (Bertino & Tajam, 2000; Borbonet, 2001).

El aumento en la producción de leche en los años siguientes se debió a la incorporación de nuevas tierras a la lechería. En forma concomitante la actividad lechera fue ocupando a una creciente fuerza de trabajo (Bertino & Tajam, 2000; DIEA, 2011).

En la actualidad, el 84 % de la leche producida se remite a plantas industriales (DIEA, 2011). Uruguay constituye un ejemplo dentro de América,

tanto por el elevado consumo de lácteos de su población como por la amplia oferta de diversos productos (DIEA, 2011). En un informe titulado "Incertidumbre y expectativas para el 2012 en la región", distribuido en el Reporte Lácteo que realiza el Instituto Nacional de la Leche (INALE, 2012), se informó por un lado que Uruguay es en el Cono Sur de América el segundo país con mayor crecimiento en el sector lechero y, además, el que tiene el mayor consumo *per cápita* de lácteos. La lechería en Uruguay abarca 857.000 hectáreas de la superficie de nuestro territorio, es una gran fuente de mano de obra, empleando a 19 trabajadores por cada 1000 hectáreas (DIEA, 2011).

A partir de 1980 se logra que la producción de litros de leche por animal se incremente dramáticamente para satisfacer las demandas del comercio que hoy alcanza más 1.766 millones de litros por año (DIEA, 2011). Es importante destacar que en la misma medida en que se desarrolla la ganadería y se obtienen rodeos de mayor potencial genético y especialización productiva, también se incrementan los riesgos de aparición de alteraciones en la composición de la leche, asociadas a ciertas enfermedades, pues se aumentan las exigencias ambientales, nutricionales y de manejo (Montero, 2001). El desafío consiste en que a pesar de que las exigencias en el metabolismo de los animales aumenten la implementación de un buen manejo permita que la incidencia de las enfermedades ligadas a la producción se mantenga estable (LeBlanc, 2006).

La posible relación entre estos trastornos y los cambios indeseables en los parámetros de normalidad establecidos para el pago al productor y el cumplimiento de la alta exigencia de calidad de la materia prima en la industria ha dado lugar a investigaciones a nivel mundial (Álvarez, 1999a). La mastitis se identifica aún como la enfermedad más costosa de los productores lecheros de todo el mundo (Halasa et al. 2009; Cressier & Bissonnette, 2011). Presenta un profundo impacto en el bienestar animal y en la calidad de la leche producida (Hillerton & Berry, 2005; Le Maréchal et al. 2011).

Mastitis

Evolución del concepto

La mastitis en los rodeos lecheros es una enfermedad multifactorial con una larga historia. Se trata de una enfermedad endémica muy costosa. Entre los componentes de la pérdida económica generada se encuentran la pérdida de cantidad y calidad de leche producida, los costos de tratamiento, las horas hombre destinadas a los animales enfermos y el descarte prematuro de los infectados en forma crónica (Seegers et al. 2003). Es posible que el mayor avance en la salud del ganado lechero en los últimos 25 años, haya estado asociado al cambio en el paradigma de curar la enfermedad clínica, por el de prevenir la enfermedad. La Epidemiología ha sido una influencia crítica y una gran herramienta para describir, cuantificar e interconectar los factores de riesgo que llevan a la enfermedad.

Otro de los avances reconocibles fue ampliar la definición de las enfermedades incluyendo las condiciones subclínicas. El control de la mastitis también tuvo un importante desarrollo a través de criterios difundidos y luego exigidos por la industria lechera a los productores, como el sellado de pezones post-ordeño y el uso de antibióticos oleosos en los pomos de secado, que fueron ampliamente implementados junto con el uso de la ordeñadora y la identificación y separación del rodeo de los animales infectados.

El uso del conteo de células somáticas (SCC) como un indicador indirecto de la infección intramamaria (IMI) se convirtió en un método estándar para el monitoreo de la calidad de leche. A través de ello el productor pudo controlar el progreso en el control de las IMI (Sharma et al. 2011).

En nuestro país, en 1963 se implementó el reglamento de Leche Calificada que estipulaba un sobrepeso del 15 % en la leche y que tenía en cuenta la sanidad de las ubres del ganado lechero y en 1976 el concepto de calidad higiénica de la leche en base a las pruebas de reductasa y lactofiltro.

En 1997 se implementa el Sistema Nacional de Calidad de Leche que utiliza como pruebas el recuento bacteriano y el recuento de células somáticas (Decreto 90/995 del 21 de febrero de 1995 del Poder Ejecutivo).

Al parecer, aún es necesario establecer un manejo para cada establecimiento y desarrollar un tratamiento para cada tambo en particular junto a un protocolo de tratamiento que reconozca los patógenos predominantes así como los indicadores del éxito del mismo.

Definición

La mastitis, que se define como la inflamación de la glándula mamaria (International Dairy Federation, 1987), puede ocurrir en forma primaria como respuesta de la glándula mamaria a una infección intramamaria (IMI), frecuentemente de origen bacteriano. Los traumas físicos, térmicos y químicos se consideran factores predisponentes.

Clasificación

La mastitis puede clasificarse en subclínica o clínica. La mastitis clínica (MC) muestra síntomas visibles que en los casos leves evidencian en la leche, la presencia de grumos o coágulos. Los casos severos muestran en la mama los signos cardinales de la inflamación: edema, rubor, calor y decoloración de la ubre.

Los síntomas pueden permanecer siendo locales o generalizarse y ocasionalmente resultar en una infección sistémica.

En caso de ausencia de signos visibles la mastitis se denomina como subclínica (MSC). La MSC puede diagnosticarse de forma rutinaria a través del recuento de células (Signorini et al. 2008). El costo de la MSC es muy difícil de cuantificar pero la mayoría de los expertos coinciden en que excede

al de la MC (Hogeveen et al. 2011).

De acuerdo a su duración las mastitis pueden distinguirse como agudas o crónicas. En la mastitis aguda la aparición de los signos es súbita y en la crónica, de acuerdo a la persistencia de los mismos, ocurre el remplazo del parénquima normal mamario por tejido fibroso, afuncional (International Dairy Federation, 1987).

El California Mastitis Test (CMT) se basa en la acción de un reactivo que disrumpe la membrana celular de todas las células presentes en la muestra de leche y reacciona con el DNA liberado formando un gel. El California Mastitis Test (CMT), brinda una determinación cualitativa del recuento de células somáticas en leche, es un “screening” test para las MSC que puede realizarse con facilidad al pie de la vaca. El uso del CMT para identificar cuartos infectados ha sido extensamente validado en vacas fuera del postparto inmediato y estudios para este período se hallan en curso (Dingwell et al. 2003).

Etiología

La glándula mamaria se encuentra expuesta a diversas bacterias durante los consecutivos períodos secos y de lactancia, en los cuales *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y varias bacterias Gram negativas, se encuentran en el grupo de los patógenos comunes más frecuentemente asociados con esta patología, aunque se han reportado más de 130 microorganismos como agentes etiológicos de enfermedad de la glándula mamaria en bovinos (Watts, 1988).

Los patógenos frecuentemente aislados de la leche mastítica se clasifican como contagiosos y no contagiosos (generalmente ambientales) en base a los reservorios y los modos de transmisión de cada grupo. *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, y las especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativo se consideran no contagiosos y *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, contagiosos (Zhao & Lacasse, 2008). *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado en leche cruda y se distribuye ampliamente en los rodeos lecheros del mundo (Zecconi & Hahn 2000; Mellenberger & Kirk 2001; Revelli et al. 2004; Barkema et al. 2006) y el agente etiológico más frecuente de la mastitis contagiosa bovina (Kerro Deogo et al. 2002; Takamatsu et al. 2008; Scarpa et al. 2009).

Staphylococcus aureus y mastitis

Staphylococcus aureus es un microorganismo patógeno oportunista, que naturalmente habita la piel y mucosas. Es extremadamente versátil, responsable de un amplio espectro de enfermedades del hombre y los animales (O’Riordan & Lee, 2004) debido a su habilidad de producir una amplia variedad de arreglos combinando los factores de virulencia de su genoma cuya expresión responde a señales medioambientales (Begun et al.

2005). Se caracteriza por ser un coco anaerobio facultativo, no esporulado, inmóvil, sensible a la coloración de Gram, productor de la enzima catalasa y no productor de la enzima oxidasa.

En Uruguay, Giannechini et al. (2002) determinaron, que en el caso de las mastitis clínicas el patógeno mayoritario fue *S. aureus* (37.5%) sin embargo, en el caso de mastitis subclínicas, ese porcentaje alcanzaba el 62.8%. Esta situación también se refleja a nivel mundial ya que *S. aureus* es uno de los más importantes agentes de mastitis subclínica bovina (Brito et al. 1999). Los reservorios de *S. aureus* en el tambo son los cuartos infectados así como la piel del pezón y las mamas. La presencia en la piel de la mama de lesiones permite su colonización permanente por *S. aureus*.

La infección desde una a otra mama ocurre durante el ordeño. Las fuentes de contaminación son el hombre, sus manos, su ropa y el equipo de ordeño. A la ordeñadora llegan cepas que provienen de la piel y de la leche, pero los estudios han demostrado que la fuente de infección intramamaria más relevante en el rodeo lechero, es la leche proveniente de animales infectados (Zadoks et al. 2002). Sólo las medidas de higiene logran evitar la contaminación y la aparición de nuevas IMI. *S. aureus* ingresa a la glándula mamaria, proveniente de la epidermis infectada o por el ingreso de leche contaminada a la glándula debido a una deficiencia en las prácticas de manejo del equipo de ordeño como un mal ajuste de las bombas de la ordeñadora.

Una vez en el orificio del pezón *S. aureus* puede persistir, reproducirse y progresar hacia el canal del pezón y la glándula mamaria. En la adhesión del microorganismo a las células epiteliales de la glándula intervienen dos tipos de fenómenos: interacciones fisicoquímicas no específicas y específicas entre las células del huésped y los receptores específicos de la pared bacteriana. Coloniza primero el canal del pezón, se adapta y multiplica en la leche, accediendo luego a la parte superior de la glándula. La bacteria se adhiere al epitelio ductal y alveolar, y comienza a producir toxinas. La adherencia bacteriana activa la llegada de macrófagos y neutrófilos que migran desde la sangre a la leche (originando el incremento del recuento de células somáticas en la leche) generando la inflamación de la glándula mamaria, afectando el sistema inmunitario del huésped y dañando las células epiteliales. Como resultado, la bacteria alcanza la capa basal subepitelial, uniéndose al fibrinógeno y otras proteínas receptoras del hospedero y finalmente establece una infección que a menudo se vuelve crónica (Foster & Höök, 1998; Cucarella et al. 2004).

La mastitis estafilocócica puede manifestarse a través de infecciones clínicas y subclínicas, que pueden persistir durante todo el período de lactación y en lactaciones subsecuentes. Posee la característica de adquirir resistencia a los antibióticos, lo que hace más difícil su tratamiento *a posteriori*. Algunos estudios muestran que es prácticamente imposible erradicar las infecciones intramamarias causadas por este microorganismo (Zadoks et al. 2002; Sommerhauser et al. 2003) aunque se pueden

implementar acciones tendientes a reducir la incidencia y prevalencia de esta infección a niveles aceptables. *S. aureus* es aún un reto debido a que las curaciones a través del tratamiento con antibiótico son escasas durante la lactancia y moderadas en el período seco. No obstante, el uso de herramientas epidemiológicas ha definido factores de riesgo para la falla en los tratamientos que permiten una prospectiva para la toma de decisiones, en particular en lo referente a infecciones crónicas (Barkema et al. 2006).

En lo que respecta a las causas potenciales de la falla para la resolución de este problema se ha sugerido que las enfermedades de etiología multifactorial no se pueden eliminar si no se presta atención a todos los factores que contribuyen a la misma o si el microorganismo es ubicuo, si no existe información disponible o si no se desarrollan prácticas de higiene adecuadas (Noordhuizen & da Silva, 2009).

Factores de virulencia

La severidad de la mastitis estafilocócica es altamente variable y abarca un espectro que puede ir de una forma subclínica a una mastitis gangrenosa. Se vinculan las infecciones extremadamente severas a la presencia de cepas hipervirulentas. Por ello, se ha enfatizado la necesidad de identificar las características involucradas en el incremento de la severidad, un mejor monitoreo de las cepas actuantes y su diseminación, para llegar a la implantación de una terapéutica adecuada. La severidad de la infección se halla ligada a ciertos factores que optimizan la virulencia de algunas cepas en el desarrollo de determinadas patologías (Le Maréchal et al. 2011).

Específicamente en lo referente a las mastitis infecciosas se ha determinado que la gravedad del cuadro puede deberse, en algunos casos, a factores relacionados con el huésped (como en la mastitis debido a *Escherichia coli* (Le Maréchal et al. 2011a) pero en la mastitis por *S. aureus* es la diversidad inter-cepas el factor decisivo. Si bien no se han identificado con exactitud los genes responsables, los resultados primarios en estudios de mastitis ovinas indican que no existe gran divergencia en el contenido genético de cepas de virulencia leve o extrema, sino que, la diferencia, radica en su expresión (Le Maréchal et al. 2011b).

S. aureus posee numerosos factores de virulencia distribuidos en forma variable entre distintas cepas, incluyendo varias enzimas extracelulares y mecanismos de adhesión asociados al establecimiento de la inflamación y posterior patogénesis en la glándula mamaria (Stutz et al. 2011). La importancia de conocer los factores de virulencia y la combinación de los mismos presentes en las cepas asociadas a la infección de la glándula mamaria ha sido enfatizada recientemente por diferentes autores que sostienen la idea de que el desarrollo de la mastitis subclínica se relacionaría a la presencia de determinados atributos específicos de las cepas patógenas (Zecconi et al. 2006).

Kerro Dego et al. (2002) propusieron la división de los factores de virulencia de *S. aureus* en tres categorías funcionales: factores que median la adhesión de la bacteria a la célula hospedadora, factores que promueven el daño y la diseminación tisular y factores que protegen a la bacteria del sistema inmune del hospedador, pero tradicionalmente se han agrupado en dos grandes grupos: componentes superficiales y toxinas y enzimas extracelulares. Son componentes superficiales el polisacárido capsular, el polisacárido extracelular y las proteínas superficiales. Las toxinas se dividen en: toxinas con actividad sobre membranas, hemolisinas α , β , γ , δ , leucocidina, toxinas con actividad de superantígenos, enterotoxinas (A-E y G-J), toxina del síndrome del choque tóxico 1 (TSST-1), toxinas epidermolíticas o exfoliativas (A y B). Las enzimas extracelulares son: estafiloquinasa, coagulasa, hialuronidasa, lipasas, proteasas, ADNasa termoestable o termonucleasa y catalasa.

S. aureus es capaz de producir infección intramamaria, debido a la capacidad de expresar ciertos factores que incluyen proteínas de superficie que promueven la adhesión y la colonización de los tejidos del huésped y otros componentes extracelulares (Götz, 2002; Cucarella et al. 2004; Sibbald et al. 2006; Otto, 2008), invasinas que son exportadas a una localización extracitoplasmática y promueven la difusión en los tejidos (leucocidinas, hialuronidasas) (Cucarella et al. 2004; Sibbald et al. 2006), factores de superficie que inhiben la fagocitosis (cápsula y proteínas), que le permiten la supervivencia en las células que colonizan, propiedades bioquímicas que mejoran la supervivencia de *Staphylococcus* en la fagocitosis (producción de carotenoides y catalasa), enmascaradores inmunológicos (proteína A y factor de coagulación), toxinas de daño de membranas: que lesionan la membrana de células eucariotas (hemolisinas y leucotoxinas) y determinantes para la resistencia inherente o adquirida a agentes antibióticos (Sibbald et al. 2006).

Las proteínas de la matriz extracelular y la adhesión a las células epiteliales son elementos clave para colonizar la glándula y desarrollar el proceso patógeno ya que *S. aureus* inicialmente debe entrar a través del canal del pezón y luego evadir el flujo descendente de leche durante el ordeño (Takamatsu et al. 2008).

Los componentes de superficie contribuyen a la persistencia del *S. aureus* debido a su adherencia al tejido subepitelial. *S. aureus* utiliza diferentes proteínas de superficie para adherirse a varios componentes de la matriz extracelular (Sutra & Poutrel, 1994; Oliveira et al. 2006; Takamatsu et al. 2008). El polisacárido capsular forma una estructura lábil extracapsular, el limo, cuya función se halla vinculada a la adherencia, la colonización y virulencia de las cepas que lo presentan (Baselga et al. 1993; Baselga et al. 1994).

S. aureus puede adherirse a las proteínas extracelulares del huésped como el colágeno y la fibronectina, así como a los glóbulos grasos de la leche para luego acceder a las células epiteliales. Es capaz de eludir la fagocitosis gracias a factores tales como la cápsula y la proteína A. Produce

además un gran número de enzimas extracelulares que le permiten persistir y multiplicarse en la mama usando los sustratos disponibles en el medio: nucleasa, coagulasa, fosfatasa, catalasa entre otras.

Entre las estrategias de sobrevivencia que *S. aureus* es capaz de emplear tanto en medios naturales como industriales, se encuentra la formación de biofilms. Se trata de la formación de una comunidad bacteriana sésil caracterizada por células unidas a un sustrato, una interfase o unas a otras que se hallan embebidas en una matriz, por ellas generada, de sustancias extracelulares poliméricas que exhiben un fenotipo alterado en lo que respecta a su crecimiento y la transcripción de genes (Donlan & Costerton, 2002). Este fenotipo distintivo hace a *S. aureus* resistente a distintos agentes antibacterianos y la matriz lo hace insensible a las moléculas bacterianas y a las células movilizadas por el huésped (Costerton et al. 1999; Melchior et al. 2006). Algunas infecciones que adoptan la estructura de biofilm se desarrollan lentamente en un principio e inicialmente no presentan más que algunos síntomas pero actúan como reservorios de células bacterianas capaces de desencadenar cuadros agudos exacerbados (Donlan & Costerton, 2002). En efecto, la habilidad de formar biofilms ha sido reconocida como un importante factor de virulencia en el caso de los estafilococos. Esta capacidad facilita su persistencia en el huésped, le permite evadir las defensas del mismo y sobrevivir en medios con altas concentraciones de compuestos antibacterianos (Oliveira et al. 2006). Muchas infecciones crónicas están asociadas con estirpes productoras de biofilms, muy difíciles de eliminar por fagocitosis y que no responden bien a un amplio rango de antimicrobianos (Mittelman, 1998; Costerton et al. 1999; Cucarella et al. 2004). Las bacterias formadoras de biofilm ocasionan daños pequeños y no evidentes en el tejido glandular del huésped. Las no formadoras de biofilm, producen toxinas, son más patogénicas en poco tiempo y causan daño tisular evidente en el animal. El resultado de este daño consiste en una exposición de las adhesinas de la matriz celular del huésped, que permiten la adherencia bacteriana a los receptores proteicos del huésped y son posteriormente difundidas hacia otros sitios del animal (Cucarella et al. 2004).

El primer mecanismo del cual se valen los microorganismos para lograr resistir a los compuestos antimicrobianos, consiste en bajar drásticamente su nivel metabólico y la tasa de división celular. A su vez la matriz polimérica de la que están formadas la mayoría de los biofilms retarda la difusión de los antimicrobianos al interior del mismo. La reacción oxidativa desencadenada por la respuesta inmune del huésped o los agentes clorados puede ser desactivada en las capas más externas del biofilm más rápido de lo que pueden difundir hacia el interior del mismo, quedando las capas más profundas protegidas (Donlan & Costerton, 2002).

El éxito en el control de los biofilm en la industria láctea generalmente radica en un buen sistema de limpieza "Clean In Place" (CIP) (Flint et al. 1997). Ha sido demostrado que la forma de limpieza y sanitización habitua-

les no son suficientes para disminuir el número de células viables adheridas al biofilm. Las células bacterianas adheridas al equipamiento incrementan su resistencia a los desinfectantes y a la vez se convierten en fuente de contaminación (Simoes et al. 2010, Öner & Ölmez, 2011) aunque en las células bacterianas asociadas a leche se ha detectado más la tendencia a la formación de biofilm que en aquellas aisladas de fuentes extramamarias (Fox et al., 2005)

Diversas cepas aisladas de biofilms generados en plantas de industrias lácteas donde se estudió la susceptibilidad antibiótica de las mismas, exhibieron una amplia resistencia a los compuestos antimicrobianos (carbenicilina, cloxacilina, cefaloridina, novobiocina y vancomicina), indicando la presencia de una microbiota multiresistente que en el caso de las plantas pueden llegar a contaminar el producto final (Sharma & Anand, 2002)

En comparación con otros patógenos causantes de mastitis, hay para la mastitis causada por *S. aureus*, un mayor conjunto de evidencias en qué basar las decisiones de un tratamiento. Las expectativas para una cura bacteriológica espontánea de una mastitis clínica o subclínica son esencialmente nulas (Ruegg, 2010a).

La resistencia antibiótica en las cepas causantes de mastitis en rumiantes es, a nivel mundial, un problema muy serio (Kumar et al. 2011a). El nivel de uso y exposición de ciertos antibióticos para el tratamiento y control de la mastitis tanto en forma intramamaria como sistémica en un rodeo, se encuentra positivamente asociado a la resistencia antimicrobiana en los patógenos de la mastitis bovina en condiciones de campo (Saini et al. 2012). Entre las drogas usadas se observó que era más frecuente la aparición de resistencia a macrólidos y lincosamidas. Debido a que la dosificación significa claramente la selección a favor de la aparición de resistencia, es necesario tener especial cuidado y no establecer tratamientos con drogas de singular importancia para la salud humana como las fluoroquinolonas (Pol & Ruegg, 2007a y b).

El monitoreo de la susceptibilidad antimicrobiana es una herramienta para estimar el comportamiento y la diversidad de las cepas autóctonas de *S. aureus*, aisladas de los rodeos locales donde se emplea la antibioticoterapia, para implantar tratamientos efectivos (Rabello et al. 2005). Los aislamientos de *S. aureus* en los distintos tambos muestran diferencias en los patrones de susceptibilidad antimicrobiana por lo que las evaluaciones deben ser realizadas en las diferentes regiones lecheras ya que estos patrones pueden variar por región (Ochoa-Zarzosa et al. 2007).

La caracterización del patógeno, *S. aureus* aislado de mastitis bovina puede ser útil en el desarrollo de prácticas de control más efectivas. Dentro de la misma, se tienen en cuenta los caracteres de virulencia que presenta el agente, particularmente la formación de biofilm, ya sea en estudios de su expresión fenotípica, (Turkyilmaz & Kaya, 2006) como genotípica (Boerlin et al. 2003; Rabello et al. 2005).

Hipótesis

La incidencia de mastitis subclínica está asociada a distintos factores y una de sus principales causas, *S. aureus*, expresa factores de virulencia que favorecen la permanencia en el huésped y el medio ambiente así como el progreso de la infección.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la prevalencia mensual y la evolución de la mastitis subclínica en vacas en ordeño en dos tambos del sur del país a lo largo de un año y caracterizar una serie de factores de virulencia bacterianos potencialmente asociados a la infección.

Objetivos particulares

- Evaluar la prevalencia de mastitis subclínica a lo largo de un año en dos tambos e identificar potenciales factores asociados a la ocurrencia de la enfermedad.
- Identificar los aislamientos nativos de *S. aureus* de leche proveniente de vacas en ordeño, que presentaran un California Mastitis Test (CMT) con scores T, 1, 2 o 3; de los dos tambos seleccionados.
- Caracterizar la expresión de factores de virulencia asociados a mastitis.
- Establecer el perfil de sensibilidad/resistencia del conjunto de cepas frente a un grupo de compuestos de antimicrobianos usados con frecuencia en la clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Duración del ensayo y establecimientos utilizados

El presente estudio se llevó a cabo en un período de doce meses, desde mayo de 2008 hasta abril de 2009, en dos predios lecheros ubicados en la cuenca lechera de nuestro país en las localidades de Libertad (tL) y Pando (tP) (departamentos de San José y Canelones, respectivamente). Los establecimientos se seleccionaron por el libre acceso que se nos concedió a los mismos así como que la dotación de animales en ordeño y por ende, el porcentaje probable de animales con MSC, era compatible con la capacidad de procesamiento de muestras en el laboratorio.

Recolección de las muestras de leche

Se muestrearon animales en ordeño de dos rodeos predominantemente de raza Holando cuya producción diaria se estableció históricamente en unos 1200 y 1800 litros para cada establecimiento, ambos con recuentos celulares de menos de 200.000 células/mL en el tanque.

Se empleó el California Mastitis Test (CMT) para identificar las posibles MSC. Para ello se extrajo una muestra de leche de aproximadamente 2 mL de leche en cada pocillo de la paleta marcados como A, B, C, y D para identificar los cuartos de los que proviene cada muestra a la que se adicionó igual cantidad de reactivo de California. Luego se procedió a homogeneizar la leche y el reactivo y se leyó el resultado del test. La intensidad de la reacción se visualiza por la viscosidad que adquiere la mezcla proporcional a la cantidad de células presentes en la leche (Mellenberger & Roth, 2000).

Posteriormente fueron extraídas muestras de leche de todas las vacas en ordeño cuya leche era colectada en el tanque, independientemente de la etapa de lactancia, edad y número de parición, cuyo California Mastitis Test (CMT) fuera considerado positivo en sus distintos grados. Se excluyeron del muestreo las vacas tratadas con antibióticos.

Las muestras fueron tomadas mensualmente en ambos establecimientos. Se muestrearon los cuartos siguiendo las recomendaciones del National Mastitis Council (1981). Una vez obtenidas las muestras (40-45 mL) en frascos estériles, las mismas se acondicionaron a 4°C y se trasladaron al laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. A su ingreso en el laboratorio, se almacenaron en una cámara a 4°C y se procesaron dentro de las 24 horas subsiguientes.

Determinación de la prevalencia de mastitis subclínica

Para determinar la prevalencia de mastitis subclínica, se evaluó la proporción de animales con cuartos subclínicamente afectados, incluyendo como tales aquellos carentes de signos clínicos y se consideró que todos los CMT con algún grado de positividad poseían un recuento celular de 300.000

o más células por mL, aunque no se lograra aislar un patógeno mamario, como lo describieron Giannechini et al. (2002).

Aislamientos e Identificación

Las muestras de leche fueron sembradas directamente en Agar Sangre (AS) y en Agar Baird Parker (ABP) e incubadas luego, en aerobiosis a 37°C durante 24 horas.

De las colonias sospechosas se realizaron preparaciones para microscopía óptica que se colorearon con Gram. Las colonias de morfología compatible con *Staphylococcus* spp. se transfirieron a Caldo Tripticasa de Soja (TSB) y Agar Tripticasa de Soja (TSA), incubándose a 37 °C, durante 24 horas. La identificación se realizó en base a las siguientes pruebas: actividad de catalasa en portaobjetos, test de coagulasa en tubo (TC), fermentación de manitol y crecimiento en medio de alta concentración salina (Manitol Sal Agar - MSA), test de deoxiribonucleasa (DNAsa) y test de Voges Proskauer (VP) usando caldo Voges Proskauer (VPB) (Roberson et al. 1992; Boerlin et al. 2003).

Cepas bacterianas

Las cepas se seleccionaron en base a los tests previamente descritos en el siguiente orden: cocos positivos a la coloración de Gram, que evidenciaron actividad de las enzimas catalasa y coagulasa. Para la diferenciación entre *S. aureus* y otros estafilococos con presencia de enzima coagulasa se usó el test de VP (Chanchaithong & Prapasarakul, 2011).

Debido a que la asociación de dos o tres tests mostraron en diferentes estudios valores predictivos positivos satisfactorios para identificar *S aureus* provenientes de mastitis bovina, se llevaron a cabo algunas pruebas adicionales: fermentación de manitol, hemólisis, actividad DNAsa (Tarabla, 2000; Boerlin et al. 2003; Kateete et al. 2010).

También se llevó a cabo un test de clustering usando el index de similitud de Ochiai a fin de mejorar el nivel de confianza en la selección de las cepas seleccionadas (Hammer et al. 2001). En base a este test se identificó un grupo homogéneo correspondiente a las veinte cepas seleccionadas de *S. aureus*.

Fueron usadas como cepas *S. aureus* de referencia las cepas ATCC 29213 (Boerlin et al. 2003), ATCC 25923 (Kateete et al. 2010) y ATCC 6538 (O'Reilly et al. 2000). También se usaron como controles en diferentes tests las siguientes cepas *Escherichia coli* de origen canino (Delucchi et al. 2008) y *Moraxella bovoculi* aislada de ojo bovino (Marrs et al. 1985).

Test de catalasa

Se llevó a cabo en portaobjeto con agua oxigenada al 3% y se consideraron positivas las muestras que presentaron una inmediata formación de burbujas (Pai et al. 2010).

Test de coagulasa

La actividad de la coagulasa fue determinada en tubos por el método descrito por Quinn et al. (2004). Tomando con el asa varias colonias del microorganismo se mezclaron con 0.5 mL de plasma de conejo, citratado, en un tubo de ensayo estéril. El tubo se incubó a 37°C y se examinó a las 4 y 24 horas. La formación de un coágulo firme fue considerado como indicador de la presencia de coagulasa. Como control negativo se empleó una cepa de *S. epidermidis*.

Test de DNAsa

Esta prueba se llevó a cabo usando agar DNAsa disponible comercialmente. Se inoculó el agar en forma de "spot" y se incubó a 37°C durante 24 horas. Luego de la incubación la aparición de un halo claro rodeando la colonia se evaluó como indicativo de la actividad de la enzima (Kateete et al. 2010). Como control negativo se empleó una cepa de *S. epidermidis*.

Test de Voges-Proskauer

Se colocaron en un tubo de ensayo 0,25 mL de solución de KOH y 0,25 mL de alfa naftol, agregando por último 0,5 mL del cultivo fresco de una suspensión bacteriana. El color rojo cereza fue considerado VP (+) y el marrón verdoso VP (-) (Chanchaithong & Prapasarakul, 2011)

Test de oxidasa

El ensayo de citocromo oxidasa se llevó a cabo partiendo de un cultivo fresco de las cepas investigadas en un medio no selectivo (TSA) y libre de colorantes y una solución al 1% de clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina de color azul. Se agregaron unas gotas del reactivo a una tira de papel de filtro colocada en una placa de Petri limpia sobre la misma se extendió luego una ansada de la colonia a estudiar. Como control negativo se usó la cepa ATCC de *S. aureus* y como control positivo la cepa ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa*. Se consideró el ensayo como positivo cuando apareció un color azul profundo en un tiempo menor a 10 seg., lento cuando se evidenció en un lapso de entre 10 y 60 seg., negativo cuando no hubo desarrollo de color, o se produjo en un tiempo mayor a 60 seg.

Test de cápsula

Para determinar la presencia de cápsula se llevó a cabo el test descrito por Gerhardt et al. (1981). Se mezclaron un asa cargada con tinta china y una pequeña cantidad de bacterias sobre un portaobjeto colocando luego un cubreobjetos. La cápsula se visualizó como una zona clara alrededor del microorganismo en un fondo negro amarronado (Türkyilmaz & Kaya, 2006).

Formación de limo

El agar Rojo Congo (Congo Red Agar, CRA) que fue desarrollado por Freeman et al. (1989) se empleó en nuestro estudio para determinar la formación de limo (Baselga et al. 1993; Türkyilmaz & Kaya, 2006). La composición del medio en gramos por litro es de Caldo infusión corazón (BHIB) (Oxoid) 37 g/L, sucrosa 50 g/L, agar 10 g/L y Rojo Congo 0.8 g/L. El colorante Rojo Congo se preparó como una solución acuosa que se esterilizó (121°C, 15 min) separadamente y se enfrió a 55°C antes de agregársela al agar. Las placas se sembraron y se incubaron en aerobiosis a 37°C, por 24 horas. Los aislamientos que al crecer, produjeron colonias negras de consistencia seca y cristalina, se consideraron productores de limo y los que dieron origen a colonias de color rosado, no productores. Como control negativo se empleó una cepa de *E. coli*.

Formación de biofilm

Los aislamientos se incubaron en placas de agar sangre por 18 horas a 37°C en condiciones de aerobiosis. Los cultivos jóvenes así obtenidos, se inocularon en 5 mL de TSB con glucosa (0,25%) y luego se incubaron a 37°C por 24 horas en iguales condiciones. La determinación se llevó a cabo según el método propuesto por Pfaller et al. (1988) usando placas de cultivo celular de 96 pocillos. En cada pocillo se colocaron 5 µL de suspensión bacteriana en TSB con glucosa (TSBg) y 195 µL del mismo medio de cultivo TSBg. Luego de 48 horas de incubación en aerobiosis a 37°C, las placas se lavaron dos veces con agua destilada. En los pocillos se colocaron 200 µL de cristal violeta al 1% por 20 minutos y se lavaron dos veces con agua destilada. El colorante asociado a las células se solubilizó con 200 µL de etanol al 95%. Las placas se leyeron con un lector automático Varioscan Flash 4.00.51 a 540 nm. Una solución de TSB estéril se usó como control negativo. Los ensayos fueron llevados a cabo con cuatro réplicas. El grado de formación de biofilm se testeó siguiendo el criterio expuesto por Mathur et al. (2006).

Hemólisis

La hemólisis se evaluó en placas de TSA suplementadas con 5% de sangre ovina. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C y a 4°C por 12 horas luego de las cuales, las muestras positivas evidenciaron una zona clara de hemólisis alrededor de las colonias.

Hemaglutinación

El test de hemaglutinación se llevó a cabo de acuerdo al método descripto por Rupp y Archer, con modificaciones (1992).

Las bacterias se cultivaron en TSB a 37°C durante 18 – 24 horas. Luego, se cosecharon mediante centrifugación y se lavaron dos veces con PBS, solución 0,11 M de buffer fosfato de sodio. Se determinaron las concentraciones bacterianas a través de los estándares de turbidez de

MacFarland y el conteo en placa.

Se ajustaron de acuerdo al standard 0,5 de MacFarland, equivalente a un recuento aproximado de 10^8 ufc/mL y se diluyeron al décimo mediante en PBS.

Los eritrocitos se obtuvieron centrifugando 3-5 mL de sangre ovina a 3500G durante 4 minutos y se lavaron con PBS 3 veces, obteniendo una concentración final de eritrocitos del 1 % en PBS. La hemaglutinación se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos con fondo en U para microtitulación¹. Se llevaron a cabo las diluciones seriadas al 50 % de suspensiones bacterianas. A todos los pocillos se le agregaron entonces 50 μ L de solución de eritrocitos al 1%. Las placas se cubrieron con film, se llevaron a agitador y se incubaron a 4°C por 2 horas. La hemaglutinación se registró como positiva cuando se observaron, macroscópicamente, agrupamientos de eritrocitos. En el ensayo, como control positivo se empleó una cepa de *S. carnosus*.

Autoagregación

Las cepas se incubaron en placas de agar sangre a 37°C por 18 horas en aerobiosis. Los cultivos frescos así obtenidos se incubaron a 37°C durante 24 horas en iguales condiciones.

Se transfirieron alícuotas de 5 μ L de cada suspensión a 5 mL de TSB Glucosa obteniendo una dilución de 10^{-3} que se incubó durante 48 horas en idénticas condiciones que las anteriores y luego 24 horas a 4° C.

Se extrajeron 200 μ L de la superficie de cada tubo y fueron transferidos a una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo cónico. Se leyó la densidad óptica (Optic Density, OD) a 600 nm. Luego de esto los tubos se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 30 segundos y se retiraron 200 μ L del cultivo y transferidos a una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo cónico.

La OD Final se leyó a 600 nm. El Porcentaje final de Autoagregación se calculó como:

$A = (1 - OD_f / OD_i) \times 100$, donde A: Porcentaje de Autoagregación; OD_f : = Densidad Óptica Final, y OD_i : = Densidad Óptica Inicial (Sorroche et al. 2010).

Susceptibilidad antibiótica

Para la determinación de la resistencia de *S. aureus* a Trimetoprim–Sulfametoxol, Gentamicina, Neomicina, Cefazolina, Nafcilina, Clindamicina, Ciprofloxacina y Penicilina se usó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer et al.1966). Se hicieron suspensiones bacterianas de todas las cepas investigadas que se ajustaron al estándar 0,5 de McFarland.

Para evaluar la resistencia antibiótica de cada uno de los

1 Costar®, Cambridge, Mass.

microorganismos se empleó el medio Mueller-Hinton Agar (MHA: Difco Laboratories). La suspensión bacteriana obtenida se sembró con hisopo y los discos se colocaron sobre la superficie del agar con una pinza. Transcurridos 10 minutos luego de la colocación de los discos, las placas se incubaron invertidas en la estufa por 24-48 horas a 37° C. En todos los casos se registraron los diámetros de los halos. La lectura se hizo a ojo desnudo incluyendo en el diámetro el disco de 6 mm. La ausencia total de inhibición correspondió a 6 mm de lectura.

Conocidos los diámetros para cada antibiótico ensayado, se determinó la sensibilidad de cada cepa que el germen es sensible, de sensibilidad intermedia, o resistente de acuerdo a las tablas de interpretación según normas de la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997; Gandara et al. 2006).

Se utilizaron como controles las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, ATCC 25923 y ATCC 6538.

Datos agrometereológicos

Los datos agrometereológicos correspondientes al período de estudio se obtuvieron de la estación agroclimática del INIA Las Brujas, ubicada en el departamento de Canelones.

Análisis estadístico de los datos

Considerando que todas las variables se expresaron como categóricas (positivo o negativo), se construyó una matriz de ausencia-presencia. A partir de ésta se practicó un Análisis de Clusters, utilizando como índice de asociación el índice de Ochiai, que destaca la co-ocurrencia y que es insensible al tamaño de los casos. Este análisis se aplicó simultáneamente a las cepas y a las variables utilizadas (coagulasa, hemólisis, VP, fermentación del manitol, DNAsa, BPA, catalasa). Para las cepas, se utilizó para seleccionar aquellas que pudieran ser consideradas fenotípicamente *S. aureus*. Para las variables, se utilizó para identificar aquellas que estuvieron asociadas a las cepas seleccionadas.

Para los datos de formación de biofilm, se tomaron las lecturas ajustadas de DO₅₄₀ y se analizaron para cada cepa mediante Análisis Exploratorio de Datos. Dadas las características de los datos estudiados, se procedió a analizarlos mediante el test de Kruskall-Wallis para establecer si había diferencias significativas ($\alpha=0,05$), seguido del test de Mann-Whitney para establecer entre qué cepas se encontraron las mismas.

En los datos calculados de porcentaje de autoagregación se siguió un procedimiento similar al anteriormente expuesto.

Estos procedimientos fueron seguidos por el estudio de la relación entre la formación de biofilm y el porcentaje de autoagregación y de las cepas respecto a ambas variables. Para ello se utilizó el índice de similitud de Bray-Curtis modificado.

Se exploró la posible relación entre algunas variables ambientales de interés y el número de aislamientos obtenidos a través de técnicas bivariadas y multivariadas buscando hacer una regresión lineal múltiple usando como variable dependiente el número de aislamientos y como variables independientes las ambientales. Se realizó un análisis de clusters usando como índice la correlación y análisis de componentes principales.

Todos los procedimientos estadísticos se practicaron utilizando el software estadístico PAST (Hammer et al. 2001).

Resultados

Muestras de leche

Durante el período del estudio, el número de animales en ordeño en ambos tambos, presentó algunas oscilaciones que se describen en la Tabla I. El promedio anual de vacas en ordeño en el tL fue de 112 animales y en el tP de 69. En los meses de enero y febrero de 2009 la dotación de vacas del tP disminuyó a un mínimo de 30 y 38 animales respectivamente, restableciéndose luego paulatinamente pero sin llegar, al final del estudio, a la población inicial.

Tabla I: Dinámica mensual de la población muestreada a lo largo del año de muestreo.

	Animales en ordeño		Animales con CMT*§		Cuartos afectados	
	tL	tP	tL	tP	tL	tP
Mayo	110	80	10 (9,1)	17 (21,3)	16	26
Junio	110	80	10 (9,1)	12 (15,0)	24	34
Julio	110	80	5 (4,5)	22 (27,5)	10	38
Agosto	110	80	14 (12,7)	30 (37,5)	22	45
Septiembre	110	80	5 (4,5)	22 (27,5)	6	35
Octubre	110	80	4 (3,6)	7 (8,8)	8	9
Noviembre	118	80	6 (5,1)	12 (15,0)	14	14
Diciembre	126	65	12 (9,5)	4 (6,2)	34	4
Enero	116	30	14 (12,7)	6 (20,0)	38	10
Febrero	100	38	9 (9,0)	6 (15,8)	16	12
Marzo	99	60	8 (8,1)	11 (18,3)	16	17
Abril	122	70	11 (9,0)	16 (22,9)	26	34
Total	1341	823	108	165	230	278
Promedio	112	69	9	14	19	23

* Número de vacas mostrando los resultados del test CMT con valores: trazas, 1, 2 y 3.

§ Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de animales con CMT en el total de animales en ordeño por establecimiento y por mes

Los porcentajes de prevalencia de CMT durante el estudio fueron 8,05 en tL y 20,04 en tP.

Del tL se extrajeron muestras de leche de 108 animales y 230 cuartos que presentaron algún grado de positividad en el CMT, mientras que en el tP fueron 165 los animales y 278 los cuartos, considerando que un mismo animal podía presentar más de un cuarto afectado a la vez. En cuanto al número de animales o cuartos testados, debe destacarse que no siempre se trató de diferentes animales o nuevos casos ya que en ocasiones, un mismo animal y/o cuarto resultaron reincidentes (Tabla II). En general, de la población muestreada, el porcentaje de animales que presentaron algún

score en el CMT fue del 8% para el tL y de 19% en el tP distribuyéndose, a lo largo del año, de la forma indicada en la Figura 1.

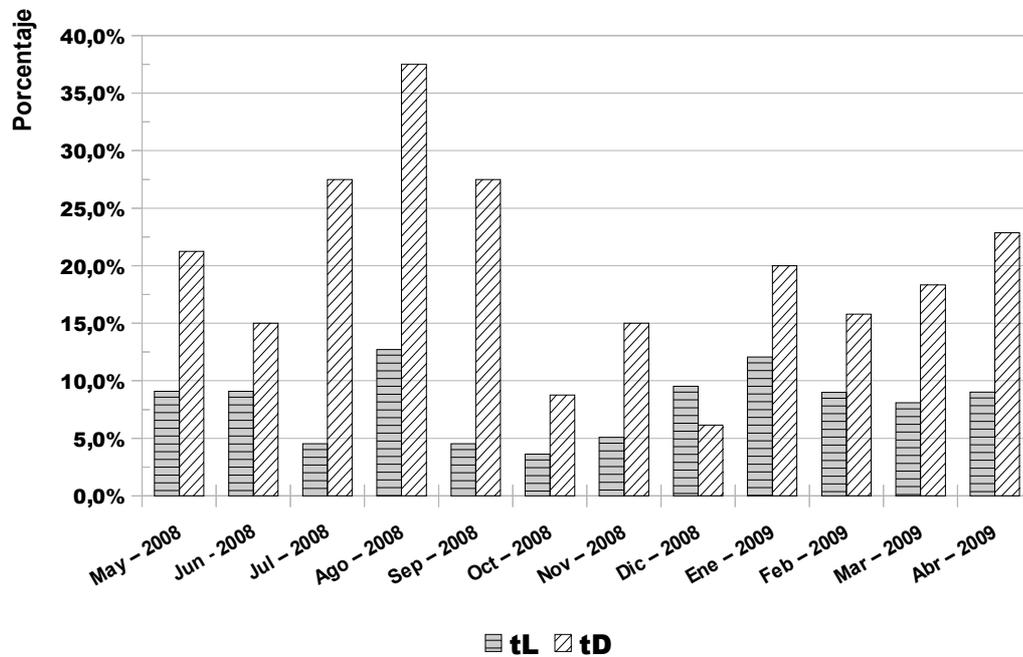


Figura 1: Comparación de la Evolución anual de la Prevalencia (%) de mastitis subclínica de los animales en ordeño en los tambos de Libertad (tL) y Pando (tP).

Tabla II: Prevalencia de mastitis subclínica estimada a través del CMT por animales y por cuartos por mes a lo largo del período mayo 2008 - abril 2009 en ambos establecimientos.

	Prevalencia por Animales		Prevalencia por Cuartos	
	tL	tP	tL	tP
Mayo	9,1%	21,3%	3,6%	8,1%
Junio	9,1%	15,0%	5,5%	10,6%
Julio	4,5%	27,5%	2,3%	11,9%
Agosto	12,7%	37,5%	5,0%	14,1%
Setiembre	4,5%	27,5%	1,4%	10,9%
Octubre	3,6%	8,8%	1,8%	2,8%
Noviembre	5,1%	15,0%	3,0%	4,4%
Diciembre	9,5%	6,2%	6,7%	1,5%
Enero	12,1%	20,0%	8,2%	8,3%
Febrero.	9,0%	15,8%	4,0%	7,9%
Marzo	8,1%	18,3%	4,0%	7,1%
Abril	9,0%	22,9%	5,3%	12,1%

De las muestras de leche obtenidas se obtuvieron en total 63 aislamientos de cocos Gram positivos. El establecimiento y el mes del que provienen los mismos se presentan en la Figura 2.

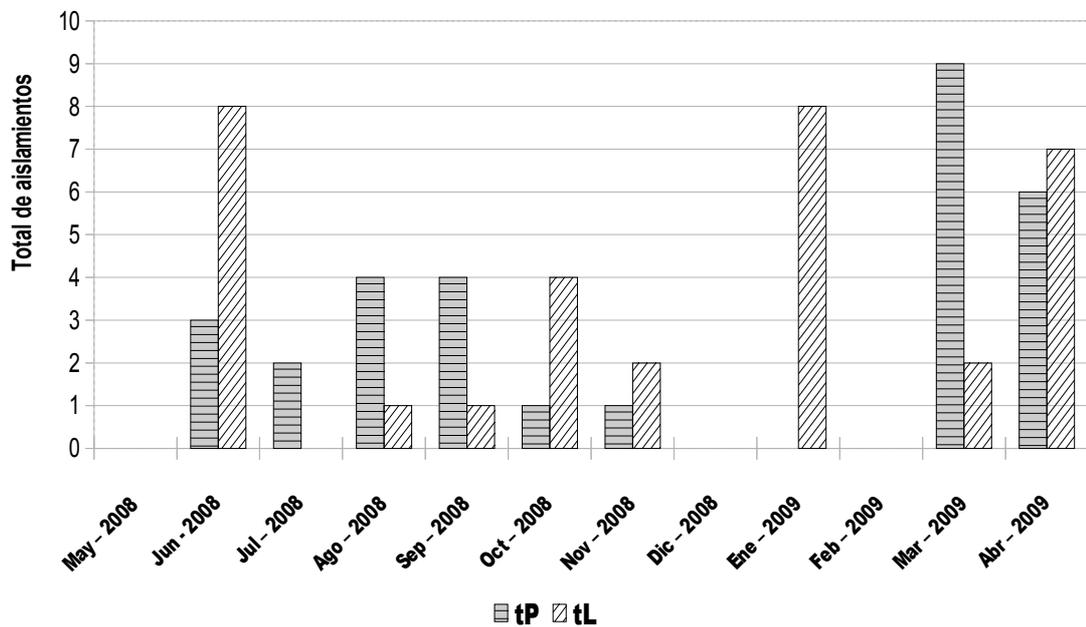


Figura 2: Total de aislamientos de cocos Gram + por establecimiento y por mes en los dos tambos en estudio

Identificación bacteriana

Las 63 cepas que exhibieron morfología de cocos dispuestos en racimos positivos a la coloración de Gram, produjeron catalasa. En 20 se logró identificar la presencia de coagulasa al desarrollarse un coágulo firme en el test de coagulasa en tubo (TC) a las 4 horas y a las 24 horas la producción de coagulasa fue evidente en 22 cepas. De éstas, 20 mostraron un cambio de coloración compatible con una reacción positiva al test de VP y se consideraron *S. aureus*. Estos 20 aislamientos presentaron hemólisis, actividad de DNAsa y pudieron desarrollarse en MSA; 19 de ellos además fermentaron el manitol lo que se evidenció con un cambio de color en el medio. Todas las cepas crecieron en el medio BP con la morfología y dimensiones características pero sin embargo, sólo en 12 se observó un halo de lipólisis rodeando la colonia. Los 2 aislamientos restantes se identificaron como *Staphylococcus* coagulasa positivos diferentes a *S. aureus*.

A los 41 aislamientos de cocos positivos a la coloración de Gram, en los que se determinó la presencia de enzima catalasa pero que no la de coagulasa, se les hizo el test de oxidasa obteniéndose en 3 casos, resultados que confirmaron la producción de la enzima. Esos aislamientos, fueron clasificados como pertenecientes al género *Micrococcus* y los restantes, negativos a la presencia de la enzima citocromo oxidasa, se consideraron *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN).

Tabla III. Clasificación de las cepas seleccionados con actividad de catalasa en base a los resultados de los tests de coagulasa (TC), Voges Proskauer (VP) y Oxidasa (Ox).

Cepas	Oxidasa negativas		Oxidasa positivas		Total Resultado
	VP -	VP +	VP -	VP +	
Coagulasa negativas	31	9	2	1	43
Coagulasa positivas	0	20	0	0	20
Total Resultado	31	29	2	1	63

Los resultados obtenidos para los tests de Catalasa, TC, DNAsa y β -Hemólisis fueron, de acuerdo a lo esperado, positivos para todas las cepas seleccionadas identificadas como *S. aureus*. Particularmente para el test de TC las cepas catalogadas como con actividad coagulasa que en los ensayos mostraron todas un coágulo firme a las 4 horas de incubación. Sólo uno de los aislamientos no fermentó el manitol.

Origen de los aislamientos

El 73 % de los aislamientos obtenidos provinieron de los animales con grado 1 de CMT, 14% pertenecieron al grado 2, 8% al 3 y el resto a los CMT que sólo evidenciaron trazas. Sin embargo, la frecuencia relativa de aislamientos respecto a la cantidad de cuartos muestreados indica que de aquellos cuartos con grado 3 se aisló un 20%, mientras que de los cuartos muestreados con grado 1 se aisló un 13% (evidenciado por la diferente cantidad de cuartos muestrados con distinto grado de CMT).

Desde el punto de vista de los cuartos se obtuvieron el 30% de los aislamientos, del cuarto A, 27% del B, 19% del C y 24% del D. Ponderando estas frecuencias según la proporción aislamiento/muestreo, pasan a ser: cuarto A: 33,81%; cuarto B: 26,83%; cuarto C: 15,10%; cuarto D: 24,25%.

Tabla IV. Relación del número de aislamientos de cocos Gram positivos con actividad catalasa con respecto a la ubicación del cuarto y grado de CMT del cuarto del que provienen

CMT	Cuarto				Total por CMT	Porcentaje
	A	B	C	D		
+	17	11	8	10	46	13,0%
++	1	3	3	2	9	10,0%
+++	0	3	0	2	5	20,0%
t	1	0	1	1	3	7,9%
Total por cuarto	19	17	12	15	63	

A: cuarto delantero izquierdo; B: cuarto delantero derecho; C: cuarto trasero izquierdo; D: cuarto trasero derecho

“+” CMT grado 1; “++” CMT grado 2; “+++” CMT grado 3; “t” CMT trazas

Tabla V. Relación del número de aislamientos de *S. aureus* con respecto a la ubicación del cuarto y grado de CMT del cuarto del que provienen

CMT	Cuarto				Total por CMT
	A	B	C	D	
+	6	3	2	5	16
++	0	1	0	0	1
+++	0	0	0	1	1
t	1	0	0	1	2
Total por cuarto	7	4	2	7	20

A: cuarto delantero izquierdo; B: cuarto delantero derecho; C: cuarto trasero izquierdo; D: cuarto trasero derecho

“+” CMT grado 1; “++” CMT grado 2; “+++” CMT grado 3; “t” CMT trazas

Producción de limo y presencia de cápsula

Todas las cepas de *S. aureus* mostraron cápsula al ser observadas mediante coloración con tinta china en microscopio óptico y fueron capaces de producir limo de acuerdo a la apariencia y coloración características

presentadas al crecer en RCA. Se empleó como control negativo para el ensayo de producción de limo una cepa de *E. coli*.

Formación de biofilm

Todas las cepas produjeron biofilm en un lapso de 24 horas. Se clasificaron como fuertes, moderadas y débiles productoras de biofilm, en base a su OD₅₄₀. Una cepa solamente se consideró como fuerte productora de biofilm (cepa 20080919: valor de la mediana OD₅₄₀ 1,24; valor del cuartil inferior OD₅₄₀ 1,05; valor del cuartil superior OD₅₄₀ 1,32), otras 10 cepas se consideraron moderadamente productoras de biofilm (valor de la media OD₅₄₀ 0,42; valor del cuartil inferior OD₅₄₀ 0,33; valor del cuartil superior OD₅₄₀ 0,53) mientras que las restantes 9 cepas fueron débiles productoras biofilm (valor de la media OD₅₄₀ 0,21; valor del cuartil inferior OD₅₄₀ 0,17; valor del cuartil superior OD₅₄₀ 0,25) (Figura 3 y Tabla VI). Como se observa en la tabla VI se eligió como medida descriptiva de resumen la mediana debido a que no requiere para su utilización realizar ningún supuesto a diferencia de la media aritmética en la que se asume una distribución simétrica imposible de verificar en función del número de repeticiones.

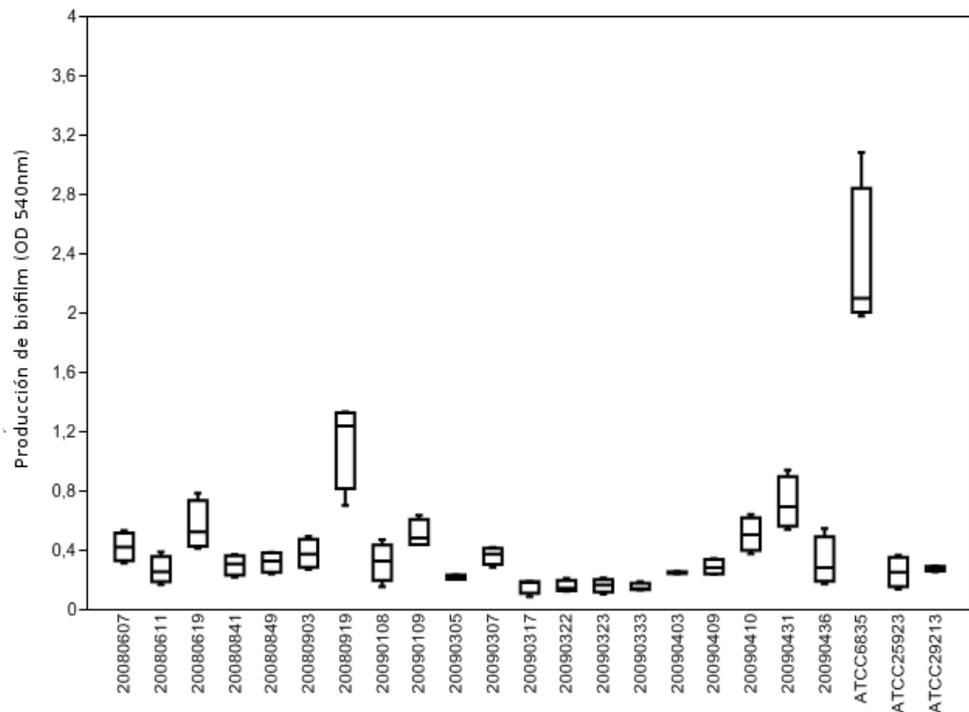


Figura 3: Formación de biofilm determinada según el método de Pfaller en el conjunto de 20 cepas aisladas de *S. aureus*. Se destaca como fuerte productora de biofilm la cepa 20080919.

Tabla VI: Medida de la OD de los aislamientos formadores de biofilm

Cepas	Mediana (OD)
ATCC6835	2,101 ^a
20080919	1,241 ^b
20090431	0,697 ^{b,c}
20080619	0,527 ^{c,d}
20090410	0,506 ^{c,d,e}
20090109	0,484 ^{c,d,e}
20080607	0,423 ^{c,d,e,f}
20080903	0,377 ^{c,d,e,f,g}
20090307	0,375 ^{d,e,f,g}
20080849	0,330 ^{e,f,g,h}
20090108	0,329 ^{e,f,g,h,i}
20080841	0,309 ^{f,g,h,i}
ATCC29213	0,285 ^{g,h,i}
20090409	0,285 ^{g,h,i}
20090436	0,285 ^{g,h,i}
20080611	0,258 ^{g,h,i}
ATCC25923	0,255 ^{g,h,i}
20090403	0,251 ^{h,i}
20090305	0,222 ⁱ
20090317	0,185 ⁱ
20090323	0,169 ⁱ
20090322	0,146 ⁱ
20090333	0,144 ⁱ

Valores con la misma letra en superíndice indican que no hay diferencias significativas. Valores con diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las mismas. (p<0.05).

Autoagregación

Las cepas mostraron un rango amplio de valores de autoagregación como puede verse en la Figura 4. La cepa 20090305 mostró los valores más altos y con una varianza pequeña, similar a la que muestra la cepa ATCC 25923. Como muestra la Tabla VII, el test de Mann-Whitney permitió agrupar las 20 cepas en seis grupos con diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$), mostrando las cepas pertenecientes al mismo grupo, el mismo superíndice. Cada letra de superíndice representa una amplitud de valores. Aquellas cepas que se encuentran en zonas marginales de estos valores se reconocen como pertenecientes a varios grupos.

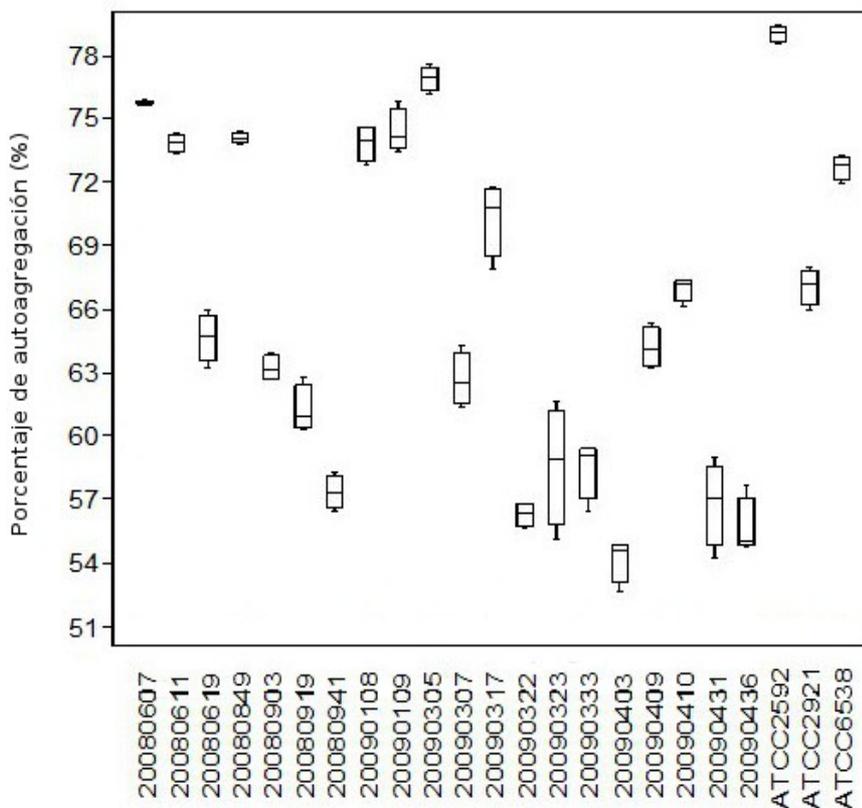


Figura 4: Porcentaje de autoagregación. Las 20 cepas de *S. aureus* mostraron un amplio rango de valores destacándose la cepa 20090305 con los valores más altos

Tabla VII: Porcentaje de autoagregación en los aislamientos de *S. aureus* asociados a MSC.

Cepa	Mediana
ATCC25923	79,03 ^a
20090305	76,90 ^b
20080607	75,69 ^c
20090109	74,13 ^c
20080849	74,00 ^c
20090108	73,93 ^c
20080611	73,86 ^c
ATCC6538	72,76 ^d
20090317	70,78 ^e
ATCC29213	67,16 ^{e,f}
20090410	67,14 ^f
20080619	64,69 ^g
20090409	64,06 ^g
20080903	63,11 ^g
20090307	62,46 ^g
20080919	60,90 ^g
20090333	59,05 ^h
20090323	58,83 ^h
20080941	57,32 ^h
20090431	57,04 ^h
20090322	56,30 ^{h,i}
20090436	54,99 ^{h,i}
20090403	54,58 ⁱ

Valores con la misma letra en superíndice indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$). Valores con diferentes letras en superíndice indican que existen diferencias significativas entre las mismas ($p < 0.05$). Mediana: Medida de tendencia central cuyo valor de que en una población de datos divide a la población en dos partes iguales

No fue posible encontrar relación entre las variables producción de biofilm y porcentaje de autoagregación ($p > 0,05$). Como se observa en la tabla VII se eligió como medida descriptiva de resumen la mediana debido a que no requiere para su utilización realizar ningún supuesto a diferencia de la media aritmética en la que se asume una distribución simétrica imposible de verificar en función del número de repeticiones.

Hemaglutinación

Excluyendo las cepas ATCC 6835 y 25923 usadas como controles positivos sólo 7 de los aislamientos fueron capaces de aglutinar los eritrocitos ovinos. Cuando la dilución bacteriana fue mayor que 10^{-1} , no se

observó hemaglutinación en ninguna cepa (Tabla VIII).

Tabla VIII: Hemaglutinación en los aislamientos de *S. aureus* asociados a MSC.

Cepas	Diluciones de suspensiones bacterianas	
	10 ⁻¹	10 ⁻²
20080607	+	-
20080611	+	-
20080619	-	-
20080849	+	-
20080903	-	-
20080919	-	-
20080941	-	-
20090108	+	-
20090109	+	-
20090305	-	-
20090307	-	-
20090317	-	-
20090322	-	-
20090323	-	-
20090333	-	-
20090403	-	-
20090409	-	-
20090410	-	-
20090431	+	-
20090436	+	-
ATCC25923	+	-
ATCC29213	-	-
ATCC6835	+	-
Control Negativo (<i>E. coli</i>)	-	-

Sólo mostraron hemaglutinación 7 (30%) de las cepas

Susceptibilidad antibiótica

La susceptibilidad y/o resistencia encontradas al evaluar ocho agentes antimicrobianos frente a los aislamientos de *S. aureus* se muestran en la Tabla IX. Cinco de las cepas resultaron resistentes a la penicilina (20%

excluyendo las cepas ATCC usadas como controles). Ninguna de las cepas presentó resistencia a más de un antibiótico o a otro antibiótico diferente a la penicilina.

Tabla IX: Resistencia / susceptibilidad antibiótica

Cepa	COT25	GEN10	N30	P0	CH30	NAF1	CD2	CIP5
20080607	S	S	S	S	S	S	S	S
20080611	S	S	S ¹	R	S	S	S	S
20080619	S	S	S	S	S	S	S	S
20080849	S	S	S	S	S	S	S	S
20080903	S	S	S	R	S	S	S	S
20080919	S	S	S	S	S	S	S	S
20080941	S	S	S	S	S	S	S	S
20090108	S	S	S	S	S	S	S	S
20090109	S	S	S	S	S	S	S	S
20090305	S	S	S	S	S	S	S	S
20090307	S	S	S	S	S	S	S	S
20090317	S	S	S	S	S	S	S	S
20090322	S	S	S	S	S	S	S	S
20090323	S	S	S	R	S	S	S	S
20090333	S	S	S	R	S	S	S	S
20090403	S	S	S	S	S	S	S	S
20090409	S	S	S	S	S	S	S	S
20090410	S	S	S	S	S	S	S	S
20090431	S	S	S	S	S	S	S	S
20090436	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC6835	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC25923	S	S	S	S	S	S	S	S
ATCC29213	S	S	S	R	S	S	S	S

S: cepa sensible. R: cepa resistente.

COT25: Trimetoprim, 1,25 µg – Sulfamethoxazole, 23,75 µg (Resistente ≤10 mm; Intermedio: 11-15 mm; Sensible ≥16 mm); **GEN10:** Gentamicina (Resistente ≤12 mm; Intermedio: 13-14 mm; Sensible ≥15 mm); **N30:** Neomicina (Resistente <13 mm; Intermedio: 13-16 mm; Sensible >17 mm); **P10:** Penicilin, 10 U (Resistente ≤28 mm; Sensible ≥29 mm); **CH30:** Cefazolina, 30 µg (Resistente ≤14 mm; Intermedio: 15-17 mm; Sensible ≥18 mm); **NAF1:** Nafcilina, 1 µg (Resistente ≤1 mm; Intermedio: 11-12 mm; Sensible ≥13 mm); **CD2:** Clindamicina, 2 µg (Resistente ≤14 mm; Intermedio: 15-20 mm; Sensible ≥21 mm).

Correlación entre parámetros agroclimáticos y aislamientos en igual período de tiempo.

Los parámetros agroclimáticos de interés correspondientes a precipitaciones, humedad relativa media y temperatura promedio se estudiaron mes a mes durante el lapso en el cual se recogieron las muestras y se obtuvieron los aislamientos, datos que se muestran en la Tabla X.

Tabla X: Registro de las precipitaciones, humedad relativa media y temperatura promedio durante el período mayo 2008- abril 2009

	Precipitaciones*	Humedad Relativa Media*	Temperatura* Promedio (Máx + Min / 2)
05 – 2008	0,65	90,25	14,05
06 – 2008	0,92	90,16	10,25
07 – 2008	1,33	94,1	13,27
08 – 2008	1,79	88,66	11,17
09 – 2008	0	92,06	12,87
10 – 2008	0,01	84,16	16,01
11 – 2008	0	75,18	22,05
12 – 2008	0,61	76,95	21,95
01 – 2009	0,16	83,13	19,5
02 – 2009	0,18	81,68	17
03 – 2009	0,29	87,97	16,33
04 – 2009	0,1	84,03	19,25
05 – 2009	0,23	87,87	21,4
06 – 2009	0,07	90,07	19

**Datos suministrados por estación agroclimática INIA Las Brujas, Canelones*

Se tomaron con reserva algunos resultados debido a la distinta naturaleza de las variables utilizadas. Al hacer la matriz de correlación se encontró una correlación baja y no significativa entre el número de aislamientos y las variables ambientales. Sí hubo una alta correlación negativa entre humedad relativa y temperatura.

DISCUSION

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la prevalencia de MSC en vacas en ordeño en dos tambos del sur del país a lo largo de un año, aislar cepas nativas de *S. aureus* de las muestras de leche con resultados de CMT de scores T, 1, 2 o 3 y caracterizar una serie de factores de virulencia bacterianos potencialmente asociados a la infección. Para la realización del mismo se logró tener libre acceso a dos predios comercialmente sustentables y con niveles higiénicos, sanitarios y productivos aceptables, aunque diferentes entre sí. Se evaluó mensualmente, durante un año, la prevalencia de animales y cuartos positivos a la prueba de CMT dentro del total de animales en ordeño, se constataron los posibles casos de MSC y en particular se aislaron de los cuartos afectados cepas de *S. aureus* y debido al procedimiento seguido para la identificación de las mismas, se obtuvieron además, una colección de cepas de cocos sensibles a la tinción de Gram con presencia de actividad de la enzima catalasa diferentes de *S. aureus*. Se excluyeron del estudio las mastitis clínicas ya que los animales clínicamente enfermos eran inmediatamente tratados con antibióticos lo que dificultaba el acceso a las muestras debido a una única frecuencia mensual de extracción y una vez establecida la terapéutica, la leche no hubiera podido ser cultivada exitosamente.

Para determinar los cuartos afectados con mastitis subclínica se optó por el CMT por su efectividad, sencillez y bajo costo para testear un número reducido de animales (200 animales, una vez al mes, distribuidos en dos tambos). La prueba CMT presenta una sensibilidad de 0.75 y una especificidad del 0.542 (Signorini et al. 2008). En cuanto al tipo de prueba, Signorini et al (2008) la describieron como adecuada para determinar la prevalencia de IMI, a nivel de un rodeo donde no se presupone una prevalencia alta de MSC (los recuentos de células somáticas del tanque en ambos rodeos eran históricamente inferiores a 200.000/mL), ya que posee una sensibilidad alta. Con respecto a la interpretación de la prueba y los grados subjetivamente asignados al resultado de la misma (Verbeek et al. 2008) se asumió que el posible error se diluye en el número de muestras y en que siempre fue el mismo equipo el encargado de recogerlas, en condiciones semejantes en ambos establecimientos (Dingwell et al. 2003).

En lo referente a la extrapolación del resultado de la misma a un determinado recuento de células somáticas, se estima el recuento celular en leche evaluada como trazas en un rango de 150.000 a 500.000/mL, para grado 1 de 400.000 a 1.500.000/mL, para grado 2 de 800.000 a 5.000.000/mL y por encima de 5.000.000/mL para aquellas consideradas grado 3 (Sierra & Torres, 2009).

Para no dejar de incluir muestras cuyo recuento excediese las 300.000 células por mililitro y no pudiendo calcular con exactitud cuáles de las consideradas como trazas fuera inferior en número a la citada cifra, se tomó el criterio de incluir todos los grados de CMT como mayores a 300.000

células y posiblemente MSC, siempre y cuando no presentaran signos clínicos aparentes.

Importancia del momento y la duración de la prueba

El diseño longitudinal del estudio permitió la detección de nuevas infecciones a través del remuestreo de los cuartos así como el manejo de los conceptos de prevalencia e incidencia (Zadoks et al. 2001).

La duración en el tiempo del estudio posibilitó además tener en cuenta variables como las climáticas para poder observar si existía alguna diferencia relevante de acuerdo a la temperatura, humedad relativa o precipitaciones registradas en el lapso antes mencionado y entre los dos establecimientos.

En ambos rodeos, el número de animales afectados con MSC, con respecto al número de animales en ordeño, varió en el transcurso del año.

El momento en que se desarrolló el estudio abarcó un período de sequía en el 2008 que terminó cuando comenzaron las lluvias en el mes de febrero de 2009 caracterizada por Zorrilla de San Martín como la más grande registrada en la cuenca lechera uruguaya, desde que se llevan registros (Zorrilla de San Martín, 2010).

Prevalencia de mastitis subclínicas

Es importante tener en cuenta al plantear la discusión de nuestros datos las características de los tambos donde se desarrolló el estudio. Si bien ambos establecimientos tenían un buen manejo higiénico sanitario en el tambo de Libertad las condiciones edilicias y la rutina de ordeño eran mejores. El tL siempre mantuvo un alto porcentaje de animales sanos que nunca fue inferior al 87% (alcanzado en agosto 2008 y en enero 2009), lo que se considera compatible con los parámetros históricos del mismo.

La prevalencia de MSC fue mayor en el tP. En éste, el número de animales sanos llegó a descender al 62 % en agosto de 2008; en julio y septiembre del mismo año fue de 72,5%, registrándose en ese trimestre el mayor número de animales con MSC.

Esto confirma lo expresado por Barkema et al. (1997) que los animales con cuartos sanos son más frecuentes de lo esperado y además implica diferencias entre los animales en cuanto a susceptibilidad a la mastitis, factores que influyen sobre la misma o la transmisión del agente dentro del rodeo (Zadoks et al. 2001).

Considerando la higiene en la rutina de ordeño en los tambos como una constante y que en el tL se mantuvo mayor apego los puntos críticos de la misma, podemos identificar ésta como una de las causas que determinó menores prevalencias de MSC (en los momentos de muestreo) en el tL. La prevalencia de las IMI por *S aureus* pueden reducirse a través de programas que contemplan prácticas apropiadas en la rutina de ordeño (Barkema et al.

2006) y la implementación exitosa de la misma reduce la posibilidad de segregación del patógeno en el rodeo (Zadoks et al. 2002).

Por otro lado, como fue indicado anteriormente, el promedio de RCS en el tanque de ambos tambos se mantuvo por debajo de 200.000 céls/ mL por lo cual era esperable un bajo porcentaje de MSC. Emanuelson & Funke (1991) indican la alta correlación existente entre el RCS del tanque con el porcentaje de animales con MSC. Valde et al. (2005) corroboran este trabajo en base a un estudio que fue llevado a cabo en base a datos de 12.700 establecimientos, en el que muestran la correlación entre el porcentaje de vacas con RCS mayor a 200.000 céls/mL en las muestras individuales con el RCS en el tanque. Los mismos fueron de 169.000 céls/mL en el tanque para 20,9% de vacas con RCS individuales mayores a 200.000 céls/mL. En nuestro estudio la prevalencia osciló para el tL entre 3,6 y 12,7% y para el tP entre 6,2 y 37,5%. Giannechini et al. 2002 obtuvieron para la región del litoral oeste de nuestro país prevalencias de 52,4% de animales con MSC en un muestreo de 29 establecimientos lecheros donde se muestrearon 1077 vacas. Este trabajo se realizó en el período septiembre-diciembre del año 1998 donde los datos de RCS en el tanque para el país eran de 491.000 céls/mL (OPYPA, 2004).

Factores climáticos

En la caracterización agroclimática suministrada por el INIA entre 1980 y 2009, el percentil 50 de la precipitación mensual para la zona estudiada, no desciende de 80 mm en ningún mes del año. Comparado esto con los datos obtenidos en la Tabla X observamos la escasez de precipitaciones registradas entre mayo de 2008 y abril de 2009.

La sequía afectó a todo el país y se tradujo en la práctica, en problemas referentes a la producción y supervivencia de las pasturas, principal insumo nutricional de las vacas de ambos predios. El grado de influencia en cada rodeo dependió del poder de suplementación de los animales en base al costo beneficio de esta acción. La forma de enfrentar el problema fue diferente en ambos predios. En ambos tambos la población de animales se vio más afectada en el trimestre enero-febrero-marzo, reflejándose en este período la falta de pasturas de verano. En el tP la estrategia para paliar la situación consistió en bajar el número de animales suplementándose sólo lo necesario para mantener una cuota mínima de producción que llevó la población a un 37,5% de la moda (80 animales): 30 animales en enero y 38 en febrero de 2009 fueron la menor cantidad de vacas en ordeño en el tP en el lapso del trabajo. Esto sin embargo no debe correlacionarse directamente con los mm de precipitación constatados solamente en esos meses sino que la gestación del problema de la disponibilidad de pasturas es anterior y posterior a los mismos. En el tL se pudo suplementar a los animales con ración y ensilado durante el tiempo de penuria. En el peor momento, que corresponde al mes de marzo, el plantel se reduce al 90% de la moda (110 animales).

Es posible pensar que esta evolución se puede asociar a factores climáticos; no obstante ello al verificar datos correspondientes a las condiciones de muestreo (lugar y tiempo), no se encontró que las variables obtenidas (Precipitaciones, Humedad Relativa Media, Temperatura Promedio) tuvieran una influencia directa que pudiera explicar los resultados obtenidos considerando además que en el caso de *S. aureus* se trata de un patógeno clasificado como contagioso cuyo reservorio son el medio ambiente y los animales infectados y que el momento clave para el contagio es durante el ordeño. Debido a la naturaleza de las variables utilizadas los resultados se tomaron con reserva. Valero et al (2010) tampoco lograron establecer un patrón estacional definido para la presencia de patógenos contagiosos y ambientales.

Prevalencia de las mastitis subclínicas. Distribución de los CMT por grado a lo largo del estudio

Datos históricos del tL se muestran en un estudio realizado entre agosto 2004 y julio 2005 por Sierra y de Torres (2009) reflejando lo que sería esperable en lo concerniente a incidencia y prevalencia de las MSC, en animales y cuartos a lo largo de un año, en particular para este establecimiento, pero que en general sería extrapolable, a los tambos de iguales características, de la región considerada en el trabajo. Utilizando el mismo sistema de muestreo que fue empleado en nuestro estudio (CMT mensual durante 12 meses), Sierra y de Torres constataron que las prevalencias, en los distintos muestreos mensuales, fueron máximas en enero y marzo (0,466 y 0,392 respectivamente) y en mayo y julio mínimas (0,133 y 0,124).

En un estudio llevado a cabo entre septiembre y diciembre de 1998 en 1077 animales de un muestreo en dos etapas, en la región del litoral del Uruguay (Paysandú y Río Negro), Giannechini et al. (2002) encontraron una prevalencia de MSC en animales, de 0,524 y en cuartos de 0,264.

En nuestro estudio en el tL la prevalencia por animal osciló en un rango de 0,036 en el mes de octubre y 0,127 en agosto y por cuarto entre 0,014 en octubre y 0,082 en enero. Ambas cifras indican una menor prevalencia que en el estudio de Giannechini et al. (2002) y un mejor control de mastitis en el establecimiento. En el tP la prevalencia por animal se situó entre 0,062 (diciembre) y 0,037 (agosto) y por cuarto fue de 0,015 (diciembre) y 0,141 (agosto). La incidencia anual por animal fue de 0,08 en el tL y de 0,190 en el tP y por cuarto se determinó para el tL de 0,042 y para el tP de 0,083. En suma, en el mismo período las cifras de prevalencia, en iguales condiciones climáticas en el tL son casi 50% inferiores al tP. Esto puede explicarse por las diferencias de manejo llevadas a cabo en los establecimientos.

En comparación con los otros trabajos uruguayos las diferencias observadas en nuestro estudio pueden explicarse por la evolución positiva de la sanidad de la ubre de los tambos en el tiempo, logrando un mejor control de la mastitis desde el año 1998 a 2008-2009. También atribuirse en

un mismo momento a dos tambos que dadas las distintas condiciones de manejo no lograron el mismo nivel sanitario. Es notorio que en la década que separa el estudio de Giannechini et al del nuestro y considerando el promedio de prevalencia entre tP y tL (0,14 para animales y 0,06 para cuartos) la prevalencia de MSC muestra una diferencia de más de un 50%. Esta diferencia muestra una tendencia a una menor incidencia y prevalencia y no una cifra definitiva. En nuestro estudio se exploró la realidad de dos tambos elegidos por la accesibilidad a los mismos pero no son una muestra representativa de la totalidad de tambos de la región. Debemos destacar además que los estudios difieren y no son exactamente comparables debido a la variación en la zona geográfica dentro del país y la vinculación histórica con la producción lechera, el diseño de los mismos en cuanto al sistema de muestreo, el número de animales evaluados así como la duración y la época del muestreo (el estudio de 1998 se llevó a cabo sólo en primavera).. En el mundo se encuentran diversos valores de incidencia de MSC que se hallan acordes a las condiciones del medio. Plozza et al (2011) en New South Wales, Australia recogió prevalencias de 0,29 calculadas entre 189 establecimientos y las describió como comparables o inferiores a las de Norteamérica y la Unión Europea. En otros países, donde también existen programas de control de mastitis como en Finlandia, Pitkala et al. (2004) indican a nivel nacional un RCS en el tanque de 132.000 céls/mL y una prevalencia de MSC de 31%. Estos recuentos son mejores a los de los tambos estudiados, en los cuales no obstante, también detectamos bajos niveles de prevalencia de MSC.

Asímismo Plozza et al. (2011) determinaron ciertos factores de riesgo asociados a los productores que presentan prevalencias inferiores al 20% entre las que se encuentran el uso de toallas de papel individuales en la limpieza de la ubre previa al ordeño, la alimentación de los animales inmediatamente posterior al fin del ordeño y el tratamiento de los animales con altos recuentos individuales de células somáticas, en suma, todas ellas referentes a una adecuada rutina de ordeño, seguidas con más eficiencia en el tL que en el tP.

Considerando sólo los datos del tL los estudios de los períodos 2004-2005 y 2008-2009 muestran una evolución muy favorable de la sanidad de la ubre en cuatro años y cómo un tambo con inferiores condiciones en la higiene y sanidad, a pesar de ser ambos autosustentables económicamente, registra incidencias de MSC parecidas a los del tL cuatro años antes. Esto expresa situaciones interesantes para destacar en el estudio donde se constata una evolución en el tiempo en la prevalencia de mastitis en ambos tambos aunque ante distintas condiciones de higiene y calidades de rutina de ordeño se dan también diferencias en los resultados obtenidos permitiendo concluir que es posible mejorar aún más las prevalencias a través de la correcta aplicación de un programa de control establecido hace más de 40 años.

Las salvedades al comparar datos de distintos estudios con diferencias

de diseño se han hecho a nivel mundial (Zadoks et al. 2001). La mayoría de los trabajos son concebidos con una estructura transversal y los datos manejados son los de prevalencia. Debido a que los trabajos longitudinales son más engorrosos, requieren repetidas recolecciones de muestras y cultivos bacteriológicos, son más escasos aunque permiten obtener datos de incidencia y eventualmente establecer relaciones de causalidad entre los hallazgos, lo cual es especialmente importante en el estudio de las MSCs (Mc Dermott & Schukken, 1994).

En el estudio de Sierra y de Torres (2009) se mostró la evolución anual de la prevalencia de la MSC en función de la dinámica de los scores de CMT en el año. En enero de 2005 se detectó el mayor número de cuartos con un grado de CMT equivalente a trazas. Los CMT de grado 1 predominaron en diciembre de 2004 (14,74% de los cuartos) los de grado 2 fueron más numerosos en marzo de 2005 (6,75% de los cuartos) y la mayor cantidad de CMT de score 3 se determinó en el mes de noviembre de 2004 en 3,96% de los cuartos. En general en los meses cálidos hubo un considerable aumento en la prevalencia de MSC por cuarto. Los CMT de scores trazas y 1 fueron los más frecuentes a lo largo del año.

Comparados con los registros expuestos por Sierra y de Torres (2009) del tL en los períodos 2004-2005 y los obtenidos por nosotros en 2007-2008 en ambos predominaron los grados T y 1 a lo largo del año, en 2004-2005 primaron los de nivel T y en segundo lugar los 1 y en 2008-2009 los grado 1 y luego los T. Sin embargo al tratarse de una escala ordinal valores muy próximos no se pueden considerar muy diferentes teniendo en cuenta que el valor asignado depende en gran parte del operador. Considerando las condiciones de medición antes mencionadas, sí son notorias las diferencias entre los grados T y 1 por un lado y 2 y 3 por otro. Los valores de Sierra y de Torres (2009) para los CMT en general, alcanzaron valores que superaron el 25% de los cuartos. En nuestro estudio en ningún caso superaron el 8,2%. Se repite la conclusión de una evolución favorable, también por cuartos a lo largo del tiempo. Los grados 2 y 3 en nuestro estudio tienen un pico de 2% para los 3 en febrero y disminuye a lo largo del año mientras que en el estudio de Sierra y de Torres (2009) se dieron picos en marzo (2%), noviembre (casi 4%) y junio de 2005 (casi 4%). Del grado 2 en marzo se observó un pico máximo que superó el 5% (6,75%) y para nosotros el pico se dio en diciembre y superó apenas el 3%.

En general el patrón de apariciones de CMT de todos los grados a lo largo del año se repitió en las tendencias globales. Se tienen antecedentes en el predio del tL de la evolución de las MSC a nivel de cuartos registradas entre agosto 2004 y julio 2005 (Sierra & de Torres, 2009) cuya máxima incidencia tuvo lugar en el trimestre diciembre-febrero (pico que también se observó en nuestro estudio pero concentrado en el mes enero que comprometió al 12,5% de los animales). En el período agosto 2004 y julio 2005 las MSC se aproximaron al 12,5% en agosto

Aislamiento e identificación de las cepas

Con un intervalo de muestreo de 30 días a lo largo de un año se obtuvieron 508 muestras provenientes de los dos rodeos. Se obtuvieron 63 aislamientos de Gram positivos que correspondieron al 12,4% de las muestras de leche sembradas. Koskinen et al (2010) describieron un 4,3 % de cultivos con crecimientos en medios inespecíficos, al provenir de leches con bajos recuentos de células como se observó en la mayoría de los CMT realizados en el estudio. Para el aislamiento de microorganismos en general y para el de *S. aureus* en particular, debe considerarse además que la eliminación de microorganismos en leche de rodeos donde se tiene control de las mastitis y los animales y cuartos en general son sanos, la eliminación de microorganismos puede ser baja e intermitente en el momento de efectuar el muestreo (International Dairy Federation, 1981).

Los aislamientos obtenidos de cocos positivos a la coloración de Gram con producción de enzima catalasa se caracterizaron como 34,9% *Staphylococcus* coagulasa positivos (31,7% *S. aureus*, 3,2% *Staphylococcus* coagulasa positivos no *S. aureus*) y 60,3% *Staphylococcus spp.* coagulasa negativos y 4,8% *Micrococcus spp.*

En general *S. aureus* es el microorganismo más aislado a nivel mundial. Sin embargo en algunos países los estafilococos coagulasa negativos (SCN) se han convertido en emergentes y patógenos predominantes en los aislamientos (Pyorala & Taponen, 2009; Piessens et al. 2011). En nuestro caso ha predominado el aislamiento de SCN aunque cabe señalar un porcentaje importante de aislamientos de *S. aureus*. En muchos tambos contemporáneos los SCN son causa frecuente de mastitis bovina y su importancia se ha revisado recientemente (Taponen & Pyorala, 2009). La importancia de los mismos en el predio reside en que si bien no son tan patógenos como otros causantes de mastitis y las infecciones permanecen como subclínicas, éstas pueden hacerse persistentes y causar aumento del recuento de células somáticas y disminución de la calidad de leche, con el perjuicio económico que esto conlleva. Las mastitis causadas por SCN responden bien a las terapias con antibióticos y a las medidas de control (Taponen & Pyorala, 2009). El tipo de bacteria predominante en los aislamientos y las especies recuperadas en los mismos de muestras de leche provenientes de animales con MSCs, varía según el tipo de tambo considerado en el muestreo y la región en la que se ubica. Con tipo de tambo nos referimos al manejo del mismo, el apego que se tenga a los puntos críticos de la rutina de ordeño, la calidad de las instalaciones y la higiene de las mismas.

En la zona estudiada influyen lo relativo a la geografía y el clima, pero también es importante la evolución de la lechería en la región. Se mencionó anteriormente que en el momento en que se llevó a cabo el estudio de Giannechini et al. (2002) la región considerada no tenía gran historia de tradición lechera. Existen contrastes con lo descrito en dicho trabajo en cuanto a la distribución de los microorganismos aislados. Para este grupo

de investigadores el grupo de *Staphylococcus* coagulasa positivos representó el 89,75% de los aislamientos de los cuales se identificó *S. aureus*, en el 88,9% de los mismos. Los aislamientos de *Staphylococcus* coagulasa positivos no *S. aureus* fueron el 0,85% y *Staphylococcus* coagulasa negativos el 10,25%. En nuestro trabajo se logró identificar la siguiente distribución de los microorganismos aislados: 34,9% correspondieron a *Staphylococcus* coagulasa positivos, 31,7% a *S. aureus*, 3,2% *Staphylococcus* coagulasa positivos no *S. aureus* y 60,3 % a *Staphylococcus* coagulasa negativos.

En nuestro trabajo los valores obtenidos indicarían un buen control de la MSC en ambos establecimientos que, aunque muestran distintas realidades económicas y de manejo, se acercan a cifras de establecimientos de países desarrollados. Aparecen como emergentes los SCN que, en tambos donde se logró con éxito el control de la mastitis por *S. aureus* y *S. agalactiae*, se asocian frecuentemente con mastitis (Pitkala et al. 2004; Ruegg, 2009).

Factores de virulencia

Uno de los factores más importantes en el control de la mastitis causada por *S. aureus* consiste en evaluar las combinaciones de factores de virulencia característicos de la población local debido a la diversidad de perfiles genéticos que *S. aureus* puede presentar (Ote et al. 2011). Se trata de un microorganismo oportunista capaz de expresar una gran variedad de factores de virulencia y de evaluar constantemente las defensas del huésped, convivir en perfecta homeostasis con el animal reprimiendo la expresión de factores que despierten una respuesta inmune o inducir la cuando la primera línea de defensa de su hospedador se ve debilitada (Camargo & Gilmore, 2008). Los mecanismos por los cuales se regula la expresión de toxinas, adhesinas y la formación de cápsula y biofilm, entre otros, son complejos y todavía no se conocen por completo.

Los factores de virulencia que posiblemente promueven el establecimiento de la mastitis, incluyen proteínas de superficie que median la adhesión y colonización de los tejidos del huésped, factores de superficie que inhiben la fagocitosis (cápsula), propiedades bioquímicas que mejoran las posibilidades de sobrevivencia dentro de los fagocitos (producción de catalasa), disfraces inmunológicos (producción de coagulasa), toxinas que disrupten las membranas de las células eucarióticas (hemolisinas) y determinantes de resistencia a agentes antimicrobianos. Los factores de virulencia se expresan de forma coordinada durante el ciclo de crecimiento de *S. aureus* (Sibbald et al. 2006). Estudios recientes han probado que las cepas de *S. aureus* pueden diferir en virulencia y en su habilidad para diseminarse a través de los tambos comerciales (Piccinini et al. 2012). En este estudio, se evaluó la expresión de un grupo de factores de virulencia potencialmente relacionados a mastitis bovina, por parte de las cepas de *S. aureus* probablemente asociadas a MSC. La formación de cápsula, limo, biofilm y la ocurrencia de la agregación bacteriana pueden converger en la

habilidad a adherirse y persistir en la mama y posiblemente contribuyen a la cronicidad de la infección y la eventual colonización de las instalaciones de ordeño.

Cápsula

El rol de la cápsula de *S. aureus* en la patogénesis de las infecciones ha sido evaluado en distintos modelos animales. En general, se considera que la cápsula permite eludir la fagocitosis y permanecer en la sangre y los tejidos del huésped. Los microorganismos que pierden la cápsula resultan menos virulentos en ciertos casos pero más virulentos en otros. Las cepas capsuladas desencadenarían una pronta respuesta inmune del huésped por la propia cápsula (observable indirectamente en el número de células somáticas según el grado de positividad del CMT) y porque son menos eficientes en internalizarse y permanecen mayor tiempo expuestas en el espacio extracelular. En vista de ello, no lograrían establecerse en una muy alta densidad poblacional. Lograrían aumentar el recuento celular y no tenderían a establecerse en forma crónica a menos que se volvieran acapsulados (Buzzola et al. 2007). En nuestro trabajo se estudiaron muestras de leche provenientes de posibles infecciones subclínicas percibiéndose en todas las cepas la presencia de la cápsula lo que podría contribuir con la resistencia y evasión la primera línea de defensa del huésped, aunque se observó la presencia de inflamación en diferentes grados, a través de los tests de CMT. Esta observación coincidió con lo observado por Poutrel et al. (1988) quienes mencionaron que la presencia de cápsula era frecuente en aislamientos de *S. aureus* involucrados en la infección de la glándula mamaria y lo propuesto con respecto al origen agudo subclínico de los mismos según los grados de CMT predominantes (Tuchscher et al. 2005). En cepas aisladas de leche de bovinos mastitis la presencia de cápsula es frecuente (Buzzola et al. 2007) pero no es una constante. Esta información es importante para el diseño racional de una vacuna que prevenga la mastitis estafilocócica (Sordelli et al. 2000). En la mayoría de los aislamientos provenientes de mastitis bovinas en Argentina, la cápsula no se expresa (Tuchscher et al. 2005). *S. aureus* es capaz de adaptarse rápidamente a diferentes huéspedes y nichos. Aparentemente los aislamientos capsulados son provenientes de infecciones agudas y los provenientes de pacientes con enfermedades crónicas son frecuentemente acapsulados indicando tal vez que la pérdida de la cápsula se asocia con persistencia (Tuchscher et al. 2010).

Biofilms y producción de limo

La formación de biofilms de *S. aureus*, es un importante factor de virulencia y se considera una ventaja selectiva ya que facilita la persistencia bacteriana en la ubre (Vasudev et al. 2003; Oliveira et al. 2007A). El biofilm promueve la adherencia y tiene un importante rol en la patogénesis de la mastitis causada por *S. aureus*. Las estructuras del biofilm facilitarían la adherencia bacteriana y la colonización del epitelio, no así la capacidad invasiva (Oliveira et al. 2011). En nuestro estudio todas las cepas

establecieron un biofilm en un lapso de 24 horas aunque en forma variable. Se pudieron establecer distintas categorías de cepas productoras de biofilm en función del espesor. No obstante, se puede considerar que en general todas las cepas, al presentar biofilm pueden ser capaces de impedir la erradicación de una mastitis crónica haciendo que la antibioticoterapia sea menos efectiva (Oliveira et al. 2007).

Es un hecho aceptado que las bacterias que se encuentran en el interior de biofilms son extremadamente resistentes a los tratamientos antibióticos y a los desinfectantes. Esta resistencia podría explicarse por distintos mecanismos que no serían necesariamente excluyentes. (Nazar, 2007). Aunque los antibióticos pueden penetrar en el biofilm, no alcanzan una concentración suficiente en algunas partes del mismo. Las bacterias situadas en la base del biofilm son metabólicamente inactivas y por ello resistentes a algunos antibióticos. Existen mecanismos de degradación activa de los antibióticos que evitan que en algunas partes del biofilm se alcancen concentraciones efectivas. *S. aureus* aislados de mastitis bovina son altamente resistentes a los agentes antimicrobianos cuando crecen en biofilms (Melchior et al. 2006).

Todas las cepas que produjeron biofilm también produjeron limo (material extracelular), atributos no siempre asociados (Vasuedan et al 2003). Por ejemplo, Oliveira et al. (2006), utilizando también la técnica de determinación de producción de limo en Agar Rojo Congo (CRA) mostraron que sólo el 37.5% de los aislamientos de *S. aureus* lo producían. Un hallazgo relacionado es que las cepas productoras de limo presentan mayor hidrofobicidad que las cepas no productoras (Ay et al. 2010). Esta hidrofobicidad podría obstaculizar la correcta limpieza con los detergentes habituales en las concentraciones usadas.

En las primeras etapas de la infección *S. aureus* produce proteínas de superficie hidrofóbicas, particularmente en los receptores para los componentes del huésped, que permiten la adherencia tanto al epitelio mamario como a los glóbulos grasos de la leche para luego diseminarse en la glándula.

Autoagregación

Otro factor que resulta importante en la infección por *S. aureus* de la glándula mamaria, es su capacidad de adhesión, la cual resulta crucial en las etapas primarias de la infección, al otorgarle protección a las células bacterianas ya instaladas en *clusters* de las defensas del huésped y los tratamientos antibióticos; esto permite perpetuar la enfermedad en el tiempo. (Kerro Dego et al. 2002; Cucarella et al. 2004; Melchior et al. 2006). La adhesión a las células epiteliales sería además un prerrequisito y un paso crucial para la infección y colonización de la glándula mamaria (Kerro Dego et al. 2002) y la formación de biofilms (Vilaa et al. 2008). Más allá de la consideración de que los biofilms son la base de las infecciones bacterianas crónicas o persistentes, la adherencia temprana a las superficies abióticas y

la adhesión intercelular son pilares para la formación de los mismos (Cucarella et al. 2001). La capacidad de agregación de las bacterias se relaciona con la adherencia ya que está dada por la adhesión de un microorganismo a otro. La autoagregación puede facilitar la adherencia a los tejidos del huésped durante la infección por *S. aureus* (Kuroda et al. 2008).

Esta propiedad se observó en todas las cepas aunque en diferentes grados. A pesar de la vinculación expresada entre la autoagregación, como medida de la capacidad de adhesión y la producción de biofilm, no se pudo establecer ninguna asociación significativa entre ambas variables, aunque sí se percibió que algunas cepas entre sí presentaron comportamientos similares.

Hemaglutinación

La hemaglutinación causada por *S. aureus* ha sido asociada con la patogénesis de mastitis bovina, no así en lo referente en las enfermedades del hombre. Rupp y Archer (1992), especularon con que las hemaglutininas jugaban un rol directo en la adherencia a polímeros y por ello es esperable que aquellos aislamientos que producen hemaglutinación puedan adherirse más fácilmente a los componentes plásticos de la máquina de ordeño, producir un biofilm y convertirse en un reservorio continuo de *S. aureus*. Posteriormente, Rupp et al. (1995) hallaron que bajo condiciones óptimas el 23% de las cepas bovinas de *S. aureus* provenientes de mastitis hemaglutinaban lo cual no difirió demasiado de lo que se determinó en nuestro trabajo donde el 30% de las cepas hemaglutinaron. Las diferencias pueden ser explicadas por las variaciones del muestreo.

Resistencia antibiótica

La capacidad de *S. aureus* para generar resistencia a los antibioticos se observó tempranamente (Vasudevan et al. 2003). En el presente estudio, *S. aureus* no mostró un patrón de resistencia antibiótico alto sino, que fueron resistentes a la penicilina sólo el 20% de las cepas (ver Tabla IX), resultados similares a los hallados por Rubin et al. (2011) pero varían con respecto a los encontrados por Giannechini et al en 2002 y 2005 donde el 47.6% de los *S. aureus* aislados se mostraron resistentes a la penicilina.

Aunque se logró el aislamiento de un número acotado de cepas nuestros datos indican que la resistencia antibiótica en el área es baja, probablemente debido a un buen manejo de la terapéutica (similar entre ambos establecimientos). Este dato puede ser sin embargo discutido en lo que respecta a la relación entre los resultados obtenidos en la práctica clínica con respecto a los ensayos *in vitro* (Hoe & Ruegg, 2005). En cada tambo se aislaron 2 cepas resistentes a la penicilina, las del tP ambas en el mes de marzo de 2009 y las del tL en junio y septiembre de 2008. En marzo de 2009 se observó un aumento de los animales con algún grado de CMT que continuó en abril. Ello podría deberse a una cepa resistente que seguramente no fue tratada en ese mes ya que provenían de CMT de grados traza y 1.

La relación de la susceptibilidad *in vitro* con los resultados de cura clínica no están bien documentados (Constable & Morin, 2003). Algunos estudios muestran poca relación entre perfiles de susceptibilidad *in vitro* y curaciones clínicas pero otros trabajos consideran que es alta si se trata de bacterias Gram positivas (Ruegg, 2004).

A pesar de que todas las cepas formaron biofilms en el test *in vitro* de susceptibilidad antibiótica sólo el 20% mostró resistencia y sólo a la penicilina. En general se estima que los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de mastitis bovinas son altamente resistentes a los agentes antimicrobianos cuando crecen en biofilms (Melchior et al. 2006).

CONCLUSIÓN

La prevalencia de MSC en el lapso durante el cual se desarrolló el estudio fue baja, según lo esperado y compatible con los registros históricos higiénico-sanitarios de ambos tambos. El diseño longitudinal del trabajo permitió asociar la prevalencia de MSC a distintas variables climáticas aunque no pudo ser establecida ninguna correlación entre las mismas y variables climáticas o estacionales, indicando que la prevalencia de las MSC se debe principalmente a medidas de manejo en la rutina de ordeño y el plan de control de mastitis dispuesto en el tambo. El número de aislamientos de cepas de *S. aureus* asociados a MSC fue menor al obtenido por otros autores y la mayor parte de ellas provinieron de leches con CMT de grado 1. Los aislamientos de SCN superaron a los de *S. aureus* situación descrita en la literatura internacional y coincidente con el adecuado control de la mastitis por *S. aureus* que posibilita la aparición de los SCN como emergentes. Para la identificación de *S. aureus* se lograron establecer un conjunto de pruebas rápidas y simultáneas que permitirían un diagnóstico económico y con suficiente índice de confianza que podría implementarse para un programa de cultivo en el tambo en el tL. Todas las cepas consideradas en el estudio expresaron factores de virulencia que potencialmente mejoran la habilidad de *S. aureus* de colonizar y persistir en el tejido mamario y las instalaciones del tambo. Los perfiles de susceptibilidad antibiótica observados en las cepas estudiadas indicarían que el problema de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos aún puede ser controlado y permitirían respaldar los protocolos de tratamiento seguidos en ambos establecimientos lecheros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvares JL.(1999) Sistema Integral de atención a la Reproducción. Los conflictos entre la reproducción y la producción de leche. México. Ediciones CENSA.
2. Ay S, Güldür T, Tekerekoğlu MS, Otlu B. (2010). Investigation of hydrophobic characteristics of biofilm producer and non-producer *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol Bul 44(2):221-230.
3. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJ, Galligan DT, Beiboer ML, Brand A. (1997) Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. J Dairy Sci. 80:1592–1599.
4. Barkema H, Schukken Y, Zadoks R. (2006) Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci. 89:1877-1895.
5. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. (1994) Bailey & Scott's diagnostic microbiology. Mosby 9th ed. St. Louis.
6. Baselga R, Albizu I, De La Cruz M, Del Cacho E, Barberan M, Amorena B. (1993) Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. Infect Immun. 61:4857-4862.
7. Baselga R, Albizu I, Amorena B. (1994) *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. Vet Microbiol. 39(3-4):195-204.
8. Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 45:493–496.
9. Begun J, Sifri C, Goldman S, Calderwood S, Ausubel F. (2005) *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. Infect Immun. 73:872–877.
10. Bertino M, Tajam H. (2000) La agroindustria láctea en el Uruguay 1911 – 1943. DT 04/00, IECOM Instituto de Economía.
11. Boerlin P, Kuhnert P, Hussy D, Schaellibaum M. (2003) Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol. 41:767-771.
12. Borbonet S. (2001) Historia de la Quesería en Uruguay. Laboratorio Tecnológico del Uruguay. Montevideo.
13. Brito MAVP, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. (1999) Padrão de

infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq Bras Med Vet Zootec* 51:129–135.

14. Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LPN, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvinho L, Sordelli DO. (2007) Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. *Infect. Immun.* 75:886-891.
15. Camargo ILBC, Gilmore MS. (2008) *Staphylococcus aureus*-probing for host weakness. *J. Bacteriol.* 190:2253-2256.
16. Chanchaithong P, Prapasarakul N. (2011) Biochemical markers and protein pattern analysis for canine coagulase-positive staphylococci and their distribution on dog skin. *J Microbiol Methods*, 86:175-181.
17. Constable PD, Morin DE. (2003) Treatment of clinical mastitis. Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19(1):139-155.
18. Cressier B, Bissonnette N. (2011) Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 94:2171-2184
19. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
20. Cucarella C, Solano C, Amorena B, Lasa I, Penadés J. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation *J. Bacteriol.* 183:2888-2896.
21. Cucarella C, Tormo M, Úbeda C, Trotonda M, Monzón M, Peris C Amorena B, Lasa I, Penadés J. (2004) Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Imm* 72: 2177-2185.
22. Delucchi L, Fraga M, Perelmuter, K, Cidade E, Zunino, P. (2008) Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of *in vitro* probiotic activity of selected isolates. *Can Vet J.* 49:991–994.
23. DIEA (2011) Estadísticas del sector lácteo 2010. Serie trabajos especiales noviembre, 2011 n°304. MGAP, Montevideo.
24. Dingwell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL. (2003) Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can Vet J.* 44: 413–416.
25. Donlan R, Costerton J. (2002) Relevant microorganisms biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167-193.
26. Emanuelson U, Funke, H. (1991) [Effect of Milk Yield on Relationship Between Bulk Milk Somatic Cell Count and Prevalence of Mastitis](#)

Journal of Dairy Science, 74(8) 2479-2483

27. Flint SH, Bremer PJ, Brooks JD. (1997) Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm* 11(1): 81-97.
28. Foster T, Höök M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*; 6:484-488.
29. Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. (2005) Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol*.107(3-4):295-299.
30. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. (1989) New method for detecting slime producing by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42:872-874.
31. Gandara A, Mota LC, Flores C, Perez H R, Green CF, Gibbs SG. (2006) Isolation of *Staphylococcus aureus* and Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* from residential indoor bioaerosols. *Environ Health Perspect.* 114:1859–1864.
32. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips (ed). 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
33. Gianneechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J. (2002) Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 43:221-230.
34. Gianneechini R, Concha C, Franklin E. (2002) Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens Isolated from Dairy Herds in the West Littoral Region of Uruguay. *Acta vet. Scand.* 43: 31-41.
35. Gianneechini R. (2005) “Monitoreo de la resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados en rodeos lecheros de la Cuenca Tradicional de Uruguay” XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría .
36. Gotz F. (2002) *Staphylococcus* and Biofilm. *Mol Microbiol.* 43:1367-1378.
37. Halasaa T, Nielena M, Huirneb RBM, Hogeveena, H. (2009) Stochastic bio-economic model of bovine intramammary infection. *Livestock Science* 124(1–3):295–305.
38. Hammer Ø Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001) PAST Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica* 4, 9 pp.
39. Hillerton JE, Berry EA. (2005) Treating mastitis in the cow a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol.*98:1250-1255.
40. Hoe FGH, Ruegg PL. (2005) Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcomes. *J*

Am. Vet. Med. Assoc. 227:1461-1468.

41. Hogeveen H, Huijps K , Lam TJGM. (2011): Economic aspects of mastitis: New developments, New Zealand Veterinary Journal, 59:1, 16-23.
42. INALE, Instituto Nacional de la Leche. (2012) Incertidumbre y expectativas para el 2012 en la región. Reporte Lácteo.uy N° 52 - 20 de Enero de 2012. Disponible en: http://www.inale.org/innovaportal/v/1535/1/innova.front/incertidumbre_y_expectativas_para_el_2012_en_la_region.html. Consultado: 15/04/2012.
43. International Dairy Federation. (1981) Laboratory methods for use in mastitis work. Doc.132:1-26.
44. International Dairy Federation. (1987) Bovine Mastitis Definitions and guidelines of diagnosis. Bull Int Dairy Fed. 211:3-8.
45. Kateete D, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC. (2010) Identification of *Staphylococcus aureus*: Dnase and Mannitol Salt Agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrobials 9:23.
46. Kerro Dego O, van Dijk JE, Nederbragt H. (2002) Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. Vet. Q 24:181-198.
47. Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, van Haeringen WA, Lam TJGM, Pyörälä S. (2010) Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. J Dairy Sci. 93:5707-5715.
48. Kumar R, Yadav BR, Anand SK, Singh RS. (2011) Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. Microb Pathog. 51(1-2):31-38.
49. Kumar R, Yadav BR, Singh RS.(2011) Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. J Biosci. 36(1):175–188.
50. Kuroda M, Ito R, Tanaka Y, Yao M, Matoba K, Saito S, Tanaka I, Ohta T. (2008) *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun. 377(4):1102-1106.
51. LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. (2006) Major advances in disease prevention in dairy cattle. J Dairy Sci. 89: 1267-1279.
52. Le Maréchal C, Jardin J, Jan G, Even S, Pulido C, Guibert JM,

- Hernandez D, François P, Schrenzel J, Demon D, Meyer E, Berkova N, Thiéry R, Vautor E, Le Loir Y. (2011) *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. *Veterinary Research*, 42:35. Disponible en: <http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/35>. Consultado: 12/04/2012.
53. Le Maréchal C, Seyffert N, Jardin J, Hernandez D, Jan G, Rault L, Azevedo V, François P, Schrenzel J, van de Guchte M, Even S, Berkova N, Thiéry R, Fitzgerald JR, Vautor E, Le Loir Y. (2011) Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS ONE* 6(11): e27354.
 54. Le Maréchal C, Thiéry R, Vautor E, Le Loir Y. (2011) Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sci. & Technol.* 91(3):247-282.
 55. Marrs CF, Schoolnik G, Koomey J M, Hardy J, Rothbard J, Falkow S. (1985) Cloning and sequencing of a *Moraxella bovis* pilin gene. *J. Bacteriol.* 163:132-139.
 56. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. (2006) Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 24:25-29.
 57. McDermott JJ, Schukken YH. (1994) A review of methods used to adjust for cluster effects in explanatory epidemiological studies of animal populations. *Preventive Veterinary Medicine* 18:155-173.
 58. Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. (2006) Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 53:326–332.
 59. Mellenberger R, Roth C. (2000) Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT). Disponible en: http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-prueba-de-mastitis-california_spanish.pdf. Consultado: 17 de mayo de 2012.
 60. Mellenberger R, Kirk J. (2001) Mastitis Control Program for *Staph. aureus* Infected Dairy Cows. Disponible: http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/mastitis-control-program_staph.-aureaus.pdf. Consultado: 17 de mayo de 2012.
 61. Mittelman M (1998) Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *J. Dairy Sci.* 81:2760–2764.
 62. Montero, E. (2001). Situación actual y perspectivas del mercado mundial de los productos lácteos. In: *Conferencia Internacional "Aseguramiento de la Calidad en la Industria Láctea"*. 15 – 20 octubre,

San José, [Costa Rica](#).

63. Montaña Brignoni, G (2011). El Tambo en Florida: “De mi abuelo a los neocelandeses”. Fondo Concursable para la Cultura del MEC. Montevideo. MEC, 120 páginas. Servicolor SRL .
64. National Mastitis Council (1981) Microbiological procedures for use in the diagnosis of Bovine Mastitis. National Mastitis Council Inc. 2nd ed. Washington DC.
65. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 4th ed., vol. 17, N° 22. M11-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.; USA
66. Nazar C. J. (2007) Biofilms bacterianos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello; 67: 61-72.
67. Noordhuizen JPTM, Cannas da Silva J. (2009) HACCP-based quality risk management approach to udder health problems on dairy farms. Irish Veterinary Journal. 62(Suppl 4):S21-25.
68. Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Lara PD, Torres-Rodríguez F, Loeza-Ángeles H, Mascot-Chiquito N, Sánchez-Baca S, López-Meza JE. (2007) Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. Antonie van Leeuwenhoek 94(02):199-206.
69. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. (2006) Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Vet Microbiol. 118:133-140.
70. Oliveira M, Nunes SF, Carneiro C, Bexiga R, Bernardo F, Vilela CL. (2007) Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Vet Microbiol. 124:187-191.
71. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Lobo Vilela C. (2011) Invasive potential of biofilm-forming Staphylococci bovine subclinical mastitis isolates. J. Vet. Sci., 12(1):95-97.
72. Öner Z, Ölmez Z. (2011) Biofilm producing microorganisms in dairy industry and prevention of biofilm formation Akademik Gıda 9(4):12-16.
73. OPYPA 2004
74. O'Reilly CE, O'Connor PM, Kelly AL, Beresford TP, Murphy, PM. (2000). Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. Appl Environ Microbiol 66, 4890-4896.
75. O'Riordan K, Lee JC. (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rev. 17:218–234.

76. Ote I, Taminiau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG. (2011) Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 153(3-4):285-292.
77. Otto, M (2008) Staphylococcal Biofilms. **In:** Romeo, T. *Bacterial Biofilm Current Topics in Microbiology and Immunology*, Berlin, Springer, pp. 207-228.
78. Pai V, Rao VI, Rao, SP (2010) Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] Isolates at a Tertiary Care Hospital in Mangalore, South India. *J Lab Physicians.* 2(2):82-84.
79. Perelmuter K, Fraga M, Zunino P. (2008) In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *J Appl Microbiol.* 104:1718–1725.
80. Pfaller MA, Davenport D, Bale M, Barrett M, Koontz F, Massanari RM. (1988) Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7:30-33.
81. Piccinini R, Tassi R, Daprà V, Pilla R, Fenner J, Carter B, Anjum MF. (2012) Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J Dairy Res.* 28:1-7.
82. Plozza K, Lievaart JJ, Potts G, Barkema HW. (2011) Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales *Aust Vet J.* 89(1-2):41-46.
83. Piessens V, Van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, Heyndrickx M, De Vliegher S. (2011) Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J Dairy Sci.* 94:2933-2944.
84. Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Mylly V, Honkanen-Buzalski T. (2004) Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 87(8):2433-41.
85. Pol M, Ruegg PL. (2007) Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci.* 90:249-261.
86. Poutrel B, Boutonnier A, Sutra L, Fournier JM. (1988) Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J Clin Microbiol.* 26:38–40.
87. Pol M, Ruegg PL. (2007) Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 90:262-273.
88. Pyörälä S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of

- mastitis Vet. Res. 34:565-578.
89. Pyörälä S, Taponen S. (2009) Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. Vet Microbiol. 134(1-2):3-8.
 90. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 2004. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby Publishing, London, pp: 327-344.
 91. Rabello RF, Souza CR, Duarte RS, Lopes RM, Teixeira LM, Castro AC. (2005) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J Dairy Sci 88:3211-3219.
 92. Revelli GR, Sbodio OA, Tercero EJ. (2004) Recuento de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. Revista Argentina de Microbiología 36:145-149.
 93. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Besser TE (1992) Evaluation of methods Ruegg for differentiation of coagulase-positive staphylococci. J Clin Microbiol. 30:3217-3219.
 94. Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. (2011) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. Can Vet J. 52:153–157.
 95. Ruegg PL. (2004) Treatment of Clinical Mastitis. Disponible en: http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/treatment_of_clinical_mastitis.pdf. Consultado: 28/02/2012.
 96. Ruegg PL. (2009) The quest for the perfect test: phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. Vet Microbiol. 134(1-2):15-19.
 97. Ruegg PL. (2010) The Application of Evidence Based Veterinary Medicine to Mastitis Therapy. World Buiatrics Congress, Santiago Chile.
 98. Ruegg PL. (2010) Tomando mejores decisiones de tratamiento para mastitis clínica. NMC Regional Meeting Proceedings
 99. Rupp M E, Archer GL. (1992) Haemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. 60:4322-4327.
 100. Rupp ME, Han J, Gatermann S. (1995) Hemagglutination by *Staphylococcus aureus* strains responsible for human bacteremia or bovine mastitis. Med Microbiol Immunol. 184(1):33-36.
 101. Saini V, McClure JT, Scholl DT, DeVries TJ, Barkema HW. (2012) Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. J Dairy Sci. 95:1921–1929.
 102. Scarpa M, Piccinini R, Brun P, Grillo A, Palù G, Mengoli C, Daprà V,

- Castagliuolo I, Zecconi A. (2009) Relationship between virulence factor genes in bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis isolates and binding to anti-adhesin antibodies. *J Dairy Res.* 77:159-167.
103. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475–491.
104. Sharma M, Anand SK. (2002) Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol.* 19(6):627–636.
105. Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. (2011) Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(3):429- 438.
106. Sibbald M, Ziebandt A, Engelmann S, Hecker M, De Jong Harmsen A, Raangs G, Stokroos I, Arends J, Dubois J, van Dijk J. (2006) Mapping the pathways to Staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:755-788.
107. Signorini ML, Canavesio VR, Neder VE, Molineri AI, Vitulich CA, Tarabla HD, Calvino LF. (2008) Valores predictivos y sensibilidad a nivel de rodeo de mastitis a partir de las características de las pruebas diagnósticas individuales y el tamaño del muestreo. *InVet.* 8:91-102.
108. Sierra G, de Torres E. (2009) Evolución del recuento celular individual por cuarto medido mediante el California Mastitis Test. Disponible en: <http://www.agrovetmarket.com/TechnicalArticlesUI.aspx?.language=1&.article=76> Consultado el 10 de abril de 2012.
109. Simões M, Simões LC, Vieira MJ (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT- Food Sci Technol.* 43:573–583.
110. Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K. (2003) The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme *Vet Microbiol.* 96(8):91–102.
111. Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee JC. (2000) Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J Clin Microbiol.* 38:846-850.
112. Sorroche FG, Rinaudi LV, Zorreguieta A, Giordano W. (2010) EPS II-Dependent Autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Curr Microbiol.* 61:465–470.
113. Stutz K, Stephan R, and Tasara T. (2011) SpA, ClfA, and FnbA

- Genetic Variations Lead to Staphaurex Test-Negative Phenotypes in Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates. J Clin Microbiol. 49: 638–646.
114. Sutra L, Poutrel B. (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 40:79-89.
 115. Takamatsu D, Hata E, Osaki M, Aso H, Kobayashi S, Sekizaki T. (2008) Role of SraP in Adherence of *Staphylococcus aureus* to the Bovine Mammary Epithelia. J Vet Med Sci. 70:735–738.
 116. Taponen S, Pyörälä S (2009) Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet Microbiol. 134(1-2):29-36.
 117. Tarabla, H. (2000) Epidemiología diagnóstica. Santa Fe: Centro de Publicaciones - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina; 120 pp.
 118. Tuchscher LPN, Buzzola FR, Alvarez LP, Caccuri RL, Lee JC, Sordelli DO. (2005) Capsule-Negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. Infect Immun. 73:7932–7937.
 119. Tuchscher LPN, Löffler B, Buzzola FR, Sordelli DO. (2010) *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. Future Microbiol. 5(12):1823-1832.
 120. Türkyilmaz S, Kaya O. (2006) Determination of some Virulence factors in *Staphylococcus spp.* isolated from various clinical samples. Turk J Vet Anim Sci. 30:127-132.
 121. Valero-LeaL K, Valbuena E, Chacon F, Olivares Y, Castro G, Briñez W. (2010) Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamaros con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. Revista Científica, FCV-LUZ. Vol. 20: 498 – 505.
 122. Valde JP, Østerås, O, Simensen, E. (2005) [Description of Herd Level Criteria for Good and Poor Udder Health in Norwegian Dairy Cows](#) Journal of Dairy Science(88)86-92
 123. Vasudevan P, Kumar M, Nair M, Annamalai T, Venkitanarayanan K. (2003) Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Veter Microbiol. 92:179-185.
 124. Verbeek C, Xia SS, Whyte D. (2008). Rheology of the gel formed in the California Mastitis Test. J Dairy Res. 75:385-391.
 125. Vilaa J, Soriano A, Mensa J. (2008) Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. Enferm Infecc Microbiol Clin 26(1):48-55.

126. Watts JL. (1988) Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol.*16(1):41-66.
127. Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Gröhn YT. (2001) Cow- and quarter-Level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 84:2649–2663.
128. Zadoks R, van Leeuwen W, Kreft D, Fox L, Barkema H, Schukken Y, van Belkum A. (2002a) Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J Clin Microbiol.* 40:3894-3902.
129. Zadoks RN, Allore HG, Hagenaars TJ, Barkema HW, Schukken YH. (2002b) A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. *Epidemiol Infect.* 129(2):397–416.
130. Zecconi A, Hahn G. (2000) *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF* 345:15-18.
131. Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Daprà V, Piccinini R. (2006) Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis* 40:177-183.
132. Zhao X, Lacasse P. (2008) Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J Anim Sci.* 86(Suppl. 1):57–65.
133. Zorrilla de San Martín, D. (2010) Lechería en el Uruguay: una década de fuertes impactos. <http://www.iica.org.uy/index.php> Consultado 1 de marzo de 2012.