

PATÓGENOS CONTAGIOSOS Y AMBIENTALES AISLADOS DE CUARTOS MAMARIOS CON MASTITIS SUBCLÍNICA DE ALTO RIESGO EN TRES FINCAS DEL ESTADO ZULIA

Contagious and Environmental Pathogens Isolated from Mammary Quarters With Subclinical Mastitis of Risk High in Three Farms of Zulia State

Kutchynskaya Valero-Leal ^{1*}, Emiro Valbuena ², Fanny Chacón ³, Yamelys Olivares ³, Gustavo Castro ² y Wilfido Briñez ²

¹ Bacteriología Clínica, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. ² Unidad de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias. ³ Estudiantes de posgrado. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

* E-mail: kutchynskaya@gmail.com

RESUMEN

La mastitis es la enfermedad más común y costosa del ganado lechero en la mayor parte del mundo. En el presente estudio se investigó la frecuencia de aislamientos de patógenos contagiosos y ambientales a partir de ganado vacuno con mastitis subclínica, en tres fincas del estado Zulia. Se determinó la asociación de los grupos de patógenos con los diferentes sistemas de ordeño empleados, así como el probable efecto de las estaciones climáticas sobre la frecuencia de aislamiento de microorganismos. A nivel de campo se practicó la prueba de California para mastitis (CMT) a 2.416 cuartos mamarios. A los 758 cuartos que fueron clasificados de alto riesgo por el CMT se les realizó cultivo bacteriológico. Los principales patógenos aislados fueron *Streptococcus agalactiae* (26%), *Staphylococcus coagulasa negativa* (23%), *Streptococcus* spp. (20%) y *S. aureus* (17%). El 73% de los patógenos aislados fueron contagiosos. El carácter contagioso de la infección intramamaria se observó en las tres fincas, la cual se presentó en un 75; 86 y 68% en las fincas A, B y C, respectivamente. No se observó un patrón estacional definido para la presencia de patógenos contagiosos y ambientales.

Palabras clave: Mastitis subclínica, patógenos contagiosos, patógenos ambientales.

ABSTRACT

Mastitis is the commonest and most expensive disease in dairy cattle in most countries. In the present study it was investi-

gated the frequency of isolates of contagious and environmental pathogens of subclinical mastitis on three farms of Zulia State. Was determined association by groups of pathogens with different milking systems used in each farm and the likely effect of the seasons. At the field level, California Mastitis Test (CMT) was performed to 2,416 mammary quarters. A 758 quarters that were classified as risks high by the CMT, also were cultured bacteriologically. In general, the most frequently isolated bacteria were *S. agalactiae* (26%), coagulase-negative *Staphylococcus* (23%), *Streptococcus* spp. (20%) and *S. aureus* (17%). Seventy three percent of isolated pathogens were contagious. The contagious nature of intramammary infection was observed in the three farms with a frequency of 75, 86 and 68% in farms A, B and C, respectively. The results did not allow inferring a clear seasonal pattern for the presence of contagious and environmental pathogens.

Key words: Subclinical mastitis, contagious pathogens, environmental pathogens.

INTRODUCCIÓN

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria causada por agentes químicos o físicos, pero en su mayoría los casos están relacionados con una infección bacteriana [26]. Se ha señalado que la aplicación de técnicas inadecuadas de ordeño en los bovinos (*Bos taurus - indicus*) favorece el establecimiento de esta entidad patológica entre un 70 a 80% de los casos [21].

Cuando la mastitis es de origen infeccioso, además del daño en el tejido mamario se presentan cambios químicos y microbiológicos en la leche y se incrementa el número de célu-

las somáticas [14]. Los efectos negativos que produce la mastitis afectan al productor, la industria láctea y el consumidor, al provocar disminución en la producción de leche, deterioro de su calidad nutritiva y alteración de sus propiedades tecnológicas, debido a la reducción de la estabilidad al calor y la disminución de la vida útil [20].

Aunque en las pérdidas económicas atribuibles a la mastitis contribuyen, tanto los animales que presentan la enfermedad clínica como subclínica, las pérdidas económicas derivadas de las mastitis subclínicas son más importantes, debido a la reducción en la producción de la leche que tiende a persistir por un largo período de tiempo y al mayor número de animales afectados por unidad de producción [30].

Una gran diversidad de bacterias pueden producir mastitis subclínica. Basados en las características epidemiológicas de los patógenos bacterianos, éstos han sido divididos en dos grupos: contagiosos y ambientales [40]. Los patógenos contagiosos son sub-categorizados en patógenos mayores y menores de acuerdo al grado de inflamación que producen en la glándula mamaria [3, 11]. En base a esta clasificación, los patógenos contagiosos mayores son: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* y *Mycoplasma* spp.; mientras que *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN) y *Corynebacterium bovis* son considerados patógenos contagiosos menores [11]. Dentro de los patógenos ambientales se encuentran los bacilos Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp.), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Enterococcus* spp. [11, 26].

El principal reservorio de los patógenos contagiosos productores de mastitis son los cuartos mamarios infectados, desde donde la infección se disemina entre vacas o entre cuartos durante el ordeño. Las medidas de control para estos patógenos están focalizadas en la aplicación de prácticas higiénicas durante el ordeño, básicamente desinfección de pezones pos-ordeño, junto con la terapia de vaca seca, lavado y desinfección de los equipos de ordeño y terapia antimicrobiana de las infecciones intramamarias (IIM) [19]. Mientras que la infección por patógenos ambientales se produce por contaminación de los pezones mediante contacto directo con las heces y/o camas contaminadas; por consiguiente, la implementación de medidas de control del medio ambiente a nivel de zonas de reposo o camas, pisos y *dípteros*, son de utilidad para controlar las mastitis de origen ambiental [11, 19].

Los sistemas de producción de ganadería bovina de doble propósito de la cuenca del Lago de Maracaibo se caracterizan en su mayoría por un manejo no especializado, donde el nivel tecnológico existente a nivel de finca es escaso, probablemente debido a las características de bajo nivel educativo del personal que allí labora [42]. Una de las formas tradicionales de ordeño en esta región lo constituye la participación del becerro para estimular la bajada de la leche. Aunque este tipo de ordeño se asocia a un menor riesgo de infección intramamaria [4, 12], esta práctica establece severas restricciones

para la implementación de la desinfección pos-ordeño, la cual no es aplicable en la mayoría de las fincas debido a que el becerro accesa la ubre, posterior a éste [2].

En la región zuliana existe una tendencia generalizada a aplicar técnicas inadecuadas de ordeño, caracterizadas por pobres condiciones higiénicas, falta de desinfección pre y/o pos-ordeño; a lo cual se suman, en el caso del ordeño mecánico, aspectos como el diseño, manejo y mantenimiento inapropiado de las máquinas, lo que incrementa la prevalencia de mastitis subclínica en el rebaño [10]. El problema adquiere dimensiones importantes debido a la falta de detección temprana de nuevas infecciones y a las condiciones climáticas propias, las cuales favorecen una mayor concentración de microorganismos en el ambiente que pueden pasar a la leche, bien sea a través del animal o de los utensilios e instalaciones destinadas al ordeño [38].

Debido a que las estrategias de control difieren para patógenos contagiosos y ambientales, es necesario identificar los microorganismos involucrados en los casos de mastitis a nivel local, para poder desarrollar un programa de control efectivo de acuerdo a los agentes causantes de estos trastornos, por lo que es necesario realizar cultivos bacteriológicos de la leche de los cuartos de las ubres afectadas [30]. Por tales razones, los objetivos de la presente investigación fueron: identificar los patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios de alto riesgo para mastitis en tres fincas del estado Zulia; determinar la asociación de los grupos de patógenos con el sistema de ordeño empleado en cada finca y determinar el probable efecto de las estaciones climáticas sobre los grupos de patógenos presentes en los cuartos mamarios de alto riesgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y características de las unidades de producción

La fase de campo de la investigación se ejecutó durante el período comprendido entre los meses de mayo 2006 y enero 2007. En esta etapa se ubicaron las tres unidades de producción que participaron en el estudio, una vez que se obtuvo la autorización del propietario. Estas fincas se caracterizaron por tener fácil acceso debido a la existencia de vías de penetración y la colaboración del encargado de la finca durante la toma de las muestras.

Las unidades de producción estaban ubicadas en los municipios Santa Rita (finca A), La Cañada de Urdaneta (finca B), y Mara (finca C) del estado Zulia, correspondientes a 2 zonas agroecológicas: Zona 1: Costa Oriental del Lago, donde se ubica el municipio Santa Rita y Zona 2: Nor-Occidental que comprende los municipios La Cañada de Urdaneta y Mara [42]. En estas zonas predominan el bosque muy seco tropical y bosque seco tropical, que se caracterizan por tener dos períodos de lluvia durante el año (abril-junio y septiembre-noviembre) y dos secos (diciembre-marzo y julio-agosto), con temperaturas promedio entre 22 y 29°C [42].

Cada finca se visitó en tres oportunidades durante el ordeño vespertino. El período de recolección de las muestras para la finca A comprendió los meses de época lluviosa (mayo, septiembre y noviembre de 2006), en la finca B se abarcó el período seco (julio 2006 y enero 2007) y el período lluvioso (octubre 2006), y en la finca C se pudieron evaluar igualmente las dos estaciones, la lluviosa (junio y octubre 2006) y la seca (julio 2006).

El rebaño de las tres unidades de producción estaba conformado por animales mestizos de doble propósito. El promedio de producción de leche por vaca era de 5 a 6 litros/día, el número de animales en producción en las fincas varió de 45 a 105 vacas. Las vacas pertenecientes al rebaño de la finca A eran ordeñadas por un sistema mecánico con apoyo del becerro; en la finca B, la forma de ordeño era manual con apoyo del becerro y en la finca C, las vacas eran ordeñadas manualmente sin apoyo del becerro.

Las fincas se caracterizaron por no aplicar buenas prácticas de ordeño. Durante las visitas se pudo constatar que no reunían las condiciones mínimas de salubridad, debido a que no disponían de un reservorio de agua clorada para la limpieza e higiene de los utensilios, además los excrementos de los animales se acumulaban en la sala durante el ordeño. Resultó evidente la falta de preparación higiénica de los ordeñadores antes de efectuar su labor. El ordeño se practicaba con unos pezones mal lavados, que no eran desinfectados ni antes ni después del ordeño, en algunos casos sólo se lavaban con agua y en otros casos con la leche que se encontraba en los baldes de ordeños previos. Mientras transcurría el ordeño, las cántaras permanecían destapadas, práctica ésta que incrementa el riesgo de contaminación del producto por insectos voladores. Adicionalmente, se evidenció que en ninguna de las fincas se realizaba el diagnóstico de mastitis subclínica.

Animales

Se evaluaron en total 622 vacas en ordeño (TABLA I) para diagnosticar mastitis subclínica. En cada finca se realizó la prueba de California para mastitis (CMT) durante el ordeño vespertino a todas las vacas en producción, evaluándose un total de 2.416 cuartos mamarios. Se excluyeron de la investigación las vacas con signos visibles de inflamación de la glándula mamaria y signos clínicos sistémicos. De manera que el criterio de inclusión de los animales fue: presencia de mastitis subclínica en cualquiera de los cuartos mamarios, sin tomar en cuenta la fase de lactancia y número de partos.

Prueba de California para mastitis (CMT)

El reactivo de CMT (Deteck, Serviqual, Venezuela) fue usado de acuerdo a la metodología descrita por Schalm y Norlander [35]. Este método es ampliamente usado para el diagnóstico de mastitis subclínica a nivel de campo [10, 24, 31, 37]. La formación del gel y las características de éste, permiten estimar en forma indirecta el número de células somáticas existentes en la leche y diagnosticar los cuartos mamarios con mastitis subclínica [18].

TABLA I
ANIMALES Y CUARTOS MAMARIOS EVALUADOS EN LAS
FINCAS ESTUDIADAS/ ANIMALS AND MAMMARY QUARTERS
EVALUATED IN THE STUDIED FARMS.

Fincas	Muestreos	Animales en ordeño	Cuartos evaluados	Cuartos atrofiados
Finca A	1	48	190	2
	2	57	222	6
	3	63	247	5
Subtotal		168	659	13
Finca B	1	84	327	9
	2	73	283	9
	3	105	414	6
Subtotal		262	1024	24
Finca C	1	45	175	5
	2	68	257	15
	3	79	301	15
Subtotal		192	733	35
Total		622	2416	72

De acuerdo a la equivalencia de los resultados del CMT con el recuento de células somáticas (RCS), se consideró que un cuarto mamario estaba afectado con mastitis subclínica, cuando no presentaba signos clínicos de infección y la reacción al CMT era $\geq 1+$, lo que equivale a un RCS entre 400.000 - 1.500.000 células somáticas/ml de leche [18]. A su vez, los resultados del CMT permitieron clasificar los cuartos mamarios en dos categorías: cuartos mamarios con reacción $\geq 2+$, se consideraron de alto riesgo para la presencia de patógenos causantes de mastitis, mientras que aquellos con reacción $< 2+$ fueron considerados de bajo riesgo [2].

Recolección de las muestras para cultivo bacteriológico

Para el cultivo bacteriano de la leche de cuartos mamarios con mastitis subclínica se seleccionaron en total 758 cuartos que presentaban una reacción de alto riesgo al CMT (TABLA II). Esta selección se realizó en base a lo reportado previamente por Faría y col. [10] y Kivaria y col. [18], en relación a un mayor porcentaje de cultivos bacterianos positivos cuando el resultado del CMT es $\geq 2+$.

Para la toma de la muestra se siguió el procedimiento descrito por el National Mastitis Council [22]. Los pezones de cada cuarto mamario fueron lavados, secados y desinfectados; para tal fin se utilizó una solución jabonosa, seguidamente el pezón se enjuagó con agua estéril y se secó con gasa estéril, posteriormente, se desinfectó la punta del pezón con una gasa impregnada en solución iodada. Una vez finalizada la asepsia del pezón, se descartó el primer chorro de leche y se recolectó una cantidad aproximada de 15 mL de leche de cada cuarto mamario con una reacción al CMT $\geq 2+$, en un tubo de vidrio, estéril con tapa de rosca. Las muestras recolectadas, fueron mantenidas y transportadas en cava con hielo hasta su llegada al laboratorio para su análisis.

TABLA II
CLASIFICACIÓN DE LOS CUARTOS MAMARIOS
DE ACUERDO A LOS RESULTADOS DEL CMT/
CLASSIFICATION OF MAMMARY QUARTERS ACCORDING
TO CMT RESULTS.

Clasificación cuartos	Finca A (%)	Finca B (%)	Finca C (%)	Total (%)
Cuartos de Alto Riesgo*	211 (32) ^a	186 (18) ^b	361 (49) ^c	758 (31)
Cuartos de Bajo Riesgo	448 (68)	838 (82)	372 (51)	1.658 (69)
Total de Cuartos evaluados	659 (100)	1.024 (100)	733 (100)	2.416 (100)

Superíndices diferentes en la misma fila difieren significativamente (P<0,05).

TABLA III
RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS DE LAS MUESTRAS
DE LECHE DE CUARTOS MAMARIOS DE ALTO RIESGO/
BACTERIOLOGICAL FINDINGS FROM MAMMARY QUARTERS
MILK SAMPLES OF HIGH RISK.

Resultados del cultivo	Finca A (%)	Finca B (%)	Finca C (%)	Total (%)
Cultivos negativos	107 (51)	104 (56)	114 (31)	325 (43)
Cultivos contaminados	6 (3)	1 (0,5)	6 (2)	13 (2)
Cultivos positivos	98 (46)	81 (44)	241 (67)	420 (55)
Muestras cultivadas	211(100)	186 (100)	361 (100)	758 (100)

Aislamiento e identificación de patógenos en leche de cuartos mamarios de alto riesgo a mastitis subclínica

Siguiendo la metodología propuesta por la Federación Láctea Internacional [17] para el análisis bacteriológico de las muestras de leche de cuartos mamarios, se utilizaron los medios de agar sangre (HiMedia Laboratories, India) de carnero (5% de sangre desfibrinada) y agar Mac Conkey (HiMedia Laboratories, India). En cada uno de los medios se sembró por superficie en un cuadrante un volumen de 0,01 mL de leche. Posteriormente, los medios se incubaron en una estufa (Marca: Fanem®, Modelo: 002CB, Sao Paulo-Brasil) en condiciones de aerobiosis a 37°C y se examinaron luego de 24 y 48 horas de incubación.

Los resultados obtenidos en el medio de cultivo se interpretaron y registraron de acuerdo a los criterios propuestos por Poutrel y Rainard [29]: a) cultivo positivo: crecimiento de cinco o más colonias del mismo tipo o crecimiento de dos tipos de colonias con un recuento mínimo de ocho colonias por tipo. b) Cultivo negativo: ausencia de crecimiento o crecimiento de menos de cinco colonias del mismo tipo. c) Muestra contaminada: crecimiento de tres o más tipos de colonias diferentes.

Se aplicaron los esquemas de identificación según el National Mastitis Council [23]. Las bacterias fueron identificadas preliminarmente por morfología colonial y tinción de Gram. Para cocos Gram positivos, se realizó la prueba de catalasa para diferenciar *Streptococcus* spp. (catalasa negativa) de *Staphylococcus* spp. (catalasa positiva). La identificación de los cocos Gram positivos catalasa positiva se realizó en base a las pruebas de coagulasa, oxidación-fermentación de la glucosa, fermentación de manitol, Voges Proskauer y susceptibilidad a la polimixina B. Para diferenciar *S. agalactiae* de otras especies de *Streptococcus* se utilizaron las pruebas de factor CAMP e hidrólisis del hipurato. Los bacilos Gram negativos fueron identificados por prueba de oxidasa, reacción en el medio de triple azúcar hierro, prueba de indol, citrato, urea, motilidad y descarboxilación de la lisina y ornitina. *Corynebacterium* spp. fue identificado por la morfología celular característica de este género bacteriano.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el programa SPSS para Windows versión 17 (SPSS Inc. Chicago, 2001). Se utilizó estadística descriptiva para determinar el porcentaje de aislamiento para géneros, especies bacterianas y grupos de patógenos contagiosos y ambientales. Para el análisis de los resultados del cultivo se asumió la clasificación de patógenos contagiosos (mayores y menores) y ambientales [3, 11, 40]. La prueba de Ji-cuadrado fue aplicada para determinar diferencias entre fincas y entre las estaciones climáticas sobre los grupos de patógenos presentes en los cuartos mamarios de alto riesgo. Los resultados del análisis estadístico fueron interpretados con un nivel de confiabilidad del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de cuartos mamarios correspondientes a las 622 vacas en ordeño de las tres fincas estudiadas, 72 (2,89%) no eran funcionales (atrofiados), por lo cual el CMT se le practicó a 2.416 cuartos (TABLA I). De acuerdo a la clasificación de los cuartos mamarios, según los resultados del CMT, 1.658 cuartos (69%) se ubicaron en la categoría de bajo riesgo y 758 (31%) en la de alto riesgo (TABLA II). El porcentaje de cuartos de alto riesgo reportado a nivel nacional es muy variado, oscilando entre 27 y 49% [7, 10, 13, 33], lo cual puede estar influenciado por el tipo de manejo, tipo racial, estación climática, ubicación geográfica, entre otros, lo que dificulta el poder realizar algún tipo de comparación sobre este aspecto.

El porcentaje de cuartos de alto riesgo varió entre fincas: la finca C presentó el mayor número de cuartos de alto riesgo (49%), seguido por la finca A (32%), mientras que la finca B presentó el menor porcentaje (18%), estos resultados fueron significativamente diferentes (P<0,05). Las diferencias observadas pueden ser atribuidas entre muchas otras opciones a los distintos sistemas de ordeño empleados en cada finca. En las fincas B y C probablemente el contraste observado en el

número de cuartos de alto riesgo, se deba a la modalidad del tipo de ordeño manual empleado: con apoyo del becerro en la finca B y sin apoyo del becerro en la finca C.

El ordeño manual con apoyo del becerro es el más característico en los sistemas de doble propósito en los países de América Latina y es el que predomina en el esquema de explotación zuliano [27]. Reportes previos han señalado el aparente efecto positivo que tiene el ordeño con apoyo del becerro en la reducción de la infección intramamaria (IIM) [4, 12]. Este tipo de ordeño se inicia cuando se estimula la eyeción de la leche con un breve amamantamiento, el cual es seguido por el ordeño y culmina con el amamantamiento del becerro para extraer la leche residual, disminuyendo así las probabilidades de que ocurra multiplicación bacteriana en el cuarto mamario; a diferencia del ordeño sin apoyo del becerro, donde sino se aplican las medidas adicionales, se ve favorecida la infección de la glándula mamaria por la leche que permanece retenida en la ubre luego del ordeño, esto hace que el ordeño con apoyo del becerro sea más eficiente [8].

El apoyo del becerro se puede utilizar, tanto en los sistemas de ordeño manual como mecánico. Al comparar el número de cuartos de alto riesgo de las vacas que se ordeñaron mecánicamente con apoyo del becerro (finca A, 32%), con las vacas que se ordeñaron a mano con apoyo del becerro (finca B, 18%), se aprecia que el porcentaje de cuartos de alto riesgo fue mayor en la finca A ($P < 0,05$), este resultado podría sugerir mal funcionamiento del equipo de ordeño y/o falta de higiene, lo que facilita la diseminación de infecciones durante el ordeño entre vacas. Los resultados de este estudio contrastan con los de otros autores en el país [10, 12], quienes han reportado una proporción superior de cuartos de alto riesgo en los animales sujetos a ordeño manual, con respecto a los ordeñados a máquina.

Los resultados de los cultivos bacteriológicos se exponen en la TABLA III. De las 758 muestras de leche provenientes

de cuartos mamarios de alto riesgo, 13 (2%) resultaron contaminadas, 325 (43%) fueron negativas y 420 (55%) presentaron crecimiento bacteriano significativo.

El elevado porcentaje de cultivos positivos obtenido en la presente investigación (55%) es un hallazgo común en las investigaciones realizadas a nivel regional donde se ha reportado una IIM por encima del 52% [2, 9], pero contrasta con lo descrito en otras regiones de Venezuela donde se ha encontrado un porcentaje de cuartos infectados entre un 26 y 36% [13, 34]. Los resultados indican que la IIM sigue siendo un problema que afecta a los productores de la región y no es muy distante de la situación reportada en otros países subdesarrollados, donde las prevalencias de IIM oscilan entre 26 y 76% [14, 18, 37]. Por el contrario, en los países desarrollados está se encuentra entre 18 y 36% [1, 15, 25, 29, 32, 41].

En el presente estudio, la ocurrencia de IIM varió entre fincas, en el rango del 44 a 67% para las fincas B y C, respectivamente (TABLA III). Aparentemente, el becerro tiene un efecto positivo en la reducción de la IIM, al obtenerse un menor porcentaje de cultivos positivos en las fincas donde se usó el becerro como apoyo para el ordeño (finca A, 46%; finca B, 44%).

De un total de 420 cultivos positivos, en 405 (96%) se detectó la presencia de un sólo patógeno bacteriano, mientras que las infecciones mixtas representaron el 4%, siendo la asociación más frecuente *S. agalactiae* y SCN. El reporte de las infecciones mixtas difiere en los diversos estudios encontrándose generalmente entre 1 a 7% de los cultivos positivos [6, 11, 15, 28]. La importancia de las IIM que son ocasionadas por dos microorganismos consiste en que existe una mayor probabilidad de que la mastitis subclínica se convierta en un evento clínico [39].

En la TABLA IV se especifica la distribución de los 435 patógenos bacterianos aislados. La bacteria más comúnmente aislada fue *S. agalactiae* (112/435; 26%), seguido por SCN

TABLA IV
FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS AISLADOS EN LOS CUARTOS MAMARIOS CON CRECIMIENTO BACTERIANO/
FREQUENCY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM MAMMARY QUARTERS WITH BACTERIAL GROWTH.

Microorganismos aislados	N° aislamientos (%)			
	Finca A	Finca B	Finca C	Total
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12 (12)	25 (30)	75 (30)	112 (26)
<i>Streptococcus</i> spp.	21 (21)	10 (12)	57 (23)	88 (20)
<i>Staphylococcus aureus</i>	45 (44)	28 (34)	2 (1)	75 (17)
<i>Staphylococcus hyicus</i>	10 (10)	8 (10)	5 (2)	23 (5)
SCN	4 (4)	6 (7)	89 (35)	99 (23)
<i>Micrococcus</i> spp.	1 (1)	-	24 (9)	25 (6)
<i>Corynebacterium</i> spp.	5 (5)	4 (5)	-	9 (2)
<i>Bacillus</i> spp.	1 (1)	-	-	1 (0,2)
Bacilo Gram negativo	2 (2)*	1 (1)**	-	3 (0,6)
Levaduras	1 (1)	-	-	1 (0,2)
Total patógenos bacterianos	101 (100)	82 (100)	252 (100)	435 (100)

* *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* spp; ** *Pseudomona aeruginosa*.

(23%), otras especies de *Streptococcus* spp. (20%) y *S. aureus* (17%). Como puede apreciarse se obtuvo una diversidad de aislamientos bacterianos, un hecho que es característico de las mastitis subclínica, lo que las convierte en una entidad patológica compleja, razón por la cual en los programas de control, el cultivo bacteriológico de las muestras de leche de cuartos individuales es de gran importancia [30].

La distribución de patógenos intramamarios de las mastitis subclínicas ha sido estudiada en diferentes países y regiones del mundo. Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio, con otros reportes, se observa una diferencia numérica en cuanto a los patógenos aislados, sin embargo, en los diferentes reportes se evidencia el predominio de bacterias Gram positivas sobre las Gram negativas [5, 18, 32, 36, 41]. En países como Finlandia, Suiza, Italia, Holanda y Alemania, donde existen programas de control establecidos contra la mastitis, la prevalencia de *S. agalactiae* ha disminuido, resultando SCN y *C. bovis* los patógenos más comunes [5, 11, 28, 36, 41]. Otros estudios reportan a *S. aureus* como el patógeno más frecuente [1, 14, 18, 25, 34, 37]. En cambio, González y col. [15], en 50 rebaños lecheros de California (EUA), así como Ferraro [13], en 13 Estados de Venezuela aislaron *S. agalactiae* como el principal productor de mastitis subclínica, similar al obtenido en este estudio.

Al clasificar los diferentes patógenos aislados, en contagiosos y ambientales (TABLA V), se evidenció que, del total de bacterias aisladas, el 73% correspondió al grupo de patógenos contagiosos, en comparación con un 27% de patógenos ambientales ($P < 0,05$). El predominio de las bacterias contagiosas se observó en las tres fincas. El principal patógeno aislado en las fincas A y B fue *S. aureus* (44 y 34%, respectivamente); mientras que en la finca C, SCN (35%) y *S. agalactiae* (30%) fueron los agentes bacterianos involucrados con mayor frecuencia (TABLA IV).

Estos resultados coinciden con otras investigaciones realizadas a nivel regional y nacional [2, 9, 12, 33] donde se reportan como principales responsables de las infecciones subclínicas a los patógenos contagiosos, con un marcado predominio de *S. agalactiae* y *S. aureus*, lo que permite afirmar que la mas-

titis por microorganismos contagiosos continua siendo una problemática en los sistemas de producción de leche a nivel nacional y su persistencia probablemente se debe a la falta de implementación de las buenas prácticas de ordeño [40].

Al relacionar la estacionalidad en las fincas B y C con la frecuencia de aislamiento de los grupos bacterianos contagiosos y ambientales (TABLA VI), se aprecia que en la finca B, los patógenos contagiosos prevalecieron en ambas estaciones ($P > 0,05$). Un comportamiento diferente y altamente significativo ($P < 0,01$) se presentó en la finca C donde la proporción de patógenos contagiosos *versus* ambientales fue diferente en ambos períodos lluviosos e incluso en una de las estaciones de lluvia se observó un comportamiento similar a la estación seca (predominio de patógenos contagiosos). Los resultados obtenidos no permiten deducir un patrón estacional definido. Esto puede deberse al hecho de que, en los municipios La Cañada de Urdaneta y Mara existen variaciones en su precipitación pluvial, la cual es irregular y muy localizada y además, hay poca variabilidad anual de la temperatura debido a la uniformidad en la duración del período diurno y nocturno durante todo el año en altitudes bajas [42].

Aunque no se pudo comparar en la finca A la estacionalidad, debido a que los tres muestreos se realizaron en el período lluvioso, fue notorio el marcado predominio de patógenos contagiosos, demostrando este resultado que la mastitis de tipo contagiosa es un problema persistente en esa unidad de producción, la cual se ha propagado fácilmente debido a las malas prácticas en la implementación de programas de prevención y control, aunado al estrés ocasionado por las altas temperaturas y la humedad de la zona, lo cual incrementa la susceptibilidad de los animales en ordeño a la IIM [16].

TABLA V
DISTRIBUCIÓN DE LOS PATÓGENOS CONTAGIOSOS Y AMBIENTALES EN LAS FINCAS ESTUDIADAS/
DISTRIBUTION OF CONTAGIOUS AND ENVIRONMENTAL PATHOGENS IN THE STUDIED FARMS.

Finca	Tipos de Patógenos		Total
	Contagiosos (%)	Ambientales (%)	
A	76 (75) ^a	25 (25) ^b	101
B	71 (87) ^a	11 (13) ^b	82
C	171 (68) ^a	81 (32) ^b	252
Total (%)	318 (73) ^a	117 (27) ^b	435

Superíndices diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$).

TABLA VI
VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA FRECUENCIA DE PATÓGENOS CONTAGIOSOS Y AMBIENTALES /
FREQUENCY OF SEASONAL VARIATION OF CONTAGIOUS AND ENVIRONMENTAL PATHOGENS.

Finca	Estación climática	Patógenos contagiosos	Patógenos ambientales
A ^a	Lluviosa	24	6
A ^a	Lluviosa	27	7
A ^a	Lluviosa	25	13
B ^a	Seca	20	6
B ^a	Lluviosa	21	4
B ^a	Seca	30	2
C ^a	Lluviosa	20	24
C ^c	Seca	91	12
C ^b	Lluviosa	61	46

Superíndices diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P < 0,01$).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos revelan un alto porcentaje de cultivos positivos en la población estudiada. Aunque en las fincas se aisló un grupo diverso de bacterias patógenas, al agruparlas en contagiosas y ambientales, resultó notorio el predominio de las bacterias contagiosas como causa de las infecciones intramamarias en las tres fincas. Los hallazgos obtenidos en relación con las estaciones climáticas revelaron resultados muy variables. Se sugiere realizar nuevos estudios dirigidos a precisar el comportamiento de las mastitis subclínicas en la estación lluviosa y seca, a nivel regional, para de esta manera poder adoptar las medidas higiénicas más pertinentes en cada época.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto CC 1035-05.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AAESTRUP, F.; WEGENER, H.; ROSDAHL, V.; JENSEN, N. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. **Acta Vet. Scand.** 36: 475-487. 1995.
- [2] ALONSO, F. R. Programas de control de mastitis subclínica bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo. **Rev. Vet. Venez.** XLVII: 11-67. 1981.
- [3] ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO, F. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. **J. Dairy Sci.** 85: 1370-1375. 2002.
- [4] BOTERO, R. Manejo de la vaca de doble propósito. **Bol. Agrop.** 117: 3-6. 1992.
- [5] BUSATO, A.; TRACHSEL, P.; SCHÄLLIBAUM, M.; BLUM, J. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. **Prev. Vet. Med.** 44: 205-220. 2000.
- [6] CALDERÓN, A.; RODRÍGUEZ, V. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cuniboyacense (Colombia). **Rev. Colomb. Cien. Pec.** 21: 582-589. 2008.
- [7] CASTILLO, M.; SUNIAGA, J.; ROJAS, G.; HERNÁNDEZ, J.; CAAMAÑO, J.; URBINA, A.; TOVAR, L. Estudio de prevalencia de mastitis subclínica en la zona alta del estado Mérida. **Agric. Andina.** 16: 39-48. 2009.
- [8] COMBELLAS, J.; TESORERO, M. Relación vaca-bece-ro en la sala de ordeño y su influencia sobre la producción de leche y su contenido de grasa. **XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal.** Valera 22 al 26 Octubre. ULA-Trujillo. 1-9 pp. 2002.
- [9] FARIA, J.; VALERO, K.; D'POOL, G.; GARCÍA, A.; ALLARA, M.; MORALES, D. Agentes bacterianos y conteo de células somáticas en leche de cuartos de bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica en cuatro fincas lecheras del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XV (1): 64-71. 2005a.
- [10] FARIA, J.; GARCÍA, A.; D'POOL, G.; VALERO, K.; ALLARA, M.; ANGELOSANTE, G. Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual y mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XV (2): 109-118. 2005b.
- [11] FERGUSON, J.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **J. Dairy Sci.** 90: 5798-5813. 2007.
- [12] FERRARO, L.; SCARAMELLI, A.; TROYA, H. Prevalencia de la mastitis subclínica bovina en Venezuela y evaluación de la prueba de mastitis de California (CMT) como prueba diagnóstica. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** IX (2): 81-90. 1999.
- [13] FERRARO, L. Análisis de la prevalencia de mastitis subclínica en vacas lecheras en Venezuela mediante la prueba de California mastitis Test (CMT) y bacteriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Trabajo de Ascenso. 79 pp. 1992.
- [14] GIANNECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DE-LUCCI, I.; MORENO, J. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. **Acta Vet. Scand.** 43: 221-230. 2002.
- [15] GONZÁLEZ, R.; JASPER, D.; FARVER, T.; BUSHNELL, R.; FRANTI, C. Prevalence of udder infections and mastitis in 50 California dairy herds. **JAVMA.** 193: 323-328. 1988.
- [16] HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **J. Dairy Sci.** 77: 2103-2112. 1994.
- [17] INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Laboratory methods for use in mastitis work. Brussels, Belgium. Document 132. 1-26 pp. 1982.
- [18] KIVARIA, F.; NOORDHUIZEN, J.; NIELEN, M. Interpretation of California mastitis test scores using *Staphylococcus aureus* culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dar es Salaam region of Tanzania. **Prev. Vet. Med.** 78: 274-285. 2007.
- [19] KRUIZE, J. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. **Arch. Med. Vet.** 30: 7-16. 1998.

- [20] MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.; GALTON, D.; RUDAN, M.; BOO, K. Effects of somatic cell count on quality and self-life of pasteurized fluid milk. **J. Dairy Sci.** 83: 264-274. 2000.
- [21] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Manejo del Hato Lechero. **Una revisión comprensiva del control de la mastitis**. Upjohn Company. Kalamazoo. Michigan, USA. 1-15 pp. 1990a.
- [22] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Procedures for the collection of milk samples. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. 3th. Ed. 1-3 pp. 1990b.
- [23] NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Procedures for the identification of specific groups or species of microorganisms that cause mastitis. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. 3th. Ed. 7-34 pp. 1990c.
- [24] NUNES, S.; BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C. Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in sub-clinical bovine mastitis. **J. Dairy Sci.** 90: 3242-3246. 2007.
- [25] ØSTERÅS, O.; SØLVERØD, L.; REKSEN, O. Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. **J. Dairy Sci.** 89: 1010-1023. 2006.
- [26] PARK, Y.; KOO, H.; KIM, S.; HWANG, S.; JUNG, W.; KIM, J.; SHIN, S.; KIM, R.; PARK, Y. H. The analysis of milk components and pathogenic bacteria isolated from bovine raw in Korea. **J. Dairy Sci.** 90: 5405-5414. 2007.
- [27] PEÑA, M.; URDANETA, F.; ARTEAGA, G.; CASANOVA, A. Caracterización del recurso animal en sistemas de ganadería bovina de doble propósito. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**. 14: 573-587. 1997.
- [28] PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **J. Dairy Sci.** 87: 2433-2441. 2004.
- [29] POUTREL, B.; RAINARD, P. Predicting the probability of quarter (by major pathogens) from somatic cell concentration. **Am. J. Vet. Res.** 43: 1296-1299. 1982.
- [30] RUEGG, P. Investigation of mastitis problems on farms. **Vet. Clin. Food Anim.** 19: 47-73. 2003.
- [31] RUIZ, J.; RAMÍREZ, N.; ARROYAVE, O. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia. **Rev. Col. Cien. Pec.** 14: 141-152. 2001.
- [32] SARGEANT, J.; LESLIE, K.; SHIRLEY, J.; PULKRABEK, B.; LIM, G. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. **J. Dairy Sci.** 84: 2018-2024. 2001.
- [33] SCARAMELLI, A.; FERRARO, L.; TROYA, H. Recuento electrónico de células somáticas aplicado a la detección de mastitis subclínica bovina en fincas lecheras de los estados Aragua y Carabobo, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ**. IX (6): 508 – 518. 1999.
- [34] SCARAMELLI, A. Evaluación de la aceptación y efectividad de un programa de control de mastitis basado en higiene y terapia de vacas secas en once fincas de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Trabajo de Ascenso. 130 pp. 1993.
- [35] SCHALM, O.; NOORLANDER, O. Experiments and observations leading to development of California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 130: 199-204. 1957.
- [36] SCHEPERS, A.; LAM, T.; SCHUKKEN, Y.; WILMINK, J.; HANEKAMP, W. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **J. Dairy Sci.** 80: 1833-1840. 1997.
- [37] SCHITANDI, A.; KIHUMBU, G. Assessment of the California mastitis test usage in smallholder dairy herds and risk of violate antimicrobial residues. **J. Vet. Sci.** 5 (1): 5-9. 2004.
- [38] SIGNORINI, M. L.; SEQUEIRA, G. J.; BONAZZA, J. C.; DALLA S, R.; OTERO, J. L.; ROSMINI, M. R. Variación estacional en los principales indicadores de higiene en leche cruda de un tambo de la cuenca central. **Rev. FAVE. Cien. Vet.** 2 (2): 97-110. 2003.
- [39] SILVA, I.; JAIN, N.; FARVER, T.; ZINKL, J. Phagocytic and postphagocytic activities of bovine neutrophils for pure and mixed bacterial cultures. **J. Dairy Sci.** 71: 2513-2519. 1988.
- [40] SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Vet. Microbiol.** 96: 91–102. 2003.
- [41] TENHAGEN, B.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **J. Dairy Sci.** 89: 2542-2551. 2006.
- [42] URDANETA, F.; MARTÍNEZ, E.; DELGADO, H.; CHIRINOS, Z.; OSUMA, D.; ORTEGA, L. Caracterización de los sistemas de producción de ganadería bovina de doble propósito de la Cuenca del Lago de Maracaibo. En: Madrid, N. y Soto E (Eds). **Manejo de la Ganadería Mestiza de Doble Propósito**. Maracaibo, Venezuela. Ediciones Astra Data. Capítulo I. 22-43 pp. 1995.