



Original

## Etiología de la Mastitis bovina en Zamora-Chinchipec, Ecuador

### Etiology of Cattle Mastitis in Zamora-Chinchipec, Ecuador

Natacha Ramírez-Sanmartín \*, Luis Rodrigo-Saa \*\*, Evelyn Lobo-Rivero \*\*\*, Anisleidy Pérez-Castillo \*\*\*, María Irian Percedo-Abreu \*\*\*

\*Universidad Nacional de Loja (UNL), Ecuador.

\*\*Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), Ecuador.

\*\*\*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correspondencia: [percedo.mi@gmail.com](mailto:percedo.mi@gmail.com)

Recibido: Julio, 2023; Aceptado: Agosto, 2023; Publicado: Septiembre, 2023.

## RESUMEN

**Antecedentes:** La mastitis bovina, problema sanitario y económico a nivel global, tiene implicaciones para la salud animal y humana. Numerosos microorganismos involucrados en su etiología complican su prevención y control, como *Mycoplasma bovis*. **Objetivo.** Profundizar en la etiología bacteriana de la mastitis bovina en Zamora-Chinchipec, Ecuador, en cuyos rebaños se constató previamente la presencia de Mollicutes en leche de tanque. **Materiales y métodos:** Durante 2015 y 2016 se muestrearon 247 vacas en ordeño de rebaños bovinos lecheros en la provincia Zamora-Chinchipec, seleccionados en los conglomerados definidos en el territorio según sus características ecológicas. Las muestras de leche de cada vaca se investigaron mediante Prueba California para Mastitis (CMT), y para el diagnóstico microbiológico de Mollicutes se realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como el diagnóstico bacteriológico para la identificación de otros patógenos. Mediante comparación de proporciones se analizaron los resultados del diagnóstico de *Mollicutes* y CMT en vacas por cantones y entre los patógenos identificados en las vacas positivas a Mollicutes. A través de Chi Cuadrado se evaluó la relación entre los resultados del diagnóstico de Mollicutes y CMT, y de los patógenos identificados, y por regresión logística se comparó su Razón de Prevalencia (RP). **Resultados:** Se encontró elevada frecuencia de mastitis subclínica (81.4%) mediante CMT y una frecuencia de 33,2 % de vacas positivas a *Mycoplasma* spp. En el diagnóstico bacteriológico *Streptococcus* spp. (27,2%) y *Staphylococcus aureus* (22,1%) tuvieron las mayores frecuencias ( $P < 0,05$ ). *S. aureus* se detectó con la mayor frecuencia en vacas positivas a *Mycoplasma* spp. (43,8%;  $P < 0,05$ ). **Conclusiones:** Se destaca la importancia de la elevada coinfección de *Mycoplasma* spp. y *S. aureus* por su

### Como citar (APA)

Ramírez-Sanmartín, N., Rodrigo-Saa, L., Lobo-Rivero, E., Pérez-Castillo, A., & Percedo-Abreu, M. (2023). Etiología de la Mastitis bovina en Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Revista de Producción Animal*, 35(2). <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e4531>



El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>, asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de [idaopen](https://www.budapestopenaccessinitiative.org/), la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

repercusión potencial en el comportamiento clínico-epidemiológico de la mastitis bovina en la provincia.

**Palabras clave:** Mastitis Bovina, Mollicutes, *Mycoplasma*, PCR, *Staphylococcus* (Fuente: MeSH)

## ABSTRACT

**Background:** Cattle mastitis is a global sanitary and economic problem that affects human and animal health. Several microorganisms involved in its etiology, such as *Mycoplasma bovis*, make prevention and control more difficult. **Aim.** To deepen the bacterial etiology of cattle mastitis in Zamora-Chinchipec, Ecuador, where collected milk was observed to have Mollicutes. **Materials and methods:** A number of 247 milking cows were studied in 2015-2016 in herds from Zamora-Chinchipec province, selected in areas with adequate ecological characteristics. The California Mastitis Test (CMT) was run on milk samples from each cow whereas Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to detect Mollicutes, and a bacteriological diagnostic was made to identify other pathogens. A comparison of proportions analysis was conducted to analyze the results of Mollicute presence, and CMT in the cows per cantons, and between the pathogens identified in the Mollicute-positive cows. Chi-square helped evaluate the relation between the Mollicute diagnostic results and CMT, and the pathogens identified. Logistic regression was useful to compare the prevalence ratio (PR). **Results:** The frequency of subclinical mastitis was found at high levels (81.4%) through CMT, and a frequency of 33.2% of *Mycoplasma* spp.-positive cows. In the bacteriological diagnostic, *Streptococcus* spp. (27.2%) and *Staphylococcus aureus* (22.1%) showed the highest frequencies ( $P < 0.05$ ). *S. aureus* was detected with the highest frequency in the *Mycoplasma* spp.-positive cows (43.8%;  $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The high infection caused by *Mycoplasma* spp. and *S. aureus* was significant, due to their potential repercussion on the clinical-epidemiological behavior of bovine mastitis in the province.

**Key words:** Bovine mastitis, Mollicutes, *Mycoplasma*, PCR, *Staphylococcus* (Source: Mesh)

## INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad compleja y multifactorial, dada por la inflamación del parénquima de las glándulas mamarias y los cambios patológicos que induce en sus tejidos, además de modificaciones biológicas, físicas y químicas en la leche, que ocasionan cambios en su composición y afectación a gran variedad de productos lácteos, además de reducir la producción de leche (Barreiro *et al.* 2017). Se reconoce como la enfermedad más común y costosa de la lechería a escala global y una de las principales causas de perjuicios a la eficiencia biológica y la fertilidad del ganado de leche (Dalanezi *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2023).

La mastitis también constituye un problema de salud pública, por los riesgos de transmisión a través de la leche de microorganismos zoonóticos y de patógenos con resistencia a los antimicrobianos, debido a su amplio y/o indebido uso para el control de la enfermedad (Paramasivam *et al.*, 2023).

Entre los patógenos causantes de mastitis se incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, enterobacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. y *Mycoplasma* spp., entre otros (Cameron *et al.*, 2017).

La preocupación por el carácter emergente de *Mycoplasma bovis* por el aumento de países que reportan su presencia en los últimos años (Citti y Blanchard, 2013; Ruegg *et al.*, 2017) y el diagnóstico de Mollicutes en leche de tanque de rebaños bovinos (25,8%, 37/143) en la provincia Zamora-Chinchipec, Ecuador, aunque no se confirmó *M. bovis* (Ramírez *et al.*, 2017), destaca la importancia de profundizar en la etiología bacteriana asociada con vistas al control de la enfermedad en sus rebaños.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante 2015 y 2016 se muestrearon 247 vacas en ordeño de rebaños bovinos lecheros en la provincia Zamora-Chinchipec, seleccionados en los conglomerados definidos en el territorio según sus características ecológicas (Saa *et al.*, 2012).

### *Prueba de California para mastitis*

Luego del despunte del pezón se depositó un pool de 2 ml de leche de todos los cuartos en los pocillos de la paleta indicada para esta prueba, a los que se agregó igual volumen del reactivo para la Prueba California para Mastitis (CMT, de sus siglas en inglés, Lauril sulfato de sodio al 4% Diagnóstico Mastitis Nocar, Medick). Se homogenizó la muestra con movimientos circulares por un tiempo aproximado de 10 a 20 segundos, e inmediatamente se interpretaron los resultados de acuerdo al grado de gelificación observado en la mezcla (Blowey y Edmonson, 2010).

### *Diagnóstico microbiológico*

Después de descartar los primeros chorros de leche de cada pezón, se colectó en tubos estériles un pool de 10mL de leche proveniente de todos los cuartos, previa su limpieza exhaustiva y desinfección con etanol al 70 % (NMC, 2014).

Todas las muestras de leche se refrigeraron (2-8°C) para su traslado al Laboratorio de Sanidad Animal y Zoonosis, de la Universidad Técnica Particular de Loja, donde se conservaron a 4°C para posteriores análisis microbiológicos.

### *Diagnóstico de Mycoplasma spp. en muestras de leche*

La detección de *Mycoplasma* spp. se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en MYCOLAB (Laboratorio Acreditado por la ISO/IEC: 17025, y de Referencia de la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA) para el diagnóstico de *Mycoplasmas*, del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba.

Para la detección de Mollicutes por PCR se utilizó la pareja de cebadores MGSO y GPO-1, que amplifican un fragmento de 270 pb correspondiente a la región conservada del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) (Van Kuppeveld *et al.*, 1998). Los cebadores se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba. Como control positivo se utilizó ADN de *Mycoplasma arginini*.

### ***Extracción de ADN a partir de muestras de leche***

La muestra de leche se centrifugó (3000 rpm por 10 minutos) y el sobrenadante se decantó. Posteriormente se tomaron 50µL del sedimento y se le adicionó 200 µL de buffer de ruptura (Tris HCl, 0,1M, pH 8,5, Tween 20, 0,05% y proteinasa K 0,24mg/mL). La mezcla se incubó durante 1 hora a 60 °C y luego de ese periodo se incubó a 95°C durante 15 minutos con el objetivo de lograr la desnaturalización del ADN (Rossetti *et al.*, 2010).

### ***Preparación de la mezcla, condiciones de corrida y visualización de los productos de PCR***

La preparación de la mezcla para la amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL. Esta mezcla se compuso de 5 µL del ADN de la muestra, 1,5µL de cada cebador (20 pmoles) y 17 µL de Master mix (Promega). Las reacciones se desarrollaron en un equipo Termociclador de ADN REACTOR ThermoHyBaid™, con el empleo del programa de amplificación específico para cada cebador, según lo descrito por los autores antes mencionados.

Los productos se aplicaron en gel de agarosa al 2 % (v/v). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, EE.UU.). El gel se tiñó con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos y los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

### ***Diagnóstico bacteriológico***

La identificación bacteriana en las muestras se realizó mediante la siembra de 15µL de leche y por agotamiento en placas Petri, las que se prepararon previamente con agar MacConkey, Salt Mannitol y Agar Sangre (Becton Dickinson-Difco BBL™), y Agar chocolate. Todas se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C (NMC, 2014).

Además, se realizaron las pruebas de hidrólisis de esculina, hipurato e inulina y crecimiento en cloruro de sodio (NaCl). A los aislados que mostraron bacilos Gram negativos en la tinción de Gram se les realizó la prueba preliminar de lectura inmediata Oxidasa y también se incluyeron las pruebas indol, triple azúcar, urea y citrato (Fernández *et al.*, 2010).

### ***Análisis estadístico***

Mediante comparación de proporciones (Castillo y Miranda, 2014) se analizaron los resultados del diagnóstico de *Mollicutes* y CMT en vacas por cantones y las frecuencias de los diferentes patógenos identificados en las vacas positivas a *Mollicutes*. A través de Chi Cuadrado se evaluó la relación entre los resultados del diagnóstico de *Mollicutes* y CMT, así como con los patógenos identificados en el estudio bacteriológico. También mediante regresión logística se comparó la Razón de Prevalencia (RP) de cada patógeno identificado por bacteriología (Corp I, 2012).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la investigación a 247 muestras de leche de vacas, resultaron positivas a CMT 201 vacas (81.4%), lo que demuestra la elevada frecuencia de mastitis subclínica (MSC) en los rebaños lecheros de la provincia. También se constató un 33.2% (82/247) de vacas positivas a *Mollicutes* (Tabla 1).

En Paquisha y Yacuambí no se detectaron vacas positivas a *Mollicutes*, pero sí a CMT, aunque en ambos cantones se investigó un número inferior de animales con respecto al resto de los cantones ante la reticencia de los productores.

En Sao Paulo se encontró un 16.4% (11/67) de rebaños positivos a *Mollicutes*; solo uno fue positivo a *M. bovis* (Manzi *et al.*, 2018), pero se supone la participación de otras especies de micoplasmas que pueden causar mastitis. Si bien *M. bovis* se considera una de las especies más patógenas y la más frecuentemente aislada a partir de neumonías, artritis y mastitis causadas por ese género en el ganado vacuno, existen otras especies, como *M. californicum*, *M. canadense*, *M. bovis genitalium*, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirhinis* y *M. dispar* que pueden causar infecciones en bovinos lecheros (Deeney *et al.*, 2021).

En Zamora-Chinchipe tampoco se identificó *M. bovis* en leche de tanque positivas a *Mollicutes*, y también se considera la participación de otras especies de micoplasmas (Ramírez *et al.*, 2017).

La no asociación entre los resultados a CMT y *Mollicutes* mediante Chi Cuadrado ( $p < 0,05$ ), se puede deber a la evidente participación de otros patógenos en la etiología de la mastitis.

**Tabla 1. Resultados del diagnóstico de Prueba de California y *Mollicutes* en vacas de rebaños lecheros en Zamora-Chinchipe, Ecuador.**

Cantones	Prueba California				<i>Mollicutes</i>		Total
	++	+++	Total Pos.	Total Neg.	Pos.	Neg.	
C. del Cóndor	4 (100,0)	0	4 (100,0) <sup>a</sup>	0	1 (25,0) <sup>d</sup>	3 (75,0)	4
Paquisha	6 (75,0)	0	6 (75,0) <sup>ab</sup>	2 (25,0)	0	8 (100,0)	8
Nangaritza	30 (73,2)	3 (7,3)	33 (80,5) <sup>b</sup>	8 (19,5)	21 (51,2) <sup>b</sup>	20 (48,8)	41
Zamora	20 (62,5)	4 (12,5)	24 (75,0) <sup>b</sup>	8 (25,0)	11 (34,4) <sup>c</sup>	21 (65,6)	32
Chinchipe	1 (33,3)	0	1 (33,3) <sup>b</sup>	2 (66,7)	1 (33,3) <sup>d</sup>	2 (66,7)	3
Yacuambi	3 (60,0)	1 (20,0)	4 (80,0) <sup>ab</sup>	1 (20,0)	0	5 (100,0)	5
Yantzatza	104 (67,5)	25 (16,2)	129 (83,8) <sup>b</sup>	25 (16,2)	48 (31,2) <sup>a</sup>	106 (68,8)	154
<b>Total</b>	168 (68,0)	33 (13,4)	201 (81,4)	46 (18,6)	82 (33,2)	165 (66,8)	247

<sup>abcd</sup> Letras desiguales en las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Así, la investigación bacteriológica detectó *Streptococcus* spp. (27,2%) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (22,6%) con las frecuencias mayores y sin diferencia entre ambas. También se observó infección bacteriana simultánea de diversos agentes bacterianos, un indicador de la participación de algunos patógenos secundarios, como coliformes y *Proteus* spp. que pueden actuar como predisponentes para la colonización posterior de patógenos mayores. Por ejemplo, coliformes se diagnosticó junto a *S. aureus* en el 10,5% de las vacas (Tabla 2).

**Tabla 2. Resultados bacteriológicos en leche de vacas en ordeño de rebaños lecheros en la provincia Zamora-Chinchipec, Ecuador.**

Patógenos	Positivos	%
<i>Streptococcus spp.</i>	67	27,1 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	56	22,6 <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i> y Coliformes	26	10,5 <sup>b</sup>
Staphylococcus Coagulasa Negativo	24	9,7 <sup>b</sup>
Staphylococcus Coagulasa Positivo	9	3,7 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i>	7	2,8 <sup>c</sup>
<i>Corynebacterium spp.</i>	6	2,4 <sup>cd</sup>
Staphylococcus Coagulasa Negativo y Coliformes	4	1,6 <sup>cd</sup>
<i>Proteus morgani</i>	3	1,2 <sup>cd</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,4 <sup>d</sup>
Negativo	44	18
<b>Total</b>	<b>247</b>	<b>100,0</b>

Patógenos tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y coliformes se señalan como los más comunes asociados a mastitis (Ruegg, 2017).

Los resultados obtenidos coinciden en señalar a *S. aureus* como uno de los patógenos de mayor ocurrencia e importancia en mastitis (Janus *et al.*, 2023; Heikkilä *et al.*, 2018; Kirkeby *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2023; Woudstra *et al.*, 2023). Aquí se coincide sobre la ocurrencia de *S. aureus* y diferentes especies de *Streptococcus* como lo más común.

Es importante señalar que la razón de prevalencia (RP) de *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) (9,7%) prácticamente no difiere respecto a *S. aureus* (22,6%) (Tabla 3). El grupo SCN se considera también un emergente mundial de mastitis, y su mayor detección se ha asociado a la disminución de patógenos mayores como *Streptococcus agalactiae* y *S. aureus*, aunque no todas las especies del grupo tienen un impacto negativo en el incremento de las células somáticas y la calidad de la leche, ya que otras parece que solo cohabitan la piel de los pezones (Cameron *et al.*, 2017).

**Tabla 3. Comparación entre las frecuencias observadas para los diferentes patógenos identificados en leche de vacas de rebaños lecheros en Zamora-Chinchipec.**

Patógeno	B	E.E.	P valor	RP	I.C. 95%	
					Inferior	Superior
<i>Staphylococcus aureus</i>	Categoría de referencia					
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	,624	,320	,051	1,867	,997	3,495
<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	,245	,223	,271	1,278	,826	1,976
Coliformes	1,344	,458	,003	3,833	1,561	9,414
<i>Streptococcus spp.</i>	-,511	,730	,484	,600	,143	2,511
<i>Escherichia coli</i>	1,022	,275	,000	2,778	1,621	4,761
<i>Corynebacterium spp.</i>	1,792	1,080	,097	6,000	,722	49,837

**Nota:** B= Coeficiente Beta; EE= Error estándar; RP=Razón de prevalencias; IC95%= Intervalo de Confianza del 95%.

En el 2017, un estudio realizado en la provincia El Oro, Ecuador, reveló una prevalencia de 11.6% de mastitis clínica (MC) moderada y 60% de mastitis subclínica (MSC). En los casos de MC se revelaron coliformes (33%), *Staphylococcus coagulasa* positiva (25,8%), *Staphylococcus coagulasa* negativa (20,4%), streptococos (9.7%), *Bacillus* spp. (7.5%) y *Klebsiella* spp (3.2%). En los casos de MSC, se identificaron staphylococos coagulasa negativa (55.4%), *Bacillus* spp. (22.1%), streptococos (9.3%), y staphylococos coagulasa positiva (6.1%) (Amer *et al.*, 2018). En contraste, en Zamora-Chinchipe se reveló menor infección por SCN (10%).

Mientras *Streptococcus agalactiae* (29,8%), *Streptococcus pyogenes* (11,7%) y *Corynebacterium* spp. (5,9 %) fueron los patógenos más frecuentes en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia (Ramírez *et al.*, 2018).

No obstante, se entiende que al comparar resultados entre diferentes estudios es necesario tener en cuenta otros muchos factores que influyen en la prevalencia de mastitis, pues el conjunto de los que son propios de cada rebaño probablemente es lo más influyente en la prevalencia de la infección (Dahl *et al.*, 2017), pues la mastitis es una enfermedad multifactorial, vinculada a la triada epidemiológica: animal (huésped), agente etiológico y ambiente (Boas da Silva *et al.*, 2023).

De particular importancia es la relación entre el diagnóstico de *Mollicutes* y de otros patógenos identificados en los procesos de mastitis ( $\chi^2= 0.042$ ). Se comprobó que *S. aureus* es el patógeno con mayor presencia en coinfección con *Mollicutes*, seguido por *Streptococcus* spp., aunque con un margen amplio de diferencia, en tanto el resto de los agentes identificados no difieren entre sí para esa condición ( $P<0,05$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4. Resultados bacteriológicos y su relación con el diagnóstico de *Mollicutes* en leche de vacas en rebaños de Zamora-Chinchipe.**

Patógeno (P)	Diagnóstico de <i>Mollicutes</i>		Total
	Cantidad de positivos (%)	Cantidad de Negativos	
<i>Staphylococcus aureus</i>	36 (43,80) <sup>a</sup>	46	82
<i>Streptococcus</i> spp.	18 (21,95) <sup>b</sup>	50	68
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	6 (7,32) <sup>c</sup>	23	29
<i>Staphylococcus coagulasa</i> positivo	5 (6,10) <sup>c</sup>	3	8
<i>Escherichia. coli</i>	1 (1,22) <sup>c</sup>	6	7
<i>Corynebacterium</i> spp.	1(1,22) <sup>c</sup>	5	6
<i>Proteus morgani</i>	0	3	3
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	1
Negativo	15 (18,29)	28	43
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>165</b>	<b>247</b>

<sup>abc</sup> Letras desiguales indican diferencia significativa,  $\chi^2= 0.042$  ( $P< 0,05$ ).

La elevada frecuencia de *S. aureus* en los cuadros de mastitis no solo constituye una amenaza para la salud animal en la provincia, sino también para la salud pública, pues se conoce su asociación con la emergencia de la resistencia antimicrobiana y su posible carácter zoonótico (Majumder *et al.*, 2023).

La patogénesis de *S. aureus* es un proceso dinámico que descansa en numerosos factores, como la composición genética y la respuesta inmune del hospedero, las condiciones geográficas, los factores de virulencia y la variabilidad genética de la bacteria (Sivakumar *et al.*, 2023).

La asociación del diagnóstico de *Mycoplasma* spp. con otros patógenos mayores en los procesos de mastitis en la provincia, y en mayor frecuencia con *S. aureus* ( $\chi^2= 0.042$ ,  $P<0.05$ ), reviste gran importancia, pues, aunque este patógeno se identificó en el 22,6% de las muestras de leche de las 247 vacas investigadas, en coinfección con *Mycoplasma* spp. su participación se incrementó al 43,8%.

El rol potencial de *Staphylococcus* spp. en las mastitis crónicas y recurrentes de difícil pronóstico y difíciles de tratar con antibióticos (Mphahlele *et al.*, 2020; Janus *et al.*, 2023, Walzl *et al.*, 2023) es un factor relevante al analizar su coinfección con Mollicutes en el presente estudio.

Los micoplasmas tienen un patrón de resistencia amplio, pues no son sensibles a los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos y las sulfonamidas, y solo son generalmente susceptibles a las drogas que interfieren con las proteínas (tetraciclinas, macrólidos, lincosamidos y florfenicol) o la síntesis de DNA (fluoroquinolonas) (Maunsell *et al.*, 2011).

A su vez la resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos, combinado con sus factores de virulencia, los mecanismos insuficientes de eliminación de los hospederos y la evasión a la respuesta inmune, inciden en que el patógeno pueda sobrevivir por períodos prolongados de tiempo en los hospederos (Walzl *et al.*, 2023).

Aislados de *S. aureus* en leche de vacas con mastitis han mostrado elevada incidencia de factores de virulencia con importante papel en la patogénesis de la enfermedad. Así, algunos de esos aislados se observan en rebaños cercanos, y se sugiere su vinculación a través de prácticas de manejo deficientes de los productores, la existencia de patógenos comunes en la misma área, la alimentación y el pastoreo conjunto de animales sanos y enfermos, y el comercio de animales entre rebaños (Sing *et al.*, 2023).

De manera que la coinfección de Mollicutes y *S. aureus* puede complicar el curso del proceso infeccioso en la ubre, comprometer su recuperación satisfactoria, y por tanto ser uno de los factores no identificados que incida en el curso epidemiológico desfavorable de la enfermedad en los rebaños y los fallos en su control en muchos lugares, como puede ocurrir en Zamora-Chinchipe.

Se reconoce que *Mycoplasma* spp. puede actuar como agente secundario que exacerba las infecciones preexistentes, pero también se ha señalado como agente primario que facilita la infección posterior con otros patógenos frecuentes en los cuadros de mastitis bovina (Deeney *et al.*, 2021). En este sentido, entre las áreas prioritarias de investigación básica respecto a *M. bovis* la necesidad de profundizar en la importancia de la coinfección con otros patógenos en relación con la progresión de la enfermedad por ese patógeno (Maunsell *et al.*, 2011).

El control de las mastitis por *M. bovis* falla regularmente cuando se basa solo en la detección de las infecciones intramamarias y la prevención de la transmisión vaca-vaca en el ordeño, porque a su recurrencia debido a la presencia de portadores asintomáticos, se suman la transmisión y

diseminación del patógeno por rutas adicionales a la mamarias, como son los aerosoles y la vía hematológica a partir de otras localizaciones del agente en la anatomía animal (Zadoks *et al.*, 2011). También por su sobrevivencia fuera del animal, porque puede persistir durante largos periodos de tiempo en estiércol, agua, arena y distintos materiales de la cama y convertirlo en un patógeno recurrente (Justice *et al.*, 2011). Es por ello que incluso se recomienda intentar la eliminación de los casos de mastitis por *M. bovis* mediante el sacrificio (Maunsell *et al.*, 2011).

Es importante destacar que para el sector lechero en su conjunto, la mastitis por *S. aureus* ocasiona las mayores pérdidas de leche debido a la amplia diseminación del patógeno y las pérdidas moderadas tanto por procesos de mastitis clínica como subclínica (Heikkilä *et al.*, 2018).

Identificar los patógenos asociados a mastitis en los rebaños es relevante para enfrentar su control, y en particular la conducta terapéutica a seguir. Con la intención por disminuir los riesgos de la resistencia antimicrobiana, en la actualidad se insiste en identificar si los patógenos presentes no ocasionan perjuicios productivos y hasta desaparecen en poco tiempo de la glándula mamaria, para solo indicar tratamiento con antibióticos en casos necesarios (Ruegg, 2018). Por lo tanto, es fundamental la detección de los patógenos presentes en cada rebaño, y evaluar su sensibilidad a los antibióticos, como parte de la estrategia de control de las mastitis (Hossain *et al.*, 2017).

La coinfección predominante entre *Mycoplasma* spp y *S. aureus* en los casos de mastitis subclínica en los rebaños investigados es evidencia de la repercusión que otros micoplasmas diferentes a *M. bovis* pueden tener en la manifestación de la enfermedad en los rebaños bovinos lecheros de Zamora-Chinchipec, por lo que se precisan más investigaciones para dilucidar las especies de mollicutes presentes y el papel de su coinfección con otros patógenos en los fallos en el control de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

La elevada frecuencia en vacas de la coinfección de Mollicutes con *Staphylococcus aureus* (43,80%) puede ser la causa del comportamiento clínico-epidemiológico desfavorable de la enfermedad en rebaños bovinos lecheros de Zamora-Chinchipec. También constituye una alerta sobre el papel que pueden tener otras especies de micoplasmas diferentes a *M. bovis* en el control de la mastitis, dada su resistencia reconocida a los antimicrobianos y el incremento de esta en otros patógenos mayores.

## REFERENCIAS

- Amer, S., Gálvez, F.L.A., Fukuda, Y., Tada, C., Ludeña, I.L., Valle, W.F.M. & Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *J. Vet. Med. Sci.*, 80(6), 861-868. <http://doi.10.1292/jvms.17-0504>
- Barreiro, J. R., Goncalves, J. L., Braga, P.A., Dibbern, A.G., Eberlin, M.N. Veiga Dos Santos, M. (2017). Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Dairy Sci.*, 100(4), 2928–2934, <http://doi.org/10.3168/jds.2016-11741>

- Blowey, R.W., Edmondson, P. (2010). *Mastitis Control in dairy herds*. 2nd ed. Oxfordshire, UK: CAB International, 152-170.
- Boas da Silva Bomfim, V., Costa Balieiro, A., Messias de Souza Ferreira da Costa, A.C., Teles Romeiro, E., de Souza Franco, E., Menezes Wanderley, M.L., de Oliveira Cortez Marinho, N.G. & Oliveira Farias, M.P. (2023). Factores de riesgo asociados a la mastitis bovina. *Rev. Ibero-Am. de Hum., Ciências e Educ.* São Paulo, 9(3). REASE. <http://doi.org/10.51891/rease.v9i3.8958>
- Cameron, M., Barkema, H.W., De Buck, J., De Vliegher, S., Chaffer, M., Lewis, J., Keefe, G.P. (2017). Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. *J. Dairy Science*, 100(3), 2137-2147. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12020>
- Castillo Duvergel, Y., Miranda, I. (2014). COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Rev. Protección Veg.*, 29(3), 231-234. ISSN: 2224-4697
- Citti, C., Blanchard, A. (2013). Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology*, 21(4), 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>
- Corp I. (2012). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0.0.0, IBM Corp Armonk, NY.
- Dahl, M.O., Maunsell, F.P., De Vries, A., Galvao, K.N., Risco, C.A. & Hernandez, J.A. (2017). Evidence that mastitis can cause pregnancy loss in dairy cows: A systematic review of observational studies. *J. of Dairy Sci.*, 1–8. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12711>
- Dalanezi, F.M., Joaquim, S.F., Guimarães, F.F, Guerra, S.T; Lopes, B.C., Schmidt, E.M.S., Cerri, R.L.A. & Langoni, H. (2020). Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 103:3648–3655 <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16841>
- Deeney, A.S., Collins, R. & Ridley, A.M. (2021). Identification of Mycoplasma species and related organisms from ruminants in England and Wales during 2005–2019. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03037-y>
- Fernandes, I., Guimaraes, N.R., Noyes, L.S. & Caixeta, V.S. (2021). Effect of subclinical mastitis detected in the first month of lactation on somatic cell count linear scores, milk yield, fertility, and culling of dairy cows in certified organic herds, *J. Dairy Science*, 104 (2),2140-2150. ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19153>.
- Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz, J.A. & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. SIMC, España. ISBN-978-84-614-7932-0

- Heikkilä, A. M., E. Liski, S. Pyorala & S. Taponen. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 101:9493–9504. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>
- Hossain, M.K., Paul, S., Hossain, M.M., Islam, M.R. & Alam, M.G.S. (2017). Bovine Mastitis and Its Therapeutic Strategy Doing Antibiotic Sensitivity Test. *Austin J Vet Sci & Anim Husband.*, 4(1), 1030. ISSN: 2472-3371. <http://www.austinpublishinggroup.com/>
- Janus, A., Deepa, P.M., Vergis, J., Habeeb, B.P., David, V & Vijayakumar, K. (2023). Epidemiological and clinico-etiological studies in recurrent bovine mastitis. *The Pharm. Inn. J.*, 12(3), 4213-4216. <https://www.thepharmajournal.com>
- Justice-Allen, A., Trujillo, J., Goodell, G., & Wilson, D. (2011). Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. *J. Dairy Sci.* 94, 3411-3419. <http://doi.org:10.3168/jds.2010-3940>
- Kirkeby, C., L. Zervens, N. Toft, D. Schwarz, M. Farre, S. Hechinger & Halasa, T. (2019). Transmission dynamics of *Staphylococcus aureus* within two Danish dairy cattle herds. *J. Dairy Sci.* 102:1428– 1442. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15106>
- Majumder, S., Sackey, T., Viau, C., Park, S., Xia, J., Ronholm, J. & George, S. (2023). Genomic and phenotypic profiling of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis for antibiotic resistance and intestinal infectivity. *BMC Microbiology*, 23, 43. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02785-1>
- Manzi, M.P., Joaquim, S.F., Guimarães, F.F., Bruder-Nascimento, A.C.M.O., Pantoja, J.C. & Langoni, H. (2018). Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. *Pesq. Vet. Bras.*, 38(4),665-669. <http://doi.10.1590/1678-5150-PVB-5192>
- Maunsell, .FP., Woolums, A.R., Francoz, D., Rosenbusch, R.F., Step, D.L., Wilson, D.J. & Janzen, E.D. (2011). *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. &, 25, 72–783. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0750.x>
- Mphahlele, M.P., Oguttu, J.W., Petzer, I.M. & Qekwana, D.N. (2020). Prevalence and antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from cow milk samples, *Veterinary World*, 13(12): 2736-2742. <http://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2736-2742>
- National Mastitis Council (NMC). (2014). Global Milk Quality. Procedures for Collecting Milk Samples. <http://www.nmconline.org/sampling.htm>
- Paramasivam, R., Raj Gopal. D., Dhandapani, R., Subbarayalu, R., Prabu Elangovan, M., Prabhu, B., Veerappan, V., Nandheeswaran, A., Paramasivam, S. & Muthupandian, S. (2023). Is AMR in Dairy Products a Threat to Human Health? An Updated Review on the Origin, Prevention, Treatment, and Economic Impacts of Subclinical Mastitis. *Infection and Drug Resistance*, 16. <https://doi.org/10.2147/IDR.S384776>

- Ramírez Vásquez, N., Fernández-Silva, J.A. & Palacio, L.G. (2018). Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Rev Med Vet.*, (36):7587. <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5173>
- Ramírez-Sanmartín, N., Rodrigo-Saa, L., Percedo-Abreu, M.I., Pérez-Castillo, A. & Lobo-Rivero, E. (2017). Detección de Mollicutes en leche de tanques procedentes de la provincia Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Rev. Salud Anim.*, (39), 3. ISSN: 2224-4697
- Rossetti, B., Frey, J. & Pilo, P. (2010). Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. *Mol Cell Probes*, 24, 321-323. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20561921/>
- Ruegg, P.L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.*, 100, 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Ruegg, P.L. (2018). Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. *Vet Clin Food Anim*, 34: 413–425 <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.06.002>
- Saa, L.R.; Perea A.; García-Bocanegra I.; Arenas A.J; Jara D.V.; Ramos R. & Carbonero A. (2012). Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod.*, 44, 645–649. <http://doi.1007/s11250-011-9948-4>
- Singh, K., Yadav, S., Mishra, K.K, Shrivastava, N., Ranjan, R., Shrivastav, A., Kumar Jha, A. & Kumar Singh, S. (2023). Incidence of virulence associated factors of *Staphylococcus aureus* isolates in subclinical bovine mastitis. *The Pharma Innovation Journal*, 12(3), 5164-5173 ISSN (E): 2277-7695. <http://www.thepharmajournal.com/>
- Sivakumar, R., Sree Pranav, P., Annamanedi. M., Chandrapriya, S., Isloor. S., Rajendhran, J. & Hegde, N.R. (2023). Genome sequencing and comparative genomic analysis of bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* strains from India. *BMC Genomics*, 24, 44. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-09090-7>
- Van Kuppeveld, F.J.M, Johansson, K.E., Galama, J.M.D., Kissing, J., Bölske, G., van der Logt, J.T.M. & Melchers, W.J.G. (1998). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied Environment Microbiol.*, 60,149-152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201282/>
- Walzl, A., Marbach, H., Belikova, D., Vogl, C., Ehling-Schulz, M., Heilbronner & S., Grunert, T. (2023). Prevalence of the SigB-Deficient Phenotype among Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Linked to Bovine Mastitis. *Antibiotics*, 12, 699. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040699>
- Woudstra, S., Wenthe, N., Zhang, Y., Leimbach, S., Gussmann, M.K., Kirkeby, C. & Krömker V. (2023). Strain diversity and infection durations of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus*

spp. causing intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 106:4214–4231.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2022-22942>

Zadoks, R.N., Middleton, J.R., McDougal, S., Katholm, J. & Schukken, Y.H. (2011). Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16, 357–372. <http://doi.10.1007/s10911-011-9236-y>

### **CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES**

Concepción y diseño de la investigación: NRS, LRS, ELR, MIPA; análisis e interpretación de los datos: NRS, LRS, ELR, APC, MIPA; redacción del artículo: NRS, LRS, ELR, MIPA.

### **CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.