



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**DETECCIÓN MOLECULAR DE  
*Streptococcus agalactiae* EN  
MUESTRAS DE LECHE MASTÍTICA  
EN BOVINOS DEL NORTE Y  
ORIENTE ANTIOQUEÑOS**

**Ximena Cardona Lopera**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Departamento de producción animal  
Medellín, Colombia  
2015



# DETECCIÓN MOLECULAR DE *Streptococcus agalactiae* EN MUESTRAS DE LECHE MASTÍTICA EN BOVINOS DEL NORTE Y ORIENTE ANTIOQUEÑOS

**Ximena Cardona Lopera**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias**

Director:

Ph.D. Julián Echeverri Zuluaga

Codirector:

Ph.D. Albeiro López Herrera

Línea de Investigación:

Mejoramiento y genética molecular

Grupo de Investigación:

Biodiversidad y Genética molecular "BIOGEM"

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de producción animal

Medellín, Colombia

2015



*A Juan Fernando*



## **Agradecimientos**

Mis más sinceros agradecimientos a la Cooperativa Colanta, por cederme tiempo para estudiar, especialmente a mi por siempre Jefe Francisco Uribe R., por esta oportunidad. A mi profesor Albeiro López H., por su forma de ser, por su paciencia y porque me enseñó algo más de la vida, algo más que Inmunología y Marcadores Moleculares. A mi profesor Julián Echeverry Z., por su humor negro, pero siempre comprensivo y dispuesto a ayudarme. Al Laboratorio de Genética Animal de la Universidad de Antioquia, por permitirme realizar las pruebas moleculares en sus instalaciones. Muchas gracias al profesor Iván Soto, por regalarme un poco de su valioso tiempo para resolver mis dudas. A Diana Macias, mi compañera del Dpto. de Control y Calidad, muchas gracias por compartir conmigo su conocimiento. Y el más tierno y sentido agradecimiento a Valentina Madrid Calderón, mi amiga, mi compañera, el motor que siempre estuvo y está diciéndome “si se puede”, siempre ahí ayudándome, impulsándome a terminar. Y a cada uno de los compañeros del grupo Biogem que me ayudaron a resolver mis dudas, gracias por su tiempo.





## Resumen

La mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria, caracterizándose por producir cambios en el tejido (hinchazón, temperatura elevada, dolor, endurecimiento), y cambios físicos y químicos de la leche como decoloración, presencia de coágulos y presencia de un alto número de leucocitos. En la mayoría de las ocasiones es debida a agentes infecciosos. Es la enfermedad más común del ganado lechero y la que representa más pérdidas económicas para los productores de leche de todo el mundo. En Estados Unidos las pérdidas vaca/año se calculan en USD 200. Las malas prácticas que se dan al momento de llevar a cabo el proceso de ordeño, permiten la infección de la glándula mamaria por parte de agentes patógenos como el *Streptococcus agalactiae*, conocido como uno de los principales agentes etiológicos de la mastitis clínica y subclínica en los bovinos. Es altamente contagioso entre las vacas, causando una de las mayores elevaciones en el Recuentos de Células Somáticas (RCS) comparado con otros patógenos.

La prueba California Mastitis Test (CMT) es el método tradicional para detectar infecciones de la glándula mamaria bovina en condiciones de campo, sin embargo, no identifica el tipo de patógeno causante de la enfermedad. La prueba para la identificación de patógenos causantes de infecciones de la glándula mamaria considerada la prueba “*gold standard*”, es el cultivo *in vitro* de la leche. La técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se basa en la detección y amplificación de secuencias específicas de cualquier genoma.

Los objetivos principales de esta tesis fueron realizar la identificación de la bacteria causante de mastitis *Streptococcus agalactiae* a través de la técnica molecular PCR a partir de muestras de leche proveniente de cuartos de hembras bovinas afectados con mastitis clínica y/o subclínica grado 3; evaluar la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* confrontado con el cultivo *in vitro* de leche, y estimar la frecuencia del *S. agalactiae* diagnosticado por la técnica PCR y cultivo bacteriológico en los hatos del norte y oriente antioqueños.

Se analizaron 297 muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas diagnosticados por la prueba CMT con mastitis clínica y subclínica grado 3, procedentes de 13 municipios del norte y oriente antioqueño.

Se estandarizaron las técnicas de biología molecular como la extracción de ADN bacteriano a partir de leche y la PCR, obteniéndose un fragmento de 586 pb del gen 16S rRNA en las muestra positivas para la presencia de *S. agalactiae*.

Mediante tablas de contingencia se evaluó la sensibilidad y la especificidad de la PCR en comparación con la prueba de cultivo *in vitro* de leche para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae*. El resultado de sensibilidad y especificidad de la PCR fue de 60% y 87.3%, respectivamente. Los resultados también indicaron que la extracción de ADN bacteriano utilizando el kit es el más acertado para procesos moleculares.

Se estimó una frecuencia de *Streptococcus agalactiae* diagnosticado por las técnicas PCR y cultivo microbiológico de las muestras de leche y se halló una frecuencia del patógeno de 31% (92 muestras positivas) por PCR y de 38.7% (115 muestras positivas) por cultivo *in vitro*, en los 13 municipios donde se tomaron muestras. Se realizó una comparación de frecuencia de Chi cuadrado para analizar si existían diferencias de frecuencia del patógeno entre los 13

municipios donde se obtuvieron las muestras. La prueba arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la frecuencia del *S. agalactiae* entre los diferentes municipios, pero no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre la frecuencia evaluada en las dos zonas geográficas (norte y oriente antioqueño).

**Palabras clave:** Mastitis bovina, *Streptococcus agalactiae*, diagnóstico molecular, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## Abstract

Bovine mastitis is defined as inflammation of the mammary gland, characterized by producing tissue changes (swelling, elevated temperature, pain, hardening), and physical and chemical changes such as discoloration of the milk, the presence of clots and the presence of a high number of leukocytes. In most cases it is due to infectious agents. It is the most common disease of dairy cattle and representing more economic losses for dairy producers worldwide. In the US cow / year losses estimated at USD 200. The bad practices that occur when conducting the milking process, allow mammary gland infection by pathogens such as *Streptococcus agalactiae*, known as a major etiologic agents of clinical and subclinical mastitis in cattle. It is highly contagious among cows, causing one of the highest elevations in Somatic Cell Counts (SCC) compared to other pathogens.

California Mastitis Test Test (CMT) is the traditional method to detect infections of the bovine mammary gland under field conditions, however, does not identify the type of pathogen causing the disease. The test for the identification of pathogens causing infections of the mammary gland is considered the "*gold standard*" test is the *in vitro* culture of milk. The molecular technique Polymerase Chain Reaction (PCR) is based on the detection and amplification of specific sequences of any genome.

The main objectives of this thesis were performed to identify the causative bacterium *Streptococcus agalactiae* mastitis through PCR molecular technique

from milk samples from affected quarters of female cattle with clinical and / or subclinical mastitis grade 3; I evaluate the sensitivity and specificity of PCR for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* confronted with *in vitro* culture of milk, and estimate the frequency of *S. agalactiae* diagnosed by PCR technique and bacteriological culture herds in northern and eastern Antioquia.

297 milk samples from female cattle quarters of the CMT test diagnosed with clinical and subclinical mastitis grade 3, from 13 municipalities in northern and eastern Antioquia were analyzed.

Molecular biology techniques were standardized as bacterial DNA extraction from milk and PCR, yielding a 586 bp fragment of the 16S rRNA gene in the positive sample for the presence of *S. agalactiae*.

By contingency tables sensitivity and specificity of PCR compared with culture *in vitro* test milk for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* was evaluated. The results of sensitivity and specificity of the PCR was 60% and 87.3%, respectively. The results also indicated that the extraction of bacterial DNA using the kit is the most successful for molecular processes.

*Streptococcus agalactiae* frequency diagnosed by PCR techniques and microbiological culture of milk samples pathogen and a frequency of 31% (92 positive samples) by PCR and 38.7% (115 positive samples) was found by *in vitro* culture was estimated in the 13 municipalities where samples were taken. A comparison of frequency of Chi square was used to analyze whether there were differences between the frequency of pathogen 13 municipalities where the samples were obtained. The test showed that there is statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in the frequency of *S. agalactiae* among the different municipalities, but no statistical difference ( $P \text{ found} > 0.05$ ) between the frequency evaluated in the two geographical areas (northern and eastern Antioquia).

**Keywords:** Bovine mastitis, *Streptococcus agalactiae*, molecular diagnostics, Polymerase Chain Reaction (PCR).

# Contenido

Resumen.....	IX
Abstract.....	XII
Lista de figuras.....	XVII
Lista de tablas .....	XVIII
Introducción .....	1
<b>1. Objetivos.....</b>	<b>7</b>
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
<b>2. Marco teórico y estado de arte.....</b>	<b>9</b>
2.1 Mastitis bovina .....	9
2.2 Importancia del control de la mastitis en la industria lechera .....	11
2.3 Etiología y la respuesta inflamatoria .....	15
2.4 Principales microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras .....	16
2.5 Microorganismos causantes de la mastitis contagiosa .....	17
2.6 Microorganismos causantes de la mastitis ambiental .....	19
2.7 Prevalencia de los principales microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras en Colombia .....	20
2.8 Métodos de diagnóstico.....	21
2.8.1 Pruebas físico-químicas.....	22
2.8.2 Pruebas Biológicas .....	24
2.8.3 Métodos de conteo electrónico celular .....	27
2.8.4 Diagnóstico microbiológico .....	27
2.8.5 Diagnósticos moleculares .....	28
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>31</b>
3.1 Estandarización de las técnicas de biología molecular (extracción de ADN bacteriano a partir de leche, PCR) que permitan la identificación de la presencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> en muestras de leche proveniente de cuartos bovinos afectados por mastitis. ....	31
3.1.1 Unidades experimentales. ....	31
3.1.2 Extracción de ADN bacteriano. ....	32
3.1.3 Cuantificación y determinación de pureza del ADN obtenido. ....	33
3.1.4 Amplificación por PCR para <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	34
3.1.5 Detección de productos de PCR.....	34
3.2 Evaluar la especificidad y la sensibilidad de la técnica PCR para el diagnóstico de <i>Streptococcus agalactiae</i> en muestras de leche, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia. ....	35

3.2.1	Unidades experimentales.....	35
3.2.2	California Mastitis Test – CMT.....	35
3.2.3	Procedimiento para la colecta de las muestras de leche. ....	36
3.2.4	Cultivo bacteriológico para <i>S. agalactiae</i> . ....	37
3.2.5	Extracción de ADN bacteriano.....	37
3.2.6	Análisis estadístico.....	38
3.3	Determinar la frecuencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> en hatos del norte y oriente antioqueño.....	40
3.3.1	Unidades experimentales.....	40
3.3.2	Análisis estadístico.....	41
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>43</b>
4.1	Estandarización de las técnicas de biología molecular (extracción de ADN bacteriano a partir de leche, PCR) que permitan la identificación de la presencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> en muestras de leche proveniente de cuartos bovinos afectados por mastitis.....	43
4.1.1	Extracción de ADN de muestras de leche. ....	43
4.1.2	Evaluación de la eficiencia de las dos metodologías de extracción de ADN...44	
4.1.3	PCR para el diagnóstico de la presencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....45	
4.2	Evaluar la especificidad y la sensibilidad de la técnica PCR para el diagnóstico de <i>Streptococcus agalactiae</i> en muestras de leche, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia. ....	46
4.2.1	Análisis estadístico para la evaluación de la especificidad y la sensibilidad de la técnica PCR para el diagnóstico de <i>Streptococcus agalactiae</i> en muestras de leche, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia. ....48	
4.3	Determinar la frecuencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> en hatos del norte y oriente antioqueño.....	54
<b>5.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>69</b>



## Lista de figuras

**Figura 1.** Interpretación de la prueba de diagnóstico California Mastitis Test (CMT)..... 26

**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% en el que se observa el ADN total extraído de 8 muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica. .... 44

**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos de PCR para el diagnóstico de *S. agalactiae* de 10 muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica.. .... 46

**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de amplificadores obtenidos por PCR para diagnóstico de *S. agalactiae* de muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica y/o subclínica grado 3. .... 47

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Cambios en la composición de la leche bovina debida a un recuento alto de células somáticas (modificado de Fokko, 2006). .....	12
<b>Tabla 2.</b> Factores predisponentes y asociados con la presencia de mastitis bovina que deben considerarse para determinar su impacto económico. (Modificado De Villagómez y Cervantes, 2013). .....	14
Tabla 3. Interpretación del número de células somáticas en leche mediante la Prueba de Wisconsin para Mastitis. (Tomado de Hernández, 2009). .....	26
<b>Tabla 4.</b> Tabla de contingencia para los resultados del estudio. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Municipios del norte y oriente de Antioquia donde se colectaron las muestras de leche bovina provenientes de cuartos positivos por CMT a mastitis clínica y/o subclínica grado 3.....	40
<b>Tabla 6.</b> Concentración y calidad del ADN obtenido de 8 muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica, mediante dos metodologías de extracción. ....	45
<b>Tabla 7.</b> Resultados de las dos metodologías empleadas (PCR y cultivo bacteriológico) para el diagnóstico de <i>S. agalactiae</i> en 297 muestras de leche. ....	48
<b>Tabla 8.</b> Tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR para diagnóstico de <i>S. agalactiae</i> . ....	49
Tabla 9. Tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR para diagnóstico de <i>S. agalactiae</i> solo de las muestras de leche donde se extrajo el ADN con Fenol:cloroformo. ....	51
<b>Tabla 10.</b> Tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR para diagnóstico de <i>S. agalactiae</i> solo de las muestras de leche donde se extrajo el ADN con el kit DNeasy blood and tissue Qiagen®. ....	53
<b>Tabla 11.</b> Resultados de diagnóstico por PCR para <i>S. agalactiae</i> de muestras de leche tomadas de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica y/o subclínica grado 3, provenientes de diferentes municipios del norte y oriente antioqueño.....	55

## Introducción

La mastitis bovina es la inflamación del parénquima de la glándula mamaria, caracterizada por cambios del tejido, y cambios físicos y químicos de la leche, donde los más importantes son hinchazón, temperatura elevada, dolor y endurecimiento de la glándula mamaria, y en el caso de la leche, decoloración, presencia de coágulos y presencia de un alto número de leucocitos (Ballou, 2011). Es causada por diferentes agentes infecciosos, que entran en el ambiente estéril de la glándula mamaria a través del esfínter del pezón, requiriendo las defensas del huésped prontas y apropiadas para prevenir la colonización y la patología de la enfermedad. Estos agentes infecciosos comúnmente están divididos en los agentes contagiosos de mastitis que se propagan de un cuarto de la ubre infectado a otro cuarto y entre vacas y los agentes ambientales los cuales están presentes usualmente en el medio y pueden llegar a colonizar la ubre (Zadoks, 2014). Es una enfermedad costosa y compleja de origen y gravedad variable, resultado del entorno, el patógeno y el estatus inmunitario de la vaca (DeVliegher *et al.* 2012).

El control de la mastitis es importante, dado que de esta condición sanitaria se derivan pérdidas financieras, efectos adversos, el bienestar de las vacas y posibles influencias en la salud pública. Las pérdidas financieras resultantes de la mastitis clínica surgen de los costos del tratamiento, servicios profesionales de médico veterinario y operarios, disminución de la producción, en la calidad y en el valor de la leche, descarte de leche, muerte y descarte temprano de hembras bovinas. El volumen de leche dejado de producir va de acuerdo a la severidad de la infección mamaria y oscila entre 2.8 y 45% de la producción por cuarto/día (Philpot, 2001). Algunos estudios calculan que por cada duplicación en el RCS por encima de 100.000 células/mL, hay una pérdida aproximadamente del 5% en

la producción de leche de la vaca afectada (Keefe y Chaffer, 2010). Estas pérdidas pueden llegar a representar aproximadamente el 38% de los costos directos totales de la producción (Green, 2003). Se estima que un hato lechero en apariencia sano tiene entre 15 y 45 % de sus vacas en producción con mastitis subclínica en algún momento de su periodo de producción y que la capacidad potencial para producir leche se reduce hasta en un 35% (Wattiaux, 2013). Se han estimado unas pérdidas totales anuales por mastitis equivalente a 1,3 kg de leche por vaca presente en el hato, así como 267 kg por cada caso de mastitis clínica (Villagómez y Cervantes, 2013).

Se ha encontrado para Colombia la mastitis como el principal factor depresor de la cantidad y la calidad de la producción de leche (Rodríguez, 2006). Martínez en 2006 calculó que la leche dejada de producir a causa de la mastitis bovina costaba COP 41.580 diarios por finca en diez hatos de la Sabana de Bogotá. Pinzón *et al.* 2009, en el departamento de Boyacá, estimaron una pérdida económica de COP 1´130.226/día por concepto de la leche dejada producir por vacas con mastitis clínica y subclínica en 34 sistemas productivos, y Trujillo *et al.* 2011, estimaron pérdidas de COP 4´608.000 mensuales en siete hatos en el departamento de Antioquia.

A pesar de ello, los ganaderos parecen ignorar el problema de la mastitis o lo consideran como un efecto transitorio. El mal manejo que se da al momento de llevar a cabo los procesos de ordeño bien sea en forma manual o mecánica, ha permitido la persistencia de una serie de agentes patógenos causantes de mastitis clínica contagiosa como son: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma bovis*, y de mastitis ambiental como son: *Streptococcus* incluido el *S. uberis* y *S. dysgalactie* y coliformes ambientales incluidos bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium* (Rossitto *et al.* 2002). Los patógenos que causan la mastitis de tipo clínica causan las mayores agresiones del tejido mamario en detrimento de la producción de leche (Riekerink *et al.* 2006).

El *Streptococcus agalactiae* es conocido como uno de los principales agentes etiológico causante de la mastitis clínica y subclínica en los bovinos (Dmitriew *et al.* 2002). Es altamente contagioso entre las vacas, diseminándose principalmente durante el ordeño, ya que puede sobrevivir por periodos cortos en las manos del ordeñador, equipos de ordeño y otros instrumentos (por ejemplo, en las toallas para lavado y secado). Después de su transmisión, coloniza la piel del pezón y logra el acceso a la ubre a través del esfínter donde es capaz de crecer y multiplicarse (Keefe y Chaffer, 2010). La infección con este patógeno tiene un impacto significativo en la calidad de la leche, causando una de las mayores elevaciones en el RCS comparado con otros patógenos (Keefe y Chaffer, 2010). Esto a nivel de finca se traduce en menor pago por litro de leche. A nivel nacional no existe ninguna legislación que penalice el precio de la leche por alto RCS, sin embargo, la industria lechera puede realizar bonificaciones voluntarias para leche con bajos niveles de células somáticas. Para la industria de lácteos, el alto RCS se convierte en productos de menor calidad, menor tiempo de vida en anaquel y el acceso denegado a mercados internacionales con estándares más exigentes. Además del impacto directo en la calidad y el precio de la leche, el efecto primario es la pérdida de la producción. Es un patógeno prevalente en los tanques de enfriamiento de la industria lechera colombiana (Keefe y Chaffer, 2010). Ramírez *et al.* 2010, realizaron 521 aislamientos microbiológicos de muestras de leche del norte de Antioquia y reportaron *S. agalactiae* en el 31.3 % de los cultivos realizados, siendo el patógeno de mayor frecuencia. Ramírez *et al.* 2011, efectuaron 648 cultivos de muestras de leche provenientes del norte de Antioquia, de las cuales 23.9% fueron negativas, 34% positivas a *Streptococcus agalactiae* y 10.2% a *Staphylococcus coagulasa* negativo. Otro estudio en lechería especializada fue realizado por Becerra *et al.* 2014, llevado a cabo en el Altiplano Boyacense donde se evaluaron 5396 cuartos, en 1349 vacas en ordeño, donde se aislaron principalmente *Streptococcus agalactiae* (9.7%); otros *Streptococcus* (4.1%); *Staphylococcus aureus* (8.3%); otros *Staphylococcus Coagulasa Positiva* (0.55%); *Staphylococcus Coagulasa*

Negativa (0.46%); *Actinomyces piogenes* (1.3%); Levaduras (0.7 %); *Escherichia coli* (0.6%); *Corynebacterium* (0.6%); mixtos *Streptococcus* + *Staphylococcus* (0.8%); otras mixtas (4.5%); *Acholeplasma* (1.4%) y *Mycoplasmas spp.* (2.2%).

El monitoreo de salud de la ubre es un reto en la ganadería, las pruebas de diagnóstico precisas son esenciales para la pronta detección de patógenos específicos de mastitis subclínica y clínica, para iniciar tratamientos de los animales infectados y reducir el riesgo de nuevas infecciones. Sin embargo, una alta proporción de mastitis no es detectable por palpación de la ubre, ni por examen visual de la leche, el diagnóstico de esta depende de pruebas indirectas las cuales dependen del contenido de leucocitos en la leche. Hay una amplia gama de procedimientos para diagnosticar la mastitis con diferentes fundamentos, donde algunos de ellos se basan en detección de anomalías de la ubre y la leche tales como cambios del color de la leche, aparición de grumos, coágulos sanguinolentos, coágulos con pus, o una leche más acuosa (Pérez *et al.* 2005); y marcadores de inflamación que incluyen el examen físico y clínico de la ubre, el recuento de células somáticas, el California Mastitis Test (CMT), la prueba de conductividad eléctrica, el medidor de pH, la prueba de NaOH y la medición de D - glucosaminidasa N-acetil-b (NAG-asa), y la lactatodeshidrogenasa (LDH). Otros tipos de diagnóstico más específicos son las técnicas de identificación directa e indirecta. Las técnicas de identificación directa se basan en el aislamiento y la identificación del patógeno causante de mastitis, como es el cultivo bacteriológico de leche, las pruebas bioquímicas y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); y las técnicas de identificación indirecta se basan en la búsqueda de anticuerpos como es el caso del Elisa.

Las pruebas diseñadas para la identificación de un (os) patógeno (s) en cualquier enfermedad infecciosa, y por ende en infecciones de la glándula mamaria, es el cultivo *in vitro* de la leche, considerada la prueba “*gold standard*”, técnica compleja, ya que demanda 1) tiempo: lento crecimiento del organismo (en algunos casos, hasta 14 días para obtener colonias visibles), 2) medios de cultivo

y condiciones de incubación especializados, y 3) pruebas adicionales (bioquímicas) para identificación (Khodakaram-Tafti y López, 2004). La técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) se basa en la detección y amplificación de secuencias específicas del genoma de cualquier organismo, es un método de identificación rápido (horas o máximo 1 ó 2 días), y en particular tiene la ventaja de ser muy específica y sensible, no necesita etapa de cultivo y pueden discriminar entre organismos estrechamente relacionados, tales como *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*, lo cual no es posible por el método bacteriológico tradicional (Riffon *et al.* 2001). No depende de la viabilidad de los microorganismos y sólo necesita nanogramos de ADN del organismo a identificar para amplificar fragmentos específicos presentes en el genoma. Se ha demostrado que las muestras de leche sirven como sustrato para la obtención del ADN tanto de los agentes patógenos presentes en la glándula mamaria, como del animal (Cremonesi *et al.* 2006). Los avances logrados en la optimización de protocolos para la extracción de ADN (McNevin *et al.* 2005) y la presencia en el mercado de kits específicos para extracción han popularizado la leche como muestra de elección utilizada para técnicas de análisis molecular. Esta posibilidad puede permitir la identificación por PCR de bacterias causantes de mastitis a partir de muestras de leche. La PCR se ha convertido en la principal tecnología y el método estándar en muchos diagnósticos de patógenos en humanos, animales y plantas (Mackay, 2004).

Adicional a ello, la leche es un fluido de fácil colección, una alternativa que posee múltiples ventajas frente a la toma de muestras de sangre, tejido por excelencia para la obtención de material genético de calidad (Smith y Burgoyne, 2004), especialmente en ocasiones donde la toma de este tipo de muestras representa gran dificultad, como es el caso de individuos de temperamento fuerte, puede desencadenar situaciones de estrés para los animales y en algunas especies, dadas las características del hemograma, la coagulación de la sangre es muy rápida (Burgos *et al.* 2007). Considerando las dificultades mencionadas, es

necesario utilizar otros tejidos o fluidos que puedan contener ADN, como lo es la leche, además de ser considerada como una técnica de muestreo no invasiva (Amory *et al.* 2007).

El diagnóstico molecular podría ser la técnica más adecuada para la identificación de agentes causantes de mastitis como el *S. agalactiae* y cualquier otro patógeno, incluso los que son difíciles de detectar por métodos convencionales. Diagnósticos basados en la PCR pueden ofrecer ventajas significativas sobre otros diagnósticos por su velocidad y su sensibilidad cuando se utiliza para la detección de patógenos de mastitis. La técnica de PCR se dirige al reconocimiento del ADN de un patógeno de mastitis específico o puede identificar más de uno (PCR múltiple). Dependiendo de la técnica de PCR se pueden clasificar los patógenos de forma cualitativa evidenciando la presencia o ausencia del ADN del patógeno, o de forma semi-cuantitativos usando técnicas de PCR en tiempo real cuantitativas (Mahmmod, 2013; Ruiz *et al.* 2013). Un diagnostico que elimine los falsos positivos, que no dependa de las concentraciones ni la viabilidad de los microorganismos, agilizará la identificación del patógeno, la selección del antimicrobiano con propósitos de terapia, disminuirá el uso innecesario de antibióticos y permitirá la supervisión de la infección en el hato, cuantificar su impacto, elaborar planes de control acordes con la patogénesis de la bacteria y determinar patrones de distribución de la misma en nuestras condiciones tropicales de producción.



# 1. Objetivos

## Objetivo General

Evaluar la especificidad y la sensibilidad de la técnica PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia.

## Objetivos Específicos

- Estandarizar las técnicas de biología molecular (extracción de ADN bacteriano a partir de leche, PCR) que permitan la identificación de la presencia de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche proveniente de cuartos bovinos afectados por mastitis.
- Determinar la frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en hatos del norte y oriente antioqueño.



## **2. Marco teórico y estado de arte**

### **2.1 Mastitis bovina**

La mastitis es una inflamación del parénquima de la glándula mamaria, caracterizada por cambios físicos y químicos de la leche y patológicamente en cambios del tejido de la glándula mamaria. El cambio más importante en la leche incluye la decoloración, la presencia de coágulos y la presencia de un alto número de leucocitos e hinchazón, cambios de temperatura, dolor y endurecimiento de la glándula mamaria en los casos de mastitis clínica (Ballou, 2011). Sin embargo, una alta proporción de mastitis no es detectable por palpación de la ubre, ni por examen visual de la leche, el diagnóstico de esta depende de test indirectos los cuales dependen del contenido de leucocitos en la leche. Esta es una enfermedad costosa y compleja de origen y gravedad variable, resultado del entorno, el patógeno y el estatus inmunitario de la vaca (DeVliegher *et al.* 2012).

La mastitis bovina es causada por diferentes agentes infecciosos, que entran en la glándula mamaria, requiriendo las defensas del huésped prontas y apropiadas para prevenir la colonización y la patología de la enfermedad posterior. Estos agentes infecciosos comúnmente están divididos en los agentes contagiosos de mastitis que se propagan de un cuarto de la ubre infectado a otro cuarto y entre vacas y los agentes ambientales los cuales están presentes usualmente en el medio y pueden llegar a colonizar la ubre (Zadoks, 2014).

Los principales patógenos causantes de mastitis clínica contagiosa son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, y de mastitis ambiental las especies de *Streptococcus* incluido el *S. uberis* y *S. dysgalactie* y coliformes ambientales incluidos bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium* (Rossitto *et al.* 2002).

En segundo orden están algunos patógenos que por lo general se encuentran en el canal del pezón y en la glándula mamaria y no causan mastitis clínica, pero al romperse el equilibrio estas bacterias pueden llegar a causar mastitis, entre estas *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium bovis* y *Corynebacterium pyogenes* (Radostits *et al.* 2002).

Los diversos agentes patógenos que pueden causar mastitis inducen diferentes respuestas inmunes en la glándula mamaria, y por lo tanto, el hospedero exige respuestas muy específicas de protección (Wellnitz *et al.* 2011). También existen factores de la vaca que son incluidos como riesgos o la pueden hacer más susceptible a contraer esta patología tales como la edad, la etapa de la lactancia, y la puntuación de células somáticas (SCC) y su historia (Contreras *et al.* 2011).

La variación en la prevalencia y cantidad de organismos causantes de mastitis, y la variación en las respuestas del hospedero hacen de la mastitis una enfermedad compleja que sigue siendo una carga económica para la industria láctea.

## **2.2 Importancia del control de la mastitis en la industria lechera**

El control de la mastitis es importante para la industria lechera, dado que de esta condición sanitaria se derivan pérdidas financieras, efectos adversos, el bienestar de las vacas y posibles influencias en la salud pública, como consecuencia se ha encontrado para Colombia la mastitis como el principal factor depresor de la cantidad y la calidad de la producción de leche (Rodríguez, 2006).

Las pérdidas financieras resultantes de mastitis clínica surgen de los costos del tratamiento, selección, muerte, disminución de la producción y en el valor de la leche, estas pérdidas por mastitis clínicas pueden llegar a representar aproximadamente el 38% de los costos directos totales de la producción (Green, 2003). Se estima que un hato lechero en apariencia sano tiene entre 15 y 45% de sus vacas en producción con mastitis subclínica en algún momento de su periodo de producción y que la capacidad potencial para producir leche se reduce hasta en un 35 % (Wattiaux, 2013). Se han estimado unas pérdidas totales anuales por mastitis equivalente a 1,3 kg de leche por vaca presente en el hato, así como 267 kg por cada caso de mastitis clínica (Villagómez y Cervantes, 2013).

Las afecciones que sufre el tejido mamario a causa de la mastitis, se ubican como la tercera causa de descarte de vacas en producción (Fokko, 2006) puesto que se ven alterados la productividad y la calidad de la leche, aumenta el conteo de células somáticas por mililitro, aparecen sabores rancios debido a la acción de las lipasas, sabores agrios debido a la acción de las enzimas proteolíticas y sabores salados debido al exceso de sodio y cloro, esto se debe a que la infección daña las células de las membranas, permitiendo mayor transmisión de minerales de la sangre a la leche y como consecuencia se obtiene un efecto negativo sobre el

sabor de la leche. La caseína, importante para fabricar queso, disminuye y el suero proteínico aumenta (Tabla 1) (Fokko, 2006).

La incidencia de mastitis afectan las concentraciones de algunas vitaminas hidrosolubles, en especial la riboflavina y el ácido ascórbico, que declinan en un 10-50%. Estos cambios en el perfil de las vitaminas de la leche afecta la capacidad de fermentación, alterando la producción de leches acidificadas, yogur y quesos (Calderón *et al.* 2011).

**Tabla 1.** Cambios en la composición de la leche bovina debida a un recuento alto de células somáticas (modificado de Fokko, 2006).

<b>Característica</b>	<b>Leche normal</b>	<b>Leche con RCS alto</b>
Agua	86,6%	Aumenta
Materia seca	13,4%	disminuye
Proteína	3,5%	Poca variación
Suero proteínico	0,6%	Aumenta
Grasa	4,4%	Disminuye
Otras proteínas	0,1%	Poca variación
Minerales	0,8%	Aumenta cloruro/sodio Disminuye calcio/potasio
Lactosa	4,6%	Disminuye
Células bacterias, enzimas, vitaminas	0,1%	Aumenta
Caseína	2,8%	Disminuye

No se debe subestimar el impacto de la mastitis bovina y su reflejo en la salud pública, dado que el indiscriminado uso de antibióticos comúnmente empleados como tratamiento pueden aumentar el riesgo de cepas de bacterias resistentes

que pueden afectar la salud humana, así mismo microorganismos zoonóticos pueden migrar de la leche bovina contaminada al consumidor final (White y McDermott, 2001). Para conocimiento de esta situación se evidencian técnicas tales como el conteo de células somáticas y antibiogramas para lograr un tratamiento más puntual.

En Colombia ha sido difícil llegar a un consenso acerca del impacto económico de la mastitis debido a las variaciones de los sistemas de producción, esta variación se ve favorecida por diversas externalidades, así como las asimetrías en los costos y en los precios corrientes (Tabla 2). Ramírez *et al.* 2011, en un estudio realizado en la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia con 421 animales, encontró que las vacas que tuvieron más de seis meses de lactancia presentaron un Odds Ratio (OR) (medida de probabilidad) de 2,65 en comparación con las de un mes de lactancia ( $p < 0,05$ ). Se halló un OR de 1,24 para la asociación de la edad y la mastitis ( $p < 0,05$ ). Para el lavado de manos se encontró un OR de 0,36 en comparación con no hacerlo ( $p < 0,05$ ), concluyendo que el porcentaje relativamente alto de vacas y de cuartos afectados con mastitis hallado en la zona podría estar relacionado con algunas deficiencias en la rutina de ordeño. Otro estudio descrito por Trujillo *et al.* 2011 menciona mayor frecuencia de mastitis en hatos con ordeño mecánico con un 61.2% vacas y 30% de cuartos afectados, con 4.7% de cuartos con mastitis clínica, que en aquellos con ordeño manual con 48% vacas, 23.6% de cuartos y 3.6% mastitis clínica.

**Tabla 2.** Factores predisponentes y asociados con la presencia de mastitis bovina que deben considerarse para determinar su impacto económico. (Modificado De Villagómez y Cervantes, 2013).

Intrínsecos	Extrínsecos
✓ Edad/número de parto.	✓ Condiciones ambientales (temperatura, humedad, precipitación pluvial).
✓ Raza.	✓ Estrés calórico.
✓ Influencia del potencial genético y la producción de leche.	✓ Época del año.
✓ Momento de la lactancia.	✓ Tamaño del hato.
✓ Duración de la lactancia.	✓ Características del aire, agua, suelo.
✓ Estado reproductivo/etapa en la gestación.	✓ Presencia de microorganismos patógenos en la ubre y en el ambiente.
✓ Temperamento de la vaca.	✓ Estimulación del sistema mamario y atención de la vaca antes y durante el ordeño.
✓ Volumen de producción láctea.	✓ Manejo e higiene antes, durante y después del ordeño.
✓ Características anatómicas e histológicas de la ubre.	✓ Influencia del equipo de ordeño (vacío, pulsación y sobreordeño).
✓ Compromiso, limitaciones y deficiencias en el sistema inmunológico.	✓ Procedimiento y rutina del ordeño.
✓ Deficiencias nutricionales (energía, proteína, minerales, vitaminas).	✓ Mantenimiento del equipo de ordeño y su calibración.
	✓ Frecuencia del ordeño.
	✓ Medidas y frecuencia de diagnóstico, prevención y control de la mastitis.
	✓ Medidas de prevención y control de la mastitis al momento del secado.
	✓ Manejo de la mastitis clínica.



## 2.3 Etiología y la respuesta inflamatoria

La complejidad de la mastitis es un reflejo de la variabilidad de los agentes causantes y la magnitud de la respuesta inmunológica a estos patógenos, lo que condiciona los métodos de control y erradicación de la enfermedad esto debido a la gran cantidad de patógenos mastitogénicos que no hacen posible un tratamiento común para todos los casos.

Dentro de las clasificaciones más comunes está la que se refiere a mastitis clínica y subclínica. La primera es aquella en la que se presentan signos clínicos, que desencadenan sintomatología sistémica como fiebre, inapetencia y decaimiento; la glándula muestra signos de inflamación (rubor, calor, edema, dolor) y, en algunos casos, llega a estados de fibrosis con pérdida de la función por atrofia de los alvéolos galactóforos. Por su parte, la leche toma aspecto sanguinolento, con coágulos, grumos y notoria disminución de la producción (Calderón *et al.* 2011; Echeverri *et al.* 2010).

La glándula mamaria bovina está equipada con una barrera anatómica, no inmune, para evitar la entrada de patógenos, en la mayoría de los casos, las bacterias causantes de la mastitis entran a la glándula mamaria atravesando estas barreras a través del canal del pezón, para colonizar el parénquima, desencadenando una plétora de mecanismos de defensa inmune que incluyen las respuestas innatas y adaptativas. La inmunidad innata no es específica pero es de cinética rápida como la acción de la lactoferrina, inmunolactoperoxidasa, lisozima, fracciones del complemento y otros compuestos químicos; mientras que la inmunidad adaptativa ofrece una respuesta muy específica con una cinética relativamente tardía, esta respuesta puede ser de tipo humoral con inmunoglobulinas y otros factores solubles o de base celular (células somáticas), incluyendo el sistema fagocítico como macrófagos y neutrófilos (PMN), y células del sistema linfóide como linfocitos T, B (Borghesi y Milcarek, 2007).

En leche proveniente de cuartos no infectados, el conteo de células somáticas es menor a 100.000/ml, consistiendo en un 12% de PMN, 60% de macrófagos y 28% de linfocitos, y una proporción de células epiteliales del 12 - 15% durante las primeras 4 semanas de lactancia y menor al 2% a medida que transcurre la misma (Corbellini, 2002). Esta respuesta inmunológica es la que hace posible por medio del conteo de células somáticas diagnosticar cuartos de la ubre con mastitis.

En el manejo integral de las mastitis, clínica y subclínica se incluye el uso de antimicrobianos, administrados vía sistémica e intramamaria respectivamente. Dentro de los grupos farmacológicos más utilizados se destacan betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas), nuevos betalactámicos, macrólidos y algunos aminoglicósidos. Sin embargo, algunos de estos antimicrobianos también son utilizados con fines profilácticos, durante el periodo de secado para reducir la mastitis en la siguiente lactancia (Pellegrino *et al.* 2011).

## **2.4 Principales microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras**

En la glándula mamaria bovina se han identificado hasta 140 especies, subespecies y serovariedades microbianas. Las técnicas microbiológicas han permitido la determinación precisa de la identidad de muchos microorganismos patógenos de la mastitis. Tomando como base la epidemiología y la fisiopatología, se han clasificado estos microorganismos como causantes de la mastitis contagiosa o ambiental, en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente (Figuroa *et al.* 2008).

Los microorganismos causantes de mastitis pueden ser agrupados en 3 categorías, los que causan mastitis contagiosa, principalmente *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Mycoplasmas spp.* Patógenos comunes del entorno ambiental en que viven las vacas o ambientales comúnmente encontrados, como coliformes, *Streptococcus* ambientales y *Staphylococcus* coagulasa negativos. Y patógenos no comunes del medio ambiente u oportunistas como *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, levaduras, *Nocardia asteroides*, *Prototheca spp*, y entre otros (Andresen, 2001).

## **2.5 Microorganismos causantes de la mastitis contagiosa**

Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.* (Fernández *et al.* 2012; Pellegrino *et al.* 2011). Son organismos transmitidos de vaca a vaca a través de las toallas de secado utilizados para limpiar las ubres, la leche residual en las pezoneras y un equipo de ordeño inadecuado que alberga los patógenos, es decir como consecuencia de una mala rutina de ordeño (Radostits *et al.* 2002).

El *Streptococcus agalactiae*, bacteria gram-positiva, infecta principalmente la cisterna y el sistema ductal de la glándula mamaria. Produce irritación que causa la inflamación de la glándula, que la mayoría de las veces es subclínica con síntomas clínicos ocasionalmente. La acumulación de desperdicios bacterianos intensifica la respuesta inflamatoria, resultando en destrucción del tejido productor de leche, reduciendo la producción de leche o causando agalactia. El

*Streptococcus agalactiae* rara vez produce una enfermedad severa, pero el extensivo daño de un cuarto puede causar que en las subsiguientes lactancias sea de menos producción de leche (Riekerink *et al.* 2006).

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria gram-positiva, puede causar mastitis subclínica y clínica en vacas lecheras, y por lo general se asocia con elevado recuento de células somáticas. En recientes experimentos se ha evaluado la invasión y supervivencia intracelular del *Staphylococcus aureus* en las células del tejido endotelial, epitelial y osteoblasto; se ha indicado que la supervivencia intracelular pudiera contribuir a la persistencia del patógeno, induciendo endocarditis, mastitis bovina y osteomielitis (Grohmann *et al.* 2003). El *Staphylococcus aureus* es actualmente uno de los patógenos más difíciles de controlar porque puede extenderse rápidamente entre el hato y puede responder pobremente a una terapia antibiótica convencional; la naturaleza crónica de la mastitis bovina por *Staphylococcus aureus*, indica que algunos productos o componentes de este patógeno pueden interferir en el desarrollo de la inmunidad protectora (Martínez *et al.* 2013).

Los mycoplasmas son bacterias pleomórficas que carecen de una pared celular, son contagiosas y pueden causar alto recuento de células somáticas y mastitis clínica crónica (Fox *et al.* 2008). Los mycoplasmas son frecuentes residentes en el tracto respiratorio de vacas aparentemente normales y puede ocurrir la transferencia de los microorganismos de los pulmones a la glándula mamaria. Brotes de mastitis por mycoplasmas se han asociado con problemas respiratorios en terneras, novillas de levante y en lugares con poca ventilación. Terneras alimentadas con leche de vacas con ubres infectadas con *Mycoplasma spp.* son susceptibles de tener infecciones respiratorias (Punyapornwithaya *et al.* 2012).

Los patógenos contagiosos de la mastitis como el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son infecciosos a nivel individual y a nivel de

población (Zadoks, 2001), han sido reportados bajo control en los hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de la ubre después del ordeño, tratamiento de la vaca seca, descarte de animales crónicos, mantenimiento del equipo de ordeño, y tratamiento con antibióticos de las infecciones intramamarias (Rossitto *et al.* 2002).

A pesar de que la mastitis por organismos contagiosos, especialmente *Streptococcus agalactiae*, ha disminuido por mejoramiento en el manejo, las pérdidas económicas debido a la enfermedad pueden continuar porque los organismos causales no pueden ser erradicados del medio ambiente de las vacas lecheras (Nash *et al.* 2002).

## **2.6 Microorganismos causantes de la mastitis ambiental**

Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Enterococcus spp.* (Rossitto *et al.* 2002). La fuente de estos agentes patógenos es el entorno de la vaca. La forma de transmisión principal es del ambiente a la vaca a través de un manejo inadecuado del primero. Algunos ejemplos incluyen la cama húmeda, terrenos sucios, ubres mojadas por la leche, preparación inadecuada de la ubre y los pezones antes del ordeño y sistemas de estabulación que favorecen las lesiones en los pezones (Radostits *et al.* 2002). Y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales que puede ocurrir en cualquier momento durante la vida de una vaca (Zadoks *et al.* 2001).

## 2.7 Prevalencia de los principales microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras en Colombia

Calderon *et al.* en un estudio realizado en el 2011, evaluaron 4.260 cuartos pertenecientes a 1.065 vacas en 15 fincas manejadas bajo el sistema doble propósito en el municipio de Montería (Córdoba), encontraron que el 92.21% de los aislamientos involucraban microorganismos infecciosos, donde *Staphylococcus aureus*, fue aislado en el 87.56 % y se convirtió en el principal patógeno aislado. *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) fueron aislados en el 0.3%. *Streptococcus agalactiae* fue aislado en el 2.1% de las muestras, *Streptococcus uberis* aislado en el 3.6%. *Corynebacterium bovis* se aisló en el 2.10%.

Resultados muy similares encontraron Mojica y Jaramillo, 2014, en un estudio realizado en el departamento de Arauca, en 247 cultivos positivos de leche de un sistema de producción doble propósito, donde se encontró en un porcentaje mayor *Staphylococcus aureus* con 43.72% correspondiente a 108 cuartos mamarios infectados. El segundo agente patógeno en 82 cuartos fue *Staphylococcus epidermis* con 33.20%, le sigue *Corynebacterium bovis* con 19 cuartos siendo 7.70% de las muestras positivas. Posteriormente en 17 cuartos se observó *Streptococcus agalactiae* (6.89%), en 11 cuartos *Corynebacterium pyogenes* (4.45%) y se aislaron en menor proporción *Streptococcus dysgalactiae* (2.83%) y *Escherichia coli* en 7 y 3 cuartos respectivamente.

El panorama cambia para las lecherías especializadas tal como encontraron Ramirez *et al.* en 2011, donde efectuaron 648 cultivos de muestras de leche provenientes del norte de Antioquia, de las cuales 23.9% fueron negativas, 34% positivas a *Streptococcus agalactiae* y 10.2% a *Staphylococcus coagulasa* negativo. Otro estudio en lechería especializada fue realizado por Becerra *et al.* 2014, llevado a cabo en el Altiplano Boyacense donde se evaluaron 5396 cuartos, en 1349 vacas en ordeño, donde se aislaron principalmente *Streptococcus agalactiae* (9.7%); otros *Streptococcus* (4.1%); *Staphylococcus aureus* (8.3%); otros *Staphylococcus* Coagulasa Positiva (0.55%); *Staphylococcus* Coagulasa Negativa (0.46%); *Actinomyces piogenes* (1.3%); Levaduras (0.7%); *Escherichia coli* (0.6%); *Corynebacterium* (0.6%); mixtos *Streptococcus* + *Staphylococcus* (0.8%); otras mixtas (4.5%); *Acholeplasma* (1.4%) y *Mycoplasmas spp.* (2.2%).

## 2.8 Métodos de diagnóstico

El monitoreo de salud de la ubre es un reto en la ganadería. Las pruebas de diagnóstico precisas son esenciales para la pronta detección de patógenos específicos de mastitis subclínica y clínica, para iniciar de inmediato el tratamiento de los animales infectados, para reducir el riesgo de nuevas infecciones y el contagio a otros animales. Hay amplias gamas de los procedimientos para diagnosticar la mastitis con diferentes principios de acción, donde algunos de ellos se basan en detección de anomalías de la ubre y la leche tales como cambios del color de la leche, aparición de grumos, coágulos sanguinolentos, coágulos con pus, o una leche más acuosa (Pérez *et al.* 2005); y marcadores de inflamación que incluyen el examen físico y clínico de la ubre, el recuento de células somáticas, el California Mastitis Test (CMT), la prueba de conductividad eléctrica, el medidor de pH, la prueba de NaOH y la medición de D - glucosaminidasa N-acetil-b (NAG-asa), y la lactatodeshidrogenasa (LDH). Otros

tipos de diagnóstico más específicos, son los basados principalmente en el aislamiento y la identificación del patógeno causante de mastitis, como es el cultivo bacteriológico de leche, las pruebas bioquímicas y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); o la respuesta inmune (anticuerpos) como es el Elisa. Cada técnica de diagnóstico tiene sus propias ventajas y desventajas y su rendimiento depende de muchos factores algunos de los cuales están relacionados con los procedimientos de toma de muestras, la preservación y el manejo en el laboratorio, otros incluyen el grado de infección y el estado de la ubre infectada, el animal infectado, tipo de patógeno causante y su virulencia y, finalmente, los relacionados con la experiencia del investigador (Mahmmod, 2013).

### **2.8.1 Pruebas físico-químicas**

Dentro de estas se incluyen la medición de pH, cloruros, la conductividad eléctrica de la leche. De las anteriores se detalla a continuación la técnica de detección de mastitis con conductividad eléctrica dado su importancia y potencial aplicabilidad en campo.

- Conductividad eléctrica de la leche

La conductividad eléctrica se ha usado comúnmente como un indicador de mastitis, este se basa en el aumento de conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico (Reddy *et al.* 2014). El proceso inflamatorio que ocurre en la ubre, cuando hay una invasión y multiplicación bacteriana, resulta en cambios en la composición iónica de la leche. La capacidad de filtración selectiva que normalmente ejerce el epitelio mamario sobre los



minerales sanguíneos se altera de tal manera que aumenta varias veces la concentración de sodio y cloro, mientras que disminuyen las concentraciones de calcio, fosfatos, magnesio y potasio (Reddy *et al.* 2014). Estos cambios en las proporciones de lactosa, sodio, potasio, cloro y calcio reducen la tolerancia de la leche a los tratamientos térmicos y altera sus características organolépticas. En general, aumentan las concentraciones de cobre, hierro y manganeso y disminuye el contenido de zinc, calcio y fósforo, ya que en su mayoría están unidos a las caseínas, mientras que el cobre y el hierro están unidos en la leche a las proteínas del suero lácteo, en especial a la seroalbúmina, a la ceruloplasmina, a la lactoferrina y a la transferrina. El pH de la leche se eleva de 6.6 a 7.0, debido al pasaje de iones bicarbonatos. Esto no afecta la acidez titulable de la leche ni su capacidad buffer, pero aumenta su conductividad eléctrica, la cual es posible medir y ser usada como indicador de inflamación (Güven *et al.* 2012). Estas alteraciones hacen que la leche se torne de sabor salado, lo que justifica una forma común de detectar la mastitis en el campo, que era probar su sabor.

Para la interpretación de los resultados con relación a la prueba de Conductividad Eléctrica (EC), se ha sugerido la siguiente clasificación (Cepero *et al.* 2005):

- ✓ Cuartos sanos: valores inferiores a 5,6 ms/cm
- ✓ Mastitis subclínica: valores entre 5,6 y 7,9 ms/cm
- ✓ Mastitis clínica: valores superiores a 8,0 ms/cm

Esta técnica de diagnóstico es importante porque mide el grado de la lesión de la ubre tan como lo hace el recuento de células somáticas, para facilitar su aplicación en campo se han desarrollado dispositivos portátiles de fácil manipulación y limpieza (Radostits, 2002), lo que garantiza un resultado confiable y rápido.

## 2.8.2 Pruebas Biológicas

El diagnóstico usando estas metodologías incorporan la detección de la celularidad de la leche que puede ser medida en forma indirecta a través de pruebas como cualitativas como Whiteside, semicuantitativas como el test de Wisconsin y el California Mastitis Test (CMT), o de forma directa y cuantitativa a través del examen microscópico o de métodos automáticos como el conteo de partículas y el analizador fluoro-óptico de ADN. Así como el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, bioquímica e identificación por PCR. A continuación se describe con más detalle métodos los más usados en la actualidad.






- Prueba de Whiteside

Desarrollada por Ávila en 1984 y Pérez en 1986. La mezcla de leche con una solución de NaOH al 4% ocasiona que la leche gelifique formando grumos visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas. Para hacer más visible la reacción es conveniente usar una placa de acrílico negra que puede tener dibujada 4 cuadros de 3cm x 3cm, uno por cada cuarto. Se interpretará de la siguiente forma (Pérez, 1986):

- ✓ Negativo: 0 – 325.000 Células somáticas / mL
- ✓ Traza: 300.000 – 600.000 Células somáticas / mL
- ✓ 1+: 600.000 – 1.000.000 Células somáticas / mL
- ✓ 2+: 1.000.000 – 2.000.000 Células somáticas / mL
- ✓ 3+: más de 2.000.000 Células somáticas / mL

- Prueba de California para Mastitis (CMT)

En la prueba diagnóstica denominada California Mastitis Test (CMT) (Schalm y Noorlander, 1957) se utiliza una sustancia aniónica, lauril sulfato de sodio, al que se le ha agregado un indicador de pH, el bromocresol púrpura. El reactivo reacciona con el ADN celular, y en caso de positividad se forma un gel característico, dando los diferentes grados de reacciones. En una infección en la glándula mamaria asciende el número de las células somáticas dado que estas migran de la sangre hacia la leche como respuesta a la infección, por lo tanto, cuanto más severa es la infección, mayor será el número de células somáticas. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación del gel resultado de la reacción con el detergente aniónico, para ser interpretado según inserto del reactivo (Figura 1). Es decir, el test permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la leche, permitiendo evaluar cada cuarto independientemente.

	SCORE	SIGNIFICADO	DESCRIPCION DE LA REACCION	INTERPRETACION (RCS / ml)
	N	Negativo	La mezcla permanece en estado líquido y homogéneo. Puede gotear de la paleta así.	0-200.000
	T	Trazas	Hay algo de engrosamiento. La reacción es reversible y la viscosidad observada por primera vez tiende a desaparecer.	150.000-500.000
	1	Ligeramente Positivo	La mezcla espesa, pero no hay formación de gel en el medio de la paleta y la viscosidad observada tiende a persistir. La mezcla cae poco a poco.	400.000-1.500.000
	2	Positivo	Gel se formará en el centro de la paleta durante el movimiento giratorio. El gel se acumula en la parte inferior de la paleta cuando el movimiento giratorio se interrumpe. Cuando se vierte la mezcla la masa gelatinosa cae y puede dejar un poco de líquido en el pocillo.	800.000-5.000.000
	3	Muy Positivo	Gel se formará en el centro de la paleta y se pega en el fondo del pocillo, pero no a un lado. Cuando se vierte la mezcla, se cae sin dejar líquido detrás.	>5.000.000

**Figura 1.** Interpretación de la prueba de diagnóstico California Mastitis Test (CMT)

- Prueba de Wisconsin para Mastitis

Esta prueba utiliza una solución similar a la que se emplea con la prueba CMT, pero en contraste los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad (Bedolla, 2004). La prueba de Wisconsin modificada consiste en utilizar un tubo graduado en mililitros en donde se depositan 3 mL de leche y una mezcla de 3 mL de reactivo para CMT con agua destilada (relación 1:1) ambas a temperatura ambiente (Cerón *et al.* 2007; Bedolla *et al.* 2007).

**Tabla 3.** Interpretación del número de células somáticas en leche mediante la Prueba de Wisconsin para Mastitis. (Tomado de Hernández, 2009).

Mililitros	Células (x1000)/mL
0-1.0	0-100
1.1-1.5	101-500
1.6-2.0	501-1000
2.1-2.5	1001-1700
2.6-3.0	1701-2500
> 3.0	> 2500

### **2.8.3 Métodos de conteo electrónico celular**

Los métodos electrónicos tienen en la actualidad una aplicación universal, sobre todo en laboratorios de control lechero o dedicados al diagnóstico o investigación de la mastitis, utilizándose aparatos de recuentos celulares como el Bactoscan, Fossomatic (Foss Electric, Dinamarca) y el Counter Coulter (Coulter, Inglaterra) (Saran y Chaffer, 2000). Los métodos electrónicos presentan ventajas importantes ante otros métodos de cuantificación de células somáticas entre las que se encuentran, tiempo mínimo de análisis, el método es objetivo, el provee una alta exactitud estadística y adicionalmente puede ofrecer datos del tamaño celular (Osorio, 2010).

### **2.8.4 Diagnóstico microbiológico**

Los resultados de las pruebas microbiológicas pueden ser muy variables debido a que dependiendo de toma de la muestra, pueden resultar falsos positivos debido a contaminaciones o falsos negativos. Aproximadamente el 10 % de las mastitis clínicas cultivadas son negativas cuando la leche es sembrada en agar sangre, esto es porque la bacteria es eliminada intermitentemente o porque la bacteria fue inactiva por los mecanismos de respuesta del huésped (Gasque y Blanco, 2001). El análisis microbiológico de la leche no garantiza con total confiabilidad el aislamiento de bacterias debido a que los animales con mastitis subclínica pueden eliminar al microorganismo causante de manera intermitente durante la lactación, así como el uso de antibióticos, presencia de leucocitos y un alto contenido de células somáticas (SC) en la leche que inhiben el crecimiento bacteriano *in vitro* (Clavijo *et al.* 2002).

La toma de muestras de leche en forma aséptica para los exámenes bacteriológicos puede proveer un diagnóstico válido y correcto para el tratamiento de la mastitis bovina. Las muestras de leche deberán ser recolectadas en tubos estériles para posteriormente ser sembrados en medios de cultivo y luego realizarse la incubación en una incubadora a 37 °C durante 18 a 24 horas (Gonzalez *et al.* 2011.). La primera lectura luego de la incubación determinará la presencia de colonias bacterianas, usando este método solamente se hará un diagnóstico hasta el nivel de género de la bacteria. Existen test rápidos que permiten diferenciar las colonias de bacterias coliformes usando reactivos simples como hidróxido de potasio al 5%, mezclando con las colonias sospechosas durante unos 20 segundos. También se dispone del test de catalasa, donde se considera la reacción de las colonias de *Staphylococcus* en contacto con agua oxigenada. Este test permite diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. Estas pruebas se deberán corroborar con diagnósticos básicos de microscopía para ganar más confiabilidad (Osteras, 2006).

### **2.8.5 Diagnósticos moleculares**

Las técnicas moleculares desarrolladas en torno a la mastitis, van desde un diagnóstico por PCR de la cepa bacteriana y pueden incluir la detección de un gen en particular de ese agente, pasando por PCR en Tiempo Real, PCR anidada, hasta el análisis de mutaciones con técnicas simples como el polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP, del inglés, Single Strand Conformation Polymorphism) o la T-RFLP (del inglés, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), cuyo principio es la amplificación del 16S rDNA de las bacterias existentes en una muestra, restricción enzimática de los distintos fragmentos obtenidos y la detección de los fragmentos terminales resultantes de la digestión (Ovidio *et al.* 2006).

---

El diagnóstico molecular podría ser la técnica más adecuada para la identificación de especies de patógenos de mastitis que son difíciles de detectar e identificar por métodos convencionales. Diagnósticos basados en la PCR pueden ofrecer ventajas significativas sobre otros diagnósticos por su velocidad y su sensibilidad cuando se utiliza para la detección de patógenos de mastitis. La técnica de PCR se dirige al reconocimiento del ADN de un patógeno de mastitis específico. Dependiendo de la técnica de PCR se pueden clasificar los patógenos de forma cualitativa evidenciando la presencia o ausencia del ADN del patógeno, o de forma semi-cuantitativos usando técnicas de PCR en tiempo real cuantitativas. Algunos tipos de PCR van dirigidos a un patógeno específico, mientras que otros pueden identificar más de uno y estas por lo tanto conocen como pruebas de PCR múltiple (Mahmmod, 2013; Ruiz *et al.* 2013).





## **3. Materiales y Métodos**

Para la consecución del objetivo general planteado en esta investigación, primero se debía ejecutar el primero de los objetivos específicos.

### **3.1 Estandarización de las técnicas de biología molecular (extracción de ADN bacteriano a partir de leche, PCR) que permitan la identificación de la presencia de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche proveniente de cuartos bovinos afectados por mastitis.**

#### **3.1.1 Unidades experimentales.**

Para la estandarización de las técnicas de biología molecular se colectaron 12 muestras de leche cruda de cuartos con mastitis clínica de hembras bovinas de dos hatos lecheros ubicados en los municipios de Don Matías y La Unión. Las muestras se tomaron en el ordeño de la tarde y se determinó la presencia de

mastitis clínica en el momento del despunte al observar leche anormal, con cambios de color y presencia de grumos. Las muestras fueron tomadas por técnicos especializados. El personal encargado se lavó y desinfectó las manos antes del muestreo y se realizó desinfección del esfínter del pezón con paño con alcohol etílico al 70 % y se extrajeron aproximadamente 5 mL de leche que se depositaron en un recipiente estéril que se sujetó de manera horizontal para evitar la entrada de contaminantes (Honkanen - Buzalski, 1995). Las muestras se transportaron refrigeradas a las instalaciones del Laboratorio de Genética Animal de la Universidad de Antioquia para su posterior análisis.

### **3.1.2 Extracción de ADN bacteriano.**

El ADN bacteriano se extrajo mediante dos metodologías. La primera mediante Fenol-Cloroformo, descrita por Potou en 2005, con modificaciones, así: se tomó 1.5 mL en tubos eppendorf de cada muestra de leche que se había tomado el día anterior y se encontraba refrigerada a 4 °C. Se centrifugó a 12.000 RPM (Revoluciones Por Minuto) por 5 minutos para descartar agua y grasa. Se adicionó 500 µL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA), 30 µL de SDS 20% y 30 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Invitrogen), y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo, las muestras se agitaron con vortex y se adicionó un volumen igual de Fenol-Cloroformo-Isoamilico (25:24:1). Por agitación, se formó una emulsión, se centrifugó a 13.000 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente y se transfirió la fase superior acuosa a un nuevo vial. Se adicionó un volumen igual de Fenol-Cloroformo-Isoamilico (25:24:1), se mezcló por inmersión hasta que las fases se entremezclaran y se centrifugó a 13.000 RPM por 3 minutos. Se transfirió la fase superior a nuevo vial de 1.5 mL y se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 2M y un volumen de etanol absoluto a – 20 °C. Se realizó la mezcla por inversión de los componentes y nuevamente se centrifugó a

13.000 RPM durante 5 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante. El botón de ADN se lavó con 500  $\mu$ L de etanol al 70% y se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer TE 1X y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El segundo método consistió en la extracción de ADN con el kit DNeasy blood and tissue Qiagen® con modificaciones, así: se tomó 1.5 mL de leche en tubos eppendorf, se centrifugó a 12.000 RPM por 5 minutos y se descartó el sobrenadante (agua y grasa). Se hizo un primer lavado del pellet con buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA): se adicionó 500  $\mu$ L de buffer TE y se resuspendió el pellet. Se centrifugó a 12.000 RPM por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado del pellet con 500  $\mu$ L de buffer TE y nuevamente se centrifugó a 12.000 RPM. Se descartó el sobrenadante y con el pellet se continuó en el paso 1c del protocolo de extracción de ADN de tejidos animales de acuerdo a las recomendaciones realizadas por la casa fabricante (Qiagen, 2006). Con la primera metodología se extrajo el ADN de 6 muestras de leche y con la segunda metodología las 6 muestras restantes.

### **3.1.3 Cuantificación y determinación de pureza del ADN obtenido.**

La pureza del ADN obtenido fue medida con base en las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™) de 8 ADN tomados al azar (4 de cada metodología de extracción). La estimación de la pureza de una muestra de ADN fue obtenida por la relación de Densidad Óptica (DO) a 260 y 280 nm. Para una preparación pura de ADN, la relación DO 260/280 debe ser 1.8; valores entre 1.8 y 2.0 indican preparaciones altamente purificadas. Valores menores a 1.8 indican contaminación de la muestras con proteínas y mayores de 2.0 indican contaminaciones con fenol.

### **3.1.4 Amplificación por PCR para *Streptococcus agalactiae*.**

Mediante la técnica de PCR se amplificó un fragmento de 586 pb del gen 16S rRNA de *Streptococcus agalactiae*. Los primers utilizados tienen la siguiente secuencia de nucleótidos: F -5'- CGT TGG TAG GAG TGG AAA AT - 3'; R - 5' - CTG CTC CGA AGA GAA AGC CT- 3' (Riffon *et al.* 2001). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL que contenía: 200 nanogramos de ADN; Buffer 10X; MgCL<sub>2</sub> 25 mM; dNTPS 200 mM, 0.5 µM de primers y 5 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas). La PCR se corrió en un termociclador Bio-Rad Termal cycler C1000®, con el siguiente perfil térmico: un ciclo inicial de desnaturalización de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos en las siguientes condiciones: 94 °C por 45 segundos para desnaturalización, 65 °C por 1 minuto para annealing y 72 °C por 2 minutos para extensión. Un ciclo final de extensión a 72 °C durante 10 minutos. Toda PCR implicó la amplificación del fragmento de 586 pb del gen 16s rRNA en el control positivo: ADN de la cepa ATCC 13813 (American Type Cultive Collection) y la ausencia de amplificación del fragmento en el control negativo que consistió en una mezcla de reacción donde se reemplazó el ADN por agua.

### **3.1.5 Detección de productos de PCR.**

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) en buffer TBE 1X y analizados en presencia de luz ultravioleta en un equipo de transiluminación (Labnet International, Inc.).

## **3.2 Evaluar la especificidad y la sensibilidad de la técnica PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia.**

### **3.2.1 Unidades experimentales.**

Se colectaron 297 muestras de leche cruda de cuartos diagnosticados por la prueba CMT con mastitis clínica y subclínica grado 3 de hembras bovinas de hatos lecheros distribuidos en 13 municipios del norte y oriente antioqueños. Estas muestras fueron tomadas por técnicos especializados.

### **3.2.2 California Mastitis Test – CMT.**

En el momento del ordeño de la tarde, después de realizado el despunte de la leche, de cada cuarto se depositaron aproximadamente 10 mL de leche en cada pozo de la paleta para realizar el CMT, se descartó el exceso de leche y se adicionó un volumen igual de lauril, sulfato de sodio al 4% (Diagnóstico Mastitis Nocar, Medick). La solución se mezcló haciendo movimientos circulares y se examinó la formación de gel para determinar el nivel de la infección de acuerdo a lo descrito por Blowey y Edmonson en 1997. En todos los casos la paleta fue lavada después de su uso y antes de pasar a la siguiente vaca. El resultado se interpretó como: Negativo (-) cuando no hubo formación de gel; Subclínica grado 1 (+) o débilmente positiva cuando en el fondo de la paleta se formó gel que desapareció rápidamente; Subclínica grado 2 (++) o positiva cuando hubo

presencia de grumos reforzantes; Subclínica grado 3 (+++) o muy positiva cuando se formó un gel robusto que no desapareció al dejar de girar la paleta. La mastitis tipo clínica se determinó cuando en el despuntador y en la paleta se observó cambios en la apariencia de la leche y presencia de grumos, coágulos y/o sangre.

### **3.2.3 Procedimiento para la colecta de las muestras de leche.**

Como se explicó anteriormente, al momento del ordeño de la tarde se realizó el CMT para determinar cuales cuartos presentaban mastitis y en que grado. Se ordeñaron los primeros chorros de leche en el despuntador y se verificó la presencia o ausencia de mastitis clínica (cambios en la apariencia de la leche, presencia de grumos, coágulos, sangre). Además, el propósito de la eliminación de los primeros chorros es extraer la flora bacteriana normal del canal y del orificio del pezón para minimizar la contaminación de la leche. Se muestrearon los cuartos con mastitis clínica y subclínica grado 3 según la prueba CMT. El personal encargado se lavó y desinfectó las manos antes del muestreo. Si el pezón estaba sucio se procedió a lavarlo con agua y a secar cada cuarto con una toalla de papel individual. Para la toma de muestra de leche se realizó desinfección del esfínter del pezón con paño con alcohol etílico al 70 % y se extrajeron aproximadamente 5 mL de leche que se depositaron en un recipiente estéril que se sujetó de manera horizontal para evitar la entrada de contaminantes (Honkanen - Buzalski, 1995). Las muestras se transportaron refrigeradas a los respectivos laboratorios para su posterior análisis. Los cultivos bacteriológicos los realizó el personal del departamento de Control Calidad de la Cooperativa Colanta en las instalaciones del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) de la Universidad CES y los procedimientos de biología molecular los realizó el personal del departamento de Asistencia Técnica de la Cooperativa Colanta en

las instalaciones del Laboratorio de Genética Animal de la Universidad de Antioquia.

### **3.2.4 Cultivo bacteriológico para *S. agalactiae*.**

Se tomó como control positivo la cepa ATCC 13813 de *S. agalactiae*. De las unidades experimentales se cultivaron 10 uL de leche para la identificación de *S. agalactiae*, así: 1) aislamiento en agar sangre con esculina, 2) incubación a 37 °C por 24 horas; 3) a las 24 horas lectura preliminar: identificación de colonias Gram positivas y Gram negativas con KOH, prueba bioquímica de catalasa y prueba bioquímica de Camp; 4) incubación a 37 °C por 24 horas (National Mastitis Council, 2015). Esta labor fue realizada en las instalaciones del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) de la Universidad CES.

### **3.2.5 Extracción de ADN bacteriano.**

El ADN bacteriano se extrajo mediante dos metodologías. La primera mediante Fenol-Cloroformo, descrita por Potou en 2005, con modificaciones descritas anteriormente, y el segundo método consistió en la extracción de ADN con el kit DNeasy blood and tissue Qiagen® con las modificaciones descritas anteriormente. Con la primera metodología se procesaron 69 muestras de leche y con la segunda metodología se procesaron 228 muestras problema.

### 3.2.6 Análisis estadístico.

Para determinar la sensibilidad y especificidad se realizó una tabla de contingencia de 2 x 2, donde se colocaron los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y por PCR, como se ilustra en la siguiente tabla 4, y se utilizaron las formulas descritas a continuación:

**Tabla 4.** Tabla de contingencia para los resultados del estudio.

<b>Metodología</b>	Cultivo microbiológico +	Cultivo microbiológico -	<b>TOTAL</b>
+ PCR	a	b	a + b
- PCR	c	d	c + d
<b>TOTAL</b>	a + c	b + d	a + b + c + d

Donde:

*a*: número de muestras de leche que coincidieron en resultado positivo tanto para el cultivo microbiológico como para la prueba PCR.

*b*: número de muestras que para la prueba de PCR dieron resultado positivo pero para el cultivo microbiológico dieron resultado negativo.



*c*: número de muestras que para la prueba PCR resultaron negativas pero resultaron positivas en el cultivo bacteriológico.

*d*: número de muestras que coincidieron en resultado negativo tanto en PCR como en el cultivo.

- Sensibilidad de la prueba de PCR: capacidad de la prueba para detectar leche positiva a *S. agalactiae*.

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{a}{a + c} \times 100$$

- Especificidad de la prueba de PCR: capacidad de la prueba para detectar leche negativa a *S. agalactiae*.

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{d}{b + d} \times 100$$

Se realizaron tablas de contingencia individuales para las dos metodologías de extracción de ADN utilizadas (fenol:cloroformo y kit) para evaluar si la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el diagnóstico del patógeno variaban de acuerdo a la técnica de extracción.

### 3.3 Determinar la frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en hatos del norte y oriente antioqueño.

#### 3.3.1 Unidades experimentales.

Las 297 muestras de leche cruda tomadas de cuartos diagnosticados por la prueba CMT con mastitis clínica y subclínica grado 3 de hembras bovinas de hatos lecheros fueron colectadas en 13 municipios del norte y oriente antioqueños como se observa en la tabla 5.

**Tabla 5.** Municipios del norte y oriente de Antioquia donde se colectaron las muestras de leche bovina provenientes de cuartos positivos por CMT a mastitis clínica y/o subclínica grado 3.

Municipios muestreados	Numero de muestras de leche tomadas
Belmira	6
Don Matias	82
El Carmen de Viboral	1
El retiro	1
Entrerrios	50
La ceja	4
La Unión	31
Rionegro	11
San José de la Montaña	23

---

San Pedro de los Milagros	45
Santa Rosa de Osos	33
Sonsón	2
Yarumal	8

---

### 3.3.2 Análisis estadístico.

Para de determinar la frecuencia de *S. agalactiae* en los municipios muestreados, se utilizó la siguiente fórmula, tanto para los resultados por PCR como por cultivo bacteriológico:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ casos positivos}}{\text{N}^{\circ} \text{ casos totales}} \times 100$$

Para analizar si existían diferencias de frecuencia del patógeno entre los 13 municipios donde se obtuvieron las muestras, se realizó una comparación de frecuencia de Chi cuadrado.

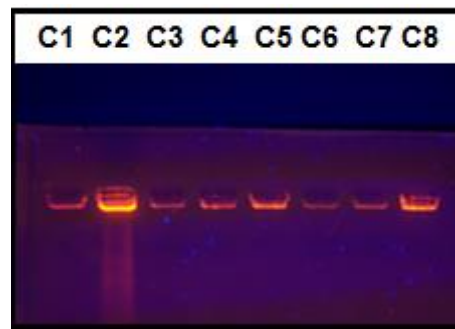


## **4.Resultados**

**4.1 Estandarización de las técnicas de biología molecular (extracción de ADN bacteriano a partir de leche, PCR) que permitan la identificación de la presencia de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche proveniente de cuartos bovinos afectados por mastitis.**

### **4.1.1 Extracción de ADN de muestras de leche.**

Se extrajo el ADN de 12 muestras de leche cruda procedentes de cuartos de hembras bovinas diagnosticados con mastitis clínica. Con la primera metodología Fenol-Cloroformo se extrajeron 6 ADN. Con la segunda metodología, kit DNeasy blood and tissue Qiagen®, se obtuvo el ADN de 6 muestras de leche.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% en el que se observa el ADN total extraído de 8 muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica. De izquierda a derecha: C2 (Nº 5), C4 (Nº 12), C5 (Nº 23), C8 (Nº 29) ADN extraído por el método fenol:cloroformo. C1 (Nº 144), C3 (Nº 157), C6 (Nº 161), C7 (Nº 163) ADN extraído por kit DNeasy blood and tissue Qiagen®.

#### 4.1.2 Evaluación de la eficiencia de las dos metodologías de extracción de ADN.

Se realizó la cuantificación por espectrofotometría de 8 ADN obtenidos por ambos métodos de extracción (Fenol:Cloroformo y Kit) tomados al azar. Los resultados se observan en la tabla 6. El protocolo de extracción por Fenol:cloroformo permitió obtener mayor cantidad de ADN mediada en ng/ $\mu$ L, pero los valores de DO 260/280 nm mostraron la existencia de proteínas en exceso, contaminantes que inhiben la PCR. El kit permitió la obtención de ADN de mejor calidad con bajos contaminantes, donde los valores de absorbancia a 260/280 nm mostraron la inexistencia de proteínas.

El kit DNeasy blood and tissue Qiagen® mostró ser el más acertado para procesos moleculares por su eficiencia en cuanto a pureza, obtención de ADN de mejor calidad con bajos contaminantes. Adicional a ello, el método de extracción

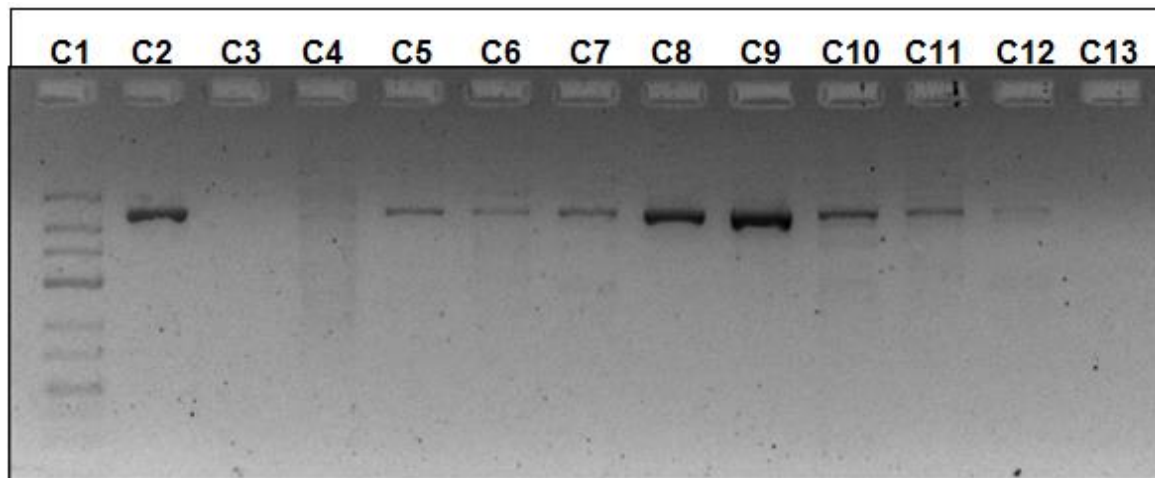
con Fenol:Cloroformo implica la utilización de materiales orgánicos, altamente tóxicos y contaminantes.

**Tabla 6.** Concentración y calidad del ADN obtenido de 8 muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica, mediante dos metodologías de extracción.

Identificación Muestra	Método de extracción de ADN	Concentración de ácidos nucleicos (ng/μl)	260/280
Nº 5	Fenol: cloroformo	1711.5	1.51
Nº 12	Fenol: cloroformo	1162.7	1.38
Nº 23	Fenol: cloroformo	1401.6	1.4
Nº 29	Fenol: cloroformo	2057.1	1.51
Nº 144	Kit	2.6	1.82
Nº 157	Kit	11.5	1.65
Nº 161	Kit	21.7	1.9
Nº 163	Kit	9.8	1.34

#### 4.1.3 PCR para el diagnóstico de la presencia de *Streptococcus agalactiae*.

Mediante PCR se obtuvo un amplificado 586 pb correspondiente a un fragmento del gen 16S rRNA en 8 de un total de 12 ADN, los cuales se diagnosticaron como positivos para la presencia de *S. agalactiae*. Entre tanto, las muestras restantes (4) que no presentaron el amplificado, se diagnosticaron como negativas para *S. agalactiae*. En la figura 3 se presenta la electroforesis con los productos de la PCR para el diagnóstico de *S. agalactiae*.



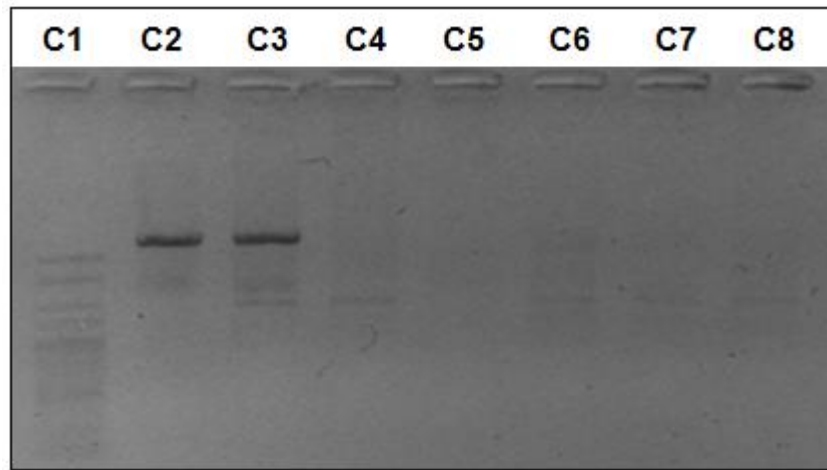
**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos de PCR para el diagnóstico de *S. agalactiae* de 10 muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica. De izquierda a derecha: C1: Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder 50 pb (Thermo Scientific). C2: control positivo (ADN cepa ATCC 13813) ADN extraído por kit. C3: control -. C4 al C13: muestras del estudio. ADN del C4 al C8 extraído por kit. ADN del C9 al C13 extraído por fenol:cloroformo. Las muestras del C4 y C13 no presentaron amplificado (negativas para *S. agalactiae*), las muestras de los otros carriles presentan el amplificado de 586 pb, fragmento gen 16S rRNA (positivas para *S. agalactiae*).

#### **4.2 Evaluar la especificidad y la sensibilidad de la técnica PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia.**

Mediante PCR se obtuvo un amplificado 586 pb correspondiente a un fragmento del gen 16S rRNA en 92 de un total de 297 ADN extraídos de muestras de leche



cruda de cuartos diagnosticados por la prueba CMT con mastitis clínica y subclínica grado 3 de hembras bovinas. Los 92 ADN se diagnosticaron como positivos para la presencia de *S. agalactiae*. Entre tanto, las muestras restantes (205) que no presentaron el amplificado, se diagnosticaron como negativas para *S. agalactiae*. Mediante el cultivo *in vitro* de leche, se diagnosticaron 115 muestras como positivas para *S. agalactiae*.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de amplificadores obtenidos por PCR para diagnóstico de *S. agalactiae* de muestras de leche provenientes de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica y/o subclínica grado 3. De izquierda a derecha: Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler Low Range DNA Ladder 50 pb (Thermo Scientific). Carril 2: control positivo (ADN cepa ATCC 13813). Carril 3: Muestra N° 99. Carril 4 al 8: Muestras N° 100 a la N° 104. Muestra N° 99, presentó amplificado de 586 pb, fragmento gen 16S rRNA (positiva para *S. agalactiae*). Muestra N° 100 a la N° 104, no presentaron amplificado (negativas para *S. agalactiae*).

#### 4.2.1 Análisis estadístico para la evaluación de la especificidad y la sensibilidad de la técnica PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche, comparado con el cultivo bacteriológico como prueba de referencia.

En la tabla 7 se observan los resultados totales de 297 muestras procesadas por cultivo bacteriológico y por PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*.

**Tabla 7.** Resultados de las dos metodologías empleadas (PCR y cultivo bacteriológico) para el diagnóstico de *S. agalactiae* en 297 muestras de leche.

Metodología de diagnóstico empleada	N° de muestras de leche	Positivas para <i>S. agalactiae</i>	Negativas para <i>S. agalactiae</i>	Total
PCR	297	92	205	297
Cultivo bacteriológico	297	115	182	297

La tabla 8, es una tabla de contingencia de 2 x 2 donde se colocaron los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y por PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*.

**Tabla 8.** Tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*.

<b>Metodología</b>	Cultivo microbiológico +	Cultivo microbiológico -	<b>TOTAL</b>
+ PCR	69	23	92
- PCR	46	159	205
<b>TOTAL</b>	115	182	297

- **Sensibilidad de la prueba de PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*:**

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{a}{a + c} \times 100$$

Ahora:

$$\frac{69}{69 + 46} \times 100 = 60\%$$

- **Especificidad de la prueba de PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*:**

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{d}{b + d} \times 100$$

Ahora:

$$\frac{159}{23 + 159} \times 100 = 87.3\%$$

Mediante la tabla de contingencia se evaluó la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* en un importante número de muestras de leche provenientes de cuartos de vacas con mastitis clínica y subclínica grado 3 en una amplia región geográfica del departamento de Antioquia, tomando la prueba de cultivo *in vitro* de leche como prueba de referencia. Los resultados de sensibilidad y especificidad de la PCR fueron de 60% y 87.3%, respectivamente.

La tabla 9 corresponde a la tabla de contingencia de 2 x 2 donde se colocaron los resultados del cultivo bacteriológico y de la PCR para diagnóstico de *S. agalactiae* solo de los ADN extraídos por el método fenol:cloroformo y con las formulas descritas se evaluó la sensibilidad y la especificidad, donde el resultado de la sensibilidad fue de 50% y de la especificidad de 91%.

**Tabla 9.** Tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR para diagnóstico de *S. agalactiae* solo de las muestras de leche donde se extrajo el ADN con Fenol:cloroformo.

<b>Metodología</b>	Cultivo microbiológico +	Cultivo microbiológico -	<b>TOTAL</b>
+ PCR	7	5	12
- PCR	7	50	57
<b>TOTAL</b>	14	55	69

- **Sensibilidad de la prueba de PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*:**

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{a}{a + c} \times 100$$

Ahora:

$$\frac{7}{7 + 7} \times 100 = 50\%$$

- **Especificidad de la prueba de PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*:**

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{d}{b + d} \times 100$$

Ahora:

$$\frac{50}{5 + 50} \times 100 = 91\%$$

En tabla 10 se observa la tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados del cultivo microbiológico y de la PCR para diagnóstico de *S. agalactiae* solo de los ADNs de las muestras de leche extraídas por el kit DNeasy blood and tissue Qiagen®. Con las formulas descritas se evaluó la sensibilidad y la especificidad, donde el valor para la sensibilidad fue de 61.3% y el valor de la especificidad fue de 86%.

**Tabla 10.** Tabla de contingencia de 2 x 2 con los resultados obtenidos por cultivo bacteriológico y PCR para diagnóstico de *S. agalactiae* solo de las muestras de leche donde se extrajo el ADN con el kit DNeasy blood and tissue Qiagen®.

<b>Metodología</b>	Cultivo microbiológico +	Cultivo microbiológico -	<b>TOTAL</b>
+ PCR	62	18	80
- PCR	39	109	148
<b>TOTAL</b>	101	127	228

- **Sensibilidad de la prueba de PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*:**

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{a}{a + c} \times 100$$

Ahora:

$$\frac{62}{62 + 39} \times 100 = 61.3 \%$$

- **Especificidad de la prueba de PCR para diagnóstico de *S. agalactiae*:**

Se calcula según la fórmula:

$$\frac{d}{b + d} \times 100$$

Ahora:

$$\frac{109}{18 + 109} \times 100 = 86\%$$

### **4.3 Determinar la frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en hatos del norte y oriente antioqueño.**

De 297 muestras de leche provenientes de cuartos de vacas con mastitis clínica y subclínica (grado 3), 92 se diagnosticaron positivas para *S. agalactiae* por PCR y 115 por cultivo bacteriológico, lo que representa 31% y 38.7%, respectivamente, de la población estudiada.

En la tabla 11 se presentan los municipios del norte y oriente de Antioquia muestreados, el número de muestras de leche tomadas en cada municipio y el número de muestras positivas para *S. agalactiae* por PCR.



**Tabla 11.** Resultados de diagnóstico por PCR para *S. agalactiae* de muestras de leche tomadas de cuartos de hembras bovinas con mastitis clínica y/o subclínica grado 3, provenientes de diferentes municipios del norte y oriente antioqueño.

<b>Municipios</b>	<b>Numero de Muestras</b>	<b>Número de casos positivos para <i>S. agalactiae</i>.</b>	<b>%</b>
La Ceja	4	3	75%
San Pedro de los Milagros	45	25	56%
Belmira	6	3	50%
Yarumal	8	4	50%
San José de la Montaña	23	10	43%
Rionegro	11	3	27%
Entrerrios	50	13	26%
Don Matías	82	19	23%
La Unión	31	7	23%
Santa Rosa de Osos	33	5	15%
El Carmen de Viboral	1	0	0%
El Retiro	1	0	0%
Sonsón	2	0	0%

Para analizar si existían diferencias de frecuencia del patógeno entre los 13 municipios donde se obtuvieron las muestras, se realizó una comparación de frecuencia de Chi cuadrado. La prueba arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la frecuencia del *S. agalactiae* entre los diferentes municipios. Por otro lado, no se encontró diferencia estadística

( $P > 0.05$ ) entre la frecuencia evaluada en las dos zonas geográficas (norte y oriente antioqueño). Norte antioqueño (7 municipios: Belmira, Don Matías, Entrerrios, San José de la Montaña, San Pedro de los Milagros, Santa Rosa de Osos y Yarumal) y Oriente antioqueño (6 municipios: El Carmen de Viboral, El Retiro, La Ceja, La Unión, Rionegro y Sonsón). 247 muestras provenían del norte y se diagnosticó la presencia del patógeno en 67 muestras de leche. 50 muestras provenían del oriente y se diagnosticó la presencia del patógeno en 13 muestras problema.

## 5. Discusión

Las dos metodologías probadas en esta investigación para extraer ADN bacteriano a partir de muestras de leche bovina provenientes de vacas con mastitis clínica y subclínica grado 3, son útiles para tal fin y se obtuvo material genético en el total de las muestras analizadas en cada uno de los ensayos. Los métodos de extracción de ADN de bacterias gram-positivas a partir de leche presentados en este estudio son eficientes y fáciles de realizar.

Según los resultados arrojados por espectrofotometría, el método fenol:cloroformo con las modificaciones reportadas, fue mas eficiente en cuanto a la extracción de una mayor cantidad de ADN medida en ng/ $\mu$ L respecto al kit. Sin embargo, los valores de DO 260/280 (1,51; 1,38; 1,51; 1,4) fueron menores a 1,8 indicando contaminación de la muestras con proteínas. Cabe resaltar que el método fenol:cloroformo, implica la utilización de materiales orgánicos, altamente tóxicos y contaminantes. El kit se comportó mas eficiente en cuanto a la pureza de los ADN obtenidos, con resultados de 1,82 y 1,9 en la relación de Densidad Óptica (DO) 260/280 nm en dos muestras, valores que indican preparaciones altamente purificadas, siendo el más acertado para procesos moleculares, ya que contaminantes como las proteínas inhiben la PCR y se requiere ADN de calidad que permita una óptima amplificación de fragmentos del genoma diana. En consecuencia, la extracción de ADN a partir de leche cruda de origen bovino, es un procedimiento de alta confiabilidad y puede ser utilizado para trabajos en el

área de la genética molecular en mamíferos. En varias investigaciones se ha evaluado la especificidad de cebadores específicos para cada especie de bacteria implicada en las infecciones intramamarias en hembras bovinas (Riffon *et al.* 2001), donde la leche ha servido como sustrato para la obtención de ADN bacteriano y para la posterior amplificación de secuencias diana mediante PCR (Lipkin *et al.* 1993).

En cuanto a la estandarización de la técnica PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae*, se obtuvo la amplificación de un fragmento de 586 pb del gen 16S rRNA en el control positivo (ADN de cepa pura de *S. agalactiae* ATCC 13813) y en 8 muestras de leche, lo que indica que las secuencias de los primers elegidos, la temperatura de hibridación y las concentraciones de los reactivos, fueron correctos. Estos resultados concuerdan con los reportados por varios autores. Riffon *et al.* 2001, probaron la PCR para la detección de los principales agentes infecciosos causantes de mastitis bovina: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*, utilizado para su estudio cepas puras ATCC y tres aislamientos de muestras de leche de casos clínicos de mastitis bovina. Todos los microorganismos (cepas ATCC y cepas silvestres) fueron sembrados en agar sangre y se identificaron bioquímicamente. El ADN bacteriano fue extraído utilizando el kit DNeasy Tissue de Qiagen, según las descripciones del fabricante. Se diseñaron un par de cebadores universales para verificar la calidad del ADN después de la extracción, que se unían al genoma de todos los patógenos estudiados, y se diseñaron cebadores específicos para cada uno de los microorganismos, concluyendo que la PCR es un método sencillo, se pueden realizar en cuestión de horas, y es una herramienta sensible, específica y fiable para el diagnóstico de los patógenos descritos, incluso para la detección directa en muestras de leche. Cremonesi *et al.* 2006, realizaron un estudio para aplicar la PCR como metodología de detección de patógenos causantes de

mastitis. Para esto utilizaron las siguientes cepas bacterianas: 2 cepas de referencia de *S. agalactiae* ATCC 18813 y SS615, 111 aislamientos de *S. agalactiae* obtenidos de muestras de leche bovina tomada en diferentes hatos lecheros de Canadá y 36 aislamientos de muestras de leche de mujeres lactantes asintomáticas. Además, 5 cepas de *Streptococcus* diferentes y 12 cepas de otras especies bacterianas causantes de infecciones intramamarias. Se realizó extracción directa del ADN bacteriano de las muestras de leche y para las dos cepas ATCC se inocularon artificialmente 10 mL de leche negativa a *S. agalactiae*. Diseñaron primers exclusivos para la identificación de *S. agalactiae*, obteniendo un amplificado de 405 pb y para confirmar la identidad del producto amplificado se recurrió a la secuenciación. El resultado de la secuenciación coincidió con la secuencia del ADN de *S. agalactiae* en todas las muestras, incluyendo la colección de aislamientos de campo (leche bovina y leche humana), así como las cepas de referencia. Finalmente, Forsman *et al.* 1997, utilizó la PCR y diferentes conjuntos de cebadores para amplificar una región de 16S y 23S rRNA, para detectar y diferenciar patógenos causantes de mastitis utilizando cepas de referencia ATCC. Los cebadores no sólo se unieron al genoma del *S. agalactiae*, sino también al genoma del *S. uberis* y *S. aureus*.

Con relación a la evaluación de la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* a partir de muestras de leche proveniente de cuartos de vacas afectadas con mastitis clínica y subclínica grado 3 tomando como prueba de referencia el cultivo *in vitro* de bacterias, en este trabajo la sensibilidad de la PCR fue de 60% y la especificidad fue del 87.3%. La sensibilidad indica la capacidad de las pruebas para dar como casos positivos los casos realmente positivos, la proporción en este caso de mastitis clínica y/o subclínica grado 3 producida por *S. agalactiae*. En otras palabras, la capacidad de la prueba para detectar el patógeno en los cuartos enfermos por *S. agalactiae*. La especificidad indica la capacidad de las pruebas para dar como negativos los casos realmente sanos, en este caso, la proporción de cuartos con mastitis clínica

y/o subclínica producida por otro patógeno diferente al *S. agalactiae*. En el diagnóstico clínico cuando los valores de sensibilidad y especificidad superan el 80% se considera una buena prueba. En este trabajo se encontró que la prueba PCR tiene una específica buena (>80%). Lo anterior es muy importante, ya que por regla general para el diagnóstico de cualquier patógeno se debe elegir pruebas con alta especificidad, donde es preferible obtener falsos negativos en el lugar de falsos positivos. En el caso concreto de la producción lechera, diagnosticar que la causa de la mastitis clínica y/o subclínica es debida al *S. agalactiae* y no ser este el patógeno que realmente este produciendo la infección, causará pérdidas financieras en costos de tratamientos inapropiados, mano de obra de médico veterinario y operarios, además de que la infección continuará por mas tiempo con sus respectivas consecuencias: disminución de la producción y la calidad de la leche, descarte de leche, e incluso descarte de animales. Sin embargo, a pesar de que el valor de la especificidad fue bueno, no fue tan alto como lo reportado por otros autores. Koskinen *et al.* 2009 en investigaciones compararon el cultivo bacteriológico .vs. PCR real – time, reportando una especificidad y sensibilidad del 100% en los ensayos para *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*. Gandra *et al.* 2009 compararon dos metodologías diferentes para la identificación de *Staphylococcus aureus*: cultivo bacteriológico con pruebas bioquímicas y PCR, concluyendo que la técnica molecular es más sensible que el cultivo. Sindhu *et al.* 2007 concluyen que la PCR permite la rápida y específica identificación de *S. aureus* y puede ser utilizada como prueba de rutina para diagnóstico.

La especificidad de la PCR depende de la temperatura empleada en la fase de hibridación, de la concentración de los diferentes reactivos que intervienen en la

reacción, y de la secuencia de los cebadores. Por una parte, cuanto mayor sea la temperatura utilizada en la fase de hibridación, más específica es la reacción. Esto se debe a que a mayor temperatura más difícil será la unión entre el cebador y la cadena molde. En condiciones de temperaturas de hibridación elevadas el cebador sólo se unirá a la cadena molde si son complementarios en todos sus nucleótidos. Por otra parte, el incremento en la concentración de MgCl<sub>2</sub> hace disminuir la especificidad de la reacción. La concentración óptima de los iones facilita la unión del cebador a la cadena molde y permiten la incorporación de los nucleótidos a la cadena creciente. En este trabajo se obtuvo una especificidad de 87.3% en muestras de leche. Sin embargo, cuando se observan los amplificadores en el control positivo (ADN de la cepa de referencia ATCC 13813), encontramos que amplificó en todos los ensayos, con la temperatura de anealing seleccionada (65 °C) después de realizar PCR con gradiente de temperatura, las concentraciones de los reactivos definidos después de realizar PCR con gradientes de MgCl<sub>2</sub> y los cebadores específicos, indicando exactitud en dichas variables.

En el presente trabajo, se encontró una sensibilidad de la prueba PCR para el diagnóstico de *S. agalactiae* de 60%. La sensibilidad de la PCR puede verse afectada por los inhibidores a través de diferentes mecanismos: interferencia con la lisis celular (Cremonesi *et al.* 2006; Wilson, 1997), la degradación o la captura de los ácidos nucleicos, o la inactivación de la Taq polimerasa. La interferencia de la lisis celular se da cuando se emplean técnicas pobres de extracción del ADN o mala preparación de las muestras dejando incluidas sustancias inhibidoras que impiden la amplificación del ADN. Las altas concentraciones de iones de calcio, potasio, magnesio y sodio pueden inhibir la polimerasa en diferentes proporciones (Wilson, 1997). El potasio en concentraciones superiores a 75 mM y el calcio a concentraciones superiores a 3 mM inhiben completamente la amplificación, el magnesio a 15 mM inhibe la capacidad de Taq polimerasa (Abu, 1998). La Taq polimerasa puede ser degradada por las proteinasas (Powell *et al.*

1994; Abu, 1998; Kim *et al.* 2001), desnaturalizada por el fenol (Kim *et al.* 2001) o detergentes (Abu, 1998) y otros factores como la grasa (Tamarapu *et al.* 2001). Diferentes métodos se han reportado para la extracción eficiente del ADN bacteriano: fenol-cloroformo, ebullición, kits comerciales, (Cremonesi *et al.* 2006; Kim *et al.* 2001; Poutou *et al.* 2005), adicional al método de extracción con base al tiocianato de guanidina, que logra eliminar grasas y proteínas, obtener mayor cantidad de ADN, logrando amplificadores más fuertes y reproducibles (Cremonesi *et al.* 2006; Kim *et al.* 2001). Khan *et al.* 1998, adicionaron al método de ebullición lavados con PBS, reportando incremento de la sensibilidad de la prueba del 52.6 % a 90 % con cuatro y cinco lavados, respectivamente. De igual manera, se han empleado técnicas para reducir el efecto de los inhibidores de PCR y separar a los microorganismos de los inhibidores. Por ejemplo, sistemas de dilución acuosa, punto de ebullición, gradiente de densidad por centrifugación, filtración, técnicas inmunológicas y métodos de extracción de ADN se han utilizado para facilitar la PCR, pero ninguno de ellos elimina completamente los inhibidores (Kim *et al.* 2001). Cien (100) gramos de leche bovina contienen 0.2 gramos de grasas (2%), 157 miligramos de potasio (1.57%) y 120 miligramos de calcio (1.2%). Trazas altas de iones de calcio, potasio y grasas pudieron no ser descartadas eficientemente por el método de extracción del ADN bacteriano, inhibiendo la polimerasa y probablemente por esto, no se obtuvo amplificación en muestras que si contenían *S. agalactiae*. Esto coincidiría con lo descrito por Wilson en 1997 y Tamarapu *et al.* 2001.

En esta investigación se utilizaron dos metodologías de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de leche y se evaluó la relación de estas con respecto a la sensibilidad y especificidad de la PCR para el diagnóstico de *S. agalactiae*. El resultado de la sensibilidad con el método de Fenol:cloroformo fue de 50% y la especificidad fue de 91%. Por otra parte, el valor de sensibilidad fue de 61.3% y de especificidad de 86% utilizando el kit DNeasy blood and tissue



Qiagen®. Estos resultados indican que el kit es el más acertado para procesos moleculares, ya que contaminantes como las proteínas inhiben la PCR y se requiere ADN de calidad que permita una óptima amplificación de fragmentos del genoma diana.

Con respecto a la estimación de la frecuencia de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche proveniente de cuartos afectados con mastitis clínica y/o subclínica grado 3 de hembras bovinas ubicadas en hatos del norte y oriente antioqueño diagnosticado por la técnica PCR, en esta investigación fue de 31%. Por su parte, la frecuencia del patógeno diagnosticado por cultivo bacteriológico fue de 38.7%. Con base en las experiencias de otros países, especialistas nacionales e internacionales han investigado el *Streptococcus agalactiae* en las circunstancias singulares de Colombia, encontrando que es un patógeno prevalente en los tanques de enfriamiento de la industria lechera de nuestro país (Keefe y Chaffer, 2010). Ramírez *et al.* 2001, realizaron CMT a cada cuarto de 112 vacas lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia, y a los cuartos positivos al CMT se les tomó muestra de leche para realizar recuento celular, cultivo y antibiograma. En los cultivos de los cuartos afectados (55 cuartos), la bacteria más frecuentemente aislada fue el *Streptococcus agalactiae*, seguida de SCN (*Staphylococcus Coagulasa Negativo*) y *Staphylococcus aureus* con un 47%, 14.6%, y 13%, respectivamente. Rodríguez en 2006, reportó la evaluación que realizó a 644 vacas distribuidas en 10 hatos en la Sabana de Bogotá enfocándose en el estudio de la mastitis por dos años. Los resultados agrupados indicaron que el *Streptococcus agalactiae* fue el principal patógeno en todos los hatos estudiados, pero tales prevalencias eran mayores en los sistemas con ordeño manual. Ramírez *et al.* 2010, realizaron 521 aislamientos microbiológicos de muestras de leche del norte de Antioquia y reportando *S. agalactiae* en el 31.3% de los cultivos realizados, siendo el patógeno de mayor frecuencia. El patrón de la infección es similar al encontrado en otros países. Ferraro *et al.* 1999, analizaron por CMT 24599 cuartos de 6405 vacas de 60

fincas lecheras en 13 estados de Venezuela. 2982 muestras de leche se cultivaron para diagnóstico microbiológico, donde el patógeno más común fue el *Streptococcus agalactiae* (37.8%). Cordero *et al.* 1991, analizaron por CMT un total de 509 vacas de 30 fincas lecheras en la provincia de Cartago, Costa Rica. Todos los cuartos positivos se cultivaron. La prevalencia de mastitis subclínica fue del 42.2% y la bacteria más común encontrada fue el *Streptococcus agalactiae* (17.7%). En Canadá, los niveles de infección por *S. agalactiae* en el rebaño van desde 11% reportado en 1991 en el estado de Alberta, hasta 47% en el estado de Vermont en 1985 (Keefe, 1997). Por su parte, Calderón y Rodríguez en 2008, evaluaron 11416 cuartos pertenecientes a 2854 vacas de 40 fincas especializadas en la producción de leche en el altiplano cundiboyacense mediante la prueba de CMT. 3931 resultaron positivos (casos clínicos y subclínicos grado 3) y fueron muestreados para aislar los microorganismos involucrados en la infección mamaria. 49.01% de los aislamientos involucraron microorganismos infecciosos. Sin embargo, el *Streptococcus agalactiae* fue aislado solo en el 6.84% de las muestras. Las infecciones mixtas representaron el 1.2% y la asociación más frecuente fue la de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*. De igual manera, Calderón *et al.* 2011, cultivaron 480 muestras de leche para aislar microorganismos involucrados en mastitis en cuartos subclínicos y clínicos para CMT en fincas del municipio de Montería (Córdoba). *Staphylococcus aureus*, fue aislado en el 87.5%, *Streptococcus uberis* aislado en el 3.6% y el *Streptococcus agalactiae* al igual que el *Corynebacterium bovis* se aisló solo en el 2.1% de las muestras. Aponte en 2007 en Paraguay, determinó la frecuencia de patógenos aislados, el perfil de resistencia y multiresistencia a los antimicrobianos utilizados contra los principales agentes etiológicos aislados 371 muestras de leche bovina cruda proveniente de cuartos con mastitis clínica y subclínica tomadas entre enero del 2000 y marzo del 2006, reportando *Streptococcus agalactiae* solo en el 9% de las muestras. En esta investigación se halló una frecuencia de *S. agalactiae* de 31% por PCR y de 38.7% por cultivo *in vitro* de la leche en los 13 municipios

analizados. Lo que concuerda con los estudios realizados por Ramírez *et al.* 2001 y 2010, Ferraro *et al.* 1999 y Cordero *et al.* 1991. Para analizar si existían diferencias de frecuencia del patógeno entre los 13 municipios donde se obtuvieron las muestras, se realizó una comparación de frecuencia de Chi cuadrado. La prueba arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la frecuencia del *S. agalactiae* entre los diferentes municipios. Por otro lado, no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre la frecuencia evaluada en las dos zonas geográficas (norte y oriente antioqueño). Norte antioqueño (7 municipios: Belmira, Don Matías, Entrerrios, San José de la Montaña, San Pedro de los Milagros, Santa Rosa de Osos y Yarumal) y Oriente antioqueño (6 municipios: El Carmen de Viboral, El Retiro, La Ceja, La Unión, Rionegro y Sonsón). 247 muestras provenían del norte y se diagnosticó la presencia del patógeno en 67 muestras de leche. 50 muestras provenían del oriente y se diagnosticó la presencia del patógeno en 13 muestras problema.

En cualquier caso de mastitis bovina, uno de los pilares del control, consiste en identificar rápidamente el patógeno para la selección del antimicrobiano con propósitos de la terapia y vigilar la tasa de infección en el hato. La idoneidad de un método de detección para el diagnóstico de rutina de microorganismos causantes de mastitis bovina depende de varios factores, como la especificidad, la sensibilidad, el costo, la cantidad de tiempo para obtener resultados y la aplicabilidad a un gran número de muestras de leche. El método de identificación de patógenos de la glándula mamaria considerada la prueba “*gold standard*” es el cultivo *in vitro* de la leche, técnica compleja y que requiere tiempo, donde son necesarios: medios de cultivo y condiciones de incubación especializados; 5 a 6 días son necesarios para el crecimiento, aislamiento e identificación del patógeno (en algunos casos con microorganismos de lento crecimiento son necesarios hasta 14 días para obtener colonias visibles); y pruebas adicionales para identificación (Khodakaram-Tafti y Lopez, 2004). Es una técnica difícil, subjetiva,

y requiere una amplia experiencia del operador, por ejemplo, para la diferenciación entre *Streptococcus* y *Enterococcus*, o entre *Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca* (Fortin *et al.* 2003). Para superar este problema, se han diseñado kits de cultivo de diagnóstico que permiten resultados más rápidos, pero su precisión diagnóstica ha sido limitada (Leslie y Dingwell, 2002; Simojoki *et al.* 2008). Adicional a ello, el cultivo convencional depende de las concentraciones de los microorganismos y la viabilidad de estos. Aproximadamente del 25 al 50% de las muestras no presentan ningún crecimiento bacteriano (Makovec y Ruegg, 2003; Bradley *et al.* 2007; Koivula *et al.* 2007). Una explicación para esto es que las muestras contengan bacterias anaeróbicas, que no crecen en medios estándar, o especies de anaerobias facultativas, por ejemplo, *Arcanobacterium pyogenes* o *Corynebacterium bovis*, que crecen lentamente o puede requerir factores de crecimiento adicionales (Makovec y Ruegg, 2003; Pitkälä *et al.* 2005). Condiciones desfavorables durante el transporte de la muestra también podrían disminuir la viabilidad de las bacterias causantes de mastitis (Dinsmore *et al.* 1992). Ramírez *et al.* 2010, reportaron que de 521 cultivos microbiológicos, en el 26.5% (138 muestras) no hubo crecimiento ni aislamiento bacteriológico. En consecuencia, los resultados de los diferentes laboratorios varían y la identificación errónea de patógenos causantes de mastitis es posible (Pitkälä *et al.* 2005).

La técnica PCR se basa en la detección y amplificación de secuencias específicas del genoma de cualquier organismo. Es un método de identificación rápida (1 o 2 días), no necesita etapa de cultivo ni un entorno especial del laboratorio donde los microorganismos puedan crecer (Riffon *et al.* 2001) y puede discriminar entre organismos estrechamente relacionados, tales como *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis*, lo cual no es posible por el método bacteriológico tradicional. No depende de la viabilidad de las bacterias y puede también detectar bacterias con crecimiento inhibido o muertas. Esta posibilidad puede

permitir la integración de los programas de control lechero (en el cual se monitorea vaca por vaca de un hato a través de muestra de leche preservadas con bronopol para medición de sólidos totales, UFC y RCS), y la identificación de bacterias de la misma muestra tomada del dispositivo de medición de la leche. Solo se necesita nanogramos de ADN. Se ha evaluado el límite de detección de la prueba de PCR para la detección de las células bacterianas: los resultados han sido hasta de 10 UFC/mL. (Cremonesi *et al.* 2006). En la PCR se cuenta con controles internos bien diseñados que ofrecen la interpretación plena de los resultados positivos y negativos lo que facilita el análisis (Bustin, 2004).

En diferentes investigaciones se ha utilizado la PCR para identificar los principales patógenos implicados en las infecciones intramamarias en hembras bovinas utilizando cebadores específicos para cada especie de bacteria a identificar (Riffon *et al.* 2001). La amplificación de regiones de los genes que codifican para el ARNr 16S y 23S son los más empleados debido a la presencia de regiones muy variables, lo que facilita el diseño de primers específicos para cada bacteria (Giovannoni *et al.* 1988) y regiones comunes para el diseño de sondas universales (Gray *et al.* 1984). Por ejemplo, los cebadores para el diagnóstico de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus uberis* han sido diseñados sobre la base de secuencias de ADN que codifica para el ARNr 23S. Para *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Mycoplasma bovis*, los cebadores se basan en secuencias de ADN que codifica para el ARNr 16S. Estas secuencias se encuentran disponibles en el Genbank (Jayarao *et al.* 1991; Mendoza *et al.* 1998; Riffon *et al.* 2001; Sabat *et al.* 2000). En varias investigaciones se ha evaluado la especificidad de cebadores específicos para cada especie de bacteria implicada en las infecciones intramamarias en hembras bovinas (Riffon *et al.* 2001), donde la leche ha servido como sustrato para la obtención de ADN bacteriano y para la posterior amplificación de secuencias diana mediante PCR (Lipkin *et al.* 1993).

Aunque la PCR para diagnóstico de microorganismos infecciosos causantes de mastitis puede ser utilizada a partir de muestras de leche cruda, los resultados son diferentes al comparar la misma técnica sobre ADN proveniente de cepas puras ATCC que sobre ADN proveniente de muestras de campo. Abu en 1998, Cremonesi *et al.* 2006 y Gandra *et al.* 2009, demostraron que partiendo de cultivos microbianos puros, la PCR es un método más potente. En las muestras clínicas, por su parte, pueden encontrarse inhibidores de PCR (Kim *et al.* 2001) y los resultados no ser fieles. El estudio actual muestra que la detección de secuencias diana en los ácidos nucleicos extraídos a partir de los aislamientos de la cepa comercial ATCC 13813 de *S. agalactiae* arrojó una exactitud del 100%. Cabe anotar que las colecciones de cepas comerciales vienen caracterizadas al mayor nivel de precisión posible (basado en secuenciación de ADN) y proporcionan la base necesaria para medir especificidad y sensibilidad de cualquier método.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

Ambas metodologías empleadas en esta investigación para extraer ADN bacteriano a partir de muestras de leche bovina son útiles, eficientes, fáciles de realizar y se obtuvo material genético en el total de las muestras analizadas. El kit DNeasy blood and tissue Qiagen® es el más acertado para procesos moleculares, ya que mostró ser más eficiente en cuanto a pureza, obteniéndose ADN de mejor calidad con bajos contaminantes. Se obtuvo la amplificación de un fragmento de 586 pb del gen 16S rRNA en el control positivo (ADN de cepa pura de *S. agalactiae* ATCC 13813) y en 8 muestras de leche, indicando que las secuencias de los primers elegidos, la temperatura de hibridación y las concentraciones de los reactivos, son correctos.

Con relación a la evaluación de la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el diagnóstico de *Streptococcus agalactiae*, a partir de muestras de leche proveniente de cuartos de vacas afectadas con mastitis clínica y subclínica grado 3, tomando con la prueba de referencia el cultivo *in vitro* de leche, en este estudio se reporta una sensibilidad del 60% y una especificidad del 87.3%. Sin embargo, a pesar de que el valor de la especificidad fue bueno, no fue tan alto como lo reportado por otros autores, y la sensibilidad fue regular debido probablemente a la presencia de inhibidores de PCR, como son las altas concentraciones de iones de calcio, potasio y grasa que pudieron no ser descartadas eficientemente por el método de extracción de ADN, inhibiendo la polimerasa. En esta investigación se utilizaron dos metodologías de extracción de ADN bacteriano a partir de muestras de leche. Los resultados indican que el kit es el más acertado para procesos

moleculares, ya que contaminantes como las proteínas inhiben la PCR y se requiere ADN de calidad que permita una óptima amplificación de fragmentos del genoma diana.

Con respecto a la estimación de la frecuencia del *Streptococcus agalactiae* diagnosticado por las técnicas PCR y cultivo microbiológico de muestras de leche proveniente de cuartos afectados con mastitis clínica y/o subclínica grado 3 de hembras bovinas ubicadas en hatos del norte y oriente antioqueño, en esta investigación se halló una frecuencia del patógeno de 31% (92 muestras positivas) por PCR y 38.7% (97 muestras positivas) por cultivo *in vitro*, en los 13 municipios donde se tomaron muestras. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Ramírez *et al.* 2001 (47%) y 2010 (31.3%), Ferraro en 1999 (37.8%) y Cordero en 1991 (17.7%). Para analizar si existían diferencias de frecuencia del patógeno entre los 13 municipios donde se obtuvieron las muestras, se realizó una comparación de frecuencia de Chi cuadrado. La prueba arrojó que existe diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en la frecuencia del *S. agalactiae* entre los diferentes municipios. Por otro lado, no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre la frecuencia evaluada en las dos zonas geográficas (norte y oriente antioqueño).



La estandarización de la técnica PCR para el diagnóstico de bacterias causantes de mastitis bovina, como lo es el *Streptococcus agalactiae*, sumado a la práctica diaria de una buena rutina de ordeño, tendrá un impacto positivo sobre los productores de leche, los laboratorios de diagnóstico, los profesionales del sector pecuario y la industria lechera. El diagnóstico molecular se ha realizado de manera experimental en países líderes en tecnología de producción lechera tanto en Norteamérica como en Europa (Cremonesi *et al.* 2006; Martínez *et al.* 2001). De hecho, ya se comercializan kits de diagnóstico molecular multipatógenos con resultados excelentes (Koskinen *et al.* 2009). En Colombia, aun no se incursionado en este desarrollo, por lo que la estandarización y difusión en nuestro medio de esta metodología repercutirá de manera positiva en la disminución del recuento de células somáticas, que se traduce en mejores pagos por calidad de leche, mayor producción, menos costos de producción (medicamentos, leche de descarte, descarte de vacas, mano de obra de médico veterinario y operarios). Por otro lado, la industria se beneficiará con materia prima de mayor calidad, productos con mayor tiempo de vida en anaquel y acceso a mercados internacionales con estándares más exigentes.

La prueba PCR mostró ser buena, con una especificidad buena y una sensibilidad regular. Promete ser una herramienta rutinaria en el diagnóstico de los patógenos causantes de mastitis a partir de muestras de leche de cuartos de vacas con mastitis clínica y subclínica. Este estudio proporciona una base para la evaluación del diagnóstico de *S. agalactiae* por PCR. Más estudios ayudarán a demostrar si el ensayo se puede implementar en la rutina de programas de diagnóstico de mastitis. La PCR tiene costos altos de reactivos e instrumentos en comparación con el cultivo bacteriano convencional, sin embargo, estos costos deben ser considerados, en relación con los beneficios técnicos proporcionados por la PCR.



## Bibliografía

- Abu, A. S., y P. Radstrom. 1998. «Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples». *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3748–3753.
- Amory, S., C. Keyser, E. Crubézy, y B. Ludes. 2007. «STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies». *Forensic Science International* 166: 218–229.
- Andresen, H. 2001. «Mastitis: Prevención Y Control». *Rev Inv Vet Perú* 12(2): 55-64.
- Aponte, F. 2007. «Perfil de resistencia *in vitro* a antimicrobianos de cepas causantes de mastitis aisladas de leche cruda bovina en establecimientos de pequeña y mediana producción». *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* 5(1).
- Ávila, T. S. 1984. «Producción intensiva de ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria». Edit. Continental. México. 139-157.
- Ballou, M. A. 2011. «Inflammation: role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows». *J Anim Sci* 90: 1466–78.

- Becerra, A., C. Carvajal, y D. Baez. 2014. «Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras del altiplano boyacense (Colombia)». *Revista Científica, FCV-LUZ* 24(4): 305-310.
- Bedolla, C. C. 2004. «Métodos de detección de la mastitis bovina». Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Bedolla, C. C. 2008. «Economic casualties inflicted by the bovine mastitis in the milk industry». *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* 4: 1695-7504. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>
- Bedolla, C. C., V. H. Castañeda, y W. Wolter. 2007. «Métodos de detección de la mastitis bovina». *Revista electrónica de Veterinaria REDVET* 8(9) <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090702.pdf>
- Borghesi, L., y C. Milcarek. 2007. «Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime». *Cancer Res* 67:3989–93.
- Bradley, A. J., K. A. Leach, J. E. Breen, L. E. Green, y M. J. Green. 2007. «Survey on the incidence and etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales». *Vet. Rec* 160: 253–258.

- Burgos, W., C. Rosero, H. Cardenas y C. Solarte. 2007. «Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's) a partir de muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA para la especie *Cavia porcellus Lin*». *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 20(1): 67-72.
- Bustin, S. A. 2004. «Quantification of nucleic acids by PCR». *An A-Z Manual of Quantitative PCR*. IUL Press, La Jolla, CA. 5 – 46.
- Calderón, A., V. C. Rodríguez, G. J. Arrieta, y S. Máttar. 2011. «Prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Montería (Colombia): etiología y susceptibilidad antibacteriana». *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 24:19-28.
- Calderón, A., y V. C. Rodríguez. 2008. «Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia)». *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21:582-589.
- Calderón, A., M. Arteaga, V. Rodríguez, G. Arrieta, D. Bermudez, y V. Villareal. 2011. «Efecto de la mastitis subclínica sobre el rendimiento en la fabricación del queso costeño». *Biosalud* 10(2):16-27.
- Calderon, R., R. Rodríguez, B. Arrieta, y V. Mattar. 2011. «Prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Montería (Colombia): etiología y

susceptibilidad antibacteriana». *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 24(1): 19-28

Cavero, D., K. H. Tolle, G. Rave, C. Buxadé y J. Krieter. 2007. «Analysing serial data for mastitis detection by means of local regression». *Livestock Science*. 110: 101 – 110.

Cepero, O., J. C. Castillo, y J. Salado. 2005. «Mastitis Subclínica: su detección mediante diferentes técnicas diagnóstica en unidades bovinas». *Revista electrónica de veterinaria REDVET* 6(3).  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305.html>

Cerón, M. F., J. E. Agudelo, y E. G. Maldonado. 2007. «Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas lecheras del departamento de Antioquia (Colombia)». *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 20:472-483.

Clavijo, A., B. Meléndez, M. L. Clavijo, A. Godoy y J. Santander. 2002. «Efecto del sistema de explotación sobre la aparición de mastitis caprina en dos fincas del estado Falcón, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos». *Zoot Trop* 20:383-395.

Contreras, G. A., y J. M. Rodriguez. 2011. «Mastitis: comparative etiology and epidemiology». *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:339–56.

- Corbellini, C. M. 2002. «La mastitis bovina y su impacto económico sobre la calidad de leche». Medellín: Memorias III Seminario internacional sobre competitividad en carne y leche COLANTA 251-265.
- Cordero, L., J. E. Quirós-Arce, R. Rojas, M. Caballero-Castillo, R. Meléndez-Arce y E. Sancho. 1991. «Prevalencia de mastitis en 30 hatos lecheros de la Meseta Central de Costa Rica». *Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Heredia, Costa Rica* 13(1): 9-13.
- Cremonesi, P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati, P. Moroni, S. Morandi y M. Luzzana. 2006. «Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk». *J. Dairy Sci* 89: 163–169.
- DeVliegher, S., L. K. Fox, S. Piepers, S. McDougall, y H. W. Barkema. 2012. «Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control». *J Dairy Sci* 95:1025-40.
- Dinsmore, R. P., P. B. English, R. N. Gonzalez y P. M. Sears. 1992. «Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis». *J. Dairy Sci* 75: 2706–2712.
- Dmitriev, A., E. Shakleina, M. Tkacikova, I. Mikula, y A. Totolian. 2002. «Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci». *Folia Microbiol* 47: 291 – 295.

Echeverri, J. J., M. G. Jaramillo y L. F. Restrepo. 2010. «Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia». *Revista Lasallista de Investigación* 49-57.

Fernández, B., G. J. Trujillo, C. J. Peña y G. J. Cerquera. 2012. «Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico». *Redvet* 13(11):1-11  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111112.html>.

Ferraro, L., A. Scaramelli, y H. Troya. 1999. «Prevalence of subclinical bovine mastitis in Venezuela and evaluation of the California mastitis test (CMT)». *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia* 9(2): 81 - 90.

Figueroa, G., y C. Bedolla. 2008. «Determination of the prevalence of bovine mastitis in the municipality of Tarimbaro, Michoacan, by means of the California test». *Revista electrónica de Veterinaria REDVET*.  
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101008/101004.pdf>

Fokko, H. 2006. «La mastitis causa grandes pérdidas económicas». *Veepro Dairy Management* 63.

Forsman, P., A. Tilsala-Timisjarvi, y T. Alatossava. 1997. «Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions». *Microbiology* 143: 3491-3500.



- Fortin, M., S. Messier, J. Paré, y R. Higgins. 2003. «Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples». *J. Clin. Microbiol* 41: 106–109.
- Fox, L. K., F. J. Muller, M. L. Wedam, C. S. Schneider, y M. K. Biddle. 2008. «Clinical *Mycoplasma bovis* mastitis in prepubertal heifers on 2 dairy herds». *The Canadian Veterinary Journal* 49(11): 1110–1112.
- Gandra, E., J. A. Silva, M.R. Macedo, M. Rivero, M. Mata, y W. Silva. 2009. «Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PCR». *Alimentos e nutrição araraquara*. 16: 99-103.
- Gasque, G., y O. Blanco. Zootecnia en bovinos productores de leche. Primera edición 2001. ISBN 968 – 36 – 9295-8. p 161.
- Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen, y N. R. Pace. 1988. «Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells». *J. Bacteriol* 170: 720–726.
- Gonzales, G., G. Navarrete, M. Sarabia, y V. Osuna. 2011. «Identificación de agentes patógenos que producen mastitis subclínica y resistencia a antimicrobianos». Tesis. Universidad Autónoma de Sinaloa. Mexico. <http://es.scribd.com/doc/248747483/MASTITIS#scribd>.

- Gray, M. W., D. Sankoff, y R. J. Cedergren. 1984. «On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in a small subunit ribosomal RNA». *Nucleic Acids Res* 12: 5837–5852.
- Grohmann, E., G. Muth, y M. Espinosa. 2003. «Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(2): 277-301.
- Güven, K., O. Cetin, O. Bingo, y M. C. Zunduz. 2012. «Relations between electrical conductivity somatic cell count California Mastitis Test and some quality parameters in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows». *Turk J Vet Anim Sci* 36: 49-55.
- Hernández, A. L. 2009. «Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina por medio de la prueba modificada de Wisconsin». 500 Tecnologías Llave en Mano, División pecuaria, Edición 1999. INIFAP-SAGAR. [http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=534&Itemid=138](http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=534&Itemid=138).
- Jayarao, B. M., J. J. Dore, G. A. Baumbach, K. R. Matthews, y S. P. Oliver. 1991. «Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA». *J. Clin. Microbiol* 29: 2774–2778.

- Keefe, G. y M. Chaffer. 2010. «Mastitis: su efecto en la calidad de la leche y plan de control». CONGRESO: VII Seminario Internacional en Competitividad en Carne y Leche. 59 – 62.
- Keefe, G. P. 1997. «*Streptococcus agalactiae* mastitis: a review». *The Canadian Veterinary Journal* 38(7): 429–437.
- Khan, M., C. Kim, I. Kakoma, E. Morin, R. Hansen, W. Hurley, D. Tripathy, y B. Baek. 1998. «Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase-chain-reaction analysis». *American Journal of Veterinary Research* 59(7): 807-813.
- Khodakaram-Tafti, A. y A. Lopez. 2004. «Immunohistopathological findings in the lungs of calves naturally infected with *Mycoplasma bovis*». *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 51:10–14.
- Kim, C. H., M. Khan, D. Morin, W. Hurley, D. Tripathy, Jr. M. Kehrli, A. Oluoch, y I. Kakoma. 2001. «Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk». *Journal of dairy science* 84: 74-83.
- Koivula, M., E. A. Mäntysaari, A. Pitkälä, y S. Pyörälä. 2007. «Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland». *Acta Agric. Scand. A* 57: 89–96.

Koskinen, M.T., J. Holopainen, S. Pyörälä, P. Bredbacka, A. Pitkälä, H. W. Barkema, R. Bexiga, J. Roberson, L. Sølverød, R. Piccinini, D. Kelton, H. Lehmusto, S. Niskala, y L. Salmikivi. 2009. «Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens». *J. Dairy Sci* 92:952 – 959.

Leslie, K. y R. Dingwell. 2002. «Mastitis control: Where are we and where are we going? Recent Developments and Perspectives in Bovine Medicine». CONGRESO: XXII World Buiatrics. Hannover, Germany.

Lipkin, E., A. Shalom, H. Khatib, M. Soller, y A. Friedmann. 1993. «Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction». *J. Dairy Sci* 76 : 2025 – 2032.

Mackay, I. M. 2004. «Real-time PCR in the microbiology laboratory». *Clin. Microbiol. Infect* 10: 190–212.

Mahmmod, Y. 2013. «The Future of PCR Technologies in Diagnosis of Bovine Mastitis Pathogens». *Adv Dairy Res* 2: 106.

Makovec, J. A. y P. L. Ruegg. 2003. «Characteristics of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001». *J Dairy Sci* 86: 3466-3472.

- Martinez, G., J. Harel, y K. M. Gottschal. 2001. «Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk». *The Canadian journal of veterinary research* 65: 68-72.
- Martinez, P., C. Carrillo, y M. Figueredo. 2013. «Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes». *Conexión Agropecuaria JDC* 3(1): 53 – 73.
- Mcnevin, D., L. Wilson-Wilde, J. Robertson, J. Kyd, y C. Lennard. 2005. «Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 2. An optimized genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles». *Forensic Science International* 153: 247–259.
- Mendoza, M., H. Meugnier, M. Bes, J. Etienne, y J. Freney. 1998. «Identification of *Staphylococcus* species by 16S–23S rDNA intergenic spacer PCR analysis». *Int. J. Syst. Bacteriol* 48:1049–1055.
- Nash, D. L., G. W. Rogers, J. B. Cooper, G. L. Hargrove, J. F. Keown. 2002. «Relationships among severity and duration of clinical mastitis and sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield». *J Dairy Sci* 85:1273-1284.
- National-Mastitis-Council. 1998. «Current Concepts of Bovine Mastitis». Natl. Mastitis Council, Madison, WI.

- Osorio, R. 2010. «Aislamiento y tipificación de los principales gérmenes que producen mastitis clínica en las diferentes etapas de lactación en vacas lecheras en el valle de jamastran, el paraíso, honduras». Tesis. Universidad De San Carlos De Guatemala. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10\\_1209.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_1209.pdf).
- Osteras, O. 2006. «Milk culture results in a large Norwegian survey». *J.Dairy Sci* 89:1010-1023.
- Ovidio, C. F., P. P. Rojas, y L. Rodríguez. 2006. «New biotechnological approaches to treat mastitis». *Agro-Ciencia* 22(1): 49-58.
- Pellegrino, M. S., I. D. Frola, L. M. Odierno, C. I. Bognia. 2011. «Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche». *REDVET Rev. Electrón. Vet* 12(7) <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070711/071110.pdf>.
- Pérez, D. M. 1986. Manual sobre ganado productor de leche. Edit. Villicaña S.A., México. 710-744.
- Pérez, C. G., C. C. Bedolla, y V. H. Castañeda. 2005. «Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche». *Sustentabilidad. Universidad de Guadalajara, Jalisco México*, 3(1):86-94.

- Philpot, W. N. 2001. «Relación entre el manejo del hato y la mastitis». <http://www.cnmweb.bizland.com/publicaciones/DrPhilpot1>.
- Pinzón, A., F. C. Moreno, y G. Rodríguez. 2009. «Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá)». *Revista de Medicina Veterinaria*. 17:23-36.
- Pitkälä, A., V. Gindonis, H. Wallin, y T. Honkanen-Buzalski. 2005. «Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis». *J. Dairy Sci* 88: 553–559.
- Poutou, R., M. Burbano, S. Sierra, K. Torres, A. K. Carrascal, y M. Mercado. 2005. «Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar listeria monocytogenes en queso, leche, carne de res y pollo.» *Revista de la Facultad de Ciencias, Universidad Pontificia Javeriana* 10 (2): 61 - 78.
- Powell, H. A. 1994. «Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction». *Lett. Appl. Microbiol* 18: 59–61.
- Punyapornwithaya, V., L. K. Fox, D. D. Hancock, J. M. Gay, J. R. Alldredge. 2012. «Time to clearance of mycoplasma mastitis: The effect of management factors including milking time hygiene and preferential culling». *The Canadian Veterinary Journal* 53 (10):1119-1122.
- Qiagen. 2006. DNeasy® Blood y Tissue Handbook.

- Radostits, O. M., C. C. Gay, D. C. Blood, y K. W. Hinchcliff. 2002. Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina. Edit. Mcgraw-hill. 9° Edición (1). Madrid, España 728 - 810.
- Ramírez, N., G. Gaviria, O. Arroyave, B. Sierra, y J. Benjumea. 2001. «Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia». *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 14 (1): 76-87.
- Ramírez, N., J. M. Cerón, M. Jaramillo, y O. Arroyave. 2010. «Diagnóstico de mastitis en el norte de Antioquia». CONGRESO: VII Seminario Internacional en Competitividad en Carne y Leche. Medellín. 69 – 78.
- Ramírez, N., O. Arroyave, M. Cerón-Muñoz, M. Jaramillo, J. Cerón, G. Palacio. 2011. «Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia». *Revista de Medicina Veterinaria* 22: 31-42.
- Reddy, B. S., K. N. Kumari, y S. Sivajothi. 2014. «Antimicrobial sensitivity of gram negative bacteria isolated from recurrent pyoderma in dogs». *Advances in Applied Science Research* 5(1):241-243.
- Riekerink, R. G. M. O., H. W. Barkema, S. Veenstra, D. E. Poole, R. T. Dingwell, y G. P. Keefe. 2006. «Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island». *The Canadian Veterinary Journal* 47(6) 567–572.



- Riffon, R., K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet y J. Lagace. 2001. «Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR». *Journal of Clinical Microbiology* 2584 – 2589.
- Rodríguez, M. G. 2006. «Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia». *Revista de Medicina Veterinaria* 12: 35-55.
- Rossitto, P. V., L. Ruiz, Y. Kikuchi, K. Glenn, K. Luiz, y J. L. Watts. 2002. «Antibiotic susceptibility patterns for environmental Streptococci isolated from bovine Mastitis in Central California Dairies». *J. Dairy Sci* 85:132-138.
- Ruiz, R., O. Cervantes, y G. Martinez. 2013. «Desarrollo de una PCR múltiple para la identificación de *Staphylococcus spp* como causa de mastitis caprina». *Arch Med vet* 45(3): 327-331.
- Sabat, G., P. Rose, W. J. Hickey, y J. M. Harkin. 2000. «Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil». *Appl. Environ. Microbiol* 66: 844–849.
- Saran, A. y M. Chaffer. 2000. Mastitis y calidad de la leche. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 11-16, 23-50.

- Schalm, O. W., y D. O. Noorlander. 1957. «Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test». *J Am Vet Med Assoc* 130(5):199–204.
- Simojoki, H. S., A. Erkkilä, A. Pitkälä, y S. Pyörälä. 2008. «A pilot study on the bacteriological diagnostics of bovine mastitis carried out by Finnish veterinarians». CONGRESO: 25th World Buiatrics Association. Budapest, Hungary.
- Sindhu, N., A. Sharma, S. Kumar, y V. Jain. 2007. «Polymerase chain reaction assay for detection of *Staphylococcus aureus* in buffalo milk». *Italian Journal of Animal Science* 6(2): 862-864.
- Smith, L., y L. Burgoyne. 2004. «Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper». *BMC Ecology* 4(4): 11.
- Tamarapu, S., J. L. Mckillip, y M. Drake. 2001. «Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products». *Journal of Food Protection* 64(5): 664-668.
- Trujillo, C. M., A. F. Gallego, N. Ramírez, y L. G. Palacio. 2011. «Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia». *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 24:11-18.

- Villagómez, C., y A. Cervantes. 2013. «Impacto económico de la mastitis bovina en la lechería tropical». XII Curso Internacional Teórico Práctico “Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina”. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Veracruz, México.
- Wattiaux, M. A. 2013. Mastitis: prevención y detección. Esenciales Lecheras. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera, Universidad de Wisconsin-Madison. Madison, WI, USA 93-96.
- Wellnitz, O., E. T. Arnold, y R. M. Bruckmaier. 2011. «Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland». *J Dairy Sci* 94: 5405–12.
- White, D. G., y P. F. McDermott. 2001. «Emergence and transfer of antibiotic resistance». *Journal of Dairy Science* 84 (E. Suppl.): 151–155.
- Wilson, I. G. 1997. «Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification». *Applied and Environmental Microbiology* 63(10): 3741–3751.
- Zadoks, R. 2014. «Understanding the sources, transmission routes and prognoses for mastitis pathogens». *WCDS Adv Dairy Technol* 26: 91–100.

Zadoks, R. N., H. G. Allore, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, Y. T. Gröhn, y Y. Schukken. 2001. «Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis». *J. Dairy Sci* 84(3): 590-599.