

Identificación de *Streptococcus uberis* aislados de muestras de leche bovina

Aluminé S. Fessia^{1,2}; Silvana A. Dieser²; Liliana M. Odierno^{2*}

1- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

2- Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Palabras clave

Streptococcus uberis,
Mastitis Bovina,
MALDI-TOF

Resumen. La mastitis es una enfermedad multifactorial originada por interacción entre el agente etiológico, el hospedador y el medio ambiente, ocasionando grandes pérdidas económicas. *Streptococcus uberis* es el principal patógeno estreptocócico ambiental responsable de mastitis clínicas y subclínicas. Los métodos precisos y rentables para identificar los patógenos de la mastitis son importantes para el diagnóstico, la vigilancia y el control de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue realizar una identificación preliminar de aislamientos de *Strep. uberis* basada en 4 pruebas bioquímicas y su posterior confirmación mediante la detección del gen *pauA*, utilizando la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF) como prueba de oro. Las colonias de cocos Gram positivos en cadenas, catalasa negativos fueron identificadas *Strep. uberis* mediante MALDI-TOF. Todos los aislamientos fueron identificados presuntamente como *Strep. uberis* en base a las pruebas bioquímicas de hidrólisis de hipurato, hidrólisis de esculina, crecimiento en cloruro de sodio 6,5% y en bilis. Posteriormente, se amplificó el gen *pauA* en los aislamientos para confirmar la pertenencia a la especie, detectando en 32 de los 34 (94,11%) aislamientos la presencia del amplicón del gen *pauA*. Los resultados del presente estudio demuestran que la combinación de cuatro pruebas convencionales para realizar una identificación preliminar y su confirmación mediante la amplificación del gen *pauA* mediante PCR permiten la identificación de *Strep. uberis* aislados de leche de casos de mastitis bovina.

Cita sugerida: Fessia, A., et al., 2018. Identificación de *Streptococcus uberis* aislados de muestras de leche bovina. Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus 1 (1): 110-115

Recibido: 19 de marzo 2018 ; aceptado: 10 de mayo 2018

*Autor para correspondencia: Liliana M. Odierno, E-mail: lodierno@exa.unrc.edu.ar - Ruta Nacional 36, Km 601. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Financiamiento: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT) y Proyecto y Programa de Investigación (PPI), otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto.



Identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine milk samples

Keywords

Streptococcus uberis,

Bovine Mastitis,

MALDI-TOF

Abstract. Mastitis is a multifactorial disease caused by interaction between the etiological agent, the host and the environment, causing severe economic losses. *Streptococcus uberis* is one of the most important environmental pathogens associated with clinical and subclinical bovine mastitis. Cost efficient and accurate methods to identify pathogens of mastitis are important for the diagnosis, monitoring and control of this disease. The aim of this work was to perform a preliminary identification of *Strep. uberis* based on 4 biochemical tests and its subsequent confirmation through the detection of the *pauA* gene, using the mass spectrometry technique (MALDI-TOF) as an gold standard. Gram-positive and negative-catalase cocci colonies were identified as *Strep. uberis* by MALDI-TOF. All isolates were presumptively identified as *Strep. uberis* based on the biochemical tests of hippurate hydrolysis, esculin hydrolysis, growth on 6.5% sodium chloride and growth on bile. Subsequently, the *pauA* gene was amplified in the isolates to confirm the belonging to the *Strep uberis*, detecting presence of the amplicon of *pauA* gen in 32 of the 34 isolates (94.11%). The results of the present study demonstrate that the combination of four conventional microbiological tests to preliminary classification and their confirmation by amplification of the *pauA* gene by PCR allow the identification of *Strep. uberis* isolated from milk samples from cases of bovine mastitis.

La mastitis es una enfermedad multifactorial que se origina por interacción entre el agente etiológico, el hospedador y el medio ambiente. La misma es altamente prevalente en el ganado bovino, ocasionando significativas pérdidas económicas debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche producida (Vissio *et al.*, 2012; Hadrich *et al.*, 2018). *Streptococcus uberis* es un importante patógeno ambiental implicado en la mastitis bovina y está asociado con infecciones intramamarias clínicas y subclínicas, tanto en el período de lactancia como en vacas no lactantes (Khan *et al.*, 2003; Calvino y Tirante, 2005). Los métodos precisos y rentables para identificar los patógenos de la mastitis son importantes para el diagnóstico, la vigilancia y el control de esta enfermedad (Leigh, 1999). Los cocos gram-positivos, catalasa-negativos, con capacidad de hidrolizar la esculina, aislados de casos clínicos y subclínicos se clasifican comúnmente como *Strep. uberis* en los laboratorios de diagnóstico de rutina considerando el elevado número de muestras que procesan y el tiempo que demandan las pruebas convencionales (Fortin *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2003; Odierno *et al.*, 2006). Las técnicas de diagnóstico molecular utilizadas en la identificación bacteriana a nivel de especie son más

precisas y carecen de la subjetividad asociada con la interpretación de las pruebas bioquímicas (Kawata *et al.*, 2004; Raemy *et al.*, 2013). La espectrometría de masas MALDI-TOF (en español: desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo; MALDI-TOF MS, Bruker®) permite el análisis de biomoléculas como proteínas y péptidos a partir de colonias generando un espectro de masas específico para cada especie. En los últimos años se ha convertido en una herramienta confiable y rápida para la identificación de microorganismos causantes de mastitis bovina, aunque de costo elevado hasta amortizar el valor del equipo (Barreiro *et al.*, 2010; Raemy *et al.*, 2013; Archer *et al.*, 2017). El objetivo de este trabajo fue realizar una identificación preliminar de aislamientos de *Strep. uberis* basada en cuatro pruebas bioquímicas y su confirmación mediante la detección del gen *pauA*, utilizando la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF) como prueba de oro.

Un total de 34 aislamientos de *Strep. uberis* provenientes de 17 establecimientos pertenecientes a la cuenca lechera central de Argentina (Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe), fueron aislados de cuartos mamarios de vacas con mastitis (RCS > 250.000 cél/

ml) en placas de agar sangre ovina 5%. Las colonias fueron identificadas presuntivamente como estreptococos por su apariencia colonial, reacción positiva a la tinción de Gram y prueba de catalasa negativa (Hogan y Smith, 2012) y conservadas a -20°C en caldo para estreptococos (triptona 1,5%, peptona de carne 0,3%, cloruro de sodio 0,5%, fosfato dipotásico 0,75%, extracto de levadura 0,75%, sacarosa 0,5%) (Britania, BA, Argentina), adicionado con 20% de glicerol. Además, se incluyeron en el estudio las cepas *Streptococcus uberis* ATCC 27958 como control positivo y *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956 y *Streptococcus dysgalactiae* subsp *dysgalactiae* ATCC 27957 como controles negativos. Para la identificación convencional de aislamientos de *Strep. uberis* se seleccionaron cuatro pruebas bioquímicas, hidrólisis de hipurato y de esculina, y crecimiento en bilis y en cloruro de sodio al 6,5% (NMC, 2004). La hidrólisis de hipurato se llevó a cabo utilizando caldo Todd Hewitt (THB) (Britania, BA, Argentina) suplementado con 0,4% de hipurato. La hidrólisis de esculina se ensayó en agar con esculina al 1% (Britania, BA, Argentina). El crecimiento en bilis se determinó en agar bilis-esculina (Britania, BA, Argentina), mientras que el crecimiento en cloruro de sodio al 6,5% se evaluó en THB adicionado con la sal. La identificación molecular se realizó mediante amplificación por PCR del gen *pauA*, tal como describe Raemy *et al.* (2013) (Tabla 1). Previamente se realizó una extracción de ADN genómico utilizando el Kit de purificación de ADN Wizard (Promega, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 20 ng de ADN molde, buffer GoTaq Green 1X, 3,5 mM MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 U de ADN Taq Polimerasa y agua libre de nucleasas (Promega, EUA). En todos los ensayos se realizó un control negativo. La amplificación fue llevada a cabo en un Termociclador PTC-220 (MJ Research Inc.).

La técnica de MALDI-TOF basada en perfiles proteómicos específicos fue utilizada como prueba de oro y realizada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Privado Universitario de Córdoba. Brevemente, una o dos colonias aisladas de cada aislamiento cultivadas 18 h en TSA fueron suspendidas en etanol 70%. Se añadió una solución de ácido fórmico 70% y acetonitrilo 1: 1 al precipitado. Las muestras se procesaron en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) con un software de control flexible (Bruker Daltonics) operado en modo lineal y equipado con un láser de nitrógeno de 337 nm. El análisis de los espectros se realizó con el programa Flex Control 3.4, y se utilizó el programa de identificación y la base de datos Biotyper 3.1. Un score de 2,300 a 3,000 se consideró identificación de especie con alto nivel de confianza (+++), mientras que un valor de 2,000 a 2,299 se consideró solo como identificación segura del género, con identificación probable de la especie (++) . El rango de valores de 1,700 a 1,999 indicaba identificación probable del género (+). Un score <1,70 se consideró una identificación inaceptable (-). Del análisis de los aislamientos del presente estudio, los 34 mostraron scores de 2 a 2,299 (+++). En relación a los datos de cepas cargados en la librería interna del software, las 3 cepas de *S. uberis* de la base de datos presentaron scores correspondientes a los rangos de calidad (+++), y las cepas *Strep agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* spp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp *equisimilis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus equi* ssp *zooepidemicus*, *Streptococcus equi* ssp *equi*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus ovis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus*, *Staph. aureus* ssp *aureus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, *Lactobacillus plantarum* ssp *plantarum*, presentaron scores correspondientes

Gen	Secuencia del cebador	Tamaño del producto	Programa
<i>pauA</i>	5' TGATTCCGACTACTACGCTAGAT 3'	723 pb	30 (94°C 60 s - 54°C 45 s - 72°C 45 s)
	5' ATACTTTGAGTTTCACCGAGTTC 3'		

Tabla 1. Secuencia de los cebadores, tamaño del producto de amplificación del gen *pauA* y programa para reacción de PCR

a los rangos de calidad (-). El score presentado por cada aislamiento fue comparado a aquellos exhibidos por las cepas antes mencionadas, confirmando de esta manera que los 34 aislamientos pertenecían a la categoría A lo cual indica consistencia a nivel de la especie *Strep. uberis*. La técnica MALDI-TOF resultó ser una herramienta confiable y rápida para identificar aislamientos de *Strep. uberis* en coincidencia con lo informado por Raemy *et al.* (2013) y Archer *et al.* (2017). Luego, los aislamientos fueron ensayados para su clasificación a nivel de especie en base a las pruebas bioquímicas de hidrólisis de hipurato, hidrólisis de esculina, crecimiento en cloruro de sodio 6,5% y en bilis, seleccionadas con el fin de reducir el número de pruebas bioquímicas propuestas por otros autores (Fortin *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2003; Odierno *et al.*, 2006; Raemy *et al.*, 2013). Estas permiten diferenciar las principales especies de *Streptococcus* causantes de mastitis bovina, *Strep. uberis*, *Strep. agalactiae* y *Strep. dysgalactiae*, de acuerdo a lo establecido por NMC (2004). Los 34 aislamientos se identificaron presuntivamente como *Strep. uberis* por ser positivos para la hidrólisis de la esculina y del hipurato, y negativos para el crecimiento en NaCl 6,5% y en agar bilis-esculina (NMC, 2004), en coincidencia con el perfil bioquímico exhibido por la cepa *Strep. uberis* ATCC 27958. Posteriormente, se confirmó la identificación a nivel de especie mediante la amplificación del gen *pauA* por PCR. Los resultados mostraron que el 94,11% (32/34) de los aislamientos de *Strep. uberis* evidenciaron una única banda de 723 pb correspondiente al producto esperado, determinada en base al marcador de peso molecular de 100 pb mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 1).

En este sentido, este resultado coincide con la elevada prevalencia del gen *pauA* descrita en la mayoría de los estudios realizados tanto en nuestro país

(Perrig *et al.*, 2015), como en otros países (Rosey *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2003). Un análisis *in silico* (Datos inéditos) realizado en el presente estudio reveló un alto grado de conservación en la secuencia nucleotídica del gen *pauA* y su correspondiente proteína PauA, indicando que se puede utilizar dicho gen como marcador putativo de especie. Este resultado coincide con la elevada identidad (> 95%) demostrada en las secuencias de los nucleótidos de 20 aislamientos de *Strep. uberis*, con respecto a las 55 secuencias registradas en GenBank y a las 30 secuencias registradas en la base de datos de Food Microbe Tracker (Perrig *et al.*, 2015). En consecuencia, la ausencia del amplicón *pauA* detectada en dos de los aislamientos en el presente estudio puede deberse a la ausencia del gen. Si bien los resultados son similares a los datos obtenidos por Raemy *et al.* (2013), quienes demostraron que el gen *pauA* permitió identificar el 100% de 40 aislamientos de *Strep. uberis*, nosotros proponemos seleccionar en estudios futuros un gen altamente conservado de *Strep. uberis* que pueda encontrarse en el 100% de los aislamientos. Los resultados del presente estudio demuestran que la combinación de cuatro pruebas microbiológicas convencionales para realizar una identificación preliminar y su confirmación mediante la amplificación del gen *pauA* mediante PCR permiten la identificación de *Strep. uberis* aislados de muestras de leche de casos de mastitis bovina. Este esquema es de utilidad en laboratorios de diagnóstico veterinario debido a su costo accesible que permite obtener resultados de manera fácil y confiable, con el fin de mejorar la condición sanitaria de los establecimientos lecheros.

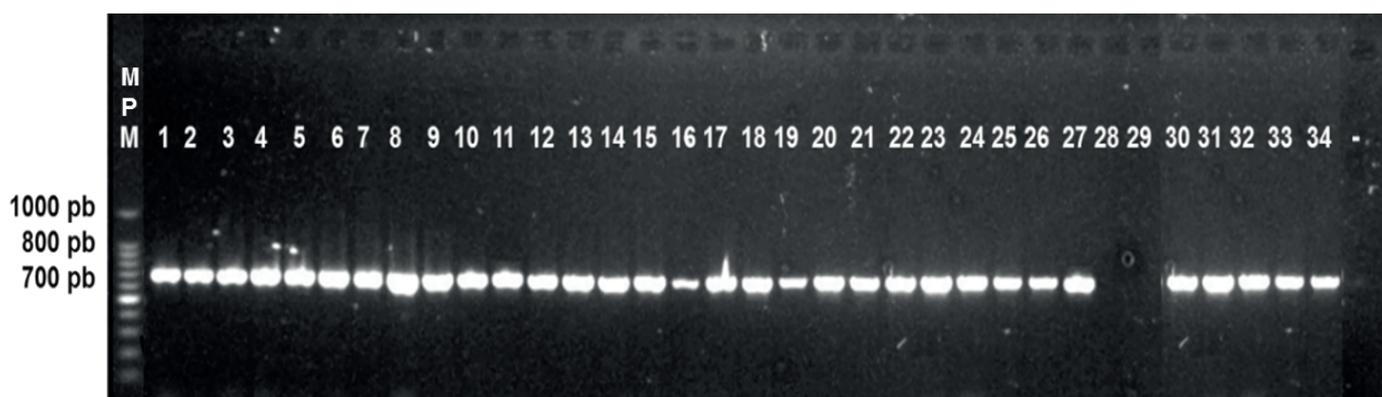


Figura 1. Amplificación del gen *pauA* de 34 aislamientos de *Streptococcus uberis*; MPM marcador de peso molecular de 100bp; - Control negativo.

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de interés.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado con fondos otorgados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCYT). Se agradece al Dr. Mario Vilaró del Hospital Privado de Córdoba por el servicio de Espectrometría de Masas. Aluminé Fessia es becaria doctoral del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- Archer, S.; Bradley, A.; Cooper, S.; Davies, P.; Green, M. 2017. Prediction of *Streptococcus uberis* clinical mastitis risk using Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in dairy herds. Preventive Veterinary Medicine. 144: 1-6.
- Barreiro, J.; Ferreira, C.; Sanvido, G.; Kostrzewa, M.; Maier, T.; Wegemann, B.; Dos Santos, M. 2010. Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of Dairy Science. 93(12): 5661-5667.
- Calvinho, L.; Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. FAVE Sección Ciencias Veterinarias. 4(1/2): 29-40.
- Fortin, M.; Messier, S.; Paré, J.; Higgins, R. 2003. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. Journal of Clinical Microbiology. 41(1): 106-109.
- Hadrich, J.; Wolf C.; Lombard J.; Dolak T. 2018. Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. Journal of Dairy Science. 101(4):3588-3596
- Hogan, J.; Smith, K. 2012. Managing environmental mastitis. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 28(2): 217-224.
- Kawata, K.; Anzai, T.; Senna, K.; Kikuchi, N.; Ezawa, A.; Takahashi, T. 2004. Simple and rapid PCR method for identification of streptococcal species relevant to animal infections based on 23S rDNA sequence. FEMS Microbiology Letters. 237(1): 57-64.
- Khan, I.; Hassan, A.; Abdulmawjood, A.; Lammler, C.; Wolter, W.; Zschock, M. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. Journal of Veterinary Science. 4(3): 213-224.
- Leigh, J. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis. The Veterinary Journal. 157(3): 225-238.
- NMC. 2004. Microbiological procedures for use in the diagnostics of bovine udder infection and determination of milk quality. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI, USA.
- Odierno, L.; Calvinho, L.; Traverssa, P.; Lasagno, M.; Bogni, C.; Reinoso, E. 2006. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. Journal of Dairy Science. 89(10): 3886-3890.
- Perrig, M.; Ambroggio, M.; Buzzola, F.; Marcipar, I.; Calvinho, L.; Veaute, C.; Barbagelata, M. 2015. Genotyping and study of the *pauA* and *sua* genes of *Streptococcus uberis* isolates from bovine mastitis. Revista Argentina de Microbiología. 47(4): 282-294.
- Raemy, A.; Meylan, M.; Casati, S.; Gaia, V.; Berchtold, B.; Boss, R.; Graber, H. U. 2013. Phenotypic and

genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55(1): 53.

Rosey, E.; Lincoln, R.; Ward, P.; Yancey, R.Jr; Leigh, J. 1999. PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett*. 178(1):27-33.

Vissio, C.; Dieser, S.; Raspanti, C.; Giraudo, J.; Bogni, C.; Odierno, L.; Larriestra, A. 2013. Dairy Herd Mastitis Program in Argentina: Farm Clusters and Effects on Bulk Milk Somatic Cell Counts. *Pakistan Veterinary Journal*. 33(1): 80-84.