

# Prevalencia De Staphylococcus Aureus En Mastitis Bovina. Municipio De Campoalegre – Huila

## Prevalence Of Staphylococcus Aureus In Bovine Mastitis. Municipality Of Campoalegre - Huila

Sergio Falla Tapias<sup>(1)</sup>, Eduardo Muñoz Collazos<sup>(2)</sup>, Gustavo Adolfo Trujillo Lancheros<sup>(3)</sup>, Luceni Muñoz Bermeo<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup>Corporación Universitaria del Huila – CORHUILA  
Grupo de Investigación Kyrón  
sergio\_3618@hotmail.es

<sup>(2)</sup> Médico Veterinario  
Zootecnista  
Cadena Ganadera Productiva  
Carne y Leche  
Secretaría Departamental de  
Agricultura y Minería  
Gobernación del Huila

<sup>(3)</sup> Médico Veterinario  
Zootecnista  
Federación Colombiana de  
Ganaderos - FEDEGAN

<sup>(4)</sup> Dirección Ejecutiva  
Comité de Ganaderos del Huila

### Resumen

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria que produce inflamación como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón por diferentes tipos de bacterias. Uno de los agentes patógenos infecciosos que induce mastitis más severa en la vaca es el *Staphylococcus aureus*, responsable de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos. Esta bacteria grampositiva es de difícil control debido a la ausencia de Buenas Prácticas Ganaderas BPG en algunas fincas. Este artículo presenta los resultados de un proyecto en el que se calculó prevalencia de *Staphylococcus aureus* por el método de PCR a 150 vacas con manifestaciones clínicas, pertenecientes a cuatro hatos ganaderos especializados en lechería del municipio de Campoalegre-Huila. El resultado de la prevalencia arrojó 129 casos positivos a la bacteria, es decir, el 86 % del total de la muestra. El artículo concluye que la identificación oportuna de la bacteria en las fincas ganaderas permite realizar un tratamiento de la mastitis a tiempo, con el antibiótico específico para el patógeno, logrando la disminución de la enfermedad y aumentando la calidad y cantidad de leche.

### Palabras clave:

Bacteria, calidad, leche, patógeno.

### Abstract

Bovine mastitis is an infectious-contagious disease of the mammary gland that produces inflammation in response to invasion through the nipple canal by different types of bacteria. One of the infectious pathogens that induces the most severe mastitis in cows is *Staphylococcus aureus*, responsible for more than 90% of clinical and subclinical cases. This gram-positive bacteria is difficult to control due to the absence of Good Livestock Practices BPG on some farms. This article presents the results of a project in which the prevalence of *Staphylococcus aureus* was calculated by the PCR method in 150 cows with clinical manifestations, belonging to four cattle herds specialized in dairy in the municipality of Campoalegre-Huila. The prevalence result yielded 129 positive cases for the bacteria, that is, 86% of the total sample. The article concludes that the timely identification of the bacteria in livestock farms allows a treatment of mastitis in time, with the specific antibiotic for the pathogen, achieving a decrease in the disease and increasing the quality and quantity of milk.

### Keywords:

Bacteria, quality, milk, pathogen.

## Introducción

La mastitis bovina se puede identificar gracias a la presencia de cinco síntomas característicos: Eritema, calor, hinchazón, dolor y pérdida funcional de la glándula mamaria de la vaca. Es la enfermedad infecto-contagiosa más costosa y común del ganado lechero y se adecua de forma endémica en distintos lugares del planeta (Philpot et al., 2001) (Calderón et al., 2008). Las mastitis contagiosas son producidas por la bacteria *Staphylococcus aureus* (Philpot et al., 2001). Existen varios tipos de mastitis provocadas por la bacteria *S. agalactiae* que son de fácil manejo y se pueden mitigar en la finca (Keefe et al., 2010). Sin embargo, las mastitis producidas por *S. aureus* son tratadas con antibióticos a través de un procedimiento mucho más agresivo debido a su gran resistencia antimicrobiana (Russi et al., 2008) (San Martín et al., 2002) ocasionada por la facilidad con la que produce biopelícula (Cucarella et al., 2001). La infección del *S. aureus* se refiere a su adhesión intercelular (Cucarella et al., 2001) y su desarrollo abarca las células epiteliales y fagos de la ubre de la vaca (Cucarella et al., 2001) (Melchior et al., 2006). De igual forma, esta infección llega a desarrollar en algunos casos fibrosis y micro-abscesos que limitan la entrada de agentes bactericidas y bacteriostáticos (Loeza et al., 2010). Este conjunto de síntomas puede generar mastitis crónicas periódicas y, cuando son agudas, suelen aparecer recaídas después de efectuar tratamiento (Sharma et al., 2010). La prevención, diagnóstico y tratamiento adecuados de la bacteria *S. aureus* resulta de gran importancia dentro del plan de Buenas Prácticas Ganaderas (BPG) en las fincas especializadas en lechería. Estos procesos involucran el análisis de las prácticas de ordeño, corrigiendo el uso de preselladores y selladores, enfatizando en el uso de guantes adecuados

para el ordeño por parte del mayordomo o del personal encargado del procedimiento (Keefe et al., 2010), al tiempo que se planifique el orden de los bovinos para el ordeño, dejando de últimas las que presenten un diagnóstico positivo a *S. aureus*, planteando la opción de descartarlas de la finca.

La mastitis es una de las patologías más costosas en la industria pecuaria porque ocasiona pérdida de leche, gastos en medicamentos y servicios veterinarios, y la reducción del tiempo de vida productiva de los animales (Koskinen et al., 2009).

## MATERIALES Y METODOS

### Área de estudio

Esta investigación fue desarrollada en fincas del municipio de Campoalegre-Huila, vereda Llano Sur, ubicadas a 525 M.S.N.M., con temperatura promedio de 28 °C, precipitación de 113 mm., humedad relativa promedio de 77%, con zona de vida bosque seco tropical. La locación está ubicada entre 2°31' y 2° 47' latitud norte, y entre 75°12' y 75°26' de longitud oeste, según las coordenadas geográficas del Instituto Geográfico Agustín Codazzi.

### Protocolo a desarrollar

Para medir la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el *S. aureus* en muestras de leche provenientes de vacas de las diferentes fincas de Campoalegre-Huila, se tomaron dos muestras de leche por vaca en una muestra de 150 vacas. Es decir, se tomaron 150 muestras de leche, con dos observaciones cada una, tales que ambas muestras provienen de los mismos 150 especímenes y cada espécimen participa solo una vez en cada muestra. La primera muestra se utilizó para el cultivo y aislamiento, en agar sangre y la tipificación con pruebas bioquímicas: Catalasa positiva, coagulasa positiva, oxidasa negativa, y prueba de descarboxilación de la ornitina

negativa. La segunda muestra se utilizó para el diagnóstico molecular por PCR. La extracción del DNA de las muestras recolectadas de leche se realizó a través el kit de DNeasy® Tissue de QIAGEN. La guía de columnas a partir de tejidos celulares fue elaborada según las instrucciones descritas por el fabricante.

El protocolo de PCR desarrollado por Cremonesi et al. (2006), amplifica una región específica del genoma del DNA que corresponde al gen 16S rRNA. Fueron utilizadas las siguientes secuencias de nucleótidos como cebadores: F 5' AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG 3' y R 5' TCG CTC GCT CAC CTT AGA A 3' para obtener un amplificado de 499 pb.

El volumen final de la PCR fue de 25 µL que contenía 200 ng de DNA extraído, buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 1U de Taq polimerasa Fermentas®, dNTPS 0,2 mM, cebadores 0.25 µM. La metodología se ejecutó en un termociclador Veriti 96-ell. Las condiciones para la PCR fueron 5 minutos de precalentamiento a 96°C., seguido de 34 ciclos compuestos de un minuto de desnaturalización a 96°C., un minuto de anillamiento de los cebadores a 55°C., un minuto de extensión a 74°C. y una extensión final de diez minutos a 74°C.

Las verificaciones de los resultados de la PCR fueron visualizadas en gel de agarosa al 2%, teñido con 0.3 µg/ml de bromuro de etidio, corrido a 120 voltios durante 30 minutos y visualizado bajo luz ultravioleta. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb del Laboratorio Molecular Bio Laboratory®.

La metodología estadística implementada fue un doble ciego a través de una tabla de contingencia de 2 x 2, verificando los resultados de la prueba de cultivo microbiológico (como prueba fundamental) con los resultados de la PCR. Para el análisis de sensibilidad y especificidad se empleó el programa SPSS.

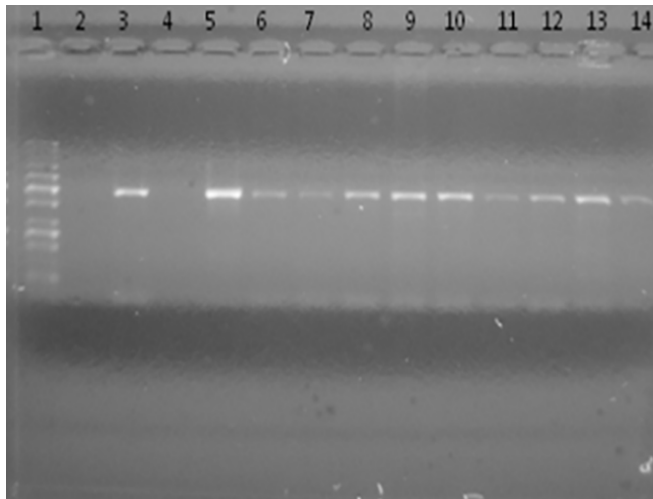
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las 150 vacas estudiadas, afectadas con mastitis y cultivadas, se obtuvo crecimiento microbiológico en 98 de ellas con la bacteria *Staphylococcus* (Tabla 1). La prevalencia de *Staphylococcus aureus* arrojó 129 casos positivos que representan un porcentaje del 86 % de la muestra.

**Tabla 1.** Cantidad de muestras de leche recolectadas en hatos de Campoalegre- Huila, con mastitis clínica que amplificaron el fragmento de 499 pb. por PCR, comparadas con el resultado del cultivo microbiológico de *Staphylococcus*.

| PCR                 | Cultivo microbiológico               |                 |            |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------|------------|
|                     | Crecimiento de <i>Staphylococcus</i> | Sin crecimiento | Total      |
| <b>AMPLIFICA</b>    | 98                                   | 31              | 129        |
| <b>NO AMPLIFICA</b> | 1                                    | 20              | 21         |
| <b>TOTAL</b>        | <b>99</b>                            | <b>51</b>       | <b>150</b> |

La Figura 1 presenta la interfaz del marcador de peso molecular verificando la amplificación de las cepas de *S. aureus*. Además, se puede observar el marcador de peso molecular, el control negativo, la cepa ATCCC 29213, y las muestras a analizar. Todas las muestras amplificaron el fragmento de 499 pb con el cebador F 5' AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG 3' y R 5' TCG CTC GCT CAC CTT AGA A 3'. A continuación, una foto de un gel con 10 muestras de DNA extraído de las leches de bovinos con signos clínicos de mastitis.



**Figura 1.** El carril 1 muestra el marcador de peso molecular de 50 pb de Molecular Bio Laboratory® (rango molecular 50-1000 bp). El carril 2 muestra el control negativo que es mezcla para PCR sin DNA. El carril 3 contiene productos de 499 pb amplificado, de las cepas ATCC 29213. El carril 4 sin muestra. Los carriles 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, y 14 son cepas de *S. aureus* aisladas e identificadas por cultivo microbiológico de muestras de leche de vacas con signos clínicos de mastitis.

La técnica de extracción del DNA de muestras de leche, usando el kit de DNeasy® Tissue de Qiagen, contribuye a producir DNA de buena calidad que logra amplificar la banda esperada sin inconvenientes. Ercolini et al. (2004) afirman que, previo al proceso de extracción de DNA, debería fortalecerse la muestra de leche con una preincubación para elevar la unidad formadora de colonias.

Además proponen una extracción eficiente del DNA a través de la metodología de fenol-cloroformo (Cremonesi et al., 2006) (Poutou et al., 2005). En la presente investigación, la metodología de extracción de DNA utilizada fue determinante en el posterior análisis. Una de las conclusiones es que los cebadores en cepas de cultivo puro tienen un 98% o 99% de amplificación.

Abu et al. (1998) demostraron que la PCR es una forma eficiente de identificación de bacterias, pero resulta determinante si a la par se realizan cultivos microbiológicos de la especie a identificar. Los resultados obtenidos en la investigación demuestran la existencia de alta especificidad en concordancia con otros trabajos (Ramesh et al., 2002).

La identificación oportuna de bacterias en fincas ganaderas contribuye a un tratamiento oportuno de la mastitis a través del antibiótico específico para el patógeno. En última instancia esto repercute en la salud y productividad de los bovinos en la finca.

Finalmente, este estudio encuentra necesaria la inversión de más recursos y esfuerzo en investigación que ayuden a identificar la prevalencia de la enfermedad ocasionada por el incumplimiento de las Buenas Prácticas Ganaderas (BPG), ya que este es un factor de riesgo que podría estar afectando significativamente la calidad de los productos lácteos en la región.

### Referencias Bibliográficas

Abu, AS., Radstrom (1998), P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*; 64:3748-3753.

Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., et al. (2006) Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *Journal of Dairy Science*; 89(1):163-169.

- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, JR. Bap (2001). A Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. Journal of Bacteriology; 183(9):2888-2896.
- Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V., Coppola, S (2004). PCR-based detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in the early stages of raw milk cheese making. Journal of Applied Microbiology; 96(5):1090-1096.
- Keefe, TM., Ceballos, A., Jaramillo, M., Londoño, M., Chaffer, M., Montoya, M. (2010) Prevalencia del Streptococcus agalactiae en tanques de enfriamiento de la Cooperativa COLANTA. En: VII Seminario Internacional Competitividad Carne y Leche. COLANTA ed. Medellín octubre 21, 22,. Vol. 1, p. 53.
- Koskinen, M., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H., et al. (2009) Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. Journal of Dairy Science; 92(3):952-959.
- Loeza-Angeles, H., López-Meza, JE., Ochoa, A. (2010) Efecto del medio condicionado de células endoteliales que expresan el péptido antimicrobiano tionina Thi2.1 de Arabidopsis thaliana sobre aislamientos de Staphylococcus aureus. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 41(2):36-41.
- Melchior, M., Vaarkamp, H., Fink-Gremmels, J. (2006) Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? The Veterinary Journal; 171(3):398-407.
- Philpot, WN., Nickerson, SC. (2001a) Ganando la lucha contra la mastitis. Naperville, USA.
- Philpot, WN. (2001b) Relación entre el manejo del hato y la mastitis. <http://www.cnmweb.bizland.com/publicaciones/DrPhilpot1.,3,2003>.
- Poutou, R., Burbano, M., Sierra, S., Torres, K., Carrascal, A., Mercado, M. (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. Pontificia Universidad Javeriana: Revista de la Facultad de Ciencias; 10(2):61-78. 51 Evaluación de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular del staphylococcus aureus.
- Ramesh, A., Padmapriya, B., Chrashekar, A., Varadaraj, M. (2002) Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of Staphylococcus aureus and Yersinia enterocolitica in milk samples. Molecular and Cellular Probes; 16:307-314.
- Russi, NB., Bantar, C., Calvino, LF. (2008) Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. Revista Argentina de Microbiología; 40(2):116-119.
- San Martín, B., Kruze, J., Morales, M., Agüero, H., León, B., Espinoza, S. et al. (2002) Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria; 34:221-234.
- Sharma, N., Pandey, V., Sudhan, N. (2010) Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine; 13(2):98-103.