



Termociclador para la realización de qPCR

Diagnóstico de mamitis bovina por qPCR: utilidad y aplicaciones

El objetivo de este artículo es hacer una reflexión sobre la aplicación de la qPCR en el diagnóstico de las mamitis bovinas y orientar sobre las condiciones en las que puede tener una mayor utilidad.

A. Prieto¹; J.M. Díaz-Cao¹; G. López-Lorenzo¹; C. López Novo¹; M. L. Barreal²; R. Lorenzana²; M.B. Pombo²; P. Díaz¹; P. Morrondo¹; R. Panadero¹; C. López¹; S. Remesar¹; P. Díez-Baños¹; G. Fernández¹

¹Grupo de Investigación en Sanidad Animal de Galicia (Invesaga), USC

²Laboratorio Interprofesional Gallego de Análisis de la Leche (Ligal)

INTRODUCCIÓN

La mamitis bovina ha sido y es una de las patologías más importantes en el ganado de leche, tanto desde un punto de vista sanitario como económico. El control de esta enfermedad es muy complejo, dado que existen más de 130 patógenos que pueden estar implicados en su etiología. No obstante, hay que indicar que la mayoría

de las infecciones son producidas por unas pocas especies, entre las que destacan actualmente por su mayor frecuencia *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis*. Otro patógeno tradicionalmente importante es *Streptococcus agalactiae*, aunque hoy en día es una infección poco frecuente. A pesar de que existen mamitis originadas por cepas de origen humano con un compor-

tamiento no tan contagioso, este microorganismo se considera un patógeno obligado de la mama. Esta característica, unida a su alta contagiosidad y a su incidencia en la producción y calidad de la leche, hace que se aconseje la erradicación de la infección en la granja. Cuando se procede a la erradicación de *Streptococcus agalactiae*, el fracaso más frecuente es debido a que si queda un único animal infectado puede ser fuente de contagio de nuevo al resto de las vacas de la explotación. Por último, un microorganismo que se considera emergente en las granjas de vacuno es *Mycoplasma bovis*. Este patógeno se asocia a mamitis, neumonías, artritis y otitis, y se aconseja analizar las nuevas incorporaciones para evitar la entrada de la infección en una explotación.

El diagnóstico de laboratorio es una herramienta fundamental para poder tomar las medidas adecuadas de control de las mamitis. Dada la complejidad de la etiología de esta enfermedad, tradicionalmente se ha recurrido al cultivo microbiológico y a la identificación de los microorganismos aislados. La ven-

► EN LOS ÚLTIMOS AÑOS, LAS TÉCNICAS BASADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR SE HAN IDO INTRODUCIENDO EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES EN ANIMALES

taja de este método es que permite la detección de un amplio espectro de patógenos y, en la mayoría de los casos, la realización de un antibiograma. Sin embargo, el cultivo microbiológico también presenta limitaciones: por ejemplo, existen patógenos como *Mycoplasma bovis* que no pueden detectarse con los métodos de cultivo de rutina, ya que necesitan requerimientos específicos para su cultivo. Por otro lado, siempre existe un porcentaje de muestras (15-25 %) de animales con inflamación en los que se obtiene un resultado negativo a cultivo debido a la presencia de antibióticos, eliminación no constante del patógeno, inflamaciones de origen no infeccioso, etc.

En los últimos años, las técnicas basadas en biología molecular se han ido introduciendo en el diagnóstico de las infecciones en animales. El más utilizado en la práctica es la PCR (*polymerase chain reaction*) y en las últimas décadas también PCR cuantitativas (qPCR), que permiten estimar la concentración de los microorganismos en la muestra. Estos métodos se basan en la detección de ADN o ARN específico del patógeno, lo que permite su detección en muestras con antibióticos u otros inhibidores del crecimiento bacteriano, así como la detección de microorganismos de difícil aislamiento. Sin embargo, también debe tenerse en consideración en la interpretación de los resultados que estas técnicas no permiten diferenciar entre microorganismos viables e inactivados. Por otro lado, dada la alta sensibilidad de la qPCR, es posible que puedan ser detectadas pequeñas cantidades de microorganismos que respondan a una contaminación y no a una verdadera infección, hecho que ocurre principalmente con patógenos de origen ambiental. No obstante, la qPCR nos permite cuantificar la cantidad de microorganismos y considerar con cautela aquellas cargas bacterianas bajas en caso de patógenos de origen ambiental. Por último, cabe señalar también como ventajas de esta técnica su facilidad de automatización, que permite procesar a la vez un elevado número de muestras, así como la reproducibilidad de los resultados.



EL NUEVO NOMBRE PARA



antigerm medentech G3

POWER BLUE MIX



SELLADOR MARCANTE DE DIÓXIDO

POTENTE ACCIÓN DESINFECTANTE

Fungicida
Bactericida
Viricida

REFORZADO CON AGENTES COSMÉTICOS

Hidratación
hasta el
siguiente ordeño.

FUERTE EFECTO MARCANTE

Aplicación muy
visible
sin manchas

CONSUMO CONTROLADO

Viscosidad
óptima



KERSIA IBERICA, S.L.

Tel: 948 32 45 32 | kersiaiberica@kersia-group.com

www.kersia-group.com

DIAGNÓSTICO DE RUTINA

En general, ante la necesidad de hacer un diagnóstico en una infección de etiología desconocida a nivel de rebaño sigue siendo de gran utilidad la realización de cultivos microbiológicos, debido a su menor coste y mayor rango de especies detectables. Normalmente, las técnicas de qPCR detectan un único patógeno, debido a su carácter específico; no obstante, en ocasiones es posible combinar pruebas para varios patógenos, lo que ha dado lugar a las denominadas qPCR *multiplex* que permiten la detección de los microorganismos más frecuentes e importantes, e incluso la detección de algún mecanismo de resistencia como a los betalactámicos. Sin embargo, en granjas con infección por un patógeno previamente identificado, el empleo de la qPCR es una buena opción como método de monitorización de la infección por dicho microorganismo.

También existen algunos casos donde las ventajas de la qPCR sobre el cultivo justifican su utilización. Un ejemplo claro es el diagnóstico de patógenos con requerimientos específicos de cultivo (*Mycoplasma spp.*), que no son detectados por métodos de cultivo microbiológico de rutina.

Como ya hemos comentado, en el caso de infecciones por *Streptococcus agalactiae* la estrategia recomendada es la erradicación. La no posibilidad de origen ambiental de este patógeno y la transcendencia que puede tener la identificación de un cuarterón infectado hacen recomendable el uso de una técnica como la qPCR para su detección, debido a su mayor sensibilidad.

También es recomendable el uso de qPCR en el caso de animales que presentan mamitis clínicas o mamitis subclínicas con altos RCS (recuento de células somáticas) cuando se ha obtenido un resultado negativo en el cultivo. Además, la qPCR ha mostrado una mayor sensibilidad que el cultivo microbiológico, por lo que su coste puede ser justificado en la detección en estos casos, especialmente cuando se trata de animales jóvenes o animales que vayan a ser introducidos en la explotación.

Sin embargo, la mayor sensibilidad de la qPCR sobre el cultivo debe ser considerada a la hora de decidir

si existe una verdadera infección y, sobre todo, antes de establecer la necesidad de un tratamiento antibiótico. Por ejemplo, se han observado resultados positivos a qPCR que responden a una fase inicial de la infección que puede llegar o no a producir una verdadera mamitis, o la detección de células de microorganismos que han sido eliminadas por tratamiento o por los mecanismos defensivos de la mama. Por lo tanto, se deberán tener en consideración otros factores, como la presencia de signos clínicos, valores de RCS, edad del animal y fase de lactación, entre otros. Los resultados positivos a PCR en casos con bajos

RCS no deben tener la misma consideración que en mamitis clínicas o mamitis subclínicas con altos RCS. Un caso especial puede ser en el de granjas con infecciones conocidas por patógenos concretos que realizan tratamiento de secado selectivo (solo realizar tratamiento de secado en animales con mamitis), donde el uso de qPCR puede estar indicado en muestras tomadas previamente al secado dada su mayor sensibilidad, y donde repetir el muestreo en animales con altos RCS con cultivos con resultado negativo no es posible, siempre valorando también el historial de RCS del animal. ►►

Tabla 1. Aplicaciones de la utilización de cultivo y qPCR

	Cultivo	qPCR
Diagnóstico en general	Explotaciones/animales con infecciones de etiología desconocida	Diagnóstico en un programa de control de un patógeno concreto
		Patógenos de difícil crecimiento (<i>Mycoplasma bovis</i>)
		Programa de erradicación <i>Streptococcus agalactiae</i>
		Cultivo negativo previo en animal con mamitis clínicas o altos RCS
	Si es necesario antibiograma	Diagnóstico previo a tratamiento selectivo
		Selección de animales para tratamiento selectivo en secado
Mezcla/pool de varios animales (p.ej.: nuevas incorporaciones)	No recomendado	Detección de uno o varios patógenos concretos
Tanque	Infecciones por <i>Streptococcus agalactiae</i>	Infecciones por <i>Streptococcus agalactiae</i>
	Otros patógenos, evaluando o con precaución valores bajos en ambientales y monitorizando con muestras periódicas	Otros patógenos, evaluando con precaución valores bajos en ambientales y monitorizando con muestras periódicas
En animales con tratamiento antibiótico	No recomendado	En los casos en que no hay respuesta adecuada al tratamiento
Evaluación de curaciones bacteriológicas	Menos sensible, pero indica si hay verdadera infección activa	Más sensible, pero debe valorarse el RCS durante 21-30 días posteriores

► LA NO INTERFERENCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS EN EL RESULTADO DE LA QPCR REPRESENTA UNA VENTAJA SOBRE EL CULTIVO MICROBIOLÓGICO

MUESTRAS DE MEZCLA DE CUARTERONES, DE MEZCLA DE ANIMALES Y DE TANQUE

Como se ha mencionado, la alta sensibilidad de la qPCR permite detectar pequeñas cantidades de microorganismos concretos. Este hecho se ha utilizado en diferentes enfermedades para detección de patógenos en mezcla de muestras de varios animales, lo que reduce el coste del diagnóstico. En el caso de la mastitis es posible utilizar mezclas de varios cuarterones, varios animales o muestras de tanque. La mezcla de muestras en *pools* de varios animales permite abaratar mucho el diagnóstico para descartar la presencia de un determinado patógeno, por lo que puede ser útil en el caso de nuevas incorporaciones previamente a su entrada en la explotación. Además, en el caso de que el *pool* sea positivo se puede realizar la prueba posteriormente de manera individual para determinar qué animales están infectados. En nuestra experiencia no recomendamos mezclas de más de cinco animales por *pool* por dos motivos: en primer lugar, para optimizar la relación de animales por *pool* en caso de resultados positivos, ya que ante un *pool* positivo el número de análisis individuales a realizar no sería excesivamente alto; en segundo lugar, para minimizar la posibilidad de resultados

negativos en un *pool* donde hay algún animal con baja eliminación del patógeno, aunque la sensibilidad de la técnica de qPCR puede permitir posiblemente un mayor número de animales en la mezcla.

Aunque es posible realizar la cuantificación de diferentes patógenos por medio de cultivo microbiológico en muestras de tanque, la laboriosidad de la técnica y su coste hacen que sea más recomendable la realización de qPCR. En el caso del tanque existen estudios que encuentran una buena correlación entre la prevalencia de la infección en los animales de la granja y la cantidad de microorganismos detectada por de la qPCR. Sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de existencia de contaminación, sobre todo en los patógenos que pueden tener un origen ambiental, por lo que las cargas microbianas bajas deben ser interpretadas con cautela. En el caso de muestras de tanque, la información que aportan los resultados obtenidos por qPCR es mucho más válida y fácil de interpretar cuando se realiza periódicamente y se puede hacer una valoración de la evolución en el tiempo de los resultados para un patógeno concreto. Debemos tener en cuenta el efecto de dilución que se produce en el tanque, por lo que infecciones con muy baja prevalencia pueden no ser detectadas en una única muestra. En el caso ya mencionado de *Streptococcus agalactiae*, la qPCR es muy útil para la detección del patógeno en muestras de mezcla de cuarterones, animales o tanque.

EVALUACIÓN DE CURACIONES

La no interferencia de los antibióticos en el resultado de la qPCR representa una ventaja sobre el cultivo microbiológico, pero también se debe tener en cuenta que esta técnica puede detectar microorganismos no viables. Por ello, en la valoración de la eficacia de un tratamiento deben ser considerados otros aspectos.

En lactación existen dos situaciones posibles en las que el empleo de qPCR puede ser ventajoso. Una es si se ha realizado un tratamiento sin cultivo ►



► LA QPCR TAMBIÉN PUEDE TENER GRAN UTILIDAD EN EL CASO DE QUERER VALORAR LA CURACIÓN BACTERIOLÓGICA DESPUÉS DE UN TRATAMIENTO EN FASE DE SECADO

previo y no se produce una respuesta adecuada que indique curación; en este caso la presencia de antibióticos durante un tiempo impide la realización de un cultivo, lo que justificaría la utilización de la qPCR. Otro caso es que, una vez realizado un tratamiento, exista curación clínica, pero se quiera confirmar la curación bacteriológica; en este caso se recomienda realizar la qPCR a los 21-30 días posteriores a la mejoría clínica o al final del tratamiento. Muestras tomadas antes pueden dar positivo aun habiendo curación bacteriológica, ya que la qPCR también detecta el ADN de los microorganismos muertos. Hay que señalar que siempre debe valorarse la evolución del RCS del animal, además del resultado de la qPCR. En mastitis subclínicas en lactación con PCR positivo y con RCS no demasiado elevados, algunos autores recomiendan realizar un cultivo microbiológico para confirmar una verdadera infección intramamaria.

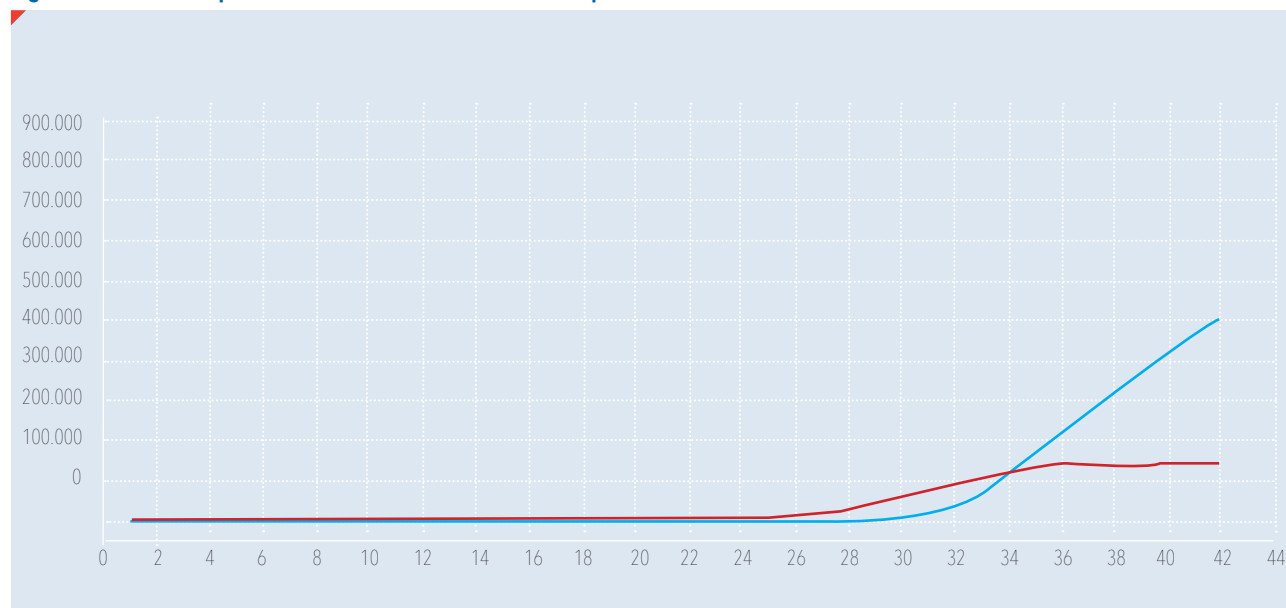
Por último, la qPCR también puede tener gran utilidad en el caso de querer valorar la curación bacteriológica después de un tratamiento en fase de secado. Por ejemplo, no es infrecuente que animales con una infección por *Staphylococcus aureus* antes del secado presenten cultivos negativos en los primeros meses de la siguiente lactación y posteriormente se vuelva a aislar en el mismo cuarterón. Aunque todavía no hay estudios sobre el

momento más adecuado para la toma de muestras, la realización de una prueba de qPCR a partir de los 21 días posparto puede ser una buena opción.

CONCLUSIONES

Las técnicas de biología molecular como la qPCR presentan una serie de características que las hacen más adecuadas que el cultivo microbiológico para el diagnóstico de infecciones intramamarias en algunos supuestos. No obstante, como se ha visto, no debemos considerar la qPCR como un sustituto universal para el cultivo. Así, la mejor opción será utilizar ambos métodos de diagnóstico teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de cada uno dependiendo del objetivo perseguido. ■

Figura 1. Lectura de qPCR de una muestra de leche de tanque



Puede observarse la amplificación del canal del patógeno (*staphylococcus aureus*, línea azul), así como la amplificación del control interno del análisis (línea roja)