



Termociclador para a realización de qPCR

Diagnóstico de mamite bovina por qPCR: utilidade e aplicacións

O obxectivo deste artigo é facer unha reflexión sobre a aplicación da qPCR no diagnóstico das mamites bovinas e orientar sobre as condicións nas que pode ter unha maior utilidade.

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 Sanidade Animal de Galicia (Invesaga), USC

²Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (Ligal)

INTRODUCCIÓN

A mamite bovina foi e é unha das patoloxías máis importantes no gando de leite, tanto desde un punto de vista sanitario coma económico. O control desta enfermidade é moi complexo, dado que existen máis de 130 patóxenos que poden estar implicados na súa etioloxía. No entanto, hai que indicar que a maioría

das infeccións son producidas por unhas poucas especies, entre as que destacan actualmente pola súa maior frecuencia *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*. Outro patóxeno tradicionalmente importante é *Streptococcus agalactiae*, aínda que hoxe en día é unha infección pouco frecuente. A pesar de que existen mamites orixinadas por cepas de orixe humana cun comportamen-

to non tan contaxioso, este microorganismo considérase un patóxeno obrigado da mama. Esta característica, unida á súa alta contaxiosidade e á súa incidencia na produción e calidade do leite, fai que se aconselle a erradicación da infección na granxa. Cando se procede á erradicación de *Streptococcus agalactiae* o fracaso máis frecuente é debido a que se queda un único animal infectado pode ser fonte de contaxio de novo ao resto das vacas da explotación. Por último, un microorganismo que se considera emerxente nas granxas de vacún é *Mycoplasma bovis*. Este patóxeno asóciase a mamites, pneumonías, artrites e otites, e aconséllase analizar as novas incorporacións para evitar a entrada da infección nunha explotación.

O diagnóstico de laboratorio é unha ferramenta fundamental para poder tomar as medidas adecuadas de control das mamites. Dada a complexidade da etioloxía desta enfermidade, tradicionalmente recorreuse ao cultivo microbiolóxico e á identificación dos

► NOS ÚLTIMOS ANOS, AS TÉCNICAS BASEADAS EN BIOLOXÍA MOLECULAR FÓRONSE INTRODUCINDO NODIAGNÓSTICO DAS INFECCIÓN EN ANIMAIS

microorganismos illados. A vantaxe deste método é que permite a detección dun amplo espectro de patóxenos e, na maioría dos casos, a realización dun antibiograma. Con todo, o cultivo microbiolóxico tamén presenta limitacións: por exemplo, existen patóxenos como *Mycoplasma bovis* que non poden detectarse cos métodos de cultivo de rutina, xa que necesitan requirimentos específicos para o seu cultivo. Doutra banda, sempre existe unha porcentaxe de mostras (15-25 %) de animais con inflamación nos que se obtén un resultado negativo a cultivo debido á presenza de antibióticos, eliminación non constante do patóxeno, inflamacións de orixe non infecciosa etc.

Nos últimos anos, as técnicas baseadas en bioloxía molecular fóronse introducindo no diagnóstico das infeccións en animais. O máis utilizado na práctica é a PCR (*polymerase chain reaction*) e nas últimas décadas tamén PCR cuantitativas (qPCR), que permiten estimar a concentración dos microorganismos na mostra. Estes métodos baséanse na detección de ADN ou ARN específico do patóxeno, o que permite a súa detección en mostras con antibióticos ou outros inhibidores do crecemento bacteriano, así como a detección de microorganismos de difícil illamento. Con todo, tamén debe terse en consideración na interpretación dos resultados que estas técnicas non permiten diferenciar entre microorganismos viábles e inactivados. Así mesmo, dada a alta sensibilidade da qPCR, é posible que poidan ser detectadas pequenas cantidades de microorganismos que respondan a unha contaminación e non a unha verdadeira infección, feito que ocorre principalmente con patóxenos de orixe ambiental. No entanto, a qPCR permítenos cuantificar a cantidade de microorganismos e considerar con cautela aquelas cargas bacterianas baixas en caso de patóxenos de orixe ambiental. Por último, cabe sinalar tamén como vantaxes desta técnica a súa facilidade de automatización, que permite procesar á vez un elevado número de mostras, así como a reproducibilidade dos 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 xeral, ante a necesidade de facer un diagnóstico nunha infección de etiología descoñecida, a nivel de rabaño segue sendo de grande utilidade a realización de cultivos microbiolóxicos, debido ao seu menor custo e maior rango de especies detectables. Normalmente, as técnicas de qPCR detectan un único patóxeno, debido ao seu carácter específico; no entanto, en ocasións é posible combinar probas para varios patóxenos, o que deu lugar ás denominadas qPCR multiplex que permiten a detección dos microorganismos máis frecuentes e importantes, e mesmo a detección dalgún mecanismo de resistencia como aos betalactámicos. Con todo, en granxas con infección por un patóxeno previamente identificado, o emprego da qPCR é unha boa opción como método de monitorización da infección polo devandito microorganismo.

Tamén existen algúns casos onde as vantaxes da qPCR sobre o cultivo xustifican a súa utilización. Un exemplo claro é o diagnóstico de patóxenos con requirimentos específicos de cultivo (*Mycoplasma spp.*), que non son detectados por métodos de cultivo microbiolóxico de rutina.

Como xa comentamos, no caso de infeccións por *Streptococcus agalactiae* a estratexia recomendada é a erradicación. A non posibilidade de orixe ambiental deste patóxeno e a transcendencia que pode ter a identificación dun cuarteirón infectado fan recomendable o uso dunha técnica como a qPCR para a súa detección, debido á súa maior sensibilidade.

Tamén é recomendable o uso de qPCR no caso de animais que presentan mamites clínicas ou mamites subclínicas con altos RCS cando se obtivo un resultado negativo no cultivo. Ademais, a qPCR mostrou unha maior sensibilidade que o cultivo microbiolóxico, polo que o seu custo pode ser xustificado na detección nestes casos, especialmente cando se trata de animais novos ou que vaian ser introducidos na explotación.

Non obstante, a maior sensibilidade da qPCR sobre o cultivo debe ser considerada á hora de decidir se existe unha verdadeira infección e, sobre todo, antes de establecer a necesidade dun tra-

tamento antibiótico. Por exemplo, observáronse resultados positivos a qPCR que responden a unha fase inicial da infección que pode chegar ou non a producir unha verdadeira mamite, ou a detección de células de microorganismos que foron eliminadas por tratamento ou polos mecanismos defensivos da mama. Por tanto, deberanse ter en consideración outros factores, como a presenza de signos clínicos, valores de RCS, idade do animal e fase de lactación, entre outros. Os resultados positivos a PCR en casos con baixos RCS (recuento de células somáticas) non

deben ter a mesma consideración que en mamites clínicas ou en mamites subclínicas con altos RCS. Un caso especial pode ser no caso de granxas con infeccións coñecidas por patóxenos concretos que realizan tratamento de secado selectivo (só realizar tratamento de secado en animais con mamites), onde o uso de qPCR pode estar indicado en mostras tomadas previamente ao secado dada a súa maior sensibilidade, e onde repetir a mostraxe en animais con altos RCS con cultivos con resultado negativo non é posible, sempre valorando tamén o historial de RCS do animal. ►

Táboa 1. Aplicacións da utilización de cultivo e qPCR

	Cultivo	qPCR
Diagnóstico en xeral	Explotacións/animais con infeccións de etiología descoñecida	Diagnóstico nun programa de control dun patóxeno concreto
		Patóxenos de difícil crecemento (<i>Mycoplasma bovis</i>)
		Programa de erradicación <i>Streptococcus agalactiae</i>
		Cultivo negativo previo en animal con mamites clínicas ou altos RCS
	Se é necesario antibiograma	Diagnóstico previo a tratamento selectivo
		Selección de animais para tratamento selectivo en secado
Mestural/pool de varios animais (p.ex.: novas incorporacións)	Non recomendado	Detección dun ou varios patóxenos concretos
Tanque	Infeccións por <i>Streptococcus agalactiae</i>	Infeccións por <i>Streptococcus agalactiae</i>
	Outros patóxenos, analizando con precaución valores baixos en ambientais e monitorizando con mostras periódicas	Outros patóxenos, analizando con precaución valores baixos en ambientais e monitorizando con mostras periódicas
En animais con tratamento antibiótico	Non recomendado	Nos casos en que non hai resposta adecuada ao tratamento
Avaliación de curacións bacteriolóxicas	Menos sensible, pero indica se hai verdadeira infección activa	Máis sensible, pero debe valorarse o RCS durante 21-30 días posteriores

► A NON INTERFERENCIA DOS ANTIBIÓTICOS NO RESULTADO DA QPCR REPRESENTA UNHA VANTAXE SOBRE O CULTIVO MICROBIOLÓXICO

MOSTRAS DE MESTURA DE CUARTEIRÓNS, DE ANIMAIS E DE TANQUE

Como se mencionou, a alta sensibilidade da qPCR permite detectar pequenas cantidades de microorganismos concretos. Este feito utilizouse en diferentes enfermidades para detección de patóxenos en mestura de mostras de varios animais, o que reduce o custo do diagnóstico. No caso da mamite é posible utilizar mesturas de varios cuarteiróns, varios animais ou mostras de tanque. A mestura de mostras en *pooles* de varios animais permite abaratar moito o diagnóstico para descartar a presenza dun determinado patóxeno, polo que pode ser útil no caso de novas incorporacións previamente á súa entrada na explotación. Ademais, no caso de que o *pool* sexa positivo pódese realizar a proba posteriormente de maneira individual para determinar que animais están infectados. Na nosa experiencia non recomendamos mesturas de máis de cinco animais por *pool* por dous motivos: en primeiro lugar, para optimizar a relación de animais por *pool* en caso de resultados positivos, xa que ante un *pool* positivo o número de análises individuais a realizar non sería excesivamente alto; en segundo lugar, para minimizar a posibilidade de resultados negativos nun *pool* onde hai algún ani-

mal con baixa eliminación do patóxeno, aínda que a sensibilidade da técnica de qPCR pode permitir posiblemente un maior número de animais na mestura.

Malia que é posible realizar a cuantificación de diferentes patóxenos por medio de cultivo microbiolóxico en mostras de tanque, a laboriosidade da técnica e o seu custo fan que sexa máis recomendable a realización de qPCR. No caso do tanque existen estudos que atopan unha boa correlación entre a prevalencia da infección nos animais da granxa e a cantidade de microorganismo detectada pola qPCR. Con todo, é necesario considerar a posibilidade de existencia de contaminación, sobre todo nos patóxenos que poden ter unha orixe ambiental, polo que as cargas microbianas baixas deben ser interpretadas con cautela. No caso de mostras de tanque, a información que achegan os resultados obtidos por qPCR é moito máis válida e fácil de interpretar cando se realiza periodicamente e pódese facer unha valoración da evolución no tempo dos resultados para un patóxeno concreto. Debemos ter en conta o efecto de dilución que se produce no tanque, polo que infeccións con moi baixa prevalencia poden non ser detectadas nunha única mostra. No caso xa mencionado de *Streptococcus agalactiae*, a qPCR é moi útil para a detección do patóxeno en mostras de mestura de cuarteiróns, animais ou de tanque.

AVALIACIÓN DE CURACIÓNS

A non interferencia dos antibióticos no resultado da qPCR representa unha vantaxe sobre o cultivo microbiolóxico, pero tamén se debe ter en conta que esta técnica pode detectar microorganismos non viábles. Por iso, na valoración da eficacia dun tratamento deben ser considerados outros aspectos.

En lactación existen dúas situacións posibles nas que o emprego de qPCR pode ser vantaxoso. Unha é se se realizou un tratamento sen cultivo previo e non se produce unha resposta adecuada que indique curación; neste caso a presenza de antibióticos durante un tempo impide a realización dun cultivo, ►



► A QPCR TAMÉN PODE TER GRANDE UTILIDADE NO CASO DE QUERER VALORAR A CURACIÓN BACTERIOLÓXICA DESPOIS DUN TRATAMENTO EN FASE DE SECADO

o que xustificaría a utilización da qPCR. Outro caso é que, unha vez realizado un tratamento, exista curación clínica, pero se queira confirmar a curación bacteriolóxica; neste caso recoméndase realizar a qPCR aos 21-30 días posteriores á melloría clínica ou ao final do tratamento. Mostras tomadas antes poden dar positivo, aínda habendo curación bacteriolóxica, xa que a qPCR tamén detecta o ADN dos microorganismos mortos. Hai que sinalar que sempre debe valorarse a evolución do RCS do animal, ademais do resultado da qPCR. En mamites subclínicas en lactación con PCR positivo e con RCS non demasiado elevados, algúns autores recomendan realizar un cultivo microbiolóxico para confirmar unha verdadeira infección intramamaria.

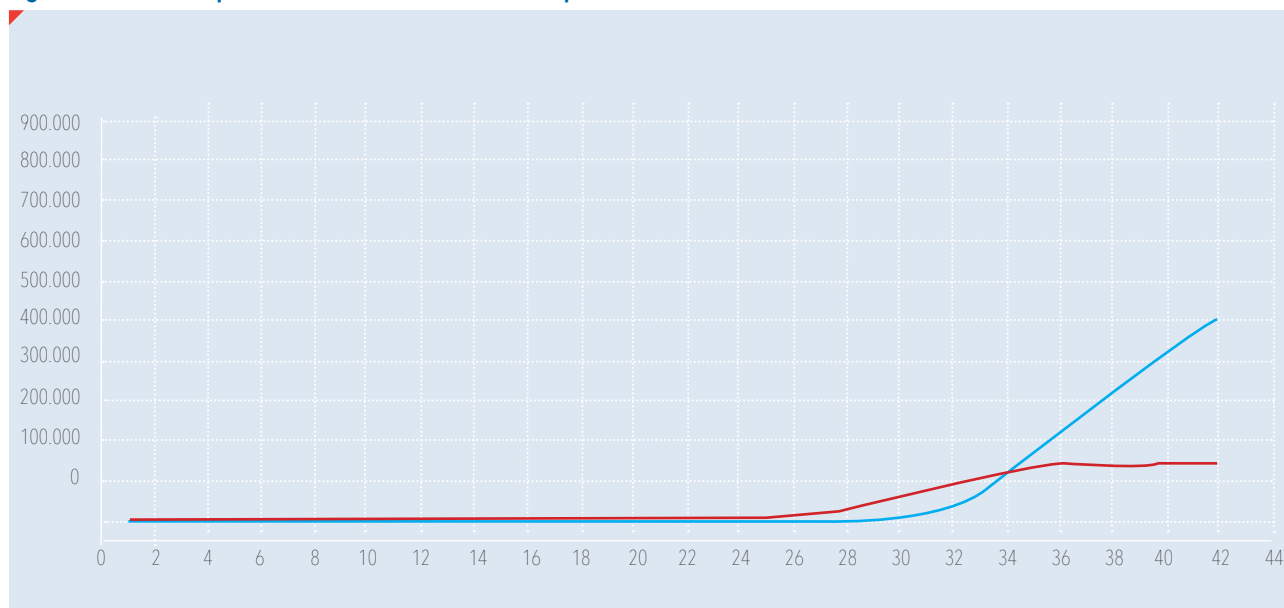
Por último, a qPCR tamén pode ter grande utilidade no caso de querer valorar a curación bacteriolóxica despois dun tratamento en fase de secado. Por exemplo, non é infrecuente que animais cunha infección por *Staphylococcus aureus* antes do secado presenten cultivos negativos nos primeiros meses da seguinte lactación e posteriormente se volva a illar no mesmo cuarteirón.

A pesar de que aínda non hai estudos sobre o momento máis adecuado para a toma de mostras, a realización dunha proba de qPCR a partir dos 21 días posparto pode ser unha boa opción.

CONCLUSIÓNS

As técnicas de bioloxía molecular como a qPCR presentan unha serie de características que as fan máis adecuadas que o cultivo microbiolóxico para o diagnóstico de infeccións intramamarias nalgúns supostos. No entanto, como se viu, non debemos considerar a qPCR como un substituto universal para o cultivo. Así, a mellor opción será utilizar ambos os métodos de diagnóstico considerando as vantaxes e inconvenientes que poidan ter dependendo do obxectivo perseguido. ■

Figura 1. Lectura de qPCR dunha mostra de leite de tanque



Pode observarse a amplificación da canle do patóxeno (*Staphylococcus aureus*, liña azul), así como a amplificación do control interno da análise (liña vermella)