



Evaluación de la qPCR para la detección de *Prototheca spp.* en leche de tanque (I)

En este artículo presento la primera parte de mi trabajo de investigación Fin de Grado. En ella abordo la etiología de este agente causante de la mastitis, su epidemiología y patogenia, así como los distintos métodos de diagnóstico de la enfermedad.

Manuel Otero Coto

Grado de Veterinaria

Investigación en Sanidad Animal de Galicia (Invesaga)

Tutor: Alberto Prieto Lago (Universidad de Santiago de Compostela)

INTRODUCCIÓN

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, producida mayoritariamente por infección. Se han implicado diversos grupos de bacterias, micoplasmas, levaduras y algas como causa de la mastitis bovina (Watts *et al.*, 1988),

aunque también se han señalado factores etiológicos no infecciosos.

La infección causa cambios patológicos en la secreción de leche de las células epiteliales, lo que disminuye la capacidad funcional de la glándula. Además, dependiendo del tipo de patógeno, las pérdidas

pueden continuar en siguientes lactaciones. La mayoría de las infecciones resultan en una inflamación local o leves casos clínicos (Ruegg, 2017); sin embargo, las infecciones crónicas pueden derivar en agalactia en el cuartón afectado o, en casos clínicos severos, en una profunda afectación sistémica que de manera ocasional puede llevar a la muerte.

La mastitis bovina provoca las pérdidas económicas más importantes en las explotaciones lecheras de ganado bovino (Halasa *et al.*, 2007). Al afectar a la glándula mamaria, la primera pérdida económica que se deriva de la mastitis es la drástica disminución en la producción y calidad de la leche.

Sin embargo, existen otras pérdidas importantes como los costes derivados del veterinario, los tratamientos, reponer las vacas que se acaban sacrificando, etc. (Beck *et al.*, 1992). Actualmente, la mastitis bovina continúa siendo el principal problema sanitario para la industria láctea, a pesar de los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento.

Dentro de las mastitis infecciosas, podemos señalar la mastitis causada por *Prototheca spp.* como una de las más problemáticas e insidiosas.

► AL AFECTAR A LA GLÁNDULA MAMARIA, LA PRIMERA PÉRDIDA ECONÓMICA QUE SE DERIVA DE LA MAMITIS ES LA DRÁSTICA DISMINUCIÓN EN LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE LA LECHE

Este patógeno afecta principalmente a vacas lecheras de alta producción, ordeñadas mecánicamente y en muchos casos mantenidas en condiciones higiénicas deficientes (Jánosi *et al.*, 2001a). La enfermedad suele asociarse a una reducción significativa de la producción de leche y a un fuerte aumento del RCS

(recuento de células somáticas) por encima de 1.000.000 por mL (Lassa *et al.*, 2011).

La incidencia real de esta mamitis sigue siendo una incógnita, pese a que cada vez es más endémica en todo el mundo; sin embargo, se cree que es mucho mayor que la registrada, dado que en ocasiones el agente causal puede clasificarse erróneamente como levadura o no crecer en condiciones microbiológicas rutinarias (Jánosi *et al.*, 2001b). Por otro lado, algunas especies de *Prototheca spp.* pueden llegar a ser un riesgo para la salud pública (Melville *et al.*, 1999), teniendo en cuenta que este agente puede llegar a eliminarse en grandes cantidades a través de la leche (Milanov *et al.*, 2016) y, además, es capaz de resistir procesos térmicos como la pasteurización (Melville *et al.*, 1999; Bozzo *et al.*, 2014). Por estos motivos, la prevención y control de la presencia de *Prototheca spp.* es de suma importancia para la industria láctea (Costa *et al.*, 1997).

ETIOLOGÍA

El género *Prototheca* incluye varias especies diferenciadas de algas unicelulares y aeróbicas que viven predominantemente como saprófitas en ambientes acuosos con contenido de material vegetal en descomposición; sin embargo, algunas especies pueden causar infección en humanos y también en animales, como es el caso de la prototecosis bovina. Este género fue descrito por primera vez por Wilhelm Krüger en 1894 (Pore, 2011), y fue reclasificado como alga en 1913 dado que sus esporas se producen internamente de manera idéntica a las algas verdes del género *Chlorella* (Chodat, 1913). Según distintos autores, al haber perdido su capacidad fotosintética debido a que carece de clorofila (Pore *et al.*, 1983), las algas de este género se convirtieron en heterótrofas debido a la necesidad de obtener energía por otra vía, un hecho que le confiere su potencial patogénico. ►

DOS POSIBILIDADES EN HIGIENE DE PEZONES, UN MISMO PRINCIPIO ACTIVO:

DIÓXIDO DE CLORO



Lactox
Alta eficacia
a un coste óptimo

- Calidad cosmética asegurada por sus altas concentraciones de dermoprotectores sumados a la acción del ALOE VERA
- Alto rendimiento, menor consumo
- Acción ahuyentadora de moscas
- Disponible en envases fáciles de mezclar y manejar (16+4, 8+2, 4+1 kg)
- La mezcla permanece activa como mínimo 3 semanas



ProquiDeza

**Higiene integral
respetuosa con el medio ambiente**



Oxilact

Máxima eficacia debido a la más alta
concentración de principios activos

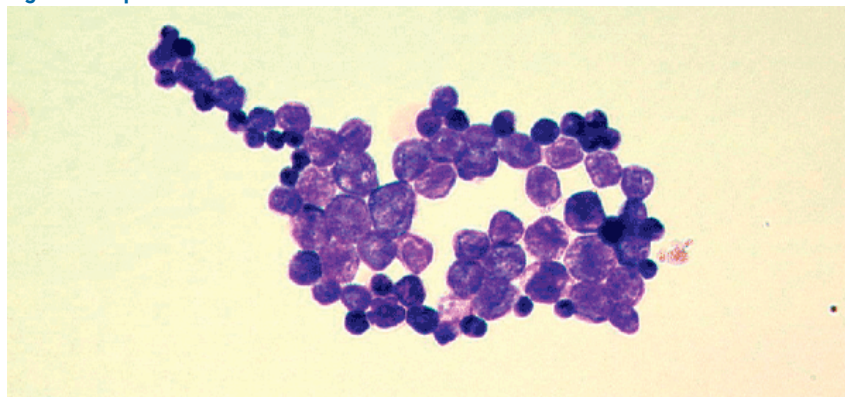


www.proquideza.com

Pol.Ind.Lalín 2000 Parcela C42/43
36500 Lalín (Pontevedra) España
Telf. (+34) 986 787 537 · info@proquideza.com

► ESTE PATÓGENO AFECTA PRINCIPALMENTE A VACAS LECHERAS DE ALTA PRODUCCIÓN, ORDEÑADAS MECÁNICAMENTE Y EN MUCHOS CASOS MANTENIDAS EN CONDICIONES HIGIÉNICAS DEFICIENTES

Figura 1. Aspecto de *Prototheca wickerhamii* en tinción de Gram



Extraído de https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Prototheca_wickerhamii.gif, con licencia de dominio público

La primera descripción de una mamitis bovina ocasionada por un alga del género *Prototheca* data de 1952 (Lerche, 1952).

Desde un punto de vista taxonómico, *Prototheca spp.* se clasifica dentro del Dominio Eukaryota, Reino Viridiplante, Filo Chlorophyta, Clase Chlorophyceae, Orden Chlorellales, Familia Chlorellaceae y Género *Prototheca* (Rapuntan et al., 2009). Dentro del género se reconocen las siguientes especies: *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. cutis*, *P. ulmea*, *P. stagnora*, *P. mirajii* y *P. zopfii*, considerándose esta última la especie mayoritaria que causa mamitis bovina (Möller et al. 2007). Otras especies, como *P. wickerhamii*, también se han observado en algún caso como causantes de mamitis bovina, aunque afecta principalmente a humanos (Marques et al., 2006; Bakula et al., 2021).

Dentro de la especie *P. zopfii* se describieron inicialmente tres biotipos, que fueron reclasificados posteriormente en 2 genotipos (1 y 2) y una nueva especie rebautizada como *P. blaschkeae* (antiguo genotipo 3) (Roesler et al., 2006). El genotipo 2 tiene mayor capacidad de adhesión al epitelio mamario y se considera la principal causa de mamitis en las vacas (Möller et al., 2007; Ahrholdt et al., 2012). Recientemente, nuevos estudios moleculares han propuesto que *P. zopfii* genotipo 1 y 2 pasen a denominarse como dos nuevas especies: *P. ciferrii* y *P. bovis* respectivamente (Jagielski et al., 2019a; Jagielski et al., 2022). *P. zopfii* es un alga unicelular inmóvil y aerobia que presenta una morfología esférica u oval, con un

diámetro entre 7-30 µm. Su principal fuente de carbono es la glucosa (Pore, 1985). Se reproduce de manera asexual: la célula madre, denominada esporangio, forma entre 2-16 células hijas mediante divisiones internas, que reciben el nombre de esporangiosporos o endosporos. Estos permanecen dentro del esporangio, envueltos en una cápsula trilaminar de esporopolenina, hasta su liberación al medio ambiente (Jànosi et al., 2001b). En la figura 1 podemos observar la morfología de *Prototheca wickerhamii*.

Se considera que *P. zopfii* genotipo 1 es más predominante en el medio ambiente que el genotipo 2, pero no se cree que cause mamitis; de hecho, se ha especulado con que el genotipo 1 es en realidad una forma adaptada al medio ambiente del genotipo 2. Sin embargo, la infección experimental del ganado con *P. zopfii* genotipo 1 se ha asociado con la aparición de lesiones granulomatosas en la glándula mamaria (Ito et al., 2011), y algún trabajo menciona el aislamiento a partir de muestras de leche recogidas en una misma granja tanto de *P. zopfii* genotipo 2 (predominante) como del genotipo 1 (poco común), así como de *P. blaschkeae* (Bozzo et al., 2014).

EPIDEMIOLOGÍA

Las diferentes especies o cepas de *Prototheca* están extendidas por todo el mundo, por lo que este tipo de mamitis ha sido descrito en distintas zonas, documentándose en muchos países como Italia (Cammi et al., 2008), Polonia (Jagielski et al., 2019b), Brazil (Bueno et al., 2006), Alemania (Roesler et

al., 2006), Estados Unidos (Kano, 2020), China (Gao et al., 2012), Japón (Toyotome et al., 2022) y España, entre otros (Jánosi et al., 2001; Abarca et al., 2001). El incremento en la incidencia de la infección causada por estos microorganismos puede llegar a ser un problema de salud pública en países subdesarrollados, ya que puede llegar a afectar a adultos o niños inmunodeprimidos, como por ejemplo con cáncer o SIDA (síndrome de la inmunodeficiencia adquirida) (Heney et al., 1991; Kaminski et al., 1992; Laeng et al., 1994; Gómez-Hernando et al., 1996). Además, se debe tener en cuenta que sobrevive al someterse a temperaturas de pasteurización de la leche (Melville et al., 1999).

Aunque *Prototheca spp.* puede estar presente en diferentes ambientes, se encuentra de manera endémica en aquellos con alta humedad, materia orgánica y temperatura relativamente elevada, actores que favorecen el crecimiento del alga en el ambiente (Costa et al., 1998).

Tras la observación de su presencia en heces (Pore y Shahan, 1988), algunos autores defienden que *Prototheca spp.* puede pasar a formar parte de la flora del tracto gastrointestinal de humanos y animales sobre todo cuando se exponen al entorno contaminado por este patógeno. Un componente en la pared celular, llamado esporopolenina, parece ser el que le proporciona protección para resistir la degradación por el tracto gastrointestinal y ser eliminada en heces volviendo a contaminar el medio ambiente (Pore et al., 1983; Costa et al., 1997). Por estos motivos, es común su aparición en ►

INABLOCK

PIENSO MINERAL PARA RUMIANTES

VERMICONTROL PLUS

Control natural de parásitos e insectos

CON
ACEITES
ESENCIALES



Reduce el riesgo de
Miasis, Lengua azul
y *E.H.E

*Enfermedad Hemorrágica Epizootica

www.inatega.com



VERMICONTROL PLUS

INDUSTRIAS DE NUTRICIÓN ANIMAL, S.L

Ctra. Valdefresno, 2. 24228. Corbillos de la Sobarriba, León.

T. +34 987 213 172 N° Registro: aESP24000088



INATEGA

explotaciones lecheras, sobre todo en zonas húmedas contaminadas con estiércol (Pore *et al.*, 1983).

Los animales sanos pueden por tanto eliminar el alga a través de las heces, por lo cual es normal que se encuentre en todo el entorno de las explotaciones lecheras, especialmente en el barro que rodea los establos (Enders y Weber, 1993a; Costa *et al.*, 1997). Los pastos en los que aparecen estas algas, tanto en el suelo como en el lodo cercano a los establos, son un riesgo potencial para las vacas, sobre todo durante el periodo seco, ya que es el momento en el que la ubre se está recuperando de la última lactancia, por tanto este es un período crítico para las nuevas infecciones por este patógeno (Costa *et al.*, 1997).

Cabe señalar que los animales salvajes también pueden estar involucrados en la transmisión de *Prototheca spp.* al ganado bovino, expulsando el agente a través de sus heces (Rakesh *et al.*, 2006). También se ha encontrado el alga en heces de otras especies como cerdos, caballos y ratas (Enders y Weber, 1993b; Weber y Enders, 1993).

Esta alga posee la capacidad para crear un biofilm, dificultando la actuación de los productos desinfectantes de uso común (Gonçalves *et al.*, 2015). Se trata de un microorganismo muy resistente, que puede encontrarse en ambientes con gran variedad de pH (1 a 12), creciendo de manera óptima entre 5 y 9. Además, puede medrar en concentraciones altas de sal, aguas tratadas con cloro y en leche pasteurizada (Marques *et al.*, 2010a; Ryohei *et al.*, 2002; Melville *et al.*, 1999; Lassa *et al.*, 2011). En relación a esto último, hay que mencionar que se trata de un agente cuyo crecimiento solo se inhibió con tratamientos térmicos de 100 °C durante 1 s, lo que sugiere que el único procedimiento industrial que asegura que la leche de las regiones endémicas es libre de este agente es la ultrapasteurización. No obstante, este mismo estudio señala que parecen existir diferencias entre especies en cuanto a la resistencia a los tratamientos térmicos, sugiriendo que *P. blaschkeae* es más resistente que *L.* (Marqués *et al.*, 2010b).

Según algunos autores, *P. zopfii* puede infectar al ganado bovino

en cualquier fase de producción (McDonald *et al.*, 1984; Furuoka *et al.*, 1989) y se ha aislado tanto de casos con mamitis clínicas como subclínicas; normalmente, la casuística ocurre de forma esporádica y epidémica, principalmente en explotaciones donde las condiciones de manejo e higiene son inadecuadas (Costa *et al.*, 1996a; 1996b). El hecho de que el cuarterón permanezca abierto durante 1-2 horas después del ordeño (la relajación del esfínter ocurre durante el proceso de ordeño para permitir el flujo de la leche) (Jones y Bailey, 2009) permite que exista una vía libre de entrada a los patógenos ambientales, lo que facilita así la infección de la glándula mamaria (Cheville *et al.*, 1984; McDonald *et al.*, 1984; Furuoka *et al.*, 1989).

Normalmente, la infección se mantiene en el rebaño gracias a la presencia de animales clínicamente sanos portadores del alga a nivel intramamario. En condiciones naturales, durante la progresión de la enfermedad, las algas son eliminadas intermitentemente a través de la leche por un número significativo de vacas infectadas, incluso durante periodos de 18 meses (Jánosi *et al.*, 2001a; Roesler y Hensel, 2003). En estos animales con infección subclínica, las algas pueden sobrevivir durante el periodo seco y reaparecer de nuevo en el calostro en el siguiente parto (Dion, 1982). Una mala actuación durante la desinfección de los cuarterones antes del ordeño (*predipping*) y durante la inmersión de estos en soluciones desinfectantes después del ordeño (*posdipping*) están relacionados con una mayor incidencia de mamitis por *P. zopfii* a nivel de rebaño (Costa *et al.*, 1996a).

Sobre las posibles fuentes de contagio, cabe señalar que se ha conseguido aislar *Prototheca spp.* tanto de leche de vacas en lactación como de secreciones de vacas secas, así como de máquinas de ordeño, de los comederos y bebederos, de muestras de forraje verde, del suelo, de las heces bovinas, de los canales de estiércol y de las aguas residuales comunitarias (Costa *et al.*, 1996a; Costa *et al.*, 1997; Anderson y Walker, 1988). El yodo es un buen antiséptico, pero es inefectivo en presencia de materia orgánica como las heces, por lo que



La *Prototheca spp.* se encuentra de manera endémica en ambientes con alta humedad, materia orgánica y temperatura relativamente elevada

una limpieza escasa y deficiente de los pezones puede contribuir a la infección por organismos ambientales como *Prototheca spp.* (Costa *et al.*, 1996a).

En cuanto a los factores predisponentes, la edad del animal y tratamientos antibióticos previos influyen en la aparición de la mamitis por *Prototheca spp.* También se ha visto que si los cuarterones tienen un historial de mamitis clínica en algún momento de la lactación son más vulnerables a ser reinfectados (Tenhagen *et al.*, 1999). Así, se ha observado que las mayores incidencias se producen en las primeras semanas de la lactación (incidencia máxima en el segundo mes) y durante los meses de verano (Costa *et al.*, 1996b; Costa *et al.*, 1997; Jánosi *et al.*, 2001a).

PATOGENIA/SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES

La prototecosis puede cursar de forma clínica o subclínica (Roesler *et al.*, 2001), y puede causar una mamitis de tipo inflamatoria aguda o granulomatosa crónica (Lopes *et al.*, 2008; Roesler *et al.*, 2001; Roesler y Hensel, 2003).

En el ganado vacuno, se cree que *Prototheca spp.* penetra por el canal estriado del pezón y llega a la glándula mamaria, típicamente después del ordeño cuando este permanece parcialmente abierto y la ubre contacta con el ambiente altamente contaminado (Salerno *et al.*, 2010). ►►



KESSENT® y LysiGEM™

LIDERANDO UNA
GANADERÍA MÁS SOSTENIBLE

La metionina y la lisina son los dos aminoácidos esenciales más limitantes para la producción lechera en los rumiantes.

Los beneficios de la metionina y la lisina son bien conocidos pero, cuando se utilizan de forma concertada, proporcionan beneficios adicionales más allá de la suplementación con el aminoácido individual. Sin su inclusión nunca podremos llegar a maximizar ni optimizar nuestra producción.

KEMIN, como único proveedor de metionina y lisina ampliamente contrastadas, pone a su disposición KESSENT y LYSIGEM.

KEMIN
RUMINANT
ESSENTIALITIES

[kemin.com/
ruminant-essentialities](https://kemin.com/ruminant-essentialities)



► SE CREE QUE *PROTOTHECA SPP.* PENETRA POR EL CANAL ESTRIADO DEL PEZÓN Y LLEGA A LA GLÁNDULA MAMARIA, TÍPICAMENTE DESPUÉS DEL ORDEÑO CUANDO ESTE PERMANECE PARCIALMENTE ABIERTO Y LA UBRE CONTACTA CON EL AMBIENTE ALTAMENTE CONTAMINADO

El alga suele invadir el tejido conectivo y también los linfonodos, y en muchos casos puede permanecer en la glándula mamaria y en los linfonodos regionales provocando granulomas inflamatorios que le dan una consistencia firme a la ubre (Jensen *et al.*, 1998).

A nivel microscópico, se ha visto que *P. zopfii* genotipo 2 induce estrés oxidativo a nivel del tejido mamario y cambios ultraestructurales asociados con apoptosis de las células epiteliales bovinas (Shahid *et al.*, 2017a; 2017b). Los mecanismos de defensa de la ubre no pueden eliminar este patógeno, por lo que puede sobrevivir por un largo tiempo en la ubre incluso durante el periodo seco (Dion., 1982; Möller *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009).

La infección suele limitarse a la glándula mamaria, pueden estar afectados uno o más cuarterones mamarios, y no necesariamente tiene por qué mostrar síntomas clínicos (Melville *et al.*, 2003; Jagielski *et al.*, 2019a; Libisch *et al.*, 2022). En las formas clínicas, entre los síntomas descritos por la literatura se menciona fundamentalmente la hinchazón y dureza de las glándulas mamarias a la palpación, como resultado de la inflamación granulomatosa que se desarrolla en el tejido de la ubre. La leche de las vacas infectadas suele ser de consistencia acuosa y contiene escamas, coágulos y grumos (Anderson y Walker., 1988; Jánosi *et al.*, 2001a, 2001b). En el estudio de un brote de mamitis por *Prototheca spp.* en Polonia (Costa *et al.*, 1996b), se observaron dos for-

mas de mamitis según los resultados bacteriológicos, síntomas clínicos y recuento de células somáticas.

En la forma aguda se detectó que la temperatura corporal era elevada, presentaban dolor y edema en la ubre, pérdida de apetito y se resistían a moverse; también la producción de leche se vio disminuida hasta detenerse completamente. La forma crónica se caracterizaba por un edema pastoso en la ubre con un ligero dolor y una consistencia de la ubre firme, así como una marcada disminución de la producción de leche; la secreción inflamatoria era acuosa y gris con escamas.

Desde un punto de vista histopatológico, *P. zopfii* causa lesiones graves y puede observarse la presencia del alga tanto en el lumen de los alvéolos como en el intersticio de la ubre, lo que conlleva a una atrofia alveolar (Corbellini *et al.*, 2001). En los casos crónicos se puede llegar a ver necrosis, atrofia alveolar y proliferación fibroblástica en el tejido conectivo intersticial (Corbellini *et al.*, 2001; Jánosi *et al.*, 2001b; Bueno *et al.*, 2006).

DIAGNÓSTICO

Los métodos de diagnóstico para la mamitis causada por *Prototheca spp.* pueden clasificarse en **métodos de diagnóstico directos e indirectos**. Los métodos directos más empleados incluyen el aislamiento, la histopatología y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); mientras que los indirectos buscan identificar signos clínicos o detectar anticuerpos específicos.

Históricamente, la identificación de *Prototheca spp.* se realizaba a través de criterios fenotípicos como la morfología de la colonia, micromorfología del microorganismo en cortes histopatológicos o cultivos y también su actividad bioquímica. Sin embargo, estos métodos convencionales fenotípicos son laboriosos y consumen demasiado tiempo, dando resultados a veces ambiguos y de baja reproducibilidad.

Hoy en día se utilizan métodos moleculares, basados en el ADN (ácido desoxirribonucleico), que se han ido desarrollando a lo largo de las dos últimas décadas, permitiendo que la identificación de *Prototheca spp.* sea más rápida y precisa (Roesler *et al.*, 2006; Gao *et al.*,

2011; Ricchi *et al.*, 2011; Sobukawa *et al.*, 2013; Capra *et al.*, 2014).

El aislamiento de *Prototheca spp.* a partir de muestras de leche suele llevarse a cabo mediante el cultivo de la muestra en diferentes medios y posteriormente tiñendo las células con azul de algodón o lactofenol y observando su morfología al microscopio óptico (Pore, 1987; Costa *et al.*, 1996b).

Sin embargo, debido al lento crecimiento de la mayoría de las cepas de *Prototheca spp.* y a la excreción intermitente de los organismos, estos métodos no pueden utilizarse para adoptar medidas de control estrictas (Roesler y Hensel, 2003). Entre los medios de cultivo más empleados podemos mencionar el agar Columbia suplementado con 5 % de sangre de cordero (denominado comúnmente agar sangre), agar Sabouraud-dextrosa o la infusión de cerebro y corazón (BHI por sus siglas en inglés), entre otros. Las bacterias, hongos y levaduras pueden actuar como microorganismos contaminantes creciendo por encima de las algas, por lo que se puede añadir cloranfenicol al medio para evitar su crecimiento. Hay que tener en cuenta que el crecimiento de *Prototheca spp.* puede ser inhibido en presencia de ciclohexamida, por lo que los medios con este inhibidor se deben evitar para identificar de manera correcta estos microorganismos (Casal *et al.*, 1997; Jánosi *et al.*, 2001b; Stenner *et al.*, 2007).

Antes del desarrollo de taxonomía molecular, la identificación de *Prototheca spp.* a nivel de especie se llevaba a cabo mediante métodos auxanográficos y bioquímicos como encontrar patrones diferenciales en los ácidos grasos (Padhye *et al.*, 1979; Roesler *et al.*, 2006). Ambos métodos consumían mucho tiempo y tenían limitaciones, como baja reproducibilidad y dificultades en la interpretación de los resultados debido a la alta interespecificidad variable de algunos aspectos bioquímicos, como recientemente se ha confirmado (Marques *et al.* 2010c). A medida que las técnicas de biología molecular iban desarrollándose y perfeccionándose, fueron apareciendo diferentes métodos que permitían la identificación de los miembros de este género. ►



MASTIVAC

EL PODER ESTÁ EN TU MANO

La protección efectiva
para el control de la mamitis

¿Quieres calcular
el retorno de tu
inversión?



Escanea el QR
y utiliza la calculadora
Mastivac

7 ANTÍGENOS
EN UNA DOSIS

EL MANEJO
MÁS SENCILLO

LA PROTECCIÓN
MÁS DURADERA

MASTIVAC suspensión inyectable para bovino. Vacuna inactivada polivalente frente a la mamitis.

Composición por dosis (5 ml): Antígenos inactivados de *S. agalactiae* cepa L01 ≥ 1 PR; *S. dysgalactiae* cepa ATCC 43078 ≥ 1 PR; *S. uberis* cepa L01 ≥ 1 PR; *S. pyogenes* cepa L01 ≥ 1 PR; *S. aureus* cepa L01 ≥ 1 PR; *A. pyogenes* cepa ATCC 9730 ≥ 1 P.R; *E. coli* cepa Bov-10 ≥ 1 PR; *E. coli* cepa Bov-14 ≥ 1 PR; *E. coli* cepa Bov-15 ≥ 1 P.R; *E. coli* cepa Suis-21 ≥ 1 PR; *E. coli* cepa J5 ATCC 43745 ≥ 1 PR. **Indicaciones y especies de destino:** Bovino (novillas y vacas). Para la inmunización activa frente a las mamitis clínicas y/o subclínicas producidas por *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *A. pyogenes* y *E. coli*. Reducción de los signos clínicos de las mamitis clínicas producidas por *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *A. pyogenes* y *E. coli*. Reducción del recuento de células somáticas en las mamitis subclínicas producidas por *S. agalactiae*, *S. uberis* y *S. aureus*. **Vía de administración:** Subcutánea. **Posología:** 5 ml. **Pauta de vacunación:** Primovacuna: Administrar 2 dosis separadas 15 días. Novillas: Administrar 2 meses antes del primer parto. Vacas: Administrar en cualquier momento independientemente del estado fisiológico del animal. Revacunación: cada 6 meses. **Contraindicaciones:** Ninguna. **Tiempo de espera:** Cero días. **Presentación:** 20 ml y 100 ml. Con prescripción veterinaria. **Titular:** CZ Veterinaria S.A. **Reg. N°:** 2990 ESP

En caso de duda consulte a su veterinario

vêtia®

A COMPANY OF ZENDAL GROUP

VETIA ANIMAL HEALTH, S.A.U. C/ Teide, nº 4. 28703 San Sebastián de los Reyes - Madrid

✉ info@vetia.es
☎ (+34) 910 901 526
🌐 www.vetia.es



En la forma aguda se detectó que la temperatura corporal era elevada, presentan dolor y edema en la ubre, pérdida de apetito y se resistían a moverse; también la producción de la leche se vio disminuida hasta detenerse completamente

Las primeras técnicas moleculares que diferenciaban las principales especies causantes de la mastitis, *P. zopffii* genotipos 1 y 2 y *P. blaschkeae*, fueron técnicas de análisis del genotipo específico mediante combinación de una PCR y una técnica de RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) dirigidas a una región específica del gen 18S rRNA (ácido ribonucleico ribosomal 18 S) de 450 pares de bases (Roesler *et al.*, 2006; Möller *et al.*, 2007). A partir de esta, se fueron desarrollando distintos métodos basados en análisis mediante PCR para mejorar el diagnóstico y ampliar el espectro de cepas detectadas, la mayoría de ellos dirigidos hacia el gen 18S rRNA. Algunos de los más destacados serían el diseño de Gao *et al.* (2011), que pusieron a punto una PCR dúplex que permitía diferenciar el genotipo 2 del resto de variantes genéticas de *P. zopffii*. Otro trabajo interesante sería el realizado por Sobukawa *et al.* (2013), que combinaron el empleo de una PCR con el análisis de fusión de alta resolución (HRM, *High Resolution Melting*), permitiendo de esta forma diferenciar las distintas especies de *Prototheca spp.* mediante el análisis de la temperatura de fusión de los amplicones generados durante la PCR. De manera similar a este último, el estudio de Onozaki *et al.* (2013) desarrolló una PCR cuantitativa específica de *P. zopffii* que, además, permitía diferenciar entre los genotipos 1 y 2 mediante el análisis del punto de fusión. Más recientemente, se ha desarrollado un ensayo rápido y sencillo de

RFLP que permite identificar y diferenciar todas las especies de *Prototheca spp.* basándose en el polimorfismo existente a nivel del gen mitocondrial *cytb*, que ha sido empleado tanto como marcador para diagnósticos como para estudios filogenéticos (Jagielski *et al.*, 2018). No obstante, y a pesar de la elevada sensibilidad de las técnicas moleculares para el diagnóstico, hay que tener en cuenta que la leche presenta algunos componentes como el calcio, grasas y proteínas, que pueden ocasionar que la polimerasa usada para los análisis moleculares no funcione correctamente.

Por este motivo, la extracción y purificación del ADN de la muestra debe realizarse con métodos que permitan eliminar de manera fiable todos los inhibidores presentes, puesto que, de lo contrario, estaríamos disminuyendo notablemente la sensibilidad analítica de la técnica (Wilson, 1997).

Otra herramienta que permite diferenciar de manera eficaz entre las diferentes especies de *Prototheca spp.* es la espectrometría de masas denominada MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-Of-Flight) (Murugaiyan *et al.*, 2012; Ahrholdt *et al.*, 2012). En el caso de *Prototheca spp.*, esta tecnología comenzó a utilizarse en 2012, permitiendo la especiación rápida y eficaz a partir de aislados obtenidos de casos de mastitis (Fidelis *et al.*, 2021). Sin embargo, el principal inconveniente de este método es que requiere de un grado elevado de conocimientos técnicos y un equipamiento adecuado y costoso, lo que dificulta que esté dispo-

nible en la mayoría de los laboratorios que realizan diagnóstico de mastitis de manera rutinaria.

En cuanto al diagnóstico indirecto mediante búsqueda de anticuerpos IgG (inmunoglobulina G) anti-*Prototheca*, Jensen *et al.* (1998) observaron que, a pesar de que pueda existir una fuerte respuesta serológica tras una infección por *Prototheca spp.*, un recuento del título de anticuerpos en una sola muestra no es válido para el diagnóstico de una mastitis causada por *Prototheca spp.*, ya que no existían diferencias significativas entre el título de anticuerpos de animales con infección activa y animales no infectados. Sin embargo, un estudio posterior de Roesler *et al.* (2001) desarrolló un ELISA para la detección de anticuerpos IgA (inmunoglobulina A) anti-*Prototheca* que obtuvo un porcentaje de sensibilidad del 96 % y una especificidad del 94 % en relación con el cultivo microbiológico. De esta manera, el examen serológico podría utilizarse para identificar a los animales infectados de forma aguda y crónica, así como a los excretadores intermitentes (Roesler *et al.*, 2001, 2003). ■

Este artículo forma parte de el trabajo de investigación Fin de Grado del autor, cuyos objetivos fueron evaluar la capacidad de la técnica de qPCR para detectar *Prototheca spp.* en muestras de leche de tanque, uno de los agentes causantes de la mastitis, y comparar los resultados obtenidos mediante esta técnica con los obtenidos mediante el cultivo microbiológico tradicional.

El estudio se realizó gracias a la colaboración entre el grupo Invesaga y el Laboratorio Interprofesional Galego do Leite (Ligal), equipos que recogieron las muestras empleadas y realizaron los cultivos microbiológicos de esta.

AGRADECIMIENTOS

A Gonzalo López Lorenzo (Invesaga), quien me ayudó con todo el procesado de muestras para la PCR), y a María Belén Pombo Río (Ligal), que se encargó de identificar las granjas positivas y recoger las muestras.

GRUPO AGROAMB

SENTIDO DEL RECICLAJE

VENTAJAS

- ✓ Mejoran la estructura del suelo, drenaje, retención de agua y aireación, proporcionando un mejor ambiente de enraizamiento de las plantas.
- ✓ Poseen cualidades de liberación de nutrientes lenta. El material continúa su descomposición dentro del suelo, reduciendo la cantidad de nitrógeno y fósforo que puede originarse con los fertilizantes químicos.
- ✓ Mejoran la capacidad de trabajo de los suelos, especialmente arcillosos pesados.
- ✓ Mejoran la retención de agua en los suelos ligeros.
- ✓ Mejoran la resistencia a la compactación del suelo y a la erosión.
- ✓ Reducen la necesidad de fertilizantes artificiales.
- ✓ Regulan el pH del suelo, al aportar cal.

PRODUCTOS FERTILIZANTES

Su contenido en materia orgánica, nitrógeno y fósforo los hacen especialmente atractivos para la elaboración de fertilizante en el sector agroforestal. Entre sus variadas ventajas hay que destacar que mejoran la estructura del suelo, su grado de porosidad y la capacidad de retención de agua debido fundamentalmente al aporte de materia orgánica. Además, le proporciona al suelo nitrógeno, fósforo y potasio de liberación lenta, y, al aportar cal, permite regular el pH del suelo. AGROAMB tiene inscritos los diferentes productos fertilizantes que elabora en el Registro de Productos Fertilizantes del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

FERTILIZANTES AUTORIZADOS

CÓDIGO	TIPO	NOMBRE COMERCIAL
F0001757/2022	Fertilizante orgánico NPK de origen animal y vegetal	AGROTHAME ORGANITE START
F0001894/2022	Enmienda orgánica compost	AGROTHAME ORGANITE COMPOST
F0001895/2022	Enmienda orgánica compost	AGROTHAME ORGANITE COMPOST START
F0001896/2022	Enmienda orgánica húmica	AGROTHAME ORGANITE HUMICO START
F0001897/2022	Enmienda orgánica húmica	AGROTHAME ORGANITE HUMICO
F0001919/2023	Fertilizante órgano-mineral nitrogenado líquido	AGROTHAME ORGANITE N-LIQ
F0001925/2023	Fertilizante órgano-mineral NK líquido	AGROTHAME ORGANITE PURINE
F0001926/2023	Fertilizante órgano-mineral NP líquido	AGROTHAME ORGANITE LIQUID
F0001980/2023	Enmienda orgánica húmica	AGROTHAME ORGANITE HUMICO ZEN
F0002420/2025	Fertilizante órgano-mineral NPK	AGROTHAME ORGANITE AGRO
F0002421/2025	Fertilizante órgano-mineral NPK	AGROTHAME ORGANITE SULFAGRO
F0002422/2025	Enmienda orgánica húmica	AGROTHAME ORGANITE HUMOST



AGROAMB

Ponte de Outeiro, 10 | 27256 Castro de Rei (Lugo)

Teléfono (+34) 982 231 365 | Fax (+34) 982 240 534

E-mail agroamb@agroamb.com | Web www.agroamb.com