



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

En este estudio presento la segunda (y última) parte de mi trabajo Fin de Grado, en la cual se describen el tratamiento y control de esta enfermedad, el material y los métodos utilizados, así como los resultados, las limitaciones y las conclusiones finales de esta investigación.

Manuel Otero Coto

Grado de Veterinaria

Investigación en Sanidad Animal de Galicia (Invesaga)

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

TRATAMIENTO Y CONTROL

De manera general puede decirse que este género de algas no responde al tratamiento con los antimicrobianos más comúnmente empleados frente a las mamitis, dejando como única opción y método de control más eficaz en el ganado bovino la eliminación de los animales infectados (Kirk, 1991; Melville *et al.*, 1999). Aunque existen algunos estudios *in vitro* que han demostrado cierta eficacia

de algunos antibióticos y antifúngicos contra cepas de *Prototheca spp.*, como por ejemplo la anfotericina B y la nistatina (Buzzini *et al.* 2004; Bexiga *et al.*, 2003), los tratamientos aplicados *in vivo* no han ofrecido resultado. Por otro lado, la capacidad y eficacia como alguicidas de algunos productos naturales también ha sido demostrada en estudios *in vitro*; por ejemplo, algunos antimicrobianos de origen natural, como el extracto de semi-

llas de frutas cítricas, el extracto etanólico de *Senecio desiderabilis* u óleos esenciales de algunas plantas (Brito y Veiga, 1997; Deuschle *et al.*, 2007; Tortorano *et al.*, 2008) pueden ser una alternativa eficaz y económica a estudiar para futuros tratamientos.

En cuanto al empleo de desinfectantes, existen algunos compuestos químicos como el sulfato de cobre, la clorhexidina y el nitrato de plata que pueden afectar al microorganismo (Melville *et al.* 2003); de esta manera, se podría utilizar clorhexidina en el paso de *predipping*, que se realiza previamente al ordeño para evitar contaminar el sistema.



► UNA VEZ IDENTIFICADAS LAS VACAS QUE PRESENTAN LA INFECCIÓN, SE DEBEN SEPARAR DEL REBAÑO Y ORDEÑARLAS EN ÚLTIMO LUGAR, ASÍ COMO FAVORECER UN DESVIEJE PREMATURO DE ESTOS ANIMALES

También se sugiere llevar a cabo un paso de *postdipping* con los mismos antisépticos para eliminar organismos de la piel y del orificio todavía abierto por la extracción de leche (Salerno *et al.*, 2010). En el caso de cuarterones ya afectados, se puede utilizar nitrato de plata para la cauterización y cierre completo del pezón. Hay que tener en cuenta que la presencia de humedad o material orgánico como las heces puede disminuir la efectividad de los desinfectantes utilizados; por lo tanto, el pezón debe estar limpio y seco previamente.

Debido a la ausencia de un tratamiento eficaz *in vivo* contra la mastitis por *Prototheca spp.*, se deben llevar a cabo estrictas medidas de higiene para prevenir y controlar la enfermedad. En caso de que haya un brote por *Prototheca spp.*, lo primero que se debe tener en cuenta sería identificar a los animales afectados y portadores que puedan actuar como reservorio y extender la enfermedad al resto del rebaño. Una vez identificadas las vacas que presentan la infección, se deben separar del rebaño y ordeñarlas en último lugar, así como favorecer un desvieje prematuro de estos animales.



La presencia de humedad o material orgánico puede disminuir la efectividad de los desinfectantes utilizados; por lo tanto, el pezón debe estar limpio y seco antes de su aplicación

Además de la segregación y eliminación de los animales infectados, para el control de este patógeno es necesario tener en cuenta que existen otras fuentes de contaminación ambiental además de los animales infectados. Por ejemplo, dada su capacidad para poder sobrevivir en el agua, esta debería ser tratada; no obstante, hay que recordar la capacidad del alga para producir *biofilm* y que los tratamientos convencionales para su eliminación como la cloración no son efectivos (Davies, 2003). En relación a esto, un estudio de Gonçalves *et al.* (2015) que evaluaba la capacidad de formar *biofilms* de *P. zopfii* aislada de casos subclínicos de mastitis bovina observó que el ácido peracético era más efectivo que el hipoclorito de sodio o el yodo, pero los tres poseían cierto efecto contra esta alga.

Otra medida que puede ser interesante es administrar la ración de los animales justo a la salida del ordeño. Dado que se trata de una mastitis principalmente ambiental que se adquiere por vía ascendente, el hecho de no alimentar a los animales después del ordeño puede provocar que las vacas se tumben en suelos o camas contaminadas con el esfínter del pezón aún abierto, favoreciendo la contaminación del canal del pezón y la posterior infección de la glándula mamaria (Costa *et al.*, 1996b). Así, ofrecer un buen alimento palatable inmediatamente tras el ordeño puede evitar que se tumben inmediatamente, dando más tiempo de esta forma a que se cierre el canal del pezón (Bueno *et al.*, 2006).

El tiempo de exposición del canal del pezón a un ambiente con posible presencia de *Prototheca spp.* debe reducirse al máximo, prestando atención a todas las instalaciones de la granja y, especialmente, a los alojamientos de las vacas secas, las novillas y las vacas en lactación, así como a la sala de ordeño.

En estas áreas se debe intentar mantener unas condiciones de sequedad adecuadas eliminando toda la humedad posible, especialmente en los materiales de las camas, debido a la preferencia de *Prototheca spp.* por los ambientes húmedos (Jánosi *et al.*, 2001b; Lopes *et al.*, 2008). Según algunos estudios, el tipo de cama tiene un efecto significativo sobre el aislamiento *in vitro*



Se debe prestar atención a todas las instalaciones de la granja, especialmente alojamientos y sala de ordeño



El tipo de cama tiene un efecto significativo sobre el aislamiento *in vitro* de *Prototheca spp.*, asociado con un mayor crecimiento a partir de materiales como el estiércol, el serrín y la arena

de *Prototheca spp.* y este efecto se ha asociado con un mayor crecimiento a partir de materiales como el estiércol, el serrín y la arena; por el contrario, las virutas de abeto secadas en horno pueden llegar a inhibir su crecimiento (Adhikari *et al.*, 2013).

Otras medidas más generales para el control incluirían también una buena alimentación.

La dieta es un factor que puede influenciar la resistencia de las vacas a la mastitis; de hecho, algunos estudios reflejaron la importancia de la vitamina E y el selenio para aumentar el nivel inmunitario de los animales frente a esta patología (Erskine, 1993; Smith *et al.*, 1997). Aunque no hay una correlación directa de la nutrición con la prototecosis bovina, la dieta sí que presenta cierta influencia en otros agentes de mastitis bovina, lo que puede ayudar a que los animales sean menos susceptibles a una infección por *Prototheca spp.*

Por último, y debido al carácter subclínico de la enfermedad, es importante realizar una buena monitorización de la leche de todos los animales de la explotación mediante la evaluación ►

► LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES COMO LA PCR PUEDEN SER UNA BUENA ALTERNATIVA PARA LA MONITORIZACIÓN DEL TOTAL DE ANIMALES EN PRODUCCIÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE DE TANQUE



La dieta es un factor que puede influenciar la resistencia de las vacas a la mastitis

de los resultados del control lechero o, en su defecto, la realización periódica de pruebas de diagnóstico como el CMT (California Mastitis Test) (Ruegg, 2017), lo que nos permitirá identificar aquellos animales con cuarterones positivos y así evitar o reducir la posibilidad de contaminación del medio y por tanto el contagio a otros animales. De manera similar, siempre que se adquieran animales, estos deberían o bien comprarse a rebaños con historial negativo demostrable o bien realizarse análisis individuales que permitan identificar si se trata de un animal portador antes de introducirlo en el rebaño (Bueno *et al.*, 2006). En este sentido, las herramientas moleculares como la PCR pueden ser una buena alternativa para la monitorización del total de animales en producción mediante el análisis de muestras de leche de tanque.

OBJETIVOS

Con todo lo expuesto en la revisión bibliográfica, y en especial con la problemática derivada de la presencia de animales positivos a *Prototheca spp.* en las explotaciones lecheras y la imposibilidad de su tratamiento, en este trabajo experimental se plantearon los siguientes objetivos:

- 1°. Evaluar la capacidad de una técnica comercial de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) para la detección de *Prototheca spp.* a partir de muestras de leche de tanque de explotaciones positivas.
- 2°. Comparar los resultados obtenidos mediante qPCR para muestras de leche de tanque con aquellos obtenidos mediante el cultivo microbiológico convencional de dichas muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras

Este trabajo se realizó en colaboración con el Laboratorio Interprofesional Gallego de Análisis de Leche (Ligal); este laboratorio es el encargado de realizar todos los análisis del programa de Control Oficial de Rendimiento Lechero que se realiza en Galicia y, además, prestan servicio de diagnóstico de mastitis a las ganaderías.

De manera resumida, para el diagnóstico de mastitis se realiza un cultivo en medio agar-sangre a partir de la leche del cuarterón o cuarterones afectados, y, en el caso de obtener colonias aisladas, se procede a su identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

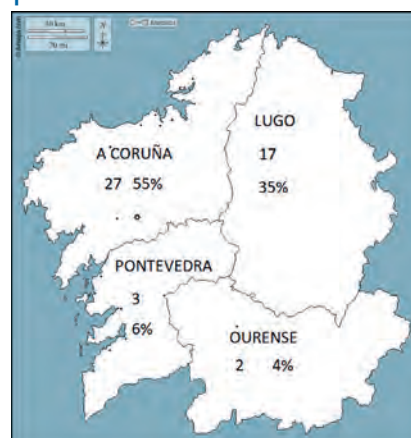
Durante el periodo de septiembre de 2021 hasta junio de 2022, se solicitó al Ligal que cada vez que obtuviesen un aislamiento positivo de *Prototheca spp.* en las muestras de leche de cuarterones individuales que reciben rutinariamente para diagnóstico, se pusiesen en contacto con dicha ganadería o su veterinario responsable solicitando una muestra de leche del tanque de dicha explotación.

Una vez obtenida la muestra de tanque, se realizó su cultivo en el Ligal en medio agar-sangre, al igual que con las muestras individuales y, a continuación, se procedió a guardarla en congelación a -20 °C. De esta forma, el Ligal recogió 49 muestras de tanque de diferentes explotaciones de toda Galicia, que cumplían la característica de que en todas ellas se había detectado al menos una vaca positiva a *Prototheca spp.* mediante cultivo microbiológico de leche de cuarterón. Posteriormente, las muestras de leche de tanque fueron enviadas a la Facultad de Veterinaria de Lugo para realizar su análisis mediante qPCR.



Es importante realizar una buena monitorización de la leche de todos los animales mediante la evaluación de los resultados del control lechero o la realización periódica de pruebas de diagnóstico como el CMT

Figura 2. Número y porcentaje de explotaciones incluidas en el estudio por cada provincia de Galicia



En la figura 2 puede observarse el número de explotaciones incluidas de cada provincia; A Coruña y Lugo son las más representadas.

Extracción de ADN

Una vez con las muestras en el laboratorio, el primer paso fue realizar la extracción y purificación del ADN presente en cada muestra. ►

Hablemos



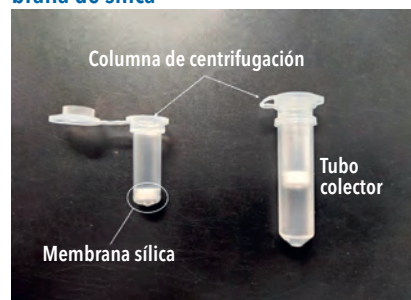
Tras la aparición de los primeros brotes en 2004, la amenaza del virus de la **lengua azul** es constante tanto en España, como en varios países de Europa.

Desde hace más de 20 años, **trabajamos codo con codo** con veterinarios y ganaderos, protegiendo a millones de vacas y ovejas frente al virus BTV.

Nuestra experiencia en la investigación y desarrollo de vacunas nos permite ofrecer **una vacunación con sentido.**

► UNA VEZ OBTENIDA LA MUESTRA DE TANQUE, SE REALIZÓ SU CULTIVO EN EL LIGAL EN MEDIO AGAR-SANGRE, AL IGUAL QUE CON LAS MUESTRAS INDIVIDUALES Y, A CONTINUACIÓN, SE PROCEDIÓ A GUARDARLA EN CONGELACIÓN A -20 °C

Figura 3. Tubo colector y columna de centrifugación, con detalle de la membrana de sílica



Este paso es uno de los más críticos, ya que, si no obtenemos un ADN en suficiente calidad y cantidad, es posible que la qPCR no funcione. Para esto utilizamos el kit comercial *high pure PCR template preparation KIT* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo el siguiente protocolo:

1. Descongelar la lisozima humana y la proteinasa K.
2. Homogeneizar las muestras de leche de tanque en un agitador de tubos.
3. Aspirar con micropipeta un volumen 200 µL de cada muestra de leche e introducir en un tubo *Eppendorf* estéril.
4. Añadir 14 µL de lisozima humana (50 mg/mL) a cada muestra de leche. Este reactivo ayuda a descomponer la pared celular de las posibles bacterias y algas presentes.
5. Homogeneizar durante 1 minuto en el agitador de tubos *ependorff*.
6. Incubar las muestras homogeneizadas durante 1 h a 37 °C con una agitación de 500 revoluciones por minuto.
7. Añadir 40 µL de proteinasa K descongelada a las muestras y homogeneizar en el agitador durante 1 minuto. La proteinasa K es una serina proteasa (enzima) con amplia actividad de escisión para destruir proteínas en lisados celulares y así liberar ácidos nucleicos. Tienen la capacidad para inactivar tanto ADNasas (desoxirribonucleasa) como ARNasas (ribonucleasas).
8. Incubar durante 1 h a 55 °C con una agitación de 500 revoluciones por minuto.
9. Añadir 200 µL de *Binding Buffer*, que permite obtener un pH y concentraciones de sales adecuadas para que el ADN se absorba y se adhiera posteriormente a la membrana sílica de la columna de centrifugación. En la figura 3 podemos observar la columna de centrifugación y su membrana sílica en el interior de un tubo colector.
10. Homogeneizar inmediatamente durante 1 minuto.
11. Incubar durante 10 minutos a 70 °C con una agitación de 500 revoluciones por minuto. Aprovechar este momento para precalentar la solución de elución a también a 70 °C.
12. Añadir 100 µL de isopropanol. De esta manera, el isopropanol precipita el ADN porque compite con este por el agua, deshidratándolo y llevándolo al fondo del tubo.
13. Homogeneizar durante 1 minuto y centrifugar brevemente (aproximadamente 10 s) en la microcentrífuga para que no quede ningún líquido ni en la tapa ni en las paredes del tubo.
14. Colocar una columna de centrifugación en un tubo colector y pipetear todo el contenido de cada *Eppendorf* con las muestras a la correspondiente columna.
15. Centrifugar durante 1 minuto a 9300 revoluciones por minuto.
16. Colocar la columna sobre un nuevo tubo colector y desecharlo el anterior.
17. Añadir 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer* (primer lavado). Este tampón contribuye a

eliminar las sustancias no deseadas presentes en la muestra como restos de membranas, grasas, proteínas, etc.

18. Centrifugar durante 1 minuto a 9300 revoluciones por minuto.
19. Colocar la columna sobre un nuevo tubo colector y desecharlo el anterior.
20. Añadir 500 µL de *Wash Buffer* (segundo lavado).
21. Centrifugar 1 minuto a 9300 revoluciones por minuto.
22. Añadir 500 µL de *Wash Buffer* (tercer lavado).
23. Centrifugar 1 minuto a 9300 revoluciones por minuto.
24. Vaciar el tubo colector y volver a colocar la columna. Centrifugar 3 minutos a 10.400 revoluciones por minuto para conseguir un secado de membrana. Mediante este paso conseguimos que no queden restos de las soluciones de lavado en la membrana de la columna de centrifugación.
25. Colocar la columna sobre un nuevo tubo *Eppendorf* estéril y libre de nucleasas donde se almacenará el ADN hasta su análisis. Añadir en la columna 100 µL de *Elution Buffer* (precalentado a 70 °C).
26. Dejar incubar 2 minutos y centrifugar 1 minuto a 9.300 revoluciones por minuto.
27. Almacenar el tubo *Eppendorf* con el ADN a -20 °C.

PROTOCOLO DE QPCR

Una vez obtenido el ADN de cada muestra mediante el protocolo anterior, se procedió a la realización de la qPCR para la detección de *Prototheca spp.* Para ello se empleó un kit comercial rápido de qPCR

Figura 4. Termociclador de tiempo real QuantStudio5® (Applied Biosystems, Estados Unidos)



(EXOone® *Prototheca spp.* oneMix, EXOPOL, España), que incluye, además, un control endógeno (CE) que utiliza como diana una región conservada del gen de la proteína β -actina que está presente en todas las células de mamíferos. Las muestras fueron analizadas en un termociclador de tiempo real QuantStudio 5® (Applied Biosystems®, Estados Unidos), el cual se puede observar en la figura 4. En la tabla 1 podemos ver una descripción de los componentes suministrados por el kit.

En primer lugar, es necesario hidratar el control positivo sintético que se suministra liofilizado con el kit y que sirve como control positivo externo del análisis. El protocolo fue el siguiente:

1. Centrifugar brevemente el tubo del Control Positivo MAM4 y reconstituir con 250 μ L de agua de grado molecular.
2. Dejar reposar el tubo 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar la resuspensión del liofilizado.

3. Homogeneizar brevemente en el agitador de tubos Eppendorf y centrifugar durante 10 s.

4. Almacenar el Control Positivo reconstituido a temperatura $\leq -18^{\circ}\text{C}$ después de utilizar.

5. A continuación, se procedió a realizar la qPCR propiamente dicha, para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

- a. Descongelar el tubo oneMIX®, que contiene todos los elementos necesarios para la detección tanto de *Prototheca spp.* como del control endógeno (polimerasa, primers, sondas, etc.).
- b. Homogeneizar brevemente el tubo oneMIX® en el agitador de tubos Eppendorf y centrifugar durante 10 s.
- c. Cubrir la plantilla de análisis, incluyendo todas las muestras a testar y los controles positivo y negativo. Colocar en una gradilla tantos tubos de 0,2 mL como muestras y controles se necesiten, siguiendo la misma distribución de la plantilla.
- d. Dispensar 15 μ L de oneMIX® en cada tubo.
- e. Añadir 5 μ L de muestra de ADN, Control Positivo o Control Negativo (agua de grado molecular) a su tubo correspondiente siguiendo la plantilla, cerrándolos a continuación para evitar contaminaciones entre tubos.
- f. Centrifugar los tubos a 1.600 revoluciones por minuto para evitar que queden gotas en la tapa o paredes del tubo.
- g. Introducir los tubos en el termociclador y programar el

análisis utilizando su propio software.

El protocolo térmico empleado está resumido en la tabla 2.

INTERPRETACIÓN DE LA QPCR

La presencia de *Prototheca spp.* en cada tubo se detectó mediante la amplificación de la señal de fluorescencia del canal FAM®, considerando positiva cualquier muestra con un valor del umbral de amplificación (Ct: *Cycle threshold*) inferior a 38. Aquellas muestras con valores de Ct entre 38 y 42 (límite de ciclos de la técnica) se consideraron como dudosos. Hay que destacar que el valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ADN diana presente inicialmente en la muestra, por lo que valores más bajos de Ct indican una mayor presencia de *Prototheca spp.* en la muestra.

En aquellas muestras para las cuales no hubo amplificación del canal FAM® que detectaba la presencia de *Prototheca spp.*, el CE incluido en el análisis permitió evaluar el funcionamiento de la qPCR. Dado que la diana del CE es la β -actina, un gen que está presente en todas las células de mamíferos, todas las muestras de leche deben obtener una amplificación positiva para esta diana; de lo contrario, un resultado negativo para esta diana nos indicaría que ha habido algún problema o error con el funcionamiento de la qPCR. El CE se detectó a través del canal VIC y su rango de Ct debe estar comprendido entre 22 y 37. De esta forma, si el Ct del CE de una muestra negativa está dentro de ese rango, se considerará que el resultado obtenido para ella en el canal de detección del patógeno es válido, mientras que si no hay ninguna lectura esto puede indicar que la extracción de ADN no ha sido eficiente o ha habido algún problema durante la realización de la qPCR (mal pipeteado, reactivos en mal estado, etc.).

En la tabla 3 (pág. sig.) se resumen los criterios de interpretación del resultado de la qPCR en función de los resultados de cada canal de fluorescencia y los controles positivo y negativo; mientras, en la figura 5 (pág. sig.) pueden verse los cuatro posibles resultados que pueden obtenerse para una muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 49 muestras de leche de tanque de explotaciones lecheras con animales positivos a *Prototheca spp.* ►

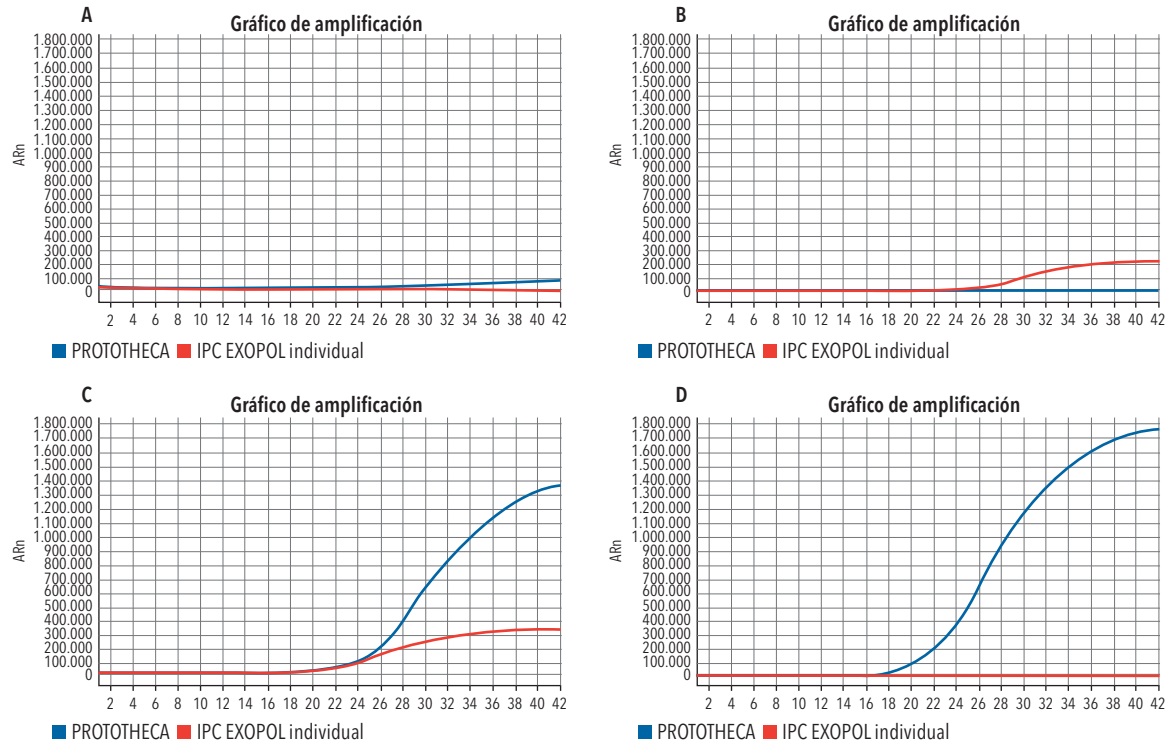
Tabla 1. Componentes empleados suministrados por el kit EXOone® *Prototheca spp.* oneMix (EXOPOL, España)

Nombre	Descripción	Presentación
PRTH oneMIX® tube	Cada tubo contiene tampón, enzimas dNTP, cebadores/sondas para el patógeno y control de detección endógeno	2 tubos
Control positivo MAM4	Control sintético específico liofilizado	1 tubo
Agua	Agua de grado molecular	1 tubo (1 mL)

Tabla 2. Protocolo térmico empleado para el análisis de *Prototheca spp.* mediante qPCR

Protocolo térmico (ciclos)	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	5 minutos	95 °C
42 ciclos	15 segundos	95 °C
	60 segundos	60 °C

Figura 5. Posibles resultados de la qPCR. Se representa la lectura de detección de *Prototheca spp.* en color celeste (canal FAM®) y la lectura de detección del control endógeno en rojo (canal VIC®)



A: Muestra no válida: muestra y control endógeno negativos
B: Muestra negativa: existe amplificación del canal que detecta el control endógeno, pero no del canal que detecta el patógeno
C: Muestra positiva: existe amplificación de ambos canales
D: Muestra positiva: existe amplificación del canal que detecta el patógeno, pero no del canal que detecta el control endógeno. Este resultado puede producirse en aquellas ocasiones en que la presencia del patógeno es tan elevada que consume todos los recursos de la qPCR, impidiendo la amplificación del control endógeno

que habían sido recogidas por el Ligal y analizadas individualmente mediante un cultivo microbiológico en medio agar-sangre, no se consiguió aislar colonias compatibles con *Prototheca spp.* en ninguna de ellas.
En cambio, el análisis de qPCR realizado sobre las mismas muestras sí obtuvo resultados positivos

en un gran número de ellas, y permitió detectar ADN de *Prototheca spp.* en las muestras de leche de tanque del 68 % de las explotaciones (33/49 explotaciones).
Para el resto de las explotaciones, en cinco de las muestras de leche de tanque (10 %) se obtuvo un resultado dudoso, mientras que en las 11 restantes (22 %) se obtuvo

un resultado claramente negativo (figura 6).
En la tabla 4 pueden verse los valores de Ct máximo y mínimo, así como la media obtenidos para cada categoría de resultado.
Estos resultados parecen indicar que la qPCR realizada sobre muestras de leche de tanque de explotaciones con infección conocida por ➡

Figura 6. Porcentaje de detección de *Prototheca spp.* mediante qPCR en las muestras de leche de tanque recogidas en este estudio

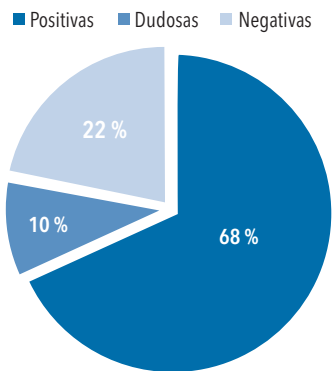


Tabla 3. Criterios de interpretación de los resultados obtenidos en la qPCR

Muestra	CE de la muestra	Control Positivo	Control Negativo	Resultado
+	No considerar	+	-	Válido
-	+	+	-	Válido
-	-	+	-	No válido
+/-	+/-	-	-	No válido
+/-	+/-	+	+	No válido

CE: control endógeno; +: positivo; -: negativo; +/-: positivo/negativo

Tabla 4. Número de muestras positivas, negativas y dudosas junto con los valores de Ct máximos, mínimos y media obtenidos para cada categoría

Resultado	Número de muestras	Ct medio	Ct mínimo	Ct máximo
Positivos	33	32,75	28,24	37,72
Dudosos	5	39,53	38,19	41,33
Negativos	11	No Ct		



In Mastitis control

PRE

is the new

PRO

PREVENIR es lo que hacen los
PROFESIONALES de la leche

Obtén más información sobre cómo ser
un profesional en el control de la mastitis
en **mastitisvaccination.com**

► EL VALOR DE CT ES INVERSAMENTE PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE ADN DIANA PRESENTE INICIALMENTE EN LA MUESTRA, POR LO QUE VALORES MÁS BAJOS DE CT INDICAN UNA MAYOR PRESENCIA DE *Prototheca spp.* EN LA MUESTRA

Prototheca spp. es una técnica con una mayor sensibilidad analítica que el cultivo microbiológico convencional, dado que no se consiguió aislar colonias de *Prototheca spp.* en ninguna de las muestras de leche de tanque analizadas.

Aunque el cultivo de *Prototheca spp.* a partir de leche de tanque ha sido descrito y empleado incluso en algún estudio reciente con hasta un 0,5 % de detección de tanques positivos (Toyotome *et al.*, 2022), la mayoría de las publicaciones encontradas realizan este análisis mediante PCR y obtienen porcentajes de detección muy superiores (6-11 %), lo que sugiere que las técnicas moleculares presentan en principio una mayor sensibilidad analítica que los métodos microbiológicos convencionales basados en el cultivo (Bauman *et al.*, 2018; Zecconi *et al.*, 2020).

Es posible que estas divergencias se deban también a que los estudios mencionados se han realizado en países diferentes, pero, teniendo en cuenta que *Prototheca spp.* es un microorganismo de origen ambiental y relacionado principalmente con las fuentes de agua, no parece que las distintas regiones geográficas sean la única causa que justifique estas diferencias.

El hecho de que en este trabajo no se lograra el aislamiento de *Prototheca spp.* en ninguna muestra podría estar seguramente relacionado con una mayor sensibilidad de la técnica de PCR, pero es probable que existan otros factores que hayan influido en estos resultados. Uno de los factores con mayor influencia

es posiblemente la prevalencia de este patógeno en las granjas, de tal manera que en aquellas explotaciones con mayor número de animales infectados es más probable que el cultivo microbiológico a partir de leche de tanque resulte positivo; esto puede verse también en un trabajo realizado por Ricchi *et al.* (2013), donde en una explotación con prevalencia del 4,8 % a *Prototheca blaschkeae* solo el 33 % de las muestras de leche de tanque cultivadas obtuvieron un aislamiento positivo. Otra posible razón para la inhibición del crecimiento de *Prototheca spp.* puede ser la presencia en la leche de ciertas sustancias con capacidad antimicrobiana, como son la lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa, entre otras, lo que, unido a una baja carga del microorganismo, puede provocar que se produzcan ausencias de crecimiento (Rainard y Riollot, 2006).

El efecto de la prevalencia de *Prototheca spp.* a nivel de rebaño es seguramente también el responsable de la aparición de falsos negativos en la qPCR en nuestro estudio, ya que, aunque todas las explotaciones incluidas habían presentado al menos un animal infectado por *Prototheca spp.*, hasta un 22 % de las muestras analizadas mediante qPCR resultaron negativas, lo que sugiere que la cantidad de *Prototheca spp.* presente en la muestra de leche de tanque era más baja que la sensibilidad analítica de la qPCR. Este efecto de la prevalencia sobre la capacidad de detección de las técnicas moleculares puede observarse también en trabajos realizados con otros microorganismos causantes de mastitis, como es el caso de *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* (Boss *et al.*, 2011; Mahmmod *et al.*, 2013).

En relación con los resultados dudosos (10 % en este estudio), hay que comentar que deberían interpretarse al menos como un posible riesgo y, por tanto, deberían tomarse medidas como la monitorización continuada de la explotación, sobre todo teniendo en cuenta las implicaciones que supone para las granjas la existencia de animales infectados por esta alga.

El desarrollo de métodos analíticos que posibiliten la detección de este patógeno en el tanque de le-

che supone un avance, ya que facilitaría realizar un mejor control de la enfermedad y reducir en parte los grandes costes económicos que provoca la presencia de este tipo de mastitis en las explotaciones ganaderas, tanto por el sacrificio de vacas afectadas como por el aumento de células somáticas en el tanque de leche y costes veterinarios asociados. Como principales ventajas de la qPCR se puede señalar que es una técnica mucho más rápida que el cultivo microbiológico en lo que se refiere a la obtención de resultados, y por tanto agiliza la toma de decisiones en granja.

De manera general, se puede decir que para que se consigan aislar colonias de *Prototheca spp.* en un medio de cultivo y confirmar el aislamiento se necesitan entre 3 y 5 días (Krukowski *et al.*, 2013; Onozaki *et al.*, 2013), mientras que para la PCR no se necesitan normalmente más de 24 h.

Por otro lado, como hemos observado, el cultivo no consiguió aislar ninguna colonia del tanque de leche, generando por tanto falsos negativos en explotaciones donde realmente sí había casos de mastitis por *Prototheca spp.*; sin embargo, la qPCR sí consiguió detectar el patógeno en un importante porcentaje de granjas, lo que indica una mayor capacidad de detección de este patógeno. Por último, hay que señalar que, al ser empleada sobre una muestra de leche de tanque, esta técnica también tiene la ventaja de que permite monitorizar las explotaciones de una manera sencilla, lo que permite conocer si la explotación es o no positiva y su evolución en el tiempo. Esta ventaja ya ha



La qPCR es una técnica mucho más rápida que el cultivo microbiológico en lo que se refiere a la obtención de resultados

► EN FUTUROS ESTUDIOS CONVENDRÍA CONOCER LA PREVALENCIA EXACTA DE LA ENFERMEDAD EN LAS EXPLOTACIONES, YA QUE DE ESTA MANERA SE PODRÍA ANALIZAR LA RELACIÓN ENTRE ESTA Y EL VALOR DE CT OBTENIDO PARA DETECTAR *Prototheca spp.*

sido demostrada para la qPCR en otros agentes patógenos causantes de mamitis; por ejemplo, Syring *et al.* (2012) demostraron la eficacia de la qPCR para conocer el estado de infección de un rebaño por *Staphylococcus aureus* y la monitorización de dicha infección en el tiempo. De manera similar, Soltau *et al.* (2017) llegaron a la conclusión de que la qPCR realizada sobre la leche de tanque permitía la detección de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*, y, por lo tanto, era una muy buena herramienta para monitorizar explotaciones si se usa con frecuencia y en repetidas muestras.

De esta manera, se podría implementar el análisis mediante qPCR de *Prototheca spp.* sobre las propias muestras de leche de tanque que se recogen periódicamente en las ganaderías para la realización de los análisis oficiales de RCS y bacteriología de tanque. En general, estas muestras se recogen utilizando un agente conservante (normalmente azidiol), por lo que no pueden ser utilizadas para cultivo microbiológico; sin embargo, la presencia de este compuesto no genera ningún tipo de problema para la realización de la qPCR. De este modo, la monitorización de ciertos patógenos como *Prototheca spp.* en las ganaderías se podría hacer de un modo mucho más económico, ya que, por un lado, solo sería necesaria una muestra de leche de tanque para saber si está presente el patógeno en la explotación y así evitar tener que analizar las vacas individualmente, y, por otro, se podrían aprovechar las muestras de leche de tanque que llegan de ma-

nera rutinaria al laboratorio, evitando tener que realizar un muestreo específico y el correspondiente desplazamiento a la granja.

A pesar de las ventajas, la técnica de qPCR también presenta ciertos inconvenientes. Entre ellos, uno de los principales es que no permite valorar la viabilidad del microorganismo detectado, a diferencia del cultivo, donde solamente crecerán aquellos microorganismos viables.

No obstante, este inconveniente puede solucionarse con la adición de algunas sustancias a la muestra problema; por ejemplo, algunos estudios sugieren que en futuras investigaciones se añadan ciertos productos como el bromuro de etidio, que impide que la polimerasa utilizada en la PCR pueda amplificar el ADN de microorganismos muertos, lo que permite que la prueba detecte solo las células viables y realmente se demuestre que existe una infección activa de dicho patógeno en la explotación (Nocker *et al.*, 2006; Taskin *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de *Prototheca spp.*, debido a ciertas características como la ausencia de un tratamiento eficaz y su amplia y fácil distribución por el ambiente de las explotaciones lecheras, el mero hecho de detectar ADN de este patógeno en tanque de leche, aunque se desconozca si pertenecía a una célula viable o no, debería ser considerado como un riesgo suficiente para empezar a tomar medidas de control estrictas, tal como se mencionó anteriormente.

LIMITACIONES DE ESTE TRABAJO

Por último, para terminar este trabajo de fin de grado habría que señalar algunas de las limitaciones que presenta el estudio experimen-

tal planteado. En primer lugar, tal y como se ha señalado anteriormente, la prevalencia de infección existente en las explotaciones es un factor que influye en la capacidad de detección de la qPCR; sin embargo, en este trabajo no ha podido evaluarse este efecto, ya que se desconocía la prevalencia exacta de infección por *Prototheca spp.* en las granjas incluidas.

Esto se debe a que, aunque el Ligal fue capaz de localizar granjas en las que había al menos un animal infectado, se carecía de información del resto de los animales de la granja, por lo que la prevalencia de infección entre unas granjas y otras posiblemente sea bastante variable. Por ese motivo, en futuros estudios convendría conocer la prevalencia exacta de la enfermedad en las explotaciones, ya que de esta manera se podría analizar la relación entre esta y el valor de Ct obtenido para detectar *Prototheca spp.* durante la qPCR. Esto permitiría establecer cuál es la prevalencia mínima de infección en las explotaciones que podría ser detectada mediante el empleo de qPCR sobre muestras de leche de tanque.

Por otro lado, a pesar de haberse observado una mayor sensibilidad de la qPCR en relación al cultivo microbiológico sobre muestras de leche de tanque, tal como se ha explicado anteriormente, se produjeron resultados falsos negativos y dudosos en explotaciones teóricamente positivas; por este motivo, sería muy interesante estudiar cómo se podría mejorar esta técnica. Una de las posibilidades que se podrían explorar sería intentar aumentar la concentración del patógeno en la muestra de leche de tanque previamente a la extracción de ADN, lo que sin duda aumentaría su sensibilidad analítica. Por ejemplo, en la industria alimentaria se han empleado con éxito algunos métodos para concentrar los patógenos en las muestras de leche y separarlos así de la matriz, como por ejemplo la centrifugación, la filtración y la separación inmunomagnética (Mortari y Lorenzelli, 2014).

La centrifugación es uno de los métodos que más se ha empleado para la preparación y concentración de patógenos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella spp.* ►

► LA TÉCNICA DE QPCR EMPLEADA ES UNA TÉCNICA VÁLIDA PARA DETECTAR *PROTOTHECA SPP.* EN EL TANQUE DE LECHE DE LAS EXPLOTACIONES GANADERAS, Y ES, ADEMÁS, UNA ALTERNATIVA ECONÓMICA



en muestras tanto de leche como de productos lácteos, pudiendo ser utilizadas posteriormente en otras aplicaciones como la PCR (Stevens y Jaykus, 2004; Paul *et al.*, 2013; Brewster y Paul, 2016).

La filtración es otra técnica que también se ha utilizado en muestras de leche; por ejemplo, Wu y Kado (2004) utilizaron filtros con poro de 0,45 µm para recuperar eficazmente células de *Escherichia coli*.

En el caso de *Prototheca spp.*, debido al mayor tamaño de esta (7-30 µm), se podrían emplear incluso filtros con mayor tamaño de poro, lo que permitiría recuperar las células del alga de una manera más limpia puesto que el resto de materiales más pequeños presentes en la muestra como bacterias escaparían a través del poro del filtro.

Por último, el método de separación inmunomagnética también ha sido empleado para concentrar diferentes agentes patógenos presentes en muestras de leche. A grandes rasgos, este método se basa en añadir a la muestra problema unas pequeñas esferas magnéticas que están recubiertas con anticuerpos específicos del microorganismo de interés que se quiere recuperar, posteriormente se incuban para facilitar la unión antígeno-anticuerpo y, finalmente, se separan del resto de la matriz utilizando un imán (Wang *et al.*, 2020). De entre las tres alternativas propuestas para mejorar la concentración de microorganismos en leche, esta es la más específica de todas, ya que utiliza anticuerpos específicos frente al agente que se intenta detectar;

seguramente este sea el motivo por el cual esta técnica ha presentado muy buenos valores de recuperación de microorganismos a partir de muestras de leche, como por ejemplo *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2022), *Escherichia coli* (Lim *et al.*, 2016) o *Salmonella spp.* (Dai *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se han deducido las siguientes conclusiones:

- La técnica de qPCR empleada es una técnica válida para detectar *Prototheca spp.* en el tanque de leche de las explotaciones ganaderas, y es, además, una alternativa económica.
- Según los resultados obtenidos, la qPCR es más sensible que el cultivo microbiológico convencional para analizar muestras de leche del tanque, dado que todas las muestras cultivadas dieron falsos negativos a diferencia de la qPCR que detectó hasta un 68 % de las muestras.
- La existencia de muestras negativas y dudosas a la qPCR sugieren que la capacidad de detección de esta técnica depende de la prevalencia de infección existente en las explotaciones.
- Teniendo en cuenta el porcentaje descrito de falsos negativos en la qPCR, convendría para futuros estudios intentar mejorar la técnica utilizando métodos de concentración de microorganismos. ■

NOTA FINAL DEL AUTOR

Este artículo es la segunda (y última) parte de mi trabajo de investigación Fin de Grado, 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 mamitis, y comparar los resultados obtenidos mediante esta técnica con los obtenidos mediante el cultivo microbiológico tradicional.

La primera parte se puede consultar en Vaca Pinta 45, mayo 2024, con el título “Evaluación de la qPCR para la detección de *Prototheca spp.* en leche de tanque (I)”: <https://vacapinta.com/es/articulos/evaluacion-de-la-qpcr-para-la-deteccion-de-prototh.html>

Este estudio se realizó gracias a la colaboración entre el grupo Invesaga y el Laboratorio Interprofesional Gallego de la Leche (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 procesamiento de muestras para la PCR, y a María Belén Pombo Río (Ligal), que se encargó de identificar las granjas positivas y recoger las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

Las personas interesadas en la bibliografía de este artículo pueden solicitarla en este correo electrónico: manuotero73@gmail.com

¿Qué es SHE DIP?

SHE DIP es un sellador de barrera en base a **ácido láctico** con extractos de cítricos, man-
teca de karité, tensoactivos no iónicos, sus-
tancias hidratantes y filmógenas.

SHE DIP protege el pezón durante el período
de mayor riesgo de infecciones intramama-
rias, **después del ordeño**. Además **mejora la
condición de la piel y la flexibilidad del
esfínter**, que es la protección natural del
pezón.



Presentación envases de:

10 kg, 20 kg, 200 kg

¿Cómo se aplica?

SHE DIP se aplica **por inmersión después del ordeño** y permite **eliminar posibles restos de leche** que quedan **adheridos** a la piel del pezón, un excelente medio de multiplicación para los microorganismos que pueden colo-
nizar el canal del pezón y causar infecciones intramamarias por vía ascendente.

SHE DIP posee **propiedades dermoprotecto-
ras debido al contenido en extractos vege-
tales** de cítricos, sorbitol, alantoína, glicerina que nos ayudan a hidratar, suavizar, regene-
rar y cuidar la piel del pezón que se ha de
enfrentar a posibles desafíos ambientales y
climáticos en el período entre ordeños.



¿Por qué elegirlo?

FORTALEZAS

- » Tiene un **olor muy agradable**.
- » Contiene un **repelente natural de insectos** para su empleo en épocas de incidencia.
- » Contiene **agentes dermoprotectores e hidratantes**.
- » **Protege el pezón en períodos de máxima exposición a infecciones**.
- » **Mejora la condición de la piel y la flexibilidad del esfínter**.
- » Gracias a su método de aplicación, **elimina el resto de leche que queda adherido a la piel**, minimizando el riesgo de infecciones intramamarias.



SHE DIP es el complemento ideal para su programa de calidad de leche y sanidad de la ubre.



DELEGACIONES

MILLADOIRO Rúa Castiñeiras, nave 122-A2, 15895 Ames (A Coruña) Tel. 981 94 17 94	SANTA COMBA Avda. Brasil, 49. Santa Comba (A Coruña) Tel. 981 88 09 72	TEIXEIRO Avda de Lugo, 40. Teixeiro-Curtis (A Coruña) Tel. 981 78 94 93
LALÍN Rúa do Ambulatorio C, 50 bajo, Lalín (Pontevedra) Tel. 986 79 23 73	MUIMENTA Polígono Ind. Par. I-4, Muimenta Cospoito (Lugo) Tel. 982 52 81 14	CARBALLO Avda. Finisterre, 77, Carballo (A Coruña) Tel. 981 70 14 44



XESGA

P.I. Milladoiro nave 112-A2
Ames 15895
A Coruña (España)
Tlf. 981 941 794 / Móv. 609 218 992
email: xesga@xesga.net

Shedip®
SELLADOR DE BARRERA EN BASE A ÁCIDO LÁCTICO Y EXTRACTOS VEGETALES

