



Avaliación da qPCR para a detección de *Prototheca spp.* no leite de tanque (II)

Neste estudo presento a segunda (e última) parte do meu traballo Fin de Grao, na cal se describen o tratamento e control desta enfermidade, o material e os métodos utilizados, así como os resultados, as limitacións e as conclusións finais desta investigación.

Manuel Otero Coto

Grao de Veterinaria

Investigación en Sanidade Animal de Galicia (Invesaga)

Titor: Alberto Prieto Lago (Universidade de Santiago de Compostela)

TRATAMENTO E CONTROL

De maneira xeral pode dicirse que este xénero de algas non responde o tratamento cos antimicrobianos máis comunmente empregados fronte ás mamites, deixando como única opción e método de control máis eficaz no gando bovino a eliminación dos animais infectados (Kirk, 1991; Melville *et al.*, 1999). Aínda que existen algúns estudos *in vitro* que demostraron certa eficacia dalgúns antibióticos

e antifúnxicos contra cepas de *Prototheca spp.*, por exemplo a anfotericina B e a nistatina (Buzzini *et al.*, 2004; Bexiga *et al.*, 2003), os tratamentos aplicados *in vivo* non ofreceron resultado. Doutra banda, a capacidade e eficacia como alguicidas dalgúns produtos naturais tamén foi demostrada en estudos *in vitro*; por exemplo, algúns antimicrobianos de orixe natural, como o extracto de sementes de froitas cítricas, o extracto etanólico de *Senecio*

desiderabilis ou óleos esenciais dalgúns plantas (Brito e Veiga, 1997; Deuschle *et al.*, 2007; Tortorano *et al.*, 2008) poden ser unha alternativa eficaz e económica a estudar para futuros tratamentos.

En canto ao emprego de desinfectantes, existen algúns compostos químicos como o sulfato de cobre, a clorhexidina e o nitrato de prata que poden afectar o microorganismo (Melville *et al.*, 2003); desta maneira, poderíase utilizar clorhexidina no paso de *predipping*, que se realiza previamente ao muxido para evitar contaminar o sistema.



► UNHA VEZ IDENTIFICADAS AS VACAS QUE PRESENTAN A INFECCIÓN, DÉBENSE SEPARAR DO RABAÑO E MUXILAS EN ÚLTIMO LUGAR, ASÍ COMO FAVORECER UN DESVELLE PREMATURO DESTES ANIMAIS

Tamén se suxire levar a cabo un paso de *postdipping* cos mesmos anti-sépticos para eliminar organismos da pel e do orificio aínda aberto pola extracción de leite (Salerno *et al.*, 2010). No caso de cuarteiróns xa afectados, pódese utilizar nitrato de prata para a cauterización e peche completo do teto. Hai que ter en conta que a presenza de humidade ou material orgánico como as feces pode diminuír a efectividade dos desinfectantes utilizados; por tanto, o teto debe estar limpo e seco previamente.

Debido á ausencia dun tratamento eficaz *in vivo* contra a mamite por *Prototheca spp.*, débense levar a cabo estritas medidas de hixiene para previr e controlar a enfermidade. No caso de que haxa un brote por *Prototheca spp.*, o primeiro que se debe ter en conta sería identificar os animais afectados e portadores que poidan actuar como reservorio e estender a enfermidade ao resto do rabaño. Unha vez identificadas as vacas que presentan a infección, débense separar do rabaño e muxilas en último lugar, así como favorecer un desvelle prematuro destes animais.

Ademais da segregación e eliminación dos animais infectados, para

o control deste patóxeno cómpre ter en conta que existen outras fontes de contaminación ambiental ademais dos animais infectados. Por exemplo, dada a súa capacidade para poder sobrevivir na auga, esta debería ser tratada; no entanto, hai que lembrar a capacidade da alga para producir *biofilm* e que os tratamentos convencionais para a súa eliminación como a cloración non son efectivos (Davies, 2003). En relación con isto, un estudo de Gonçalves *et al.* (2015) que avaliaba a capacidade de formar *biofilms* de *P. zopfii* illada de casos subclínicos de mamite bovina, observou que o ácido peracético era máis efectivo que o hipoclorito de sodio ou o iodo, pero os tres posuían certo efecto contra esta alga.

Outra medida que pode ser interesante é administrar a ración dos animais xusto á saída do muxido. Dado que se trata dunha mamite principalmente ambiental que se adquire por vía ascendente, o feito de non alimentar os animais despois do muxido pode provocar que as vacas se tomben en chans ou camas contaminadas co esfínter do teto aínda aberto, favorecendo a contaminación do canal e a posterior infección da glándula mamaria (Costa *et al.*, 1996b). Así, ofrecer un bo alimento palatable inmediatamente tras o muxido pode evitar que se tomben inmediatamente, dando máis tempo desta forma a que se peche o canal do teto (Bueno *et al.*, 2006).

O tempo de exposición do canal do teto a un ambiente con posible presenza de *Prototheca spp.* debe reducirse ao máximo, prestándose atención a todas as instalacións da granxa e, especialmente, aos aloxamentos das vacas secas, ás xovencas e ás vacas en lactación, así como á sala de muxido.

Nestas áreas débese tentar manter unhas condicións de sequedade adecuadas eliminando toda a humidade posible, especialmente nos materiais das camas, debido á preferencia de *Prototheca spp.* polos ambientes húmidos (Jánosi *et al.*, 2001b; Lopes *et al.*, 2008). Segundo algúns estudos, o tipo de cama ten un efecto significativo sobre o illamento *in vitro* de *Prototheca spp.* e este efecto asociouse cun maior crecemento a partir de materiais como o esterco, as serraduras e a area; pola contra,



Débeselles prestar atención a todas as instalacións da granxa, especialmente aloxamentos e sala de muxido



O tipo de cama ten un efecto significativo sobre o illamento *in vitro* de *Prototheca spp.*, asociado cun maior crecemento a partir de materiais coma o esterco, as serraduras e a area

as labras de abeto secadas en forno poden chegar a inhibir o seu crecemento (Adhikari *et al.*, 2013).

Outras medidas máis xerais para o control incluírían tamén unha boa alimentación.

A dieta é un factor que pode influenciar a resistencia das vacas á mamite; de feito, algúns estudos reflectiron a importancia da vitamina E e o selenio para aumentar o nivel inmunitario dos animais fronte a esta patoloxía (Erskine, 1993; Smith *et al.*, 1997). Aínda que non hai unha correlación directa da nutrición coa prototecose bovina, a dieta si que presenta certa influencia noutros axentes de mamite bovina, o que pode axudar a que os animais sexan menos susceptibles a unha infección por *Prototheca spp.*

Por último, e debido ao carácter subclínico da enfermidade, é importante realizar unha boa monitorización do leite de todos os animais da explotación mediante a avaliación dos resultados do control leiteiro ou, na súa falta, a realización periódica de probas de diagnóstico como o CMT (California Mastitis Test) (Ruegg, 2017), o que nos permitirá ►



A presenza de humidade ou material orgánico pode diminuír a efectividade dos desinfectantes utilizados; polo tanto, o teto debe estar limpo e seco antes da súa aplicación

► AS FERRAMENTAS MOLECULARES COMO A PCR PODEN SER UNHA BOA ALTERNATIVA PARA A MONITORIZACIÓN DO TOTAL DE ANIMAIS EN PRODUCCIÓN MEDIANTE A ANÁLISE DE MOSTRAS DE LEITE DE TANQUE

identificar aqueles animais con cuarteiróns positivos e así evitar ou reducir a posibilidade de contaminación do medio e, por tanto, o contaxio a outros animais. De maneira similar, sempre que se adquiran animais, estes deberían ou ben comprarse a rabaños con historial negativo demostrable ou ben realizarse análises individuais que permitan identificar se se trata dun animal portador antes de introduci-lo no rabaño (Bueno *et al.*, 2006). Neste sentido, as ferramentas moleculares como a PCR poden ser unha boa alternativa para a monitorización do total de animais en produción mediante a análise de mostras de leite de tanque.

OBXECTIVOS

Con todo o exposto na revisión bibliográfica, e en especial coa problemática derivada da presenza de animais positivos a *Prototheca spp.* nas explotacións leiteiras e a imposibilidade do seu tratamento, neste traballo experimental expuxéronse os seguintes obxectivos:

- 1º. Avaliar a capacidade dunha técnica comercial de qPCR (reacción en cadea da polimerasa cuantitativa) para a detección de *Prototheca spp.* a partir de mostras de leite de tanque de explotacións positivas.
- 2º. Comparar os resultados obtidos mediante qPCR para mostras de leite de tanque con aqueles obtidos mediante o cultivo microbiolóxico convencional das devanditas mostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Toma de mostras

Este traballo realizouse en colaboración co Laboratorio Interprofesional Galego de Análise de Leite (Ligal); este

laboratorio é o encargado de realizar todas as análises do programa de Control Oficial de Rendemento Leiteiro que se realiza en Galicia e, ademais, préstanlles servizo de diagnóstico de mamite ás ganderías.

De maneira resumida, para o diagnóstico de mamite realízase un cultivo no medio agar-sangue a partir do leite do cuarteirón ou cuarteiróns afectados, e, no caso de obter colonias illadas, procédese á súa identificación mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Durante o período de setembro de 2021 a xuño de 2022, solicitóuselle ao Ligal que cada vez que obtivesen un illamento positivo de *Prototheca spp.* nas mostras de leite de cuarteiróns individuais que reciben rutinariamente para diagnóstico, se puxesen en contacto coa devandita gandería ou co seu veterinario responsable, solicitando unha mostra de leite do tanque da devandita explotación.

Unha vez obtida a mostra de tanque, realizouse o seu cultivo no Ligal no medio agar-sangue, do mesmo xeito que coas mostras individuais e, a continuación, procedeuse a gardala en conxelación a -20 °C. Deste xeito, o Ligal recolleu 49 mostras de tanque de diferentes explotacións de toda Galicia, que cumprían a característica de que en todas elas se detectou polo menos unha vaca positiva a *Prototheca spp.* mediante cultivo microbiolóxico de leite de cuarteirón. Posteriormente, as mostras de leite de tanque foron enviadas á Facultade de Veterinaria de Lugo para realizar a súa análise mediante qPCR.

Na figura 2 pode observarse o número de explotacións incluídas de cada provincia; A Coruña e Lugo son as máis representadas.

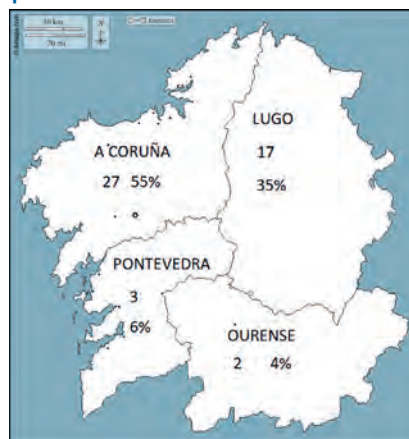


A dieta é un factor que pode influenciar a resistencia das vacas á mamite



É importante realizar unha boa monitorización do leite de todos os animais mediante a avaliación dos resultados do control leiteiro ou a realización periódica de probas de diagnóstico como o CMT

Figura 2. Número e porcentaxe de explotacións incluídas no estudo por cada provincia de Galicia



Extracción de ADN

Unha vez coas mostras no laboratorio, o primeiro paso foi realizar a extracción e purificación do ADN presente en cada mostra.

Este paso é un dos máis críticos, xa que, se non obtemos un ADN en suficiente calidade e cantidade, é posible que a qPCR non funcione. ►►

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.

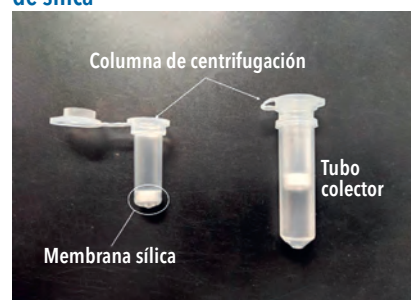
Desde hace más de 20 años, **trabajamos codo con codo** con veterinarios y ganaderos, protegiendo a millones de vacas y ovejas frente al virus BTV.

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



► UNHA VEZ OBTIDA A MOSTRA DE TANQUE, REALIZOUSE O SEU CULTIVO NO LIGAL NO MEDIO AGAR-SANGRE, DO MESMO XEITO QUE COAS MOSTRAS INDIVIDUAIS E, A CONTINUACIÓN, PROCEDEUSE A GARDALA EN CONXELACIÓN A -20 °

Figura 3. Tubo colector e columna de centrifugación, con detalle da membrana de sílica



Para isto utilizamos o kit comercial *high pure PCR template preparation KIT* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemaña) seguindo o seguinte protocolo:

1. Desconxelar a lisozima humana e a proteinasa K.
2. Homoxeneizar as mostras de leite de tanque nun axitador de tubos.
3. Aspirar con micropipeta un volume 200 µL de cada mostra de leite e introducir nun tubo Eppendorf estéril.
4. Engadir 14 µL de lisozima humana (50 mg/mL) a cada mostra de leite. Este reactivo axuda a descompoñer a parede celular das posibles bacterias e algas presentes.
5. Homoxeneizar durante 1 minuto no axitador de tubos *Eppendorf*.
6. Incubar as mostras homoxeneizadas durante 1 h a 37 °C cunha axitación de 500 revolucións por minuto.
7. Engadir 40 µL de proteinasa K desconxelada ás mostras e homoxeneizar no axitador durante 1 minuto. A proteinasa K é unha serina proteasa (encima) con ampla actividade de escisión para destruír proteínas en lisados celulares e así liberar ácidos nucleicos. Teñen a capacidade para inactivar tanto ADNasas (desoxirribonucleasa) como ARNasas (ribonucleasas).
8. Incubar durante 1 h a 55 °C cunha axitación de 500 revolucións por minuto.
9. Engadir 200 µL de *Binding Buffer*, que permite obter un pH e concentracións de sales adecuados para que o ADN se absorba

e se adhira posteriormente á membrana sílica da columna de centrifugación. Na figura 3 podemos observar a columna de centrifugación e a súa membrana sílica no interior dun tubo colector.

10. Homoxeneizar inmediatamente durante 1 minuto.
11. Incubar durante 10 minutos a 70 °C cunha axitación de 500 revolucións por minuto. Aproveitar este momento para prequeantar a solución de elución a tamén a 70 °C.
12. Engadir 100 µL de isopropanol. Desta maneira, o isopropanol precipita o ADN porque compite con este pola auga, deshidratándoo e levándoo ao fondo do tubo.
13. Homoxeneizar durante 1 minuto e centrifugar brevemente (aproximadamente 10 s) na microcentrifuga para que non quede ningún líquido nin na tapa nin nas paredes do tubo.
14. Colocar unha columna de centrifugación nun tubo colector e pipetear todo o contido de cada *Eppendorf* coas mostras á correspondente columna.
15. Centrifugar durante 1 minuto a 9300 revolucións por minuto.
16. Colocar a columna sobre un novo tubo colector e refugar o anterior.
17. Engadir 500 µL de Inhibitor Removal Buffer (primeiro lavado). Este tampón contribúe a eliminar as substancias non desexadas presentes na mostra como restos de membranas, graxas, proteínas etc.
18. Centrifugar durante 1 minuto a 9300 revolucións por minuto.

19. Colocar a columna sobre un novo tubo colector e desbotar o anterior.

20. Engadir 500 µL de *Wash Buffer* (segundo lavado).

21. Centrifugar 1 minuto a 9300 revolucións por minuto.

22. Engadir 500 µL de *Wash Buffer* (terceiro lavado).

23. Centrifugar 1 minuto a 9300 revolucións por minuto.

24. Baleirar o tubo colector e volver colocar a columna. Centrifugar 3 minutos a 10400 revolucións por minuto para conseguir un secado de membrana. Mediante este paso conseguimos que non queden restos das solucións de lavado na membrana da columna de centrifugación.

25. Colocar a columna sobre un novo tubo *Eppendorf* estéril e libre de nucleasas onde se almacenará o ADN ata a súa análise. Engadir na columna 100 µL de *Elution Buffer* (precalentado a 70 °C).

26. Deixar incubar 2 minutos e centrifugar 1 minuto a 9300 revolucións por minuto.

27. Almacenar o tubo *Eppendorf* co ADN a -20 °C.

PROTOCOLO DE QPCR

Unha vez obtido o ADN de cada mostra mediante o protocolo anterior, procedeuse á realización da qPCR para a detección de *Prototheca spp.* Para iso empregouse un kit comercial rápido de qPCR (EXOone® *Prototheca spp.* oneMix, EXOPOL, España), que inclúe, ademais, un control endóxeno (CE) que utiliza como diana unha rexión conservada do xene da proteína β-actina que está presente en todas as células de mamíferos.

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



As mostras foron analizadas nun termociclador de tempo real QuantStudio 5® (Applied Biosystems®, Estados Unidos), o cal se pode observar na figura 4. Na táboa 1 podemos ver unha descrición dos compoñentes fornecidos polo kit.

En primeiro lugar, é necesario hidratar o control positivo sintético que se fornece liofilizado co kit e que serve como control positivo externo da análise. O protocolo foi o seguinte:

1. Centrifugar brevemente o tubo do Control Positivo MAM4 e reconstituír con 250 µL de auga de grao molecular.
2. Deixar repousar o tubo 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar a resuspensión do liofilizado.
3. Homoxeneizar brevemente no axitador de tubos Eppendorf e centrifugar durante 10 s.

4. Almacenar o Control Positivo reconstituído a temperatura ≤ -18°C despois de utilizar.

5. A continuación, procedeuse a realizar a qPCR propiamente dita, para o que se seguiu o seguinte protocolo:

- a. Desconxelar o tubo oneMIX®, que contén todos os elementos necesarios para a detección tanto de *Prototheca spp.* como do control endógeno (polimerasa, primers, sondas etc.).
- b. Homoxeneizar brevemente o tubo oneMIX® no axitador de tubos Eppendorf e centrifugar durante 10 s.
- c. Cubrir o persoal de análise, incluíndo todas as mostras a testar e os controis positivo e negativo. Colocar nunha graddilla tantos tubos de 0,2 mL como mostras e controis se necesiten, seguindo a mesma distribución do persoal.
- d. Dispensar 15 µL de oneMIX® en cada tubo.
- e. Engadir 5 µL de mostra de ADN, Control Positivo ou Control Negativo (auga de grao molecular) ao seu tubo correspondente seguindo o persoal, pechándoos a continuación para evitar contaminacións entre tubos.
- f. Centrifugar os tubos a 1600 revolucións por minuto para evitar que queden pingas na tapa ou paredes do tubo.
- g. Introducir os tubos no termociclador e programar a análise utilizando o seu propio software.

O protocolo térmico empregado está resumido a táboa 2.

INTERPRETACIÓN DA QPCR

A presenza de *Prototheca spp.* en cada tubo detectouse mediante a amplificación do sinal de fluorescencia da canle FAM®, considerando positiva calquera mostra cun valor do limiar de amplificación (Ct: Cycle threshold) inferior a 38. Aquelas mostras con valores de Ct entre 38 e 42 (límite de ciclos da técnica) consideráronse como dúbidosos. Hai que destacar que o valor de Ct é inversamente proporcional á cantidade de ADN diana presente inicialmente na mostra, polo que valores máis baixos de Ct indican unha maior presenza de *Prototheca spp.* na mostra.

Naquelas mostras para as cales non houbo amplificación da canle FAM® que detectaba a presenza de *Prototheca spp.*, a CE incluído na análise permitiu avaliar o funcionamento da qPCR. Dado que a diana da CE é a β-actina, un xene que está presente en todas as células de mamíferos, todas as mostras de leite deben obter unha amplificación positiva para esta diana; pola contra, un resultado negativo para esta diana indicárianos que houbo algún problema ou erro co funcionamento da qPCR. A CE detectouse a través da canle VIC e o seu rango de Ct debe estar comprendido entre 22 e 37. Desta forma, se o Ct da CE dunha mostra negativa está dentro dese rango, considerárase que o resultado obtido para ela no canal de detección do patóxeno é válido, mentres que se non hai ningunha lectura isto pode indicar que a extracción de ADN non foi eficiente ou houbo algún problema durante a realización da qPCR (mal pipeteado, reactivos en mal estado etc.).

Na táboa 3 (páx. seg.) resúmense os criterios de interpretación do resultado da qPCR en función dos resultados de cada canle de fluorescencia e os controis positivo e negativo; mentres, na figura 5 (páx. seg.) poden verse catro posibles resultados que poden obterse para unha mostra.

RESULTADOS E DISCUSIÓN

Das 49 mostras de leite de tanque de explotacións leiteiras con animais positivos a *Prototheca spp.* que foran recollidas polo Ligal e analizadas individualmente mediante un cultivo microbiolóxico no medio agar-sangue, non se conseguiu illar colonias compatíbles con *Prototheca spp.* en ningunha delas. ►►

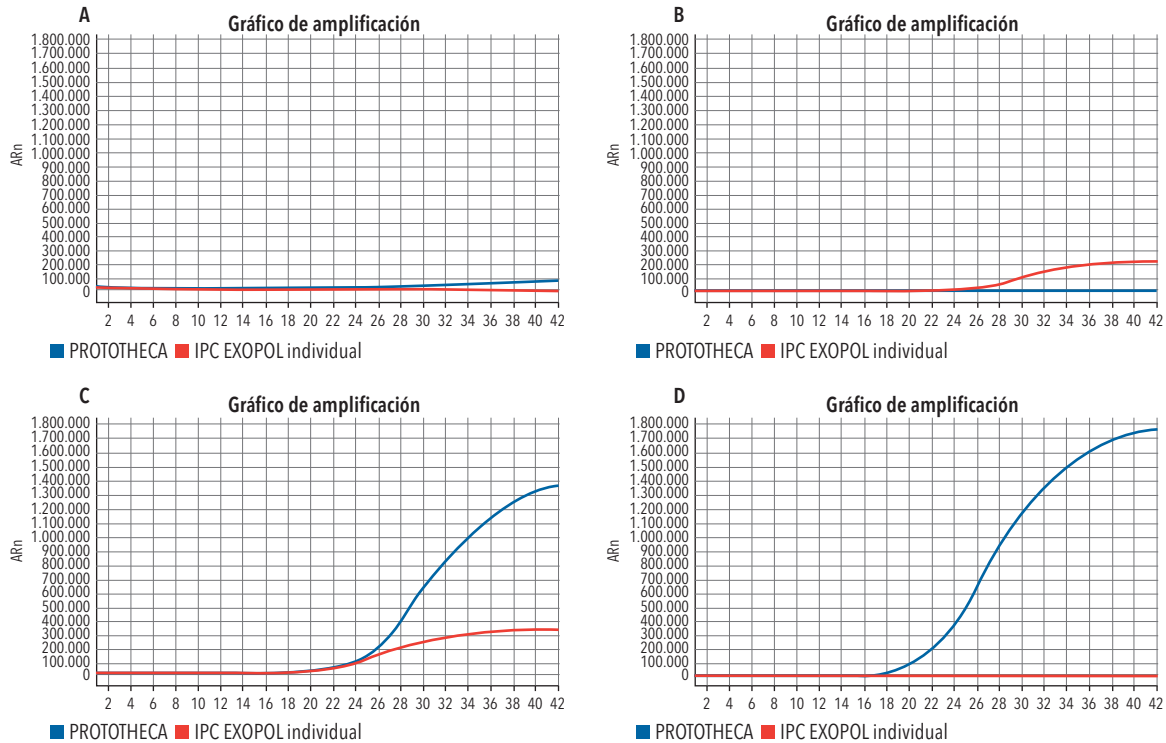
Táboa 1. Compoñentes empregados subministrados polo kit EXOone® *Prototheca spp.* oneMix (EXOPOL, España)

Nome	Descrición	Presentación
PRTH oneMIX® tube	Cada tubo contén tampón, enzimas dnTP, cebadores/sondas para o patóxeno e control de detección endógeno	2 tubos
Control positivo MAM4	Control sintético específico liofilizado	1 tubo
Auga	Auga de grao molecular	1 tubo (1 mL)

Táboa 2. Protocolo térmico empregado para a análise de *Prototheca spp.* Mediante qPCR

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

Figura 5. Posibles resultados da qPCR. Representábase a lectura de detección de *Prototheca spp.* en cor celeste (canal FAM®) e a lectura de detección de control endóxeno en vermello (canal VIC®)



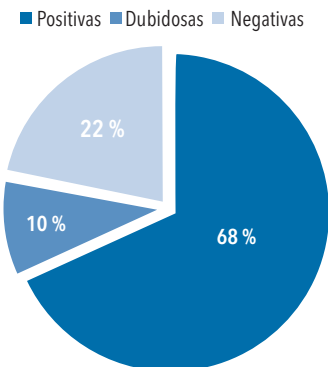
A: Mostra non válida: mostra e control endóxeno negativos
B: Mostra negativa: existe amplificación do canal que detecta o control endóxeno, pero non do canal que detecta o patóxeno
C: Mostra positiva: existe amplificación de ambos os canais
D: Mostra positiva: existe amplificación do canal que detecta o patóxeno, pero non do canal que detecta o control endóxeno. Este resultado pode producirse naquelas ocasións nas que a presenza do patóxeno é tan elevada que consome todos os recursos da qPCR, impedindo a amplificación do control endóxeno

En cambio, a análise de qPCR realizada sobre as mesmas mostras si obtivo resultados positivos nun gran número delas, e permitiu detectar ADN de *Prototheca spp.* nas mostras de leite de tanque do 68 % das explotacións (33/49 explotacións).
Para o resto das explotacións, en cinco das mostras de leite de tanque (10 %) obtívose un resultado dubidoso,

mentres que nos 11 restantes (22 %) se obtivo un resultado claramente negativo (figura 6).
Na táboa 4 poden verse os valores de Ct máximo e mínimo, así como a media obtida para cada categoría de resultado.
Estes resultados parecen indicar que a qPCR realizada sobre mostras de leite de tanque de explotacións

con infección coñecida por *Prototheca spp.* é unha técnica cunha maior sensibilidade analítica que o cultivo microbiolóxico convencional, dado que non se conseguiu illar colonias de *Prototheca spp.* en ningunha das mostras de leite de tanque analizadas.
Aínda que o cultivo de *Prototheca spp.* a partir de leite de tanque foi descrito e empregado mesmo nalgún ➡

Figura 6. Porcentaxe de detección de *Prototheca spp.* Mediante qPCR nas mostras de leite de tanque recollidas neste estudo



Táboa 3. Criterios de interpretación dos resultados obtidos na qPCR

Mostra	CE da mostra	Control Positivo	Control Negativo	Resultado
+	Non considerar	+	-	Válido
-	+	+	-	Válido
-	-	+	-	Non válido
+/-	+/-	-	-	Non válido
+/-	+/-	+	+	Non válido

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

Táboa 4. Número de mostras positivas, negativas e dubidosas xunto cos valores Ct máximos, mínimos e media obtidos por cada categoría

Resultado	Número de mostras	Ct medio	Ct mínimo	Ct máximo
Positivos	33	32,75	28,24	37,72
Dubidosos	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**

► O VALOR DE CT É INVERSAMENTE PROPORCIONAL Á CANTIDADE DE ADN DIANA PRESENTE INICIALMENTE NA MOSTRA, POLO QUE VALORES MÁIS BAIXOS DE CT INDICAN UNHA MAIOR PRESENZA DE *PROTOTHECA SPP.* NA MOSTRA

estudo recente con ata un 0,5 % de detección de tanques positivos (Toyotome *et al.*, 2022), a maioría das publicacións atopadas realizan esta análise mediante PCR e obteñen porcentaxes de detección moi superiores (6-11 %), o que suxire que as técnicas moleculares presentan en principio unha maior sensibilidade analítica que os métodos microbiolóxicos convencionais baseados no cultivo (Bauman *et al.*, 2018; Zecconi *et al.*, 2020).

É posible que estas diferenzas se deban tamén a que os estudos mencionados se realizaron en países diferentes, pero, tendo en conta que *Prototheca spp.* é un microorganismo de orixe ambiental e relacionada principalmente coas fontes de auga, non parece que as distintas rexións xeográficas sexan a única causa que xustifique estas diferenzas.

O feito de que neste traballo non se lograra o illamento de *Prototheca spp.* en ningunha mostra podería estar seguramente relacionado cunha maior sensibilidade da técnica de PCR, pero é probable que existan outros factores que influísen nestes resultados. Un dos factores con maior influencia é posiblemente a prevalencia deste patóxeno nas granxas, de tal maneira que naquelas explotacións con maior número de animais infectados é máis probable que o cultivo microbiolóxico a partir de leite de tanque resulte positivo; isto pode verse tamén nun traballo realizado por Ricchi *et al.* (2013), onde nunha explotación con prevalencia do 4,8 % a *Prototheca blaschkeae* só o 33 % das mostras de leite de tanque cultivadas obtiveron un illamento positivo.

Outra posible razón para a inhibición do crecemento de *Prototheca spp.* pode ser a presenza no leite de certas substancias con capacidade antimicrobiana, como son a lactoferrina, lisozima e lactoperoxidasa, entre outros, o que, unido a unha baixa carga do microorganismo, pode provocar que se produzan ausencias de crecemento (Rainard e Riollet, 2006).

O efecto da prevalencia de *Prototheca spp.* a nivel de rabaño é seguramente tamén o responsable da aparición de falsos negativos na qPCR no noso estudo, xa que, aínda que todas as explotacións incluídas presentasen polo menos un animal infectado por *Prototheca spp.*, ata un 22 % das mostras analizadas mediante qPCR resultaron negativas, o que suxire que a cantidade de *Prototheca spp.* presente na mostra de leite de tanque era máis baixa que a sensibilidade analítica da qPCR. Este efecto da prevalencia sobre a capacidade de detección das técnicas moleculares pode observarse tamén en traballos realizados con outros microorganismos causantes de mamites, como é o caso de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (Boss *et al.*, 2011; Mahmmod *et al.*, 2013).

En relación cos resultados dubidosos (10 % neste estudo), hai que comentar que deberían interpretarse polo menos coma un posible risco e, daquela, deberían tomarse medidas como a monitorización continuada da explotación, sobre todo tendo en conta as implicacións que supón para as granxas a existencia de animais infectados por esta alga.

O desenvolvemento de métodos analíticos que posibiliten a detección deste patóxeno no tanque de leite supón un avance, xa que facilitaría realizar un mellor control da enfermidade e reducir en parte os grandes custos económicos que provoca a presenza deste tipo de mamites nas explotacións gandeiras, tanto polo sacrificio de vacas afectadas coma polo aumento de células somáticas no tanque de leite e custos veterinarios asociados. Coma principais vantaxes da qPCR, pódese sinalar que é unha técnica moito máis rápida que o cultivo microbiolóxico no que se refire á obtención de resultados e, polo tanto, axiliza a toma de decisións en granxa.

De maneira xeral, pódese dicir que para que se consigan illar colonias

de *Prototheca spp.* nun medio de cultivo e confirmar o illamento necesítanse entre 3 e 5 días (Krukowski *et al.*, 2013; Onozaki *et al.*, 2013), mentres que para a PCR non se necesitan normalmente máis de 24 h.

Doutra banda, como observamos, o cultivo non conseguiu illar ningunha colonia do tanque de leite, xerando por tanto falsos negativos en explotacións onde realmente si había casos de mamite por *Prototheca spp.*; con todo, a qPCR si conseguiu detectar o patóxeno nunha importante porcentaxe de granxas, o que indica unha maior capacidade de detección deste patóxeno. Por último, hai que sinalar que, ao ser empregada sobre unha mostra de leite de tanque, esta técnica tamén ten a vantaxe de que permite monitorizar as explotacións dunha maneira sinxela, o que permite coñecer se a explotación é ou non positiva e a súa evolución no tempo. Esta vantaxe xa foi demostrada para a qPCR noutros axentes patóxenos causantes de mamite; por exemplo, Syring *et al.* (2012) demostraron a eficacia da qPCR para coñecer o estado de infección dun rabaño por *Staphylococcus aureus* e a monitorización da devandita infección no tempo. De maneira similar, Soltau *et al.* (2017) chegaron á conclusión de que a qPCR realizada sobre o leite de tanque permitía a detección de patóxenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, e, por tanto, era unha moi boa ferramenta para monitorizar explotacións se se usa con frecuencia e en repetidas mostras.

Desta maneira, poderíase implementar a análise mediante qPCR



A qPCR é unha técnica moito máis rápida ca o cultivo microbiolóxico no que se refire á obtención de resultados

► EN FUTUROS ESTUDOS CONVRÍA COÑECER A PREVALENCIA EXACTA DA ENFERMIDADE NAS EXPLOTACIÓNS, XA QUE DESTA MANEIRA SE PODERÍA ANALIZAR A RELACIÓN ENTRE ESTA E O VALOR DE CT OBTIDO PARA DETECTAR *PROTOTHECA SPP.*

de *Prototheca spp.* sobre as propias mostras de leite de tanque que se recollen periodicamente nas ganderías para realizar as análises oficiais de RCS e a bacterioloxía de tanque. En xeral, estas mostras recóllense utilizando un axente conservante (normalmente azidiol), polo que non poden ser utilizadas para cultivo microbiolóxico; con todo, a presenza deste composto non xera ningún tipo de problema para a realización da qPCR. Deste xeito, a monitorización de certos patóxenos como *Prototheca spp.* nas ganderías poderíase facer dun modo moito máis económico, xa que, por unha banda, só sería necesaria unha mostra de leite de tanque para saber se está presente o patóxeno na explotación e así evitar ter que analizar as vacas individualmente, e, pola outra, poderíanse aproveitar as mostras de leite de tanque que chegan de maneira rutineira ao laboratorio, evitando ter que realizar unha mostraxe específica e o correspondente desprazamento á granxa.

A pesar das vantaxes, a técnica de qPCR tamén presenta certos inconvenientes. Entre eles, un dos principais é que non permite valorar a viabilidade do microorganismo detectado, a diferenza do cultivo, onde soamente crecerán aqueles microorganismos viables.

Non obstante, este inconveniente pode solucionarse coa adición dalgunhas substancias a mostra problema; por exemplo, algúns estudos suxiren que en futuras investigacións se engadan certos produtos coma o bromuro de etidio, que impide que a polimerasa utilizada na PCR poida amplificar o ADN de microorganismos mortos, o que permite que a proba detecte só as células viables e realmente se demostre que existe

unha infección activa de devandito patóxeno na explotación (Nocker *et al.*, 2006; Taskin *et al.*, 2006). Con todo, no caso de *Prototheca spp.*, debido a certas características coma a ausencia dun tratamento eficaz e a súa ampla e fácil distribución polo ambiente das explotacións leiteiras, o mero feito de detectar ADN deste patóxeno en tanque de leite, aínda que se descoñeza se pertencía a unha célula viable ou non, debería ser considerado coma un risco suficiente para empezar a tomar medidas de control estritas, tal e como se mencionou anteriormente.

LIMITACIÓNS DESTE TRABALLO

Por último, para rematar este traballo de fin de grao habería que sinalar algunhas das limitacións que presenta o estudo experimental exposto. En primeiro lugar, tal e como se sinalou anteriormente, a prevalencia de infección existente nas explotacións é un factor que inflúe na capacidade de detección da qPCR; con todo, neste traballo non puido avaliarse este efecto, xa que se descoñecía a prevalencia exacta de infección por *Prototheca spp.* nas granxas incluídas.

Isto débese a que, aínda que o Ligo foi capaz de localizar granxas nas que había polo menos un animal infectado, se carecía de información do resto dos animais da granxa, polo que a prevalencia de infección entre unhas granxas e outras posiblemente sexa bastante variable. Por ese motivo, en futuros estudos conviría coñecer a prevalencia exacta da enfermidade nas explotacións, xa que desta maneira se podería analizar a relación entre esta e o valor de Ct obtido para detectar *Prototheca spp.* durante a qPCR. Isto permitiría establecer cal é a prevalencia mínima

de infección nas explotacións que podería ser detectada mediante o emprego de qPCR sobre mostras de leite de tanque.

Doutra banda, a pesar de observarse unha maior sensibilidade da qPCR en relación ao cultivo microbiolóxico sobre mostras de leite de tanque, tal como se explicou anteriormente, producíronse resultados falsos negativos e dubidosos en explotacións teoricamente positivas; por este motivo, sería moi interesante estudar como se podería mellorar esta técnica. Unha das posibilidades que se poderían explorar sería tentar aumentar a concentración do patóxeno na mostra de leite de tanque previamente á extracción de ADN, o que, sen dúbida, aumentaría a súa sensibilidade analítica. Por exemplo, na industria alimentaria empregáronse con éxito algúns métodos para concentrar os patóxenos nas mostras de leite e separalos así da matriz, por exemplo a centrifugación, a filtración e a separación inmunomagnética (Mortari e Lorenzelli, 2014).

A centrifugación é un dos métodos que máis se empregou para a preparación e concentración de patóxenos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella spp.* en mostras tanto de leite coma de produtos lácteos, podendo ser utilizadas posteriormente noutras aplicacións como a PCR (Stevens e Jaykus, 2004; Paul *et al.*, 2013; Brewster e Paul, 2016).

A filtración é outra técnica que tamén se utilizou en mostras de leite; por exemplo, Wu e Kado (2004) utilizaron filtros con poro de 0,45 µm para recuperar eficazmente células de *Escherichia coli*. No caso de *Prototheca spp.*, debido ao maior tamaño desta (7-30 µm), poderíanse empregar incluso filtros con maior tamaño de poro, o que permitiría recuperar as células da alga dunha maneira máis limpa posto que o resto de materiais máis pequenos presentes na mostra como bacterias escaparían a través do poro do filtro.

Por último, o método de separación inmunomagnética tamén foi empregado para concentrar diferentes axentes patóxenos presentes en mostras de leite. A grandes liñas, este método baséase en engadirle á mostra problema unhas pequenas esferas magnéticas que ►

► A TÉCNICA DE QPCR EMPREGADA É UNHA TÉCNICA VÁLIDA PARA DETECTAR *PROTOTHECA SPP.* NO TANQUE DE LEITE DAS EXPLOTACIÓNS GANDEIRAS, E É, ADEMAIS, UNHA ALTERNATIVA ECONÓMICA



están recubertas con anticorpos específicos do microorganismo de interese que se quere recuperar, posteriormente se incuban para facilitar a unión antíxeno-anticorpo e, finalmente, sepáranse do resto da matriz utilizando un imán (Wang *et al.*, 2020). De entre as tres alternativas propostas para mellorar a concentración de microorganismos en leite, esta é a máis específica de todas, xa que utiliza anticorpos específicos fronte ao axente que se tenta detectar; seguramente este sexa o motivo polo cal esta técnica presentou moi bos valores de recuperación de microorganismos a partir de mostras de leite, por exemplo *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2022), *Escherichia coli* (Lim *et al.*, 2016) ou *Salmonella spp.* (Dai *et al.*, 2015).

CONCLUSIÓNS

De acordo cos resultados obtidos neste traballo, deducíronse as seguintes conclusións:

- A técnica de qPCR empregada é unha técnica válida para detectar *Prototheca spp.* no tanque de leite das explotacións gandeiras, e é, ademais, unha alternativa económica.

- Segundo os resultados obtidos, a qPCR é máis sensible que o cultivo microbiolóxico convencional para analizar mostras de leite do tanque, dado que todas as mostras cultivadas deron falsos negativos a diferenza da qPCR que detectou ata un 68 % das mostras.
- A existencia de mostras negativas e dubidosas á qPCR suxiren que a capacidade de detección desta técnica depende da prevalencia de infección existente nas explotacións.
- Tendo en conta a porcentaxe descrita de falsos negativos na qPCR, conviría para futuros estudos tentar mellorar a técnica utilizando métodos de concentración de microorganismos. ■

NOTA FINAL DO AUTOR

Este artigo é a segunda (e última) parte do meu traballo de investigación Fin de Grao, cuxos obxectivos foron avaliar a capacidade da técnica de qPCR para detectar *Prototheca spp.* en mostras de leite de tanque, un dos axentes causantes da mamite,

e comparar os resultados obtidos mediante esta técnica cos obtidos mediante o cultivo microbiolóxico tradicional.

A primeira parte pódese consultar en *Vaca Pinta* 45, maio 2024, co título “Evaluación da qPCR para a detección de *Prototheca spp.* en leite de tanque (I)”: <https://vacapinta.com/é/articulos/evaluacion-de-a-qpcr-para-a-deteccion-de-prototh.html>

Este estudo realizouse grazas á colaboración entre o grupo Invesaga e o Laboratorio Interprofesional Galego do Leite (Ligal), equipos que recolleron as mostras empregadas e realizaron os cultivos microbiolóxicos desta.

AGRADECEMENTOS

A Gonzalo López Lorenzo (Invesaga), quen me axudou con todo o procesado de mostras para a PCR, e a María Belén Pombo Río (Ligal), que se encargou de identificar as granxas positivas e recoller as mostras.

BIBLIOGRAFÍA

As persoas interesadas na bibliografía deste artigo poden solicitala neste 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.



¿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
Cospeito (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

