



Tesis de grado en la Licenciatura en Ciencias Biológicas  
Profundización Biología Molecular

**“Comparación entre la identificación fenotípica y la utilización de técnicas moleculares como la Multiplex PCR para analizar cepas de *Streptococcus spp.* aislados de casos de Mastitis Bovina en Uruguay”**

**Br.Lucas Mastroianni**

Tutora: MSc. Dra. Laureana De Brun

Departamento Patobiología, Unidad Académica de Microbiología,  
Facultad de Veterinaria UdelaR

**Montevideo, Uruguay**

**2021**

# Agradecimientos

A la Facultad de Veterinaria por brindarme las instalaciones que me permitieron realizar el trabajo.

A toda la gente del Departamento Patobiología por la buena onda y hacer posible que este trabajo sea más ameno y sencillo.

A la Dra. Virginia Diana que colaboró en el aislamiento e identificación inicial de las cepas.

A Laureana por ser mi tutora y formar parte de todo este proceso final de la carrera.

Al tribunal por aceptar evaluar este trabajo final de grado.

A mis tíos y futuros colegas Leticia y Andrés por los consejos y comentarios desde el inicio. En especial a mi tía por acercarme a esta carrera.

A mis padres Marcello y Alicia y a mi hermana Sofía que a pesar de no entender mucho de que se trata todo esto siempre estuvieron ahí apoyando al firme desde el día uno.

A Diego y Adriana por el apoyo durante todos estos años.

A mis compañeros de facultad Diego, Agustín, Nicasio y Pía.

A Ana Paula por siempre estar presente en todo momento, por ser un pilar fundamental, por tener siempre la palabra adecuada en el momento indicado, y por su invaluable compañía y apoyo durante todos estos años.

# Índice

<b>Introducción</b> .....	1
Definición de Mastitis .....	2
Agentes etiológicos de Mastitis Bovina.....	2
Diagnóstico de laboratorio de Mastitis Bovina .....	4
Uso de antibióticos y la Mastitis .....	7
<b>Hipótesis de estudio</b> .....	8
<b>Objetivos generales</b> .....	8
<b>Objetivos específicos</b> .....	8
<b>Materiales y Métodos</b> .....	8
Recepción y procesamiento inicial de muestras .....	8
Extracción de ADN.....	9
Puesta a punto de la Multiplex PCR.....	10
Identificación de las cepas de <i>Streptococcus sp.</i> mediante Multiplex PCR.....	11
Determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica. ....	11
Determinación de los perfiles de Resistencia .....	12
Análisis de datos.....	12
<b>Resultados</b> .....	13
Control de viabilidad y confirmación de Género de las cepas .....	13
Extracción de ADN.....	13
Puesta a punto de la Multiplex PCR y evaluación de la sensibilidad y especificidad	13
Identificación genotípica de las cepas .....	18
Comparación entre resultados de identificación fenotípica y genotípica.....	19
Determinación fenotípica de los perfiles de resistencia a antibióticos.....	20
Análisis de datos.....	22
<b>Discusión</b> .....	23
<b>Conclusiones</b> .....	26
<b>Perspectivas</b> .....	27
<b>Difusión</b> .....	27
<b>Bibliografía</b> .....	28

## Índice de tablas y figuras

<b>Figura 1.</b> Tinción de Gram y cultivo de cepa de <i>Streptococcus</i> pura.....	3
<b>Figura 2.</b> Ejemplo de la técnica CAMP.....	4
<b>Figura 3.</b> Ejemplo del ensayo de hidrólisis de esculina.....	5
<b>Tabla 1.</b> Características de los cebadores .....	8
<b>Tabla 2.</b> Concentración y pureza de los extractos de ADN.....	10
<b>Figura 4.</b> Resultado de PCR de gradiente para <i>S.uberis</i> .....	11
<b>Figura 5.</b> Resultado de PCR de gradiente para <i>S. dysgalactiae</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> Resultado de PCR de gradiente para <i>S. agalactia</i> .....	12
<b>Figura 7.</b> Resultado de la puesta a punto de la multiplex PCR.....	13
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la especificidad de la técnica.....	13
<b>Figura 9.</b> Evaluación de la sensibilidad de la técnica.....	14
<b>Tabla 3.</b> Datos de la identificación fenotípica y genotípica.....	14
<b>Figura 10.</b> Comparativo de coincidencias entre la identificación fenotípica y genotípica.....	15
<b>Tabla 4.</b> Resultados generales de los antibiogramas.....	16
<b>Tabla 5.</b> Resultados por patógeno de los antibiogramas.....	17
<b>Figura 11.</b> Ejemplo de los antibiogramas realizados.....	21

## **Lista de abreviaciones**

ml - Mililitro

$\mu$ l - Microlitro

UFC/ml – Unidades formadoras de colonia por mililitro

cel/ml - Células por mililitro

U/ $\mu$ l – Unidades por microlitro

ng/ $\mu$ l – Nanogramos por microlitro

pb – Pares de bases

min – minutos

$\mu$ /M – Micro molar

DEPC - Detilpirocarbonato

## Resumen

La mastitis bovina es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria. En nuestro país y en el mundo genera grandes pérdidas en la producción lechera, puede ser causada por bacterias del género *Streptococcus* como son *S.uberis*, *S.agalactiae* y *S.dysgalactiae*. El correcto diagnóstico de esta problemática es de gran importancia ya que permite implementar un rápido y adecuado tratamiento de la enfermedad y así poder minimizar el gran impacto que genera en la producción. Por ello, se puso a punto una PCR multiplex para la rápida y confiable identificación de las tres especies de *Streptococcus* en simultáneo. Se analizaron 116 cepas de este género mediante multiplex PCR identificándose a nivel de especie y comparando el resultado con el obtenido a través pruebas fenotípicas convencionales (Prueba de CAMP, hidrólisis de esculina, hemólisis producida en agar sangre). Se observaron diferencias significativas entre la detección fenotípica y genotípica de las especies. Analizando únicamente aquellas cepas que pudieron identificarse a nivel fenotípico solo el 31% coincidió con el resultado arrojado por multiplex PCR. Si profundizamos en la análisis de las cepas que fueron identificadas como *S.uberis* solo el 25% coincidió con lo expresado a nivel fenotípico, en el caso de *S.dysgalactiae* el 40% y por último para *S.agalactiae* 33%. Por otro lado, en relación a las prevalencias de los patógenos en base a los datos de la identificación fenotípica, el predominante fue *S.dysgalactiae* seguido de *S.uberis* y por último *S.agalactiae*, sin embargo, cuando lo analizamos en base a la identificación genotípica el más prevalente pasa a ser *S.uberis* seguido de *S.dysgalactiae*. Con respecto al análisis de la resistencia evaluada a nivel fenotípico se encontró que, del total de las cepas analizadas, (N=94) se detectó una alta sensibilidad a penicilina (95.7%), una moderada sensibilidad a eritromicina (85,1%) y una baja sensibilidad a tetraciclina (67%). Si analizamos los perfiles de resistencia por microorganismos encontramos una alta sensibilidad a penicilina para las tres especies. En cuanto a la tetraciclina se encontró una baja susceptibilidad para *S.agalactiae* (33,3%) y *S.dysgalactiae* (34,4%), y una moderada sensibilidad para *S.uberis* (86.4%). Por último, para eritromicina se encontró una moderada sensibilidad para *S.dysgalactiae* (81,3%) y *S.uberis* (86,4%), además se reportó una alta sensibilidad para *S.agalactiae* (100%). En conclusión, fue posible poner a punto una técnica rápida y sensible como la multiplex PCR capaz de identificar de forma efectiva las tres especies de *Streptococcus* en estudio en comparación con los métodos convencionales. Debido a la gran sensibilidad y rapidez de la técnica podría ser considerada para implementar como método de rutina para el diagnóstico de mastitis bovina causada por *Streptococcus* en cualquier laboratorio. Además, se pudo determinar una aproximación de los perfiles de resistencia de las tres especies.

## Introducción

Uruguay es el mayor productor de leche en América Latina con un total de 230 Lts/persona. Se producen aproximadamente 2200 millones de litros de leche anuales, de los cuales el 30% se utiliza para consumo interno y el 70% restante se exporta a más de 60 mercados a nivel mundial teniendo como prioridad Argelia, Brasil y Rusia. Esto posiciona a Uruguay como el 7° mayor exportador de leche y derivados a nivel mundial. En el 2020, se exportaron 237mil toneladas de productos lácteos lo que se traduce en un valor de 692 millones de dólares, lo cual refleja la importancia de la producción láctea en nuestro país (INALE, 2020). De acuerdo con los datos publicados por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), Uruguay cuenta con 3423 establecimientos productores de Leche que ocupan 761mil hectáreas y que poseen 759 mil cabezas de ganado (Font *et al.*, 2020).

La leche de buena calidad se determina en base a diferentes parámetros como la seguridad, higiene y estado de salud de la ubre lo que determinará su aptitud para uso (Katz *et al.*, 2016). En el ámbito de la industria, el valor de la leche cruda se establece en base a la calidad higiénico-sanitaria de la misma. Para ello, se toman en cuenta distintos indicadores de calidad como: el recuento de células somáticas (RCS), el recuento bacteriano o en UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonia por mililitro) y la cantidad de proteína y grasa presente. En Uruguay el MGAP estableció a través de un decreto los límites RCS y de las UFC/ml para la comercialización de la leche. Esto se determinó de forma progresiva llegando a las 100.000 UFC/ml y 400.000 cel/ml, a su vez el decreto establece mecanismos de evaluación de la calidad de la leche a los productores. Aquellos que presenten una determinada cantidad de medidas por encima de los valores establecidos quedará en infracción, esto es de gran relevancia para la comercialización, ya que una buena calidad es fundamental para llegar y mantener el comercio (Decreto 359/013 art.6 MGAP, 2013), para la correcta elaboración de los subproductos lácteos y para la inocuidad de los alimentos.

Por otro lado, organismos que se encargan de la certificación de los productos alimenticios, como el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), establecen categorías de calidad de la leche en base al RCS (Santo & Ferreira, 2014). Establecer límites de RCS es de gran importancia ya que permite conocer el estado de la ubre y la aparición de alguna infección, así como también determinar su utilización o no para producir sus productos derivados (Vásquez *et al.*, 2014).

Finalmente, pero no menos importante, la mastitis bovina es una enfermedad que tiene un gran impacto tanto en el ámbito económico como sanitario y de bienestar animal. En

Uruguay se estimó que las pérdidas por mastitis para el año 2002, fueron de US\$21 millones (Giannechini, *et al.*, 2002). Si bien en la actualidad no hay estudios que determinen las pérdidas, se estima que al día de hoy serían mucho mayores (Com. Pers. Dr. Edgardo Giannechini).

### Definición de Mastitis

La Mastitis Bovina (MB), es una de las enfermedades más frecuentes en el ganado lechero y puede presentarse de dos formas, un que denominamos clínica y la otra subclínica. La forma clínica es de fácil diagnóstico, ya que por lo general el cuarto de la ubre afectada presenta una inflamación perceptible y la leche se observa visiblemente alterada por la presencia de coágulos o descamaciones. En cambio, en aquellas vacas que cursan la enfermedad en forma subclínica no presentan ninguna afección de la glándula mamaria ni de la leche a simple vista, pero a causa de la infección hay un incremento en la cantidad de leucocitos polimorfonucleares, lo que se refleja en un incremento del RCS (Smith, 2015). Por lo tanto, su diagnóstico se realiza mediante el RCS, valores por encima de las 200.000 cel/ml en vacas y 100.000 cel/ml en vaquillonas se consideran que el animal está cursando una infección (Bedolla *et al.*, 2007).

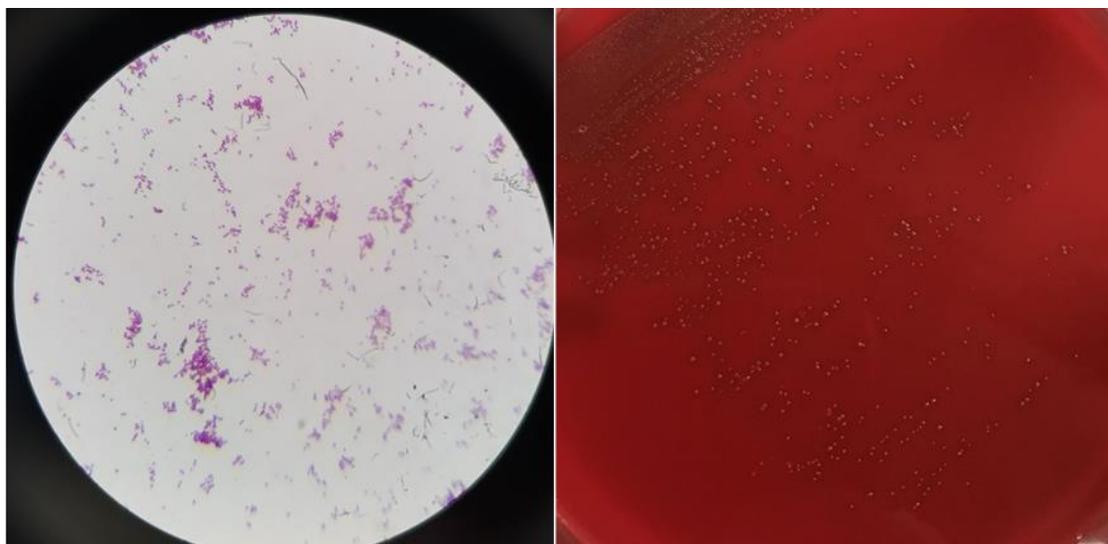
Los patógenos bacterianos que causan la MB pueden clasificarse como patógenos ambientales o contagiosos. Dentro de los ambientales tenemos a *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Streptococcus uberis*. Por otro lado, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* se identifican como contagiosos. Estos patógenos son los principales y más relevantes, sin embargo, existen otros como levaduras, hongos y algas. La clasificación utilizada se debe al sitio que utilizan como reservorio principal. En el caso de los patógenos ambientales, los podemos encontrar en el barro, excremento, agua, etc., mientras que los patógenos contagiosos los encontraremos dentro de la glándula mamaria del animal. Esta clasificación es de gran importancia ya que nos permite inferir en base al patógeno las vías de contagio (Smith, 2015). En el caso del *S. dysgalactiae* existen diversas opiniones sobre si debería catalogarse como patógeno ambiental o contagioso, debido a que hay evidencias de que puede persistir tanto en la glándula mamaria como en el ambiente (Smith, 2015).

### Agentes etiológicos de Mastitis Bovina

Los principales patógenos que provocan mastitis en Uruguay son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*), *Streptococcus uberis* (*S. uberis*),

*Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Trueperella pyogenes* en ese orden de prevalencia (Giannechini *et al.*, 2002). En la mayoría de los trabajos se destaca a *Staphylococcus aureus* como el patógeno más prevalente y de mayor virulencia (Smith, 2015.), sin embargo, entre los años 2013 y 2019 en el noreste de Polonia se realizó un estudio de prevalencia en vacas con mastitis clínica y subclínica dando como resultado a las bacterias del género *Streptococcus sp.* como las más prevalentes en los últimos 5 años (Kaczorek-Łukowska *et al.*, 2021).

Las bacterias del género *Streptococcus sp* son Gram positivas, catalasa y oxidasa negativo y al microscopio óptico se visualizan como microorganismos de forma esférica formando cadenas (Raemy *et al.*, 2013) (Figura 1).



**Figura 1.** En la figura de la izquierda se observa una imagen tomada de un microscopio óptico de la técnica de tinción de gram de bacterias del género *Streptococcus*. En la figura de la derecha se muestra un cultivo puro de *Streptococcus* en medio agar sangre.

*S. agalactiae* es considerado un patógeno obligatorio de la glándula mamaria causando en la mayoría de los casos mastitis subclínica y en el caso de no ser detectado puede perdurar por largos periodos de tiempo (Smith, 2015). Este microorganismo se adhiere a las células epiteliales de la glándula mamaria produciendo enzimas y hemolisinas que destruyen el tejido mamario sin invadir el tejido intersticial. Además, debido a su gran multiplicación y los daños que ocasiona, sumado a la numerosa liberación de neutrófilos, genera una obstrucción en los conductos que lleva a la pérdida de la función secretora de la glándula mamaria ( Markey, 2013).

Por otro lado, *S. uberis* se encuentra principalmente depositado en el ambiente, sobre todo en suelos contaminados por heces. Otro reservorio común de este microorganismo es el tracto genital, aunque se cree que no sería de gran relevancia para contraer la enfermedad (Smith, 2015). Al igual que *S. agalactiae* algunos autores han descrito la

capacidad de *S. uberis* de adherirse a las células epiteliales de la glándula mamaria y producir exoenzimas, además se estima que gran parte de las infecciones causadas por *S. uberis* pueden derivar en mastitis crónica (Almeida *et al.*, 2006).

Por último, *S. dysgalactiae*, que anteriormente era catalogado como un patógeno ambiental, actualmente es considerado contagioso por lo que su principal reservorio es la glándula mamaria. Sin embargo, los mecanismos de cómo es capaz que persistir dentro de la misma no están claros por el momento (Markey, 2013). A pesar de ello, algunos autores lo clasifican como ambiental al igual que *S. uberis*.

Si bien el énfasis se ha puesto en combatir a los patógenos clasificados como contagiosos, se ha notado en ciertos países un incremento en los casos de mastitis por patógenos ambientales (Kabelitz *et al.*, 2021). Se estima que aproximadamente el 50% de los casos de mastitis producidos por patógenos catalogados como ambientales se da durante el periodo seco (tiempo que transcurre entre una lactancia y la siguiente), ya que en ese momento se observa una mayor susceptibilidad de la glándula mamaria a contraer enfermedades. Finalmente, más de la mitad de ellos son de carácter clínico, ya que como se observó anteriormente afectan de forma significativa la producción de leche (Smith, 2015).

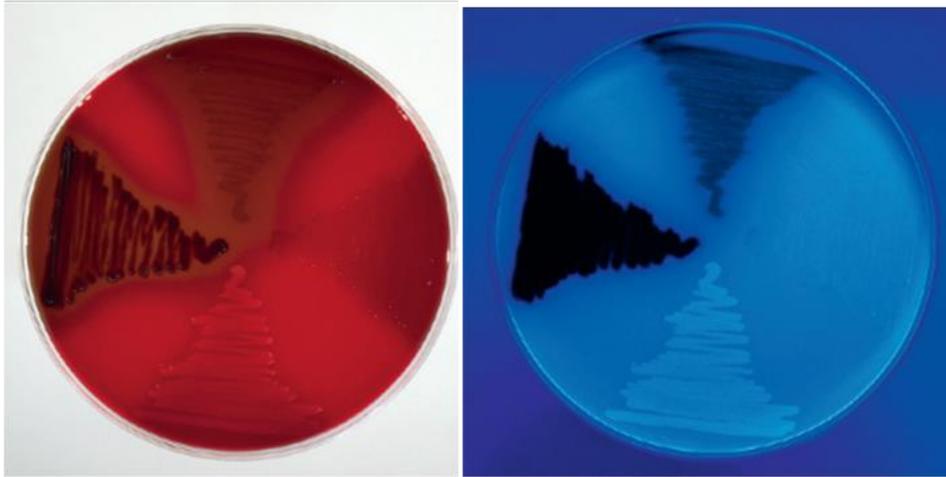
### Diagnóstico de laboratorio de Mastitis Bovina

Para el diagnóstico de la mastitis se utilizan principalmente técnicas fenotípicas que se basan en la observación de la morfología de las colonias, características típicas de crecimiento y la metabolización de ciertos sustratos específicos (Zadoks & Watts, 2009). En la mayoría de países como el nuestro, se realizan una serie de pruebas bioquímicas estandarizadas para la diferenciación a nivel de especie, principalmente debido a su bajo costo y su fácil implementación. La prueba de Christie–Atkins– Munch-Petersen (CAMP,(Munch-Petersen & Christie, 1945)), basada en la acción hemolítica del factor CAMP sobre la sangre contenida en el medio, es un ensayo típico que permite la identificación de los *Streptococcus* del grupo  $\beta$ -hemolíticos dentro de los cuales se encuentra *S. agalactiae* (Brown *et al.*, 1974) (Figura 2).



**Figura 2.** En esta imagen se puede apreciar un ejemplo de la técnica de CAMP en agar sangre. La línea horizontal del centro corresponde a una cepa de *Staphylococcus aureus* y en la parte superior derecha se puede observar una cepa CAMP + que en este caso corresponde a *Streptococcus agalactiae*. Como se puede apreciar se genera la típica forma de “flecha” causada por el factor CAMP en presencia del *Staphylococcus aureus*. Imagen extraída del libro Clinical Veterinary Microbiology, (Markey et al., 2013)

La identificación de *S. uberis* y *S. dysgalactiae* se realiza mediante el ensayo de hidrólisis de esculina en placa. Esta prueba se basa en la capacidad que tienen algunas bacterias de hidrolizar la esculina generando subproductos que tornarán el color del medio a negro (Figura 3). De esta forma, se diferencia *S. uberis*, que es esculina positiva de *S. dysgalactiae* que es esculina negativa. Además de estas pruebas bioquímicas básicas existen otras como son el crecimiento en inulina, manitol, rafinosa, salicin y sorbitol que permitirían una identificación más exacta de cada especie.



**Figura 3.** En esta imagen se observa un ejemplo del ensayo de hidrólisis de esculina en medio Edwards que se utiliza para discriminar entre *S.uberis* y *S.dysgalactiae*. En la zona izquierda de la placa encontramos *Enterococcus faecalis* que es positivo para la hidrólisis de esculina ya que genera ese color negro característico de la reacción. En la parte superior de la placa encontramos una cepa de *S.uberis* que también es positivo para el ensayo de esculina. Por último, en la zona de la derecha e inferior encontramos a *S.dysgalactiae* y *S.agalactiae* respectivamente que son negativos para el ensayo de esculina. En la imagen de la derecha se observa la misma placa de la izquierda, pero bajo la luz UV lo que ayuda a discriminar los positivos de los negativos. Imagen extraída del libro *Clinical Veterinary Microbiology*, (Markey et al., 2013)

En algunos trabajos se evaluó la efectividad de los métodos bioquímicos convencionales frente a otros métodos como API® 20 Strep que se basa en la capacidad que tienen los microorganismos de fermentar azúcares y de la actividad enzimática que poseen. Estas reacciones producen cambios de pH en el medio que generan cambios de coloración, estos son comparados con una tabla de referencia para establecer el resultado. El otro método utilizado es el 16S rDNA RFLP, en este caso la identificación se realiza mediante la utilización de enzimas de restricción que fragmentan de forma específica los fragmentos de ADN dando como resultado diferentes tamaños según la especie. Al comparar estos métodos con los convencionales se encontró que los métodos bioquímicos convencionales pudieron identificar correctamente el 94% de las cepas analizadas (Odierno *et al.*, 2006). Por otro lado, ciertos trabajos afirman haber encontrado la expresión del factor CAMP en cepas de *S. uberis* catalogando como variable el resultado de esta prueba para esta especie (Jiang *et al.*, 1996), siendo así una limitante en el diagnóstico. Además, se destaca que la identificación genotípica es más efectiva también para identificar otros microorganismos que causan mastitis bovina (Zadoks & Watts, 2009). Por otro lado, se comprobó que el desarrollo de técnicas moleculares como PCR es sensible y efectiva para el diagnóstico de patógenos causantes de mastitis bovina (Riffon *et al.*, 2001). La utilización técnicas como multiplex PCR poseen una alta sensibilidad y especificidad para la detección de microorganismos

patógenos (Ashraf *et al.*, 2017). Se sugiere esta técnica como una alternativa rápida y confiable a los métodos convencionales por su especificidad y rapidez (Kalin *et al.*, 2017).

### Uso de antibióticos y la Mastitis

Los agentes antimicrobianos se han utilizado ampliamente a lo largo de los años como método principal para el tratamiento de vacas con MB lo cual ha generado en algunos casos resistencia de determinadas bacterias a algunos antibióticos. En un estudio realizado por Giannechini *et al* en el 2014 se evaluó la sensibilidad frente a penicilina, ampicilina, cefalotina, enrofloxacin, eritromicina, tetraciclina y sulfametoxazol-trimethoprim de cepas de *Streptococcus* causante de mastitis aisladas en nuestro país. En particular se destaca que tanto *S. agalactiae* como *S. dysgalactiae* fueron resistentes en su mayoría a tetraciclina y en segundo lugar a enrofloxacin. Asimismo, las cepas de *S. uberis* presentaron un alto nivel de sensibilidad a todos los antibióticos testeados (Giannechini *et al.*, 2014). Otro estudio realizado en Alemania reveló que las cepas de *S. uberis* y *S. dysgalactiae* estudiadas fueron resistentes en primer lugar a tetraciclina seguido de eritromicina, no así las de *S. agalactiae* que fueron susceptibles a estos antibióticos (Minst *et al.*, 2012). Además, se destacó la sensibilidad de todas las cepas de *Streptococcus* frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, se resalta un aumento en la concentración inhibitoria mínima (CIM) lo que podría reflejar un cambio a futuro en la susceptibilidad de estos microorganismos a estos antibióticos (Minst *et al.*, 2012).

La correcta identificación de los patógenos causantes de MB es de gran importancia ya que permite realizar planes de control de la enfermedad que dependen del o los microorganismos involucrados. De esta forma, se podrían establecer las causas de origen de la enfermedad y determinar la epidemiología de la misma, así como también las distintas formas de contagio. A su vez, determinar los perfiles de resistencia a los diferentes antibióticos permite un correcto tratamiento de la enfermedad y evitar la generación de cepas resistentes en el futuro.

Por todo lo dicho anteriormente, este trabajo se centró en el desarrollo de una técnica rápida, eficaz y confiable que identifique de forma correcta, mediante métodos moleculares, las cepas de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*. Además, se intentó determinar los perfiles de resistencia de las cepas identificadas con el objetivo de tener una mejor idea de la susceptibilidad frente a determinados antibióticos.

## **Hipótesis de estudio**

Los resultados de la identificación genotípica no coinciden con los de la identificación fenotípica en muestras de cultivo de leche mastítica.

## **Objetivos generales**

Identificar mediante métodos moleculares cepas de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* pertenecientes a un banco de cepas aisladas de muestras de leche mastítica y comparar los resultados con los obtenidos en la identificación fenotípica. Además, determinar los distintos perfiles de resistencia fenotípica a antibióticos.

## **Objetivos específicos**

1. Estandarizar una Multiplex PCR para la identificación de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*. Determinar la especificidad y sensibilidad de la misma.
2. Realizar un análisis de la efectividad de la identificación de las cepas de *Streptococcus sp.* mediante la comparación con los datos de la caracterización fenotípica y genotípicas realizada a las cepas.
3. Determinar los perfiles de resistencia fenotípico a macrólidos, tetraciclinas y penicilina en todas las cepas de *Streptococcus* identificadas.

## **Materiales y Métodos**

### Recepción y procesamiento inicial de muestras

Se trabajó con 127 cepas que fueron remitidas por el Laboratorio de la Rural de San José obtenidas de muestras de leche extraídas de vacas con diagnóstico de mastitis clínica.

La identificación fenotípica de dichas cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales en el Laboratorio de la Rural de San José. La determinación del género se realizó mediante tinción de Gram, la prueba de catalasa y la prueba de producción de hemólisis por crecimiento en agar sangre. Para la identificación de especies se

utilizaron la prueba de CAMP, el ensayo de hidrólisis de esculina y la determinación del Grupo de Lancefield. Con dichas pruebas las cepas fueron separadas en *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y *Streptococcus*.

Luego de su identificación las muestras fueron rotuladas y enviadas en caldo TSB al Departamento de Patobiología, Unidad Académica de Microbiología de la Facultad de Veterinaria donde fueron almacenadas en freezer -20°C hasta su estudio asignándoseles un código interno del Laboratorio de Microbiología.

Las muestras se sembraron en agar sangre al 5% de forma de comprobar su viabilidad, descartándose aquellas que no desarrollaron crecimiento de colonias en placa (11/127).

Posteriormente se corroboró su pertenencia al género *Streptococcus* repitiendo las pruebas de tinción de Gram y catalasa.

Las cepas bajo estudio fueron almacenadas en freezer -80°C hasta su utilización. Para ello se introdujo una colonia de cada una de ellas en un tubo eppendorf con caldo TSB los cuales se mantuvieron en agitación (shaker) a 37°C durante 48hrs. Seguidamente, fueron colocadas en un criotubo con caldo glicerol al 20% y almacenadas en freezer -80°C.

### Extracción de ADN

Previo a la extracción de ADN las muestras almacenadas a -80°C se re-aislaron en placas con medio agar sangre al 5%.

Para realizar la extracción de ADN genómico se utilizó la enzima Achropeptidasa (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO). En primer lugar, se incorporaron 95µl de agua DPC en un tubo eppendorf de 1,5ml, posteriormente se agregaron 5µl de la solución de Achropeptidasa a una concentración de 10U/µl. Una vez realizado esto, con la ayuda de un ansa, se tomó una o dos colonias de la placa y se incorporó al tubo con la enzima agitando vigorosamente mediante vortex. Los tubos se llevaron a baño de 50°C durante 10 min y posteriormente a uno de 94°C por el mismo tiempo. Luego se centrifugaron por 7 min a 13500 rpm y se reservaron 80µl del sobrenadante que se almacenaron en tubos rotulados en freezer a -20°C hasta su posterior utilización. La pureza y cantidad del ADN extraído fue evaluada en NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.), mediante la relación de absorbancia 260/280 y la concentración de ADN medida en ng/µl.

## Puesta a punto de la Multiplex PCR

Para la puesta a punto de la Multiplex PCR para la identificación genotípica de las muestras en estudio se incluyeron tres cepas de referencia (ATCC, Washington DC, EE.UU.) de las tres especies: *S. uberis* (ATCC 9927), *S. agalactiae* (ATCC 13813) y *S. dysgalactiae* (ATCC 12394). Se utilizaron tres pares de cebadores que amplifican una porción del ARNr 16s (*S. dysgalactiae* y *S. agalactiae*) y 23s (*S. uberis*) de 624, 405 y 281pb respectivamente (Riffon *et al.*, 2001) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los cebadores utilizados en el estudio

Nombre del Primer	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del producto(pb)	Tm °C	Especie que identifica
Sag40	CGC TGA GGT TTG GTG TTT ACA	405	60	<i>S. agalactiae</i>
Sag445	CAC TCC TAC CAA CGT TCT TC			
Sdy105	AAA GGT GCA ACT GCA TCA CTA	281	57	<i>S. dysgalactiae</i>
Sdy386	GTC ACA TGG TGG ATT TTC CA			
Sub1546	TGA TGG GGA GCG AAA ATA AG	624	59	<i>S. uberis</i>
Sub2170	CCC AAC AAC GCC TCA AAC GA			

Como primer paso se determinó la temperatura adecuada de *annealing* a través de la realización de PCRs de gradiente para cada una de las tres especies. Para ello, se estableció un rango de temperaturas de entre 55°C a 65°C basado en los datos de las temperaturas de *melting* (Tm) provista por los *primers* (Tabla 1). El protocolo establecido para el PCR de gradiente se inició con un paso previo de 94°C durante 1 minuto, luego se realizaron 35 ciclos iniciando con un paso de desnaturalización a 94°C durante 45 seg, para la etapa de *annealing* se diseñó un gradiente de temperatura de 55°C a 65°C durante 1 min y una etapa de extensión a 72°C durante 2 min. Por último, se determinó una etapa extra de extensión por 1 min. Esta configuración se utilizó para realizar los tres PCR de gradiente. Para visualizar los productos de PCR se utilizó un gel de Agarosa al 2%, al preparado se le adicionó GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd) que oficia de intercalador de ADN y flúorese bajo luz UV. Para cargar las muestras al gel de agarosa previamente se mezcló el producto de PCR con *loading buffer* 6x (Thermo Scientific™) y luego se procedió a la carga de los productos. Además, se utilizó como referencia para la corrida el marcador de peso molecular de Thermo Scientific™ que corresponde a 100pb. Se realizó una comparación de las bandas de cada una de las PCR y se seleccionaron aquellas bandas que poseían una definición y claridad óptima.

Utilizando la  $T_m$  determinado a partir de las tres PCRs de gradiente anteriores se realizó una múltiplex PCR utilizando una mezcla de las extracciones de ADN de las cepas ATCC de *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae*, previamente analizadas en cuanto a pureza y concentración.

#### Identificación de las cepas de *Streptococcus sp.* mediante Multiplex PCR

La identificación de las cepas de *Streptococcus sp.* en estudio se realizó mediante la multiplex PCR. Como control positivo se utilizó la mezcla ADN de las cepas ATCC y como control negativo se utilizó agua DEPC.

La amplificación por PCR se realizó en un equipo Biorad (C1000 Touch™). Todas las reacciones fueron llevadas a cabo usando un volumen final de 25µl de los cuales 14µl correspondieron a Mango Mix (Bioline), 0,4µM a *primer forward* y *primer reverse* de cada uno de los tres pares de *primers* correspondientes a las tres especies. Por último, se agregaron 3µl de agua y 2µl de ADN de la muestra para completar el volumen total (25µl).

Se aplicó un paso previo a 94°C por 1 min, a continuación, se estableció un total de 35 ciclos que se realizó en base a las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 45s, *annealing* a 58°C 1 min y una etapa de extensión a 72°C por 2 min. Finalmente, una vez concluidos los ciclos, se agregó un paso extra de extensión de 72°C por 1 min.

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% lo cual permitió la correcta visualización y discriminación entre los tamaños de banda generados por los distintos pares de primers. Al preparado del gel se le adicionó GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd) que se intercala en la hebra de ADN y fluórese al exponerse a luz UV. De esta manera, fue posible visualizar con claridad las bandas generadas por los productos de PCR. Para cargar las muestras al gel de agarosa se utilizó *loading buffer* 6x (Thermo Scientific™). Por último, se utilizó como referencia de la corrida un marcador de peso molecular de 100 pb. (Thermo Scientific™).

#### Determinación de la sensibilidad y especificidad de la técnica.

La evaluación de la especificidad de la Multiplex PCR se realizó usando una mezcla de la extracción de ADN de las tres cepas ATCC de *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae*, en conjunto y separadamente en presencia de los tres pares *primers* en simultáneo. De esta manera es posible comprobar que el ADN de cada una de las tres cepas en estudio,

se una de forma específica con su *primer* y no con más de uno.

Para evaluar la sensibilidad se ejecutó la reacción incluyendo diluciones a partir de una mezcla de ADN de las cepas de referencia con una concentración conocida (41ng/μl). A partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta la dilución 10<sup>-8</sup> (41x10<sup>-8</sup>ng/μl).

### Determinación de los perfiles de Resistencia

Para determinar los perfiles de resistencia a penicilina, tetraciclina y eritromicina a nivel fenotípico se realizaron antibiogramas a 94 de las cepas en estudio, siguiendo protocolo de la CLSI (CLSI, 2020). Estos antibióticos han sido estudiados en trabajos previos ya que son de uso veterinario (Liu et al., 2018).

Las cepas fueron sembradas y re-aisladas en placas con medio agar sangre al 5%, e incubadas en estufa a 37°C por 48hrs. Posteriormente se realizó una suspensión en suero fisiológico equivalente el 0,5 de la escala McFarland (Remel™ Equivalence Turbidity Standards-Thermo Scientific™). A continuación, con un hisopo se sembró cada muestra en una placa con medio Muller-Hinton sangre al 5%. Por último, se le agregaron los discos de difusión de cada antibiótico (Oxoid™). Se dejó reposar la placa por 20 min para una óptima difusión del antibiótico, posteriormente se llevó a estufa a 37°C por 48hrs, luego de las cuales se procedió a la medición del halo generado utilizando la tabla de referencia proporcionada por la CLSI para definir si la cepa era resistente o no al antibiótico.

### Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo exhaustivo de los datos mediante la utilización de planillas realizadas en Microsoft Excel, donde se identificó correctamente cada muestra con un número, y los resultados obtenidos de cada cepa bacteriana expresados como positivos o negativos tanto a nivel fenotípico como molecular, así como los perfiles de resistencia. Para determinar la asociación entre las pruebas fenotípicas y las moleculares se utilizó la prueba chi(cuadrado) de contingencia mediante el software STATA v14.

## Resultados

### Control de viabilidad y confirmación de Género de las cepas

Del total de 127 cepas provenientes de muestras de leche de vaca con diagnóstico de mastitis clínica positivos, 116 fueron viables. Al total de las cepas viables se les realizaron las pruebas bioquímicas de rutina, tinción de Gram y prueba de catalasa que confirmaron el resultado de las pruebas bioquímicas, tinción de Gram y prueba de catalasa efectuadas previamente por el Laboratorio de la Rural de San José ratificando su identificación como *Streptococcus spp.*

### Extracción de ADN

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la pureza y concentración del ADN, en promedio, obtenido mediante el procedimiento de extracción utilizado separado de acuerdo a la determinación fenotípica inicial.

**Tabla 2.** Pureza y concentración de los extractos realizados con una fracción de las muestras estudiadas.

Fenotipo <sup>1</sup>	Abs 260/280 <sup>2</sup>	[ng/μl] <sup>3</sup>
<i>Streptococcus</i>	1,54	50,66
<i>S.agalactiae</i>	1,27	106,8
<i>S.dysgalactiae</i>	1,69	47,22
<i>S.uberis</i>	1,54	54,27

<sup>1</sup> Según pruebas convencionales de laboratorio.

<sup>2</sup> Relación entre absorbancia 260 nm y 280 nm.

<sup>3</sup> Concentración de ADN

### Puesta a punto de la Multiplex PCR y evaluación de la sensibilidad y especificidad

Los resultados de la PCR de gradiente de temperatura de annealing efectuada para *S.uberis*, *S.dysgalactiae*, *S.agalactiae* en forma individual se muestran en las figuras 4,5 y 6 respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 4, en el caso de *S.uberis* se observó amplificación de una banda correspondiente a 624 pb en todas las temperaturas evaluadas a pesar de que su Tm es de 59°C, sin embargo, en el caso de *S.dysgalactiae* con una Tm de

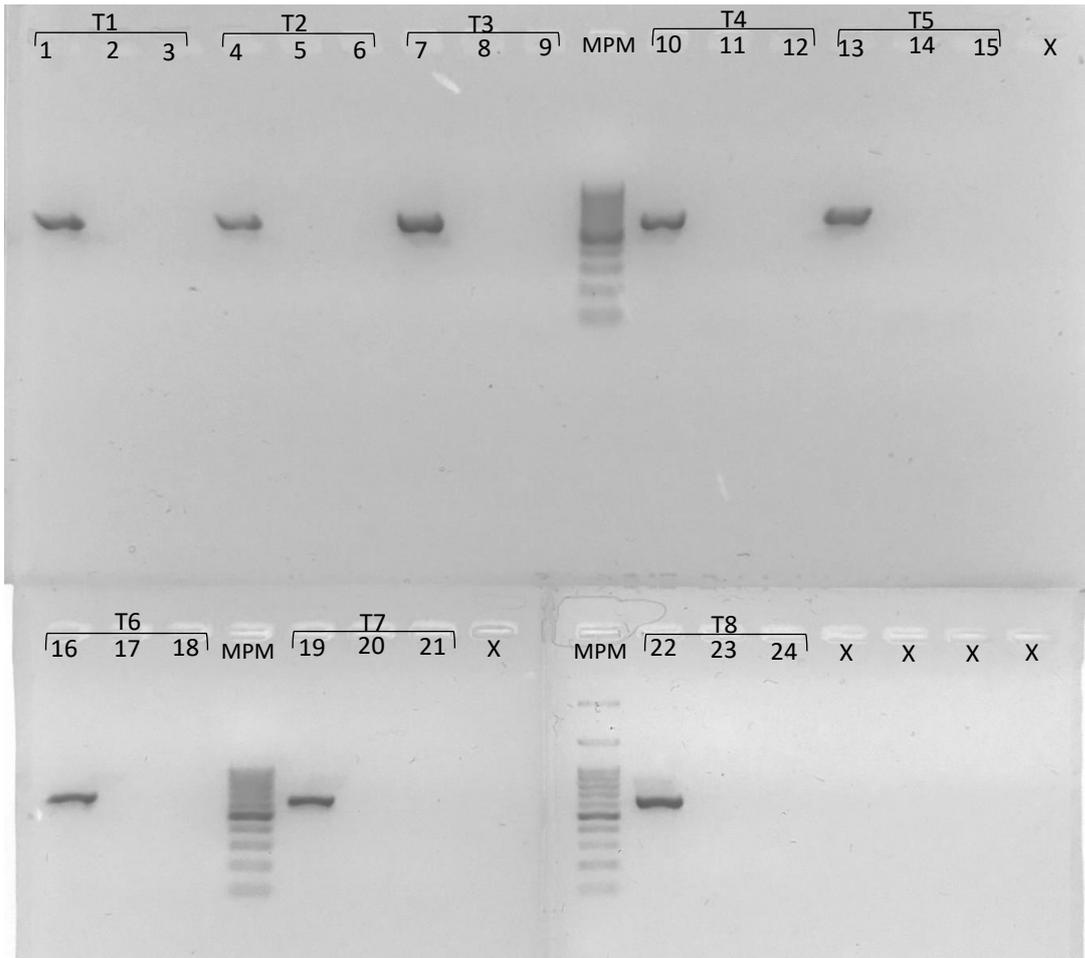
57°C se observan bandas nítidas correspondientes a 281 pb a 59°C y temperaturas menores (Figura 5). Mientras que a 61°C se aprecia una banda tenue y en temperaturas de 63°C a 65°C no se observan bandas. Por último, en el caso de *S.agalactiae* (Figura 6) se observa que hay amplificación de una banda de 405 pb en todas las temperaturas annealing ensayadas a pesar de tener su Tm en 60°C. Si bien en las temperaturas de 60°C y 59°C se observaron bandas que corresponderían a *S. uberis* en la temperatura 58°C se ve una banda nítida de *S.agalactiae*, sin amplificación en el carril correspondiente a *S.uberis*.

Por lo cual se seleccionó una temperatura de *annealing* de 58°C para ser utilizada en el ajuste de la multiplex PCR ya que permitía la amplificación de bandas nítidas para las tres especies y sin observar bandas inespecíficas para los diferentes patógenos.

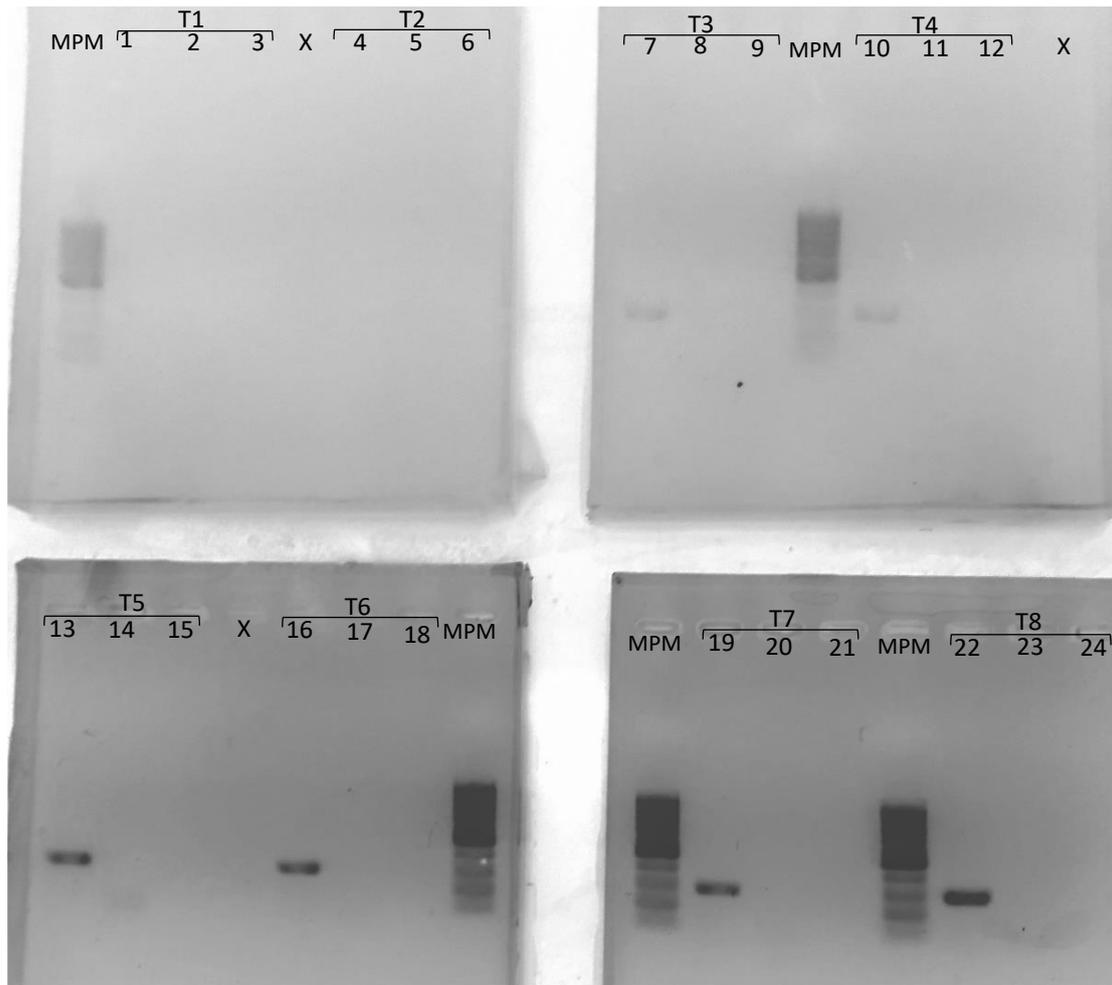
Se logró ajustar una multiplex PCR que permitió discriminar eficazmente genotípicamente las cepas de referencia utilizadas y posteriormente proceder a la caracterización de las cepas en estudio (Figura 7).

La evaluación de la especificidad de la Multiplex PCR mostró que, a pesar de que en una muestra esté presente el ADN de las tres especies de *Streptococcus* estudiadas, cada *primer* se unió específicamente con su correspondiente especie amplificando el producto esperado (Figura 8).

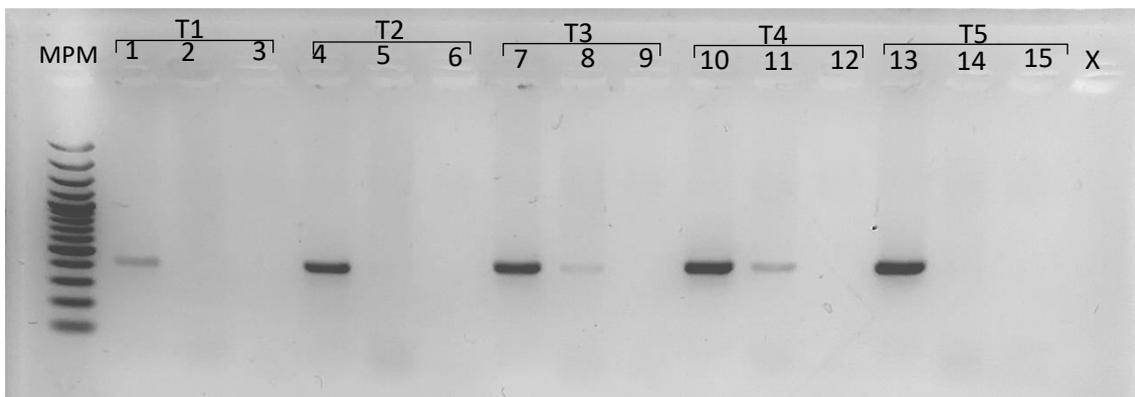
Al evaluar la sensibilidad de la Multiplex PCR se pudo constatar que la técnica presenta una alta sensibilidad, ya que fue posible observar bandas hasta la dilución de  $10^{-7}$  que corresponde a  $41 \times 10^{-7} \text{ ng}/\mu\text{l}$  de ADN (Figura 9). Tal como se observa en la imagen, es posible visualizar bandas hasta la dilución  $10^{-7}$  lo que demuestra la gran sensibilidad de la técnica.



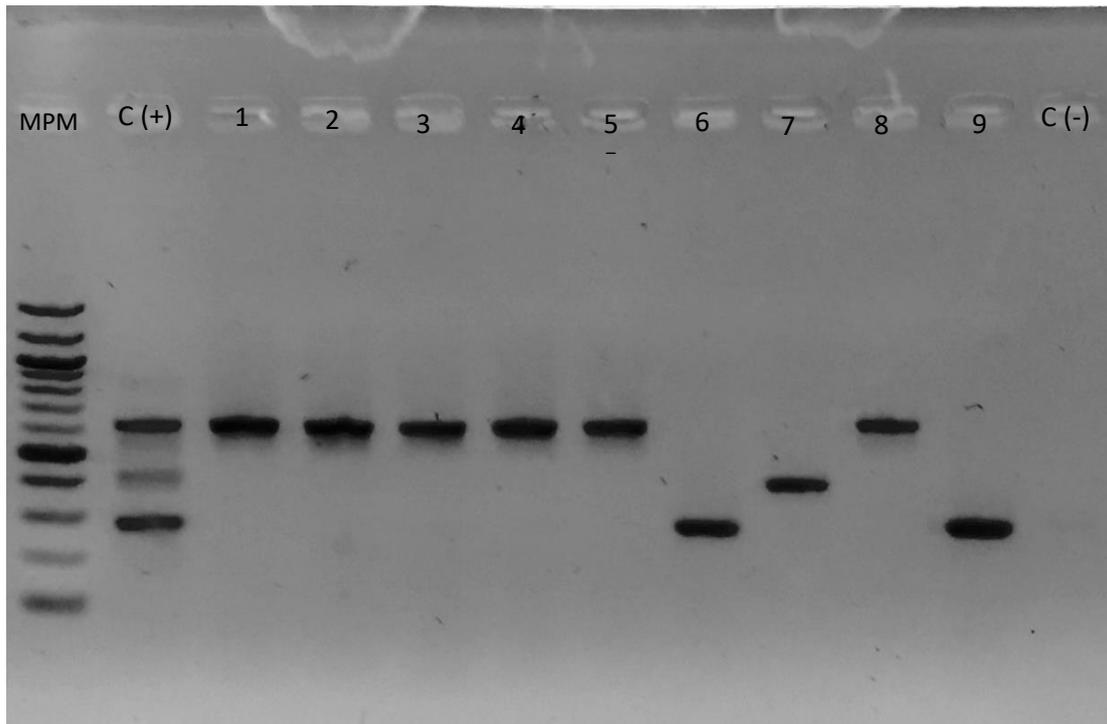
**Figura 4.** Resultado de la PCR de gradiente de temperaturas para *S.uberis* en gel de Agarosa al 2%. Los carriles 1,4,7,10,13,16,19 y 22 corresponden a la cepa ATCC 9927, los carriles 2,5,8,11,14,17,20,23 corresponden a una cepa de *S.agalactiae*, por último los carriles 3,6,9,12, 15, 18, 21 y 24 corresponden al control negativo (agua). El carril MPM corresponde a los marcadores de peso molecular de 100p. T1 corresponde a 65°C, T2 a 64.5°C, T3 a 63.3°C, T4 a 61.4 °C, T5 a 59°C, T6 a 57°C, T7 a 55.7°C y T8 a 55°C de temperaturas de annealing. Las bandas observadas corresponden a 624pb.



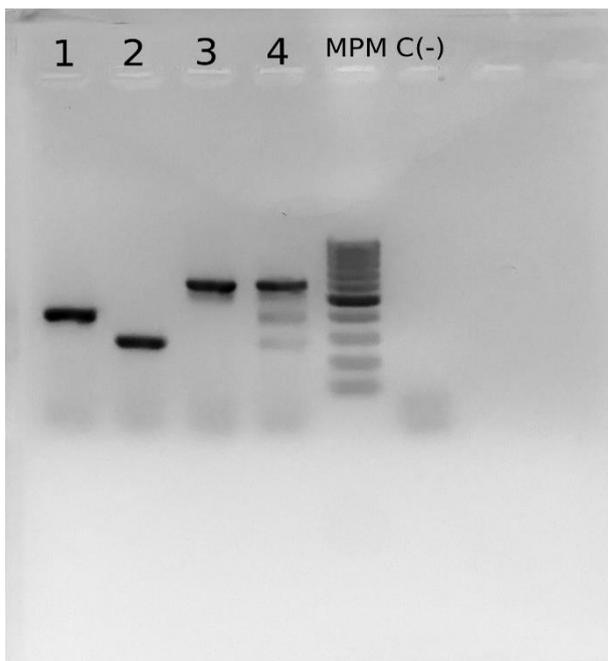
**Figura 5.** Resultado de la PCR de gradiente de temperaturas para *S. dysgalactiae* en gel de Agarosa al 2%. Los carriles 1,4,7,10,13,16,19 y 22 corresponden a la cepa ATCC 12394, los carriles 2,5,8,11,14,17,20,23 corresponden a una cepa de *S. agalactiae*, por último los carriles 3,6,9,12, 15, 18, 21 y 24 corresponden al control negativo (agua). El carril MPM corresponde a los marcadores de peso molecular de 100p. T1 corresponde a 65°C, T2 a 64.5°C, T3 a 63.3°C, T4 a 61.4 °C, T5 a 59°C, T6 a 57°C, T7 a 55.7°C y T8 a 55°C de temperaturas de annealing. Las bandas observadas corresponden a 281pb.



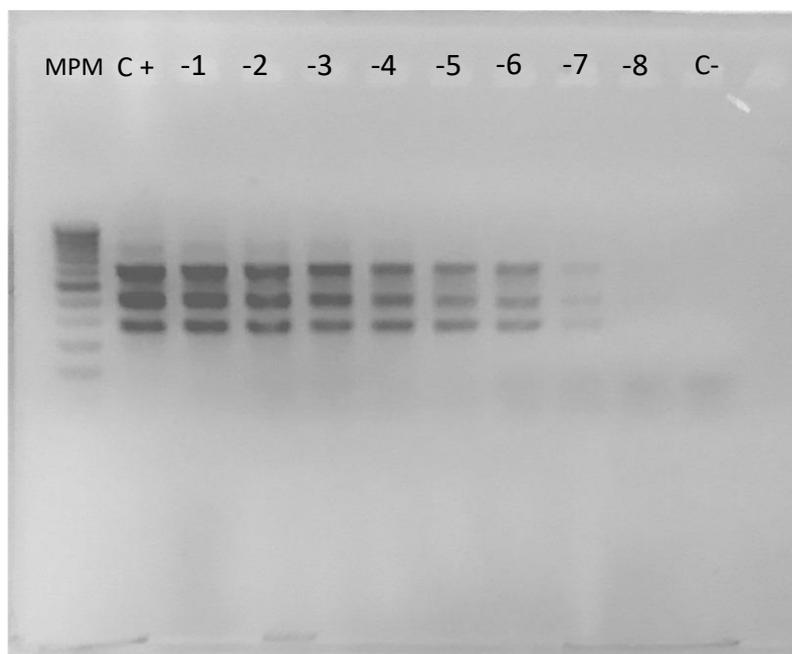
**Figura 6.** Resultado de la PCR de gradiente de temperaturas para *S. agalactiae* en gel de Agarosa al 2%. Los carriles 1,4,7,10,13 corresponden a la cepa ATCC 13813, los carriles 2,5,8,11,14 corresponden a una cepa de *S. uberis*, por último los carriles 3,6,9,12 y 15 corresponden al control negativo (agua). El carril MPM corresponde a los marcadores de peso molecular de 100p. T1 corresponde a 62°C, T2 a 61°C, T3 a 60°C, T4 a 59 °C, T5 a 58°C. Las bandas observadas corresponden a 405 pb.



**Figura 7.** En esta imagen se observa el resultado de una Multiplex PCR en gel de Agarosa al 2% para la identificación genotípica de 9 cepas. El Marcador de Peso Molecular corresponde a 100pb. El C (+) corresponde a una mezcla de las extracciones de ADN de las tres cepas ATCC utilizadas, *S.uberis*, *S.agalactiae* y *S.dysgalactiae*. El C (-) corresponde a agua. Por último, los carriles del 1, 2, 3, 4, 5, 8 corresponden a *S.uberis* (624pb), el carril 6 y 9 corresponden a *S.dysgalactiae*(281pb), y el carril 7 a *S.agalactiae*(405pb).



**Figura 8.** Productos de PCR obtenidos al evaluar la especificidad de la Multiplex PCR puesta a punto. Se utilizó un gel de Agarosa al 1,5%. En el carril 1 se observa una banda perteneciente a *S.agalactiae* (405pb), en el carril 2 vemos la correspondiente a *S.dysgalactiae* (281pb) y en el carril 3 la corresponde a *S.uberis* (624pb). En el carril 4 encontramos 3 bandas que corresponden a cada una de las tres especies en una muestra mezcla. Por último, tenemos el control negativo donde se utilizó agua (C-).



**Figura 9.** Productos amplificados por multiplex PCR en gel de Agarosa al 2% utilizando diluciones seriales 1/10 de las muestras, desde (-1), la más concentrada hasta (-8), la más diluida. Se observan las bandas correspondientes a cada una de las tres cepas desde la dilución (-1) a (-7).

### Identificación genotípica de las cepas

La identificación genotípica llevada a cabo a través de la multiplex PCR ajustada constató que 70/116 cepas corresponden a *S.uberis*, 4/116 a *S.agalactiae* y 42/116 a *S.dysgalactiae* (Tabla 3).

**Tabla 3.** Identificación fenotípica y genotípica de las cepas estudiadas.

<b>Organismo</b>	<b>Identificación Fenotípica</b>	<b>%</b>	<b>Identificación Genotípica</b>	<b>%</b>
<i>S. uberis</i>	28	24,1	70	60,3
<i>S. agalactiae</i>	7	6,0	4	3,4
<i>S. dysgalactiae</i>	52	44,8	42	36,2
<i>Streptococcus</i>	29	25,0	0	0,0
<b>Total</b>	116	100,0	116	100,0

### Comparación entre resultados de identificación fenotípica y genotípica

Respecto a la identificación de las cepas (n=116) se encontraron diferencias entre los resultados de la identificación fenotípica y la genotípica realizada con multiplex PCR con una significancia del  $p=0.023$ .

Según la información suministrada por el Laboratorio de la Rural de San José, del total de las 116 muestras analizadas, 28 corresponden a *S.uberis*, 7 *S.agalactiae*, 52 a *S.dysgalactia* y 29 no pudieron ser categorizadas mediante la identificación fenotípica (Tabla 3).

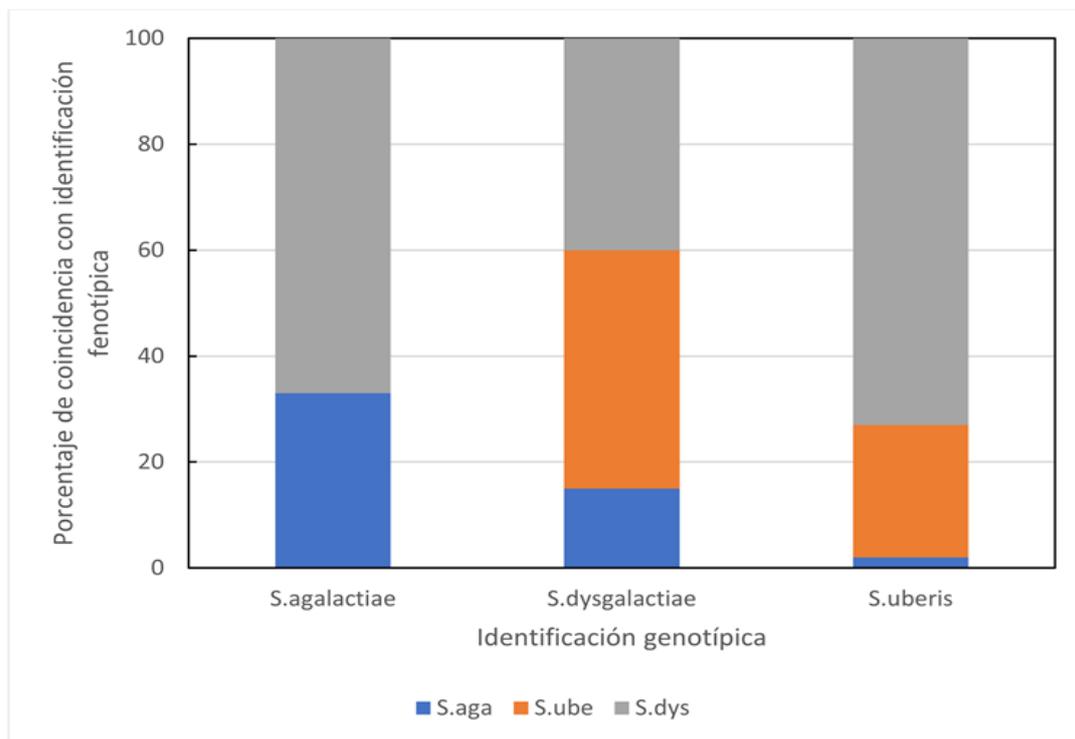
Se encontró que un porcentaje muy bajo del total presentaba coincidencias entre los resultados de la identificación fenotípica y genotípica. Al quitar del análisis las 29 muestras cuya especie no pudo ser determinada fenotípicamente solo coincidían los resultados en el 31% de las muestras analizadas (27/87).

Si bien el número de cepas analizadas es bajo, solamente 33% de las cepas identificadas como *S.agalactiae* (n=3) de forma fenotípica, coincidieron con el resultado de la Multiplex PCR. Para aquellas situaciones en las que la identificación no coincidió, observamos que del total de cepas identificadas como *S.agalactiae* (n=3) el 67% había sido identificada por técnicas bioquímicas como *S.dysgalactiae*.

En el caso de *S.dysgalactiae* (n=33), solo un 39% los resultados fenotípicos coincidían con los genotípicos, mientras que un 45% correspondió a *S.uberis* y un 15% a *S.agalactiae*

Por último, para las cepas de *S.uberis* (n=51) observamos que solo en un 25% coincidían la identificación fenotípica y genotípica (Figura 10) mientras que el 73% correspondía a *S.dysgalactiae* y 2% a *S.agalactiae* cuando se realizó la identificación molecular (Figura 10).

Cuando el resultado de la identificación fenotípica fue *Streptococcus* (29 muestras), el análisis genotípico las categorizó en *S.agalactiae* 3% (1/29), *S.dysgalactiae* (9/29) 31% y *S.uberis* 66% (19/29).



**Figura 10.** Comparativo de coincidencias entre los resultados de la identificación genotípica y fenotípica de las cepas estudiadas según especies.

#### Determinación fenotípica de los perfiles de resistencia a antibióticos.

De las 94 muestras analizadas, 90 (95,7%) fueron sensibles a penicilina y 4 (4,3%) resistentes. Frente a la tetraciclina, 63 (67,0%) fueron sensibles, 22 (23,4%) resistentes y 9 (9,6%) dieron un resultado intermedio. Por último, 80 (85,1%) fueron sensibles a eritromicina, 12 (12,8%) resistentes y 2 (2,1%) intermedias (Tabla 4). (Figura 11)

**Tabla 4.** Resultados de los antibiogramas realizados con 94 cepas de *Streptococcus* spp.

<b>Antibióticos</b>	<b>Susceptibles</b>		<b>Intermedias</b>		<b>Resistentes</b>	
	Número (n)	Porcentaje (%)	Número (n)	Porcentaje (%)	Número (n)	Porcentaje (%)
<b>Penicilina</b>	90	95,7	0	0	4	4,3
<b>Tetraciclina</b>	63	67,0	9	9,6	22	23,4
<b>Eritromicina</b>	80	85,1	2	2,1	12	12,8

Como se observa en la Tabla 4 un porcentaje considerable de las cepas estudiadas presentó resistencia a tetraciclina y a eritromicina (23,4 y 12,8% respectivamente). Por otro lado, se constató una alta sensibilidad a Penicilina (95,7 %).



**Figura 11.** En esta imagen se puede apreciar un ejemplo de los antibiogramas realizados. En este caso se observa una cepa que fue sensible a eritromicina y resistente a tetraciclina y penicilina.

Si analizamos los perfiles de resistencia por organismo, *S.agalactiae* mostró alta susceptibilidad a penicilina y eritromicina y una cierta resistencia a tetraciclina (Tabla 5).

En el caso de *S.dysgalactiae* se observaron altos a moderados niveles de resistencia a tetraciclina (37,5%) y eritromicina (15,6%) y alta sensibilidad a penicilina (96,9%) (Tabla 5).

Cuando analizamos los perfiles de resistencia de *S.uberis* se constató una alta sensibilidad a penicilina (96,6%) y una moderada resistencia a tetraciclina (13,6%) y eritromicina (11,9%) (Tabla 5). A su vez, algunas de las cepas mostraron resistencia a más de uno de los antibióticos evaluados, específicamente una a penicilina y tetraciclina y una a eritromicina y tetraciclina.

Es de destacar que para *S.dysgalactiae* se encontraron niveles intermedios de resistencia principalmente a tetraciclina (28,1%).

**Tabla 5.** Se presentan los distintos porcentajes de resistencia y susceptibilidad de *S.agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* a Penicilina, Tetraciclina y Eritromicina.

<b><i>S.agalactiae</i> (n=3)</b>			
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	66,7%	0%	33,3%
Tetraciclina	33,3%	0%	66,7%
Eritromicina	100%	0%	0%

<b><i>S.dysgalactiae</i> (n=32)</b>			
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	96,9%	0%	3,1%
Tetraciclina	34,4%	28,1%	37,5%
Eritromicina	81,3%	3,1%	15,6%

<b><i>S.uberis</i>(n=59)</b>			
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Penicilina	96,6%	0%	3,4%
Tetraciclina	86,4%	0%	13,6%
Eritromicina	86,4%	1,7%	11,9%

### Análisis de datos

En base a los datos obtenidos de la identificación fenotípica y genotípica se realizó un test estadístico de Pearson  $\chi^2$  en el programa STATA V.14 para evaluar el grado de discordancia entre los datos. Como resultado del estadístico se encontró que *p-value*  $0.023 < 0.05$  por lo que las diferencias de resultado de los test convencionales y la Multiplex PCR puesta a punto son significativos.

## Discusión

Hasta el momento las pruebas bioquímicas convencionales constituyen el método *Gold Standard* para la identificación de bacterias causantes de mastitis bovina. Estas, se basan en la observación morfológica de las colonias y la realización de la prueba de catalasa, reacción de Gram y adicionalmente, diferentes pruebas bioquímicas de rutina como son el ensayo de CAMP, la hidrólisis de esculina, la determinación del grupo de Lancefield y la observación de hemólisis en agar sangre al 4%. Su eficacia para una correcta identificación de estos organismos se ha comprobado frente a otros métodos como API® 20 Strep y RFLP 16S rDNA (Odierno *et al.*, 2006) .

En ese sentido, Raemy *et al.*, 2013 compararon la identificación de *S.uberis*, *S.dysgalactiae* y *S.agalactiae* mediante métodos fenotípicos frente a la de multiplex PCR y reportaron un 92%, 90% y 100% de eficacia para cada patógeno respectivamente, por lo que recomiendan para una correcta identificación la combinación de pruebas como catalasa y Gram junto con multiplex PCR (Raemy *et al.*, 2013).

En este trabajo se ajustó exitosamente una reacción de multiplex PCR que permitió, específica y sensiblemente la detección e identificación de *S.agalactiae*, *S.uberis* y *S.dysgalactiae* a partir de aislamientos de cepas de referencia y de muestras de vacas con mastitis. El método de extracción utilizado permitió obtener extractos de ADN de calidad aceptable (Thermo Scientific, 2012) con una concentración promedio mayor a 40 ng/μl.

Como resultado de los PCR de gradiente realizados se pudo establecer como 58°C la temperatura de *annealing* de consenso para la amplificación de los tres microorganismos. Sin embargo, en la PCR de gradiente de *S.agalactiae* (Figura 6) observamos que en las temperaturas 59°C y 60°C aparecen bandas en el carril correspondiente a *S.uberis*. Esto puede deberse a contaminación a la hora de cargar el gel de agarosa debido que el tamaño de la banda es igual al tamaño de banda generado por *S.agalactiae* en los carriles vecinos.

La multiplex PCR ajustada permitió discriminar correctamente las cepas de referencia correspondiente a los tres patógenos en estudio. A su vez, mostró una alta sensibilidad llegando a determinar concentraciones equivalentes  $41 \times 10^{-7}$  ng/μl. Es de destacar que el presente estudio fue realizado a partir de colonias puras de cultivo, pero abre la posibilidad para que esta metodología sea evaluada en la identificación y detección directamente sobre muestras de leche, permitiendo esto reducir los tiempos de diagnóstico. De todas formas, la complementación de las técnicas fenotípicas con la

multiplex PCR aumentaría la precisión del diagnóstico y determinación de especie. Algo muy necesario ya que epidemiológicamente, el tratamiento, el manejo y las características de la enfermedad según sea causada por estos patógenos son diferentes lo cual es muy relevante desde el punto de vista práctico. Por ejemplo, la tasa de curación para *S.uberis* y *S.dysgalactiae* es distinta cuando se trata la enfermedad con penetamato de iohidrato siendo 87,7% para *S.uberis* y 64,7% para *S.dysgalactiae* (McDougall *et al.*, 2007).

Los análisis efectuados permitieron clasificar las 116 cepas estudiadas en las tres especies en cuestión sin registrar casos en los que no hubiera amplificación y destacando la identificación de las cepas que no poseían identificación fenotípica del laboratorio de origen

*S.uberis* fue la especie prevalente seguida de *S.dysgalactiae* y por último *S.agalactiae* lo cual coincide con lo encontrado en la mayoría de las regiones del mundo (Kabelitz *et al.*, 2021).

Sin embargo, los estudios de prevalencia realizados en Uruguay han reportado que dentro de los *Streptococcus* el más prevalente es *S.dysgalactiae*. (Giannechini *et al.*, 2014). Si bien en el presente trabajo *S.uberis* fue el más frecuente debe considerarse que las muestras provinieron solamente de vacas con mastitis clínica lo cual pudo influir en el resultado final, ya que la mastitis clínica puede repercutir en la baja prevalencia de *S.agalactiae* reportada ya que éstas son causadas principalmente por patógenos catalogados como “ambientales”, como son, *S.dysgalactiae* y *S.uberis* (Smith, 2015; Almeida *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo en particular a través de una técnica genotípica no coincidieron con los resultados obtenidos por las pruebas fenotípicas. Según estas últimas, la especie más frecuente dentro de las cepas estudiadas fue *S.dysgalactiae*, seguido de *S.uberis* y por último de *S.agalactiae*. Lo cual concuerda con lo encontrado por (Giannechini *et al.*, 2014) que realizó el estudio mediante la utilización de métodos convencionales. Esto podría implicar la subestimación de algunos patógenos.

Estas diferencias podrían deberse a varios factores. En primer lugar, a las características inherentes a cada prueba. Mientras la PCR se basa en amplificación de un fragmento del genoma correspondiente a una región conservada y específica para cada una de estas bacterias generando una banda específica que permite una identificación con alto grado de exactitud, los métodos fenotípicos implican la realización de pruebas de laboratorio que en algunos casos generan dudas en la interpretación de sus resultados y en oportunidades se han reportado cambios en las respuestas.

Además, este tipo de pruebas necesitan de un extenso tiempo para que se den las reacciones necesarias, asimismo es imprescindible la disponibilidad de personal capacitado para la realización de dichas pruebas debido a la complejidad de la manipulación.

Por ejemplo, a la hora de identificar *S.uberis* por métodos convencionales se encontró que cuando se determina el grupo de Lancefield los resultados pueden ser variables, pudiendo indicar pertenencia al grupo E, G, P o U. Además, *S.uberis* también puede mostrar respuestas variables para la prueba de CAMP (Kabelitz *et al.*, 2021).

Por otro lado, para *S.dysgalactiae*, considerado no hemolítico, es decir que no genera hemólisis en placas con agar sangre al 4%, también se han reportado casos en los que presenta alpha-hemólisis al igual que *S.uberis* (Kabelitz *et al.*, 2021).

Por último, *S.agalactiae* si bien es considerado beta-hemolítico por excelencia, se han encontrado casos en los que no se presenta hemólisis al igual que *S.dysgalactiae* (Kabelitz *et al.*, 2021).

Dadas las discrepancias discutidas anteriormente sería conveniente la realización de estudios posteriores para profundizar el tema y conocer sus causas dada la importancia práctica de contar con una técnica fácil, sensible y específica que complemente las técnicas actualmente en uso.

La evaluación de la respuesta a antibióticos realizada con las 94 cepas en general mostró una alta sensibilidad a penicilina (96%) lo cual coincide con lo encontrado por (Giannechini *et al.*, 2014). La sensibilidad a eritromicina (86%) y a tetraciclina (67%) encontrada fue menor, y a su vez, algunas cepas mostraron respuestas intermedias (2 y 10% respectivamente).

Considerando la resistencia a los antibióticos, se constató un porcentaje considerable de las cepas que mostraron resistencia a tetraciclina y a eritromicina (23,4 y 12,8% respectivamente), lo cual coincide con lo reportado por Minst *et al.*, 2012. Esta información tiene que ser de estrecha comunicación entre los laboratorios y los médicos veterinarios actuantes a nivel de campo para dar un buen uso de los antimicrobianos

Si bien el número de cepas de *S.agalactiae* evaluado fue muy bajo (n=3), todas fueron sensibles a eritromicina y 2/3 a penicilina y 2/3 resistentes a tetraciclina.

Las cepas de *S. dysgalactiae* presentaron altos niveles de resistencia a tetraciclina y alta sensibilidad a penicilina al igual que lo reportado por Giannechini *et al.*, 2014 y a diferencia moderados a eritromicina.

Las cepas de *S. uberis* presentaron alta sensibilidad a penicilina y moderada resistencia a tetraciclina y eritromicina. Comparando los resultados con los de Giannechini *et al.*, 2014 existe coincidencia con la sensibilidad a penicilina y si bien no la hay en cuanto a resistencia a eritromicina y tetraciclina, estos autores reportaron respuestas intermedias que podrían derivar en un eventual posterior desarrollo de resistencia a estos antibióticos.

A su vez, algunas de las cepas *S. uberis* exhibieron resistencia a más de uno de los antibióticos evaluados, específicamente a penicilina y tetraciclina (1) y a eritromicina y tetraciclina (1), fenómeno que también fue encontrado por Minst *et al.*, 2012 aunque en valores mayores.

De acuerdo a estos resultados la penicilina seguiría siendo un tratamiento efectivo contra estos patógenos frente a tetraciclina y eritromicina los cuales mostraron respuestas de menor efectividad principalmente para *S. dysgalactiae*. La presencia de cepas con respuestas de resistencia tanto a antibióticos individuales como a varios de estos da una señal de alerta para el futuro tratamiento de esta enfermedad y para la administración de estos principios.

## Conclusiones

- 1) Se estandarizó una Multiplex PCR que permitió la identificación de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* y se determinó su especificidad y utilizando cepas de referencia.
- 2) Mediante multiplex PCR se identificaron 116 cepas de *Streptococcus spp* aisladas de muestras de leche mastítica.
- 3) La especie prevalente fue *S. uberis*, seguida por *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae*.
- 4) Los resultados obtenidos solo coincidieron en 31% de los aislados con los de la identificación fenotípica.
- 5) La determinación de los distintos perfiles de resistencia fenotípica a antibióticos evidenció que la mayoría de las cepas analizadas eran sensibles a penicilina y eritromicina y en menor proporción a tetraciclina.
- 6) Algunas cepas presentaron resistencia a eritromicina y tetraciclina, siendo algunas de ellas resistentes también a otros antibióticos (penicilina+tetraciclina y eritromicina+tetraciclina).

## **Perspectivas**

Para continuar y ampliar en la línea de trabajo sería muy oportuno realizar una evaluación con mayor cantidad de muestras provenientes de distintos laboratorios del país. De esta manera sería posible evaluar de forma más significativa los resultados de identificación a nivel país. Por otro lado, si nos enfocamos en la Multiplex PCR como herramienta de diagnóstico cotidiano se podría ajustar la técnica para realizarla directamente a partir de muestras de leche y no de aislados bacterianos. De esta forma se optimizarían los tiempos de diagnóstico a 24 hs. Por último, sería oportuno poner a punto una técnica de Multiplex PCR que abarque más de un género de patógeno haciendo mucho más efectivo y rápido el diagnóstico.

## **Difusión**

Los datos preliminares se difundieron en las XI Jornadas técnicas veterinarias realizado en la Facultad de Veterinaria-UdelaR y en la Red Latinoamericana de investigación en Mastitis (RELIM) en la ciudad de La Plata-Argentina.

## Bibliografía

- Almeida, R. A., Luther, D. A., Park, H. M., & Oliver, S. P. (2006). Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.005>
- Ashraf, A., Imran, M., Yaqub, T., Tayyab, M., Shehzad, W., & Thomson, P. C. (2017). A novel multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically significant bacterial pathogens associated with bovine mastitis. *Molecular and Cellular Probes*, 33, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2017.03.004>
- Bedolla, C., Catañeda, H., & Wolter, W. (2007). Métodos de detección de la mastitis bovina. *Redvet*, 9, 265–270. [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infecciosas/bovinos\\_leche/12-mastitis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/12-mastitis.pdf)
- Brayan Markey, et. al. (2013). *Microbiology, Clinical Veterinary*.
- Brown, J., Farnsworth, R., Wannamaker, L. W., & Johnson, D. W. (1974). CAMP factor of group B streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows. *Infection and Immunity*, 9(2), 377–383. <https://doi.org/10.1128/iai.9.2.377-383.1974>
- CLSI. (2020). *CLSI VET01S*. <http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI VET01S ED5:2020&xormat=SPDF&src=BB>
- Font, V., Fern, J., Bianchi, M., Le, F. De, & Ortiz, A. (2020). *Anuario DIEA*. 255. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario-estadístico-de-diea-2019>
- Gianneechini, E. Parietti and De María, P. (2002). Evaluación de pérdidas económicas relacionadas a mastitis para establecimientos lecheros en Uruguay. *Director*.
- Gianneechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil, J., Salvarrey, L., & Rivero, R. (2014). Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *Veterinaria*, 50(193), 111–132.
- Gianneechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., & Moreno López, J. (2002). Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(4), 221–230. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-221>
- INALE. (2017). *Uruguay lechero*. <https://www.inale.org/uruguay-lechero/%0Ahttps://www.inale.org/uruguay-lechero/%0Ahttp://www.inale.org/innovaportal/v/3204/4/innova.front/uruguay-lechero.html>
- Jiang, M., Babiuk, L. A., & Potter, A. A. (1996). Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. *Microbial Pathogenesis*, 20(5), 297–307. <https://doi.org/10.1006/mpat.1996.0028>
- Kabelitz, T., Aubry, E., van Vorst, K., Amon, T., & Fulde, M. (2021). The role of streptococcus spp. In bovine mastitis. *Microorganisms*, 9(7), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>
- Kaczorek-Łukowska, E., Małaczewska, J., Wójcik, R., Naumowicz, K., Blank, A., & Siwicki, A. K. (2021). Streptococci as the new dominant aetiological factors of mastitis in dairy cows in north-eastern Poland: analysis of the results obtained in 2013–2019. *Irish Veterinary Journal*, 74(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13620->

- Kalin, R., Karahan, M., Acik, M. N., Tasdemir, B., & Cetinkaya, B. (2017). Mastitisli inek sütlerinde önemli patojenlerin direkt tespiti için bir multipleks PCR yönteminin geliştirilmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(6), 925–931. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2017.17995>
- Katz, G., Merin, U., Bezman, D., Lavie, S., Lemberskiy-Kuzin, L., & Leitner, G. (2016). Real-time evaluation of individual cow milk for higher cheese-milk quality with increased cheese yield. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4178–4187. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10599>
- Liu, C., Feng, J., Zhang, D., Xie, Y., Li, A., Wang, J., & Su, Y. (2018). Clustering analysis of antibiograms and antibiogram types of streptococcus agalactiae strains from Tilapia in China. *Microbial Drug Resistance*, 24(9), 1431–1439. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0350>
- McDougall, S., Arthur, D. G., Bryan, M. A., Vermunt, J. J., & Weir, A. M. (2007). Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *New Zealand Veterinary Journal*, 55(4), 161–170. <https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36762>
- MGAP. (2013). *MGAP Decreto 359/013 Artículo 6*. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-originales/359-2013/6>
- Minst, K., Märtilbauer, E., Miller, T., & Meyer, C. (2012). Short communication: Streptococcus species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 6957–6962. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5852>
- MUNCH-PETERSEN, E., & CHRISTIE, R. (1945). Further notes on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 23, 193–195. <https://doi.org/10.1038/icb.1945.30>
- Odierno, L., Calvino, L., Traverssa, P., Lasagno, M., Bogni, C., & Reinoso, E. (2006). Conventional identification of Streptococcus uberis isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3886–3890. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72431-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72431-6)
- P. Smith, B. (2015). *Large Animal Internal Medicine*, Elsevier (Fifth Edit).
- Raemy, A., Meylan, M., Casati, S., Gaia, V., Berchtold, B., Boss, R., Wyder, A., & Graber, H. U. (2013). Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-53>
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., & Lagacé, J. (2001). Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2584–2589. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2584-2589.2001>
- Santo, C., & Ferreira, E. (2014). Impacto de infraestructura de la calidad en la cadena láctea en Uruguay. In *Midiendo el impacto de la infraestructura de la calidad en América Latina: experiencias, alcances y limitaciones*.
- Thermo Scientific, D. (2012). NanoDrop Lite: Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. *Protocols and Product Manuals*, T123, 1.
- Vásquez, J. A., Novoa, C. F., & Carulla, J. E. (2014). EFECTO DEL RECUESTO DE

CÉLULAS SOMÁTICAS SOBRE LA APTITUD QUESERA DE LA LECHE Y EN LA CALIDAD FÍSICOQUÍMICA Y SENSORIAL DEL QUESO CAMPESINO.  
*Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 61(2), 171–185.  
<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v61n2.44680>

Zadoks, R. N., & Watts, J. L. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.012>