



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTRATEGIAS PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
MASTITIS BOVINA: DETECCIÓN AMPLIADA DE PATÓGENOS Y
SU APLICACIÓN PRÁCTICA**

LETICIA MARÍA DIANA SÁNCHEZ

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY
2024**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTRATEGIAS PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
MASTITIS BOVINA: DETECCIÓN AMPLIADA DE PATÓGENOS Y
SU APLICACIÓN PRÁCTICA**

LETICIA MARÍA DIANA SÁNCHEZ

TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Rodrigo Puentes
Director de Tesis

AÑO
2024

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dr. Joaquín Barca; DMV. PhD. Medicina preventiva y epidemiología. Dpto. ciencia y tecnología de la leche. Laboratorio de endocrinología- Facultad de Veterinaria UdelaR

Dr. Herman Barkema; DMV. PhD. Epidemiology of Infectious Diseases. Universidad de Calgary-Canadá

Dr. Marcos Veiga; DMV. PhD. Departamento de Nutrición y Producción Animal-Universidad de Sao Paulo (FMVZ-USP).

**AÑO
2024**



Centro de Posgrados y Educación Permanente
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE DOCTORADO

ORIENTACIÓN: Doctorado en Producción Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 07/06/2024

TRIBUNAL: Dr. Joaquin Barca (presidente), Dr. Herman Barkema - University of Calgary (Canada), Dr. Marcos Veiga - Universidade de Sao Paulo (Brasil)

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4276724-2	DIANA SÁNCHEZ, LETICIA MARÍA	B.B.B	6

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

DCV. MSc. PhD. Joaquín Barca

Herman W. Barkema, DVM PhD FCAHS

Marcos Veiga dos Santos, DVM PhD

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Veterinaria que en el año 2012 me abrió sus puertas para comenzar este camino docente en la formación de los futuros Veterinarios. Espero poder seguir aportando mi conocimiento por varios años más.

Al Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la Beca de Doctorado otorgada y la financiación de un proyecto del Fondo María Viñas que aportó gran parte del sustento económico para el desarrollo de esta tesis.

A la Comisión Sectorial de Investigación científica (CSIC) y la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC) por la financiación de proyectos CIDEC y PAIE que también aportaron recursos para la realización de esta tesis.

A la Dra. Virginia Diana y el Dr. Andrés López por colaborar con las muestras y cepas.

A los integrantes del tribunal por aceptar evaluar esta tesis y por los aportes brindados en la defensa de la misma.

A la Dra. Elena de Torres por estar siempre con la palabra justa y siempre presente frente a dudas y consultas del tema que se iban presentando.

A mi tutor Rodrigo Puentes que siempre, desde cerca o de lejos, supo como guiarme en los buenos y en los malos momentos.

A todos mis compañeros de la Unidad de Microbiología que siempre estuvieron en este trayecto, los que están desde el principio y los que se incorporaron recientemente.

A todos mis compañeros del Departamento de Patobiología en especial a aquellos que me “presentó” la mudanza compartiendo un montón de cosas académicas y personales.

A los estudiantes que mediante sus tesis de grado aportaron de manera significativa a los resultados de este doctorado y con los que compartí montón de charlas, discusiones y la felicidad de verlos terminar sus carreras, Lucas, Nico y Pablo.

A Eli que siempre estuvo y juntas codo a codo vamos transitando desde el 2017 este mundo científico. Vendrán cosas maravillosas.

A mi familia, mi mamá y mis hermanos que me enseñaron que siempre se puede y que uno tiene que hacer lo que a uno le gusta y lo hace feliz.

A mis hijos, Tomas y Manuel, que son lo más lindo que me pasó en la vida y me llena de felicidad mostrarles que con estudio y esfuerzo se llega siempre a la meta. Los amo más que a nada en el mundo.

Finalmente al amor de mi vida, Andrés que siempre me incentivó para terminar y estuvo ahí cuando lo necesité. Brindando su conocimiento científico, una palabra de aliento, largas charlas científicas y de las otras, los viajes de sábado a la nueva sede, que más decirte que gracias y que te amo profundamente.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	ii
RESUMEN.....	iv
SUMMARY	v
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	2
2.1 PRODUCCIÓN LECHERA EN EL MUNDO	2
2.2 PRODUCCIÓN LECHERA EN EL URUGUAY	2
2.2 MASTITIS	3
2.2.1 ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS.....	4
2.2.1.1 PATÓGENOS MAYORES Y MENORES	4
2.2.1.2 PATÓGENOS AMBIENTALES	4
2.2.1.3 PATÓGENOS CONTAGIOSOS.....	5
2.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA MASTITIS EN EL MUNDO Y EN NUESTRO PAÍS	5
2.2.3. DIAGNÓSTICO DE MASTITIS.....	6
3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	12
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
4.1 Hipótesis	13
4.2 Objetivo general	13
4.3 Objetivos específicos	13
5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	14
5.1 Capítulo 1:.....	15
5.2 Capítulo 2:.....	30
Resumen	30
Introducción.....	30
Materiales y Métodos	33
Resultados	34
Discusión	37
BIBLIOGRAFÍA.....	39
5.3. Capítulo 3:.....	43
5.4 Capítulo 4:.....	62

Introducción.....	62
Objetivo general	63
Objetivos específicos:	64
Materiales y métodos	64
Resultados	66
Discusión	70
6. CONCLUSIÓN FINAL	73
7. PERSPECTIVAS	74
8. BIBLIOGRAFÍA.....	74

RESUMEN

La producción mundial de lácteos es esencial para la alimentación humana y constituye una parte importante de la disponibilidad global de productos derivados de la leche. Aproximadamente 150 millones de hogares en el mundo están dedicados a la producción de leche. En Uruguay, la actividad lechera utiliza solo el 5% de la tierra agrícola y contribuye con el 9% del valor bruto de la producción agrícola del país. A pesar de esto, el sector lácteo genera la mayor parte de los ingresos por exportación por hectárea, exportando el 70% de su producción lechera a más de 60 países, incluidos Argelia, Brasil y Rusia, en forma de leche en polvo, queso y manteca. Los sistemas de producción actuales enfrentan desafíos relacionados al mantenimiento de la intensificación de la producción de manera sostenible a largo plazo. La mastitis es una de las enfermedades más prevalentes en la industria láctea a nivel mundial y la principal causa de pérdidas económicas para los productores de leche. Un diagnóstico adecuado de la mastitis es crucial, ya que permite implementar medidas de control y tratamiento eficaces, asegura la calidad de la leche, promueve el bienestar animal y protege la salud pública. El método de referencia recomendado por el National Mastitis Council (NMC) para el diagnóstico de mastitis y la identificación de patógenos bacterianos es el cultivo microbiológico. El propósito principal de esta tesis fue evaluar la eficacia de técnicas moleculares, específicamente la PCR en tiempo final y la PCR digital en gotas, en el diagnóstico de mastitis bovina y comparar su sensibilidad y especificidad con los métodos de cultivo convencionales. Se comenzó con la estandarización de un método de PCR digital en gotas (ddPCR) para identificar y cuantificar dos patógenos significativos, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* (Artículo I). Los resultados de este primer trabajo indicaron que la ddPCR podría ser una herramienta útil para diagnosticar mastitis precozmente, incluso cuando las cargas bacterianas son muy bajas. Posteriormente, se desarrolló una técnica de PCR tiempo final múltiplex para la identificación específica de diversas especies de *Streptococcus* utilizando cultivos bacterianos, aplicando luego este método para identificar cepas en casos de mastitis (Artículo II-en revisión). Se encontraron diferencias significativas entre las identificaciones de patógenos mediante técnicas moleculares y métodos fenotípicos. Finalmente, se analizaron muestras de leche de animales con mastitis clínica y cultivos negativos, identificando diferentes patógenos mediante PCR. Cabe destacar que la detección de bacterias pertenecientes a la Clase *Mollicutes* (*Myco/Acholeplasma*) dejó la puerta abierta para continuar las investigaciones en este terreno que aún no ha sido explorado en nuestro país.

En resumen, esta tesis presenta dos herramientas valiosas para la producción lechera y el diagnóstico de la mastitis bovina, abriendo el camino para futuras estrategias de control y tratamiento de esta enfermedad.

SUMMARY

The global production of dairy products is essential for human nutrition and constitutes a significant part of the global availability of milk-derived products. Approximately 150 million households worldwide are dedicated to milk production. In Uruguay, dairy farming uses only 5% of the agricultural land and contributes 9% to the country's gross agricultural production value. Despite this, the dairy sector generates the majority of export revenues per hectare, exporting 70% of its dairy production to over 60 countries, including Algeria, Brazil, and Russia, in powdered milk, cheese, and butter. Current production systems face challenges in maintaining production intensification sustainably over the long term. Mastitis is one of the most prevalent global diseases in the dairy industry and the main cause of economic losses for milk producers. An adequate diagnosis of mastitis is crucial, as it allows for the implementation of effective control and treatment measures, ensures milk quality, promotes animal welfare, and protects public health. The microbiological culture is the reference method recommended by the National Mastitis Council (NMC) for diagnosing mastitis and identifying bacterial pathogens. The main purpose of this thesis was to evaluate the efficacy of molecular techniques, specifically end-point PCR and droplet digital PCR, in diagnosing bovine mastitis and comparing their sensitivity and specificity with conventional culturing methods. The standardization of a droplet digital PCR (ddPCR) method began to identify and quantify two significant pathogens, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* (Article I). The results of this initial work indicated that ddPCR could be a useful tool for diagnosing mastitis early, even when bacterial loads are very low. Subsequently, a multiplex end-point PCR technique was developed for the specific identification of various *Streptococcus* species using bacterial cultures, later applying this method to identify strains in mastitis cases (Article II-in revision). Significant differences were found between the identifications of pathogens by molecular techniques and phenotypic methods. Finally, milk samples from animals with clinical mastitis and negative cultures were analyzed, identifying different pathogens using PCR. It is noteworthy that the detection of bacteria belonging to the Class *Mollicutes* (*Myco/Acholeplasma*) left the door open to continue investigations in this field that have not yet been explored in our country. In summary, this thesis presents two valuable tools for dairy production and the diagnosis of bovine mastitis, paving the way for future control and treatment strategies for this disease.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Figura 1: Resumen del proceso de diagnóstico de la mastitis bovina

Figura 2: Representación esquemática de los diferentes patrones de liberación por la ubre que pueden tener algunos patógenos causantes de mastitis.

CAPÍTULO 2

Tabla 1: Primers publicados por Riffon et al. (2001) para la identificación de *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *S. agalactiae* mediante PCR múltiplex.

Figura 1: Amplificación mediante multiplex PCR para testear la especificidad de los primers de la Multiplex PCR puesta a punto.

Figura 2: Sensibilidad analítica de la múltiplex PCR a partir de diluciones seriadas en base 10 de la mezcla de ADN de las tres especies

Figura 3: Identificación mediante la múltiplex PCR de 9 cepas de campo aisladas de leche pertenecientes al cepario del laboratorio de Microbiología

CAPÍTULO 4

Tabla 1: Primers utilizados para la identificación de *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *Mollicutes* (*Myco/Acheloplasma*) mediante PCR.

Figura 1: Porcentaje de cepas negativas y positivas por PCR para los patógenos en general

Figura 2: Porcentaje de muestras positivas por PCR para cada patógeno en el total de muestras positivas.

Figura 3: Porcentaje de muestras positivas para cada patógeno tanto en infecciones únicas como mixtas.

Tabla 2: Resultados de la identificación mediante secuenciaciones de *Mollicutes*

Artículos científicos publicados en el marco de la tesis doctoral

Diana L, Traglia G, Diana V, Calvinho L, Laporta J, Iriarte A and Puentes R (2024). Duplex droplet digital PCR detection of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae*, major etiological agents of bovine mastitis. *Frontiers in Animal Science*. Sci. 4:1336816. doi: 10.3389/fanim.2023.1336816.

Artículos científicos generados en el marco de la tesis doctoral y que se encuentran en revisión.

Diana L, Mastroianni L and Puentes R. (2024) “Resultados contradictorios en la identificación fenotípica y molecular de cepas de *Streptococcus spp.* en cepas aisladas de casos de mastitis bovina” Revista Argentina de Microbiología. ELSEVIER. EN PRENSA

Poster en congresos publicados con resultados de la tesis doctoral

Mastroianni Lucas; **Diana Leticia**, Diana Virginia. “Puesta a punto de una Multiplex PCR para la identificación de Streptococcus aislados de casos de mastitis bovina: ¿vamos por el camino correcto en el diagnóstico de estos agentes?”, XI Jornadas técnicas Veterinarias 2019.

Mastroianni Lucas; **Diana Leticia**, Diana Virginia. “Puesta a punto de una Multiplex PCR para la identificación de Streptococcus aislados de casos de mastitis bovina: ¿vamos por el camino correcto en el diagnóstico de estos agentes?”, V Reunion del RELIM 2019, La Plata Argentina.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes y prevalentes que afectan al ganado lechero y por lo tanto genera gran impacto en lo que es la producción láctea. Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas por lo que su correcto diagnóstico se ha convertido en un pilar fundamental para el control y manejo de los animales que la padecen. La importancia de avanzar en los métodos de diagnóstico se centra en la necesidad de poder determinar los agentes etiológicos causantes y realizar tratamientos adecuados así como también poder tener conocimiento más preciso de la epidemiología de la enfermedad en los tambos.

Tradicionalmente el diagnóstico de la mastitis se basa en la observación de signos clínicos, recuento de células somáticas y la realización de cultivos microbiológicos para detectar e identificar específicamente al microorganismo presente. Uno de los problemas principales en relación al diagnóstico de la mastitis es el amplio porcentaje de cultivos sin crecimiento que se obtienen al momento de realizar el diagnóstico (Kour et al. 2023). Esto puede ocurrir debido a muchos factores, uno de ellos puede ser las limitaciones en la sensibilidad de la prueba utilizada. Algunas pruebas no son lo suficientemente sensibles para detectar niveles bajos de infección. Una toma de muestra incorrecta o insuficiente puede llevar a un resultado negativo. Esto puede deberse a una mala técnica de muestreo, contaminación de la muestra o que la muestra se tomó en una etapa de la enfermedad donde la concentración de los patógenos o células somáticas es baja (Britten et al. 2012). En etapas tempranas de la enfermedad los cambios en la leche o en la ubre pueden no ser evidentes y los patógenos pueden estar presentes en bajas concentraciones imposibles de detectar por los métodos clásicos de diagnóstico, como por ejemplo el cultivo microbiológico. La mastitis puede variar considerablemente en su presentación entre diferentes animales y bajo diferentes condiciones. Algunas vacas pueden tener una respuesta inmunitaria que minimiza los signos clínicos y los cambios en la leche, lo que dificulta la detección mediante métodos convencionales. Finalmente si la muestra no se maneja o almacena correctamente, puede degradarse o contaminarse, lo que podría afectar negativamente la precisión del resultado del diagnóstico (Chakraborty et al. 2019).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 PRODUCCIÓN LECHERA EN EL MUNDO

La producción global de productos lácteos juega un papel fundamental en la nutrición humana, siendo una contribución significativa a la oferta mundial de alimentos derivados de la leche. En el mundo, aproximadamente el trabajo de 150 millones de hogares está destinado a la producción lechera (FAO, 2023). Este sector abarca desde pequeñas explotaciones locales hasta complejas instalaciones industriales. La leche y sus derivados representan una fuente esencial de nutrientes para millones de personas en todo el mundo, proporcionando proteínas, vitaminas y minerales esenciales. Más allá de su valor nutricional, la producción láctea desempeña un papel económico crucial en numerosos países, generando empleo, contribuyendo al comercio internacional y produciendo ganancias relativamente rápidas para los pequeños productores (Faye & Konuspayeva, 2012).

En las últimas décadas la producción lechera ha crecido considerablemente a nivel mundial especialmente en los países subdesarrollados. Esto no se relaciona específicamente a la productividad del animal individual sino al aumento de la cantidad de animales destinados a la producción. Los países subdesarrollados presentan algunas dificultades en la producción láctea relacionadas principalmente a los recursos de nutrientes para los animales, presencia de enfermedades y el acceso limitado al mercado y algunos servicios por parte de los productores. Diferente es lo que ocurre en algunos países desarrollados que no presentan estas problemáticas, pero no tienen las condiciones climáticas para el desarrollo de la producción lechera (FAO, 2023).

La India es el mayor productor mundial de leche, con el 22% de la producción total, seguido por los Estados Unidos de América, China, Pakistán y Brasil (FAO, 2023). Desde la década del '70, el aumento de la producción lechera se registra en su mayor parte en Asia meridional, que es el principal impulsor del crecimiento de este tipo de producción en el mundo en desarrollo, mientras que la producción lechera en África crece más lentamente que en otras regiones en desarrollo debido a la pobreza y en algunos países, a las condiciones climáticas adversas. Los países que encabezan la lista en cuanto a superávit de leche incluyen a Nueva Zelanda, Estados Unidos, Alemania, Francia, Australia e Irlanda mientras que China, Italia, Rusia, México, Argelia y Indonesia son los que presentan mayores déficits (FAO, 2023).

2.2 PRODUCCIÓN LECHERA EN EL URUGUAY

En el Uruguay la producción láctea ocupa un 5% de la superficie agropecuaria y representa el 9% del valor bruto de la producción. Sin embargo, el sector lácteo es el que cuenta con mayores ingresos de exportación por hectárea, exportando el 70% de la leche producida a más de 60 países como Argelia, Brasil y Rusia en forma de leche en polvo, queso y manteca. Nuestro país cuenta con más de 3100 productores lecheros y un tambo promedio tiene aproximadamente 150 vacas en ordeño produciendo 18 litros de leche diarios. Actualmente

el sistema de alimentación combina el pastoreo a cielo abierto y la suplementación con concentrado energético y forrajes conservados (INALE, 2023).

En el año 2020, las exportaciones del sector lácteo alcanzaron una cifra superior a los 690 millones de dólares, representando un 8% del total de las exportaciones nacionales (CERES, 2021).

El aumento en la producción de leche nacional ha sido notorio en las últimas décadas. Según la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) la producción láctea presentó un aumento de un 52% en los últimos 15 años, pasando de 1.3 a 2 millones de litros por año. Sin embargo, el número de tambos se redujo en un 31%, pasando de 5.1 a 3.9 miles de tambos generando de esta manera una gran intensificación en la producción (MGAP, 2023). Estos cambios han llevado a que los sistemas productivos enfrenten actualmente nuevas problemáticas en el intento de que esta intensificación sea sostenible en el tiempo.

2.2 MASTITIS

La mastitis es reconocida como una de las enfermedades más comunes en la industria láctea a nivel global, además, se destaca como la causa principal de pérdidas económicas para los productores lecheros en el mundo (Halasa et al. 2007). Las pérdidas económicas por esta enfermedad se ven reflejadas directamente en la producción por la reducción de la calidad de la leche, descarte por presencia de residuos de antibióticos, e indirectamente por el sacrificio prematuro de vacas lecheras y el costo de reposición, el bajo precio de venta de los animales, los costos asociados al tratamiento y los gastos asociados al diagnóstico (Halasa et al. 2007; Azooz et al. 2020; Sharun et al. 2021).

La mastitis bovina se define como la inflamación del parénquima de la glándula mamaria debida a varios factores, entre ellos, la colonización de la misma por algún microorganismo especialmente bacterias (Middleton et al. 2014). La salud de la ubre puede evaluarse a través del recuento de células somáticas (SCC, por su sigla en inglés). Un SCC que supera las 200,000 células/ml en vacas multíparas y 100,000 células/ml para vacas primíparas es un indicador de la presencia de infección en el cuarto mamario (Harmon, 2001).

Puede clasificarse según las características clínicas en mastitis clínica o mastitis subclínica dependiendo de los síntomas, duración y el agente patógeno causante de la misma (Kour et al. 2023). Teniendo en cuenta los síntomas observados, la mastitis clínica se manifiesta con un inicio súbito acompañado de enrojecimiento, aumento de tamaño en la ubre y calor permitiendo un diagnóstico relativamente fácil. La leche proveniente de un cuarto afectado muestra alteraciones, como la presencia de grumos o coágulos y puede adquirir una consistencia acuosa. Algunos animales pueden presentar síntomas más generalizados como hipertermia, anorexia y depresión e incluso, en los casos más extremos puede terminar con la muerte del animal (Cobirka et al. 2020). Por otro lado, la mastitis subclínica se caracteriza por la ausencia de sintomatología visible tanto en la leche como en el animal haciéndola de difícil diagnóstico. Esta presentación de la mastitis se relaciona a un aumento de las células somáticas y disminución de la producción de la leche, así como también juega un rol fundamental en la propagación de los patógenos dentro del rodeo por ser “silenciosa”, de mayor duración y más frecuente (Cobirka et al. 2020).

En relación a la etiología, las causas infecciosas son las más comunes, hasta la actualidad se han descrito más de 200 microorganismos diferentes que pueden causar mastitis incluyendo hongos, levaduras, virus y bacterias (Ashraf & Imran, 2018; Morales-Ubaldo et al. 2023). Sin embargo, está ampliamente reportado que la mayoría de los casos de mastitis están asociados a infecciones bacterianas. Los patógenos bacterianos causantes de mastitis pueden clasificarse en diferentes categorías: bacterias contagiosas, ambientales y oportunistas (Ruegg, 2017).

2.2.1 ETIOLOGÍA DE LA MASTITIS

La mastitis es una enfermedad multifactorial en la cual participan la interacción vaca-ubre, el ambiente y los patógenos. En relación a estos últimos tanto hongos, virus o bacterias pueden causar alteraciones en la glándula mamaria llevando a la aparición de la enfermedad. Se han reconocido más de 150 especies bacterianas distintas, abarcando tanto bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas, como agentes etiológicos de la mastitis. Estas pueden ser categorizadas en dos grupos principales: contagiosas y ambientales. Aquellas clasificadas como contagiosas están vinculadas específicamente a la glándula mamaria, siendo capaces de transmitirse de una ubre infectada a otra sana. Por otro lado, las bacterias clasificadas como ambientales están asociadas al entorno circundante del animal (Cobirka et al. 2020).

2.2.1.1 PATÓGENOS MAYORES Y MENORES

Una forma de categorizar los agentes causantes de mastitis es mediante la distinción entre patógenos mayores y menores según la severidad de los efectos que provocan en la glándula mamaria. Los patógenos mayores incluyen al *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Streptococcus spp.*, *Prothoteka spp.*, *Nocardia spp.*, *Klebsiella spp.*, coliformes, levaduras, y Gram negativos no coliformes (Heikkilä et al. 2018). Este tipo de patógenos producen significativos cambios en la composición de la leche, incluyendo un aumento en el recuento de células somáticas (SCC) generando así un mayor impacto económico (Schepers et al. 1997).

Por otro lado, los patógenos considerados menores son *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) y *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*). Las infecciones provocadas por estos microorganismos solo resultan en una inflamación moderada y un aumento del SCC de dos a tres veces más que una ubre sana. Las infecciones causadas por patógenos menores están menos frecuentemente asociadas a casos de mastitis clínica con cambios en la composición de la leche o una disminución drástica de la producción (Harmon, 1994).

2.2.1.2 PATÓGENOS AMBIENTALES

Cuando la mastitis es producida por patógenos que se encuentran en el ambiente del animal se la conoce como mastitis ambiental. En general los patógenos que se consideran ambientales son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*,

Pseudomonas sp, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. Estos se propagan a través de diversas vías, no solo mediante la leche contaminada proveniente de vacas infectadas o la falta de higiene durante el proceso de ordeño, sino también mediante la cama, las heces, la orina, agua estancada y otros agentes contaminantes (restos de silo, agujas y cánulas de uso intramamaria contaminadas) (Ashraf & Imran, 2020; Cobirka et al. 2020). En contraste, los SCN conforman un conjunto bacteriano que incluye especies como *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus* y *S. simulans*, que predominantemente residen en la piel. Sin embargo, en este grupo también se encuentran *S. xylosus* y *S. sciuri* que se desarrollan principalmente en el entorno del animal. Por esta razón, los SCN no son clasificados ni como ambientales ni como contagiosos (Nascimento et al. 2005). Finalmente es importante destacar que el conducto del pezón puede permanecer abierto durante una o dos horas después del proceso de ordeño por lo que entre ordeños, el extremo del pezón queda continuamente expuesto a patógenos presentes en el entorno (Jones, 2011).

2.2.1.3 PATÓGENOS CONTAGIOSOS

Los patógenos que son capaces de transmitirse de un cuarto infectado a otro sano principalmente durante el ordeño son clasificados como contagiosos. Ellos son por excelencia el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp* y *Mycoplasma spp* (Cobirka et al. 2020). Es importante destacar que si bien los *Streptococcus uberis* y *dysgalactiae* se lo clasifica como ambiental se han descrito cepas que tienen capacidad de comportarse como contagiosas sobreviviendo en la glándula mamaria por largos períodos de tiempo (Garcia, 2004; Davies et al. 2016).

2.2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA MASTITIS EN EL MUNDO Y EN NUESTRO PAÍS

A nivel mundial siempre se ha reconocido al *S. aureus* como el agente más común causante de mastitis bovina seguido de las especies de SCN y *E. coli*. Sin embargo, los datos de prevalencia de los diferentes patógenos pueden variar con la aparición de brotes específicos, así como también según el país, el continente e incluso diferentes regiones geográficas del mismo país (Ashraf & Imran, 2020). La prevalencia a nivel mundial de algunos patógenos específicos como *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Escherichia coli* fue estimada mediante meta-análisis en el 2021 por un grupo de investigadores de India (Krishnamoorthy et al. 2021). En este trabajo se incluyeron trabajos publicados entre 1979 – 2019 siendo un total de 156 trabajos de relevancia de *Staphylococcus*, 129 de *Streptococcus* y 92 de *E. coli*. Los resultados obtenidos indicaron que la prevalencia a nivel mundial de *Staphylococcus* es del 28%, de *Streptococcus* 12% y de *E. coli* 11% (Krishnamoorthy et al. 2021). Otro resultado que arroja este trabajo indicó que la prevalencia más alta de *Staphylococcus* fue en América Latina mientras que en Oceanía se determinó la mayor prevalencia de *Streptococcus* y de *E. coli* (Krishnamoorthy et al. 2021).

Calvinho & Tirante (2005) llevaron a cabo un análisis regional sobre la prevalencia de patógenos de mastitis clínica en Argentina, revelando que un estudio de los años 80 en la cuenca del Valle de Lerma, Salta, mostró prevalencias de 29,5% para *S. aureus*, 11,1% para

Str. agalactiae y 12,5% para *E. coli*. Por otro lado, en el área de Gran Buenos Aires se determinaron prevalencias de 15,9% para *Str. agalactiae*, 9,7% para *S. aureus*, 6,6% para *S. epidermidis* y 5,5% para otras especies de *Streptococcus* (Calvinho, 2005).

Otras investigaciones realizadas en la provincia de Buenos Aires, indicaron que *S. aureus* estaba presente en el 80% de los rebaños estudiados y *Str. agalactiae* en el 12,3%. De las muestras con cultivo positivo, el 29% correspondía a *S. aureus* y el 39,6% a diversas especies de *Streptococcus* (Chertcoff et al. 2001).

Un estudio realizado en São Paulo y Minas Gerais en el 2015 posicionó a los *Streptococcus* ambientales como los más comúnmente aislados (26,7%), dentro de los cuales *Str. uberis* representó el 11,8%, *Str. dysgalactiae* el 9,4% y otros *Streptococcus spp.* el 5,44%. Por su parte las bacterias Gram negativas constituyeron el 24,2% de los casos de mastitis clínica, con *E. coli* (47,1%), *Klebsiella spp.* (16,54%) y *Citrobacter spp.* (11,54%) siendo las más frecuentes. *S. aureus* se encontró en el 7,2% de las bacterias Gram positivas y representó el 5,1% del total de muestras positivas. En general, las bacterias Gram positivas formaron el 70,5% de todos los cultivos positivos (Tomazi et al. 2015).

En nuestro país en 1999, Bouman et al. (1999) llevaron a cabo investigaciones que revelaron que, en muestras de vacas con mastitis clínica en los rodeos lecheros uruguayos, los patógenos más comúnmente aislados eran *Staphylococcus spp.*, presentando una prevalencia similar tanto en *S. aureus* (32%) como en SCN (28%).

En los años 2012 y 2013, investigaciones llevadas a cabo por De Torres et al. (2014) señalan que *S. aureus* continuó siendo el microorganismo más prevalente en muestras de leche de vacas con mastitis clínica (MC), con tasas de prevalencia del 34,6% en 2012 y 34,5% en 2013.

En el año 2014 en un trabajo realizado por Giannechini et al. (2014) también mostraba que *S. aureus* era el patógeno mayormente aislado de casos de MC en la cuenca lechera del litoral oeste (37,5%) y sur (23,1%). Sumado a esto también se determinó que, en la cuenca litoral sur, al *S. aureus* lo seguía en prevalencia el *Streptococcus dysgalactiae* (18,1%).

Un trabajo más reciente que fue llevado a cabo por Larumbe & Vidart (2016) utilizando una base de datos que recopila información de diversos laboratorios especializados en bacteriología de mastitis. Las muestras analizadas provinieron de las regiones de Paysandú, Río Negro, Colonia, Durazno, San José, Flores, Florida, Maldonado y Rocha. Los resultados de este trabajo volvieron a mostrar a *S. aureus* como el microorganismo más prevalente, tanto en el año 2014 como en el año 2015, con tasas de prevalencia del 27,5% y 28,8%, respectivamente. Finalmente, en el año 2022 se determinó que *Staphylococcus aureus* era el patógeno mayormente aislado de animales con mastitis subclínica en los tambos de Uruguay. Además, en muchos casos, este formaba parte de una infección mixta con SCN (De Los Santos et al. 2014).

2.2.3. DIAGNÓSTICO DE MASTITIS

El correcto diagnóstico de la mastitis es un aspecto fundamental de esta enfermedad ya que es crucial para poder desarrollar medidas de control y tratamiento efectivas, garantizar una buena calidad de la leche producida, así como promover el bienestar animal y salvaguardar

la salud pública.

En términos básicos, el proceso de diagnóstico de una enfermedad se divide en dos fases: la primera determina si la enfermedad está presente o no, como un indicativo de su estado y en la segunda, se identifica el agente que la provoca (Ashraf & Imran, 2018). Una descripción general simplificada del proceso diagnóstico para la mastitis en bovinos se ilustra en la Figura 1.

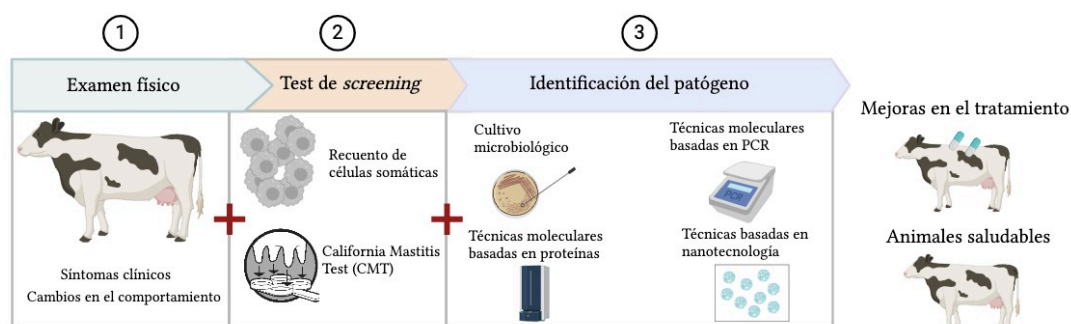


Figura 1: Resumen del proceso de diagnóstico de la mastitis bovina.

Dos términos que con frecuencia se utilizan para describir la calidad de un método de diagnóstico son la sensibilidad y la especificidad. La sensibilidad de una prueba es la probabilidad (expresada como un porcentaje) de que una prueba detecte un verdadero positivo, mientras que la especificidad es la probabilidad de que una prueba identifique correctamente un verdadero negativo.

Para determinar si la enfermedad está presente en el animal realiza un examen clínico de la ubre en el cual se observan síntomas como inflamación y cambios observables en la leche. En casos de mastitis severa se puede observar también fiebre, debilidad, deshidratación e inapetencia en especial, en casos de mastitis clínica o crónica (Royster & Wagner, 2015).

El diagnóstico inicial de los casos de mastitis subclínica, donde no se observan síntomas, es realizado mediante la estimación del número de células somáticas en la leche (Harmon, 1994). Una forma de estimar indirectamente este número en el tambo y al pie de la vaca es mediante la realización del California Mastitis test (CMT) (Schalm, 1957). Esta prueba se realiza añadiendo un detergente a la muestra de leche produciendo la lisis de las células somáticas presentes en ella liberando el contenido celular (ácido nucleico y otros constituyentes). La presencia de una gran cantidad de células somáticas resultará en la formación de un gel viscoso indicando alto conteo de las mismas. Sin embargo, este método de simple realización en el tambo presenta varias desventajas: está sujeto a resultados falsos positivos y negativos, es inespecífico del patógeno y no brindan un resultado numérico, sino que solamente indican alta o baja viscosidad (Smolenski et al. 2007; Viguier et al. 2009). Una manera de determinar directamente el número de células somáticas en la leche es utilizando un contador de células automático que determina el número de células utilizando citometría de flujo (Recuento de Células Somáticas) (SCC por la sigla en inglés). Es importante considerar que la sensibilidad y la especificidad del SCC para determinar una infección intramamaria es del 30-89% y 60 a 90% respectivamente (McDermott et al. 1983). Según Harmon (2001), un Recuento de Células Somáticas (SCC) considerado dentro de los

parámetros normales para vacas saludables generalmente no excede las 200,000 células/ml en vacas multíparas, mientras que, para las vacas primíparas, este recuento se mantiene por debajo de las 100,000 células/ml. Ninguna de las pruebas mencionadas previamente logra identificar el agente causal o la gravedad de la infección.

La técnica *Gold-standard* para el diagnóstico de la mastitis e identificación de los patógenos bacterianos recomendada por el National Mastitis Council (NMC) continúa siendo el cultivo microbiológico (NMC, 2017). En esta técnica de diagnóstico el objetivo es cultivar e identificar al menos una colonia de un solo organismo viable (unidad formadora de colonias [ufc]) y el diagnóstico se declara positivo cuando se dice que el organismo identificado es la causa de ese caso de mastitis. Resulta relevante examinar de manera independiente dos componentes cruciales del éxito en la detección del patógeno mediante cultivo: primero, la posibilidad de que una muestra obtenida contenga el patógeno buscado; y segundo, la capacidad del procedimiento de laboratorio para aislar y reconocer de manera acertada dicho patógeno (Britten, 2012). El cultivo microbiológico es una técnica que demanda mucho tiempo, es laboriosa, costosa y puede arrojar falsos negativos debido a que solamente detecta los microorganismos viables presentes en la muestra (Taponen et al. 2009; Viguiet et al. 2009). En varios trabajos se ha reportado que los cultivos de muestras de leche con mastitis pueden arrojar entre un 27 y un 50% de resultados falsos negativos (Makovec & Ruegg, 2003; Bradley et al. 2007; Koivula et al. 2007; Riekerink et al. 2008).

Uno de los factores que pueden afectar la capacidad del método de cultivo para el diagnóstico de mastitis son los patrones errantes de eliminación por la ubre que presentan algunos patógenos. Se ha reportado que inicialmente, al comienzo de la infección, existe un pico de liberación del patógeno por la ubre incrementando el número de bacterias liberadas que luego debido al proceso inflamatorio y la respuesta del sistema inmune disminuyen los niveles de liberación (Figura 2A) (Britten, 2012). Se ha descrito que para que el diagnóstico por cultivo sea exitoso debe existir una liberación de al menos 100 ufc/mL de leche (Britten, 2012). Uno de los patógenos que presenta un patrón de liberación por la ubre altamente variable es el *Staphylococcus aureus* haciendo que su detección por cultivo sea dificultoso, detectando en vacas infectadas artificialmente solo un 75% de cultivos positivos (Sears et al. 1990; Lam et al. 2009; Gundelach et al. 2011). Por otro lado, una vaca que presente una liberación de patógenos por debajo del nivel de detección del cultivo puede constituir un peligro para las demás en el rodeo, incluso con una diseminación tan reducida (Figura 2B) (Britten, 2012). En el futuro, esta condición podría llevar a nuevos episodios clínicos y a una diseminación intermitente que exceda el nivel de detección (Figura 2C) (Britten, 2012).

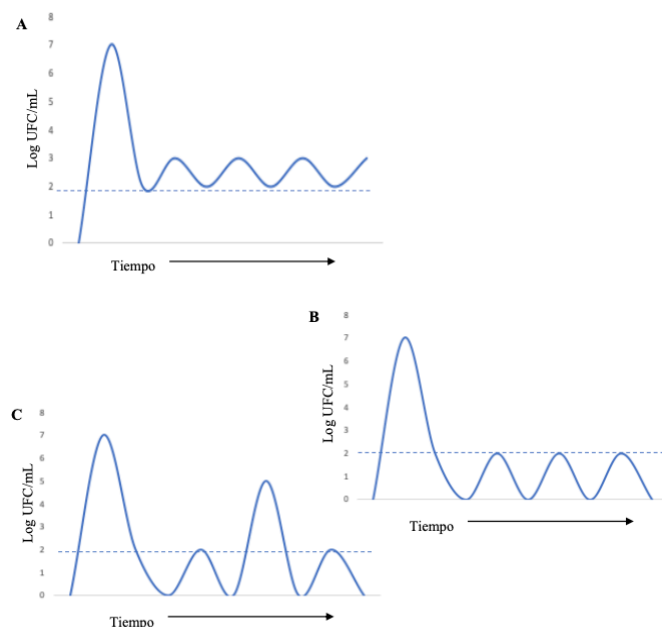


Figura 2: Representación esquemática de los diferentes patrones de liberación por la ubre que pueden tener algunos patógenos causantes de mastitis. La línea punteada indica el límite de detección del cultivo a partir de 10 μ L de muestra. A: Liberación típica de un episodio de mastitis. B: Liberación del patógeno por debajo del límite de detección de la técnica y C: Liberación intermitente con picos por arriba del umbral de detección.

Teniendo en cuenta la existencia de los problemas previamente mencionados a la hora de realizar el diagnóstico mediante cultivo, varios autores han propuesto varias soluciones a los mismos. Por un lado, Sears et. al. (1990) indicó que una posibilidad para lograr la detección de aquellos patógenos que presentan liberación variable es tomar una segunda muestra y repetir el cultivo. Por otro lado algunos autores indican que aumentar la cantidad de leche que se siembra de 10 a 100 μ L podría ser efectivo, así como también realizar una preincubación de la muestra de leche a 37°C durante 4 hs (Dinsmore et al. 1992).

En términos de sensibilidad y especificidad no debemos olvidar que en la técnica de diagnóstico por cultivo no solamente es importante el lograr aislar al microorganismo sino posteriormente identificarlo en lo posible a nivel de especie. Para poder lograr esto, la identificación se basa en la observación de la morfología de las colonias, características típicas de crecimiento y la metabolización de ciertos sustratos específicos (identificación fenotípica) (Zadoks & Watts, 2009). El éxito de la identificación fenotípica de los patógenos a nivel de especie a partir de un cultivo puro va a depender del esquema de identificación que elija el laboratorio y de la solvencia del analista a cargo del análisis. Existen numerosas galerías disponibles en el mercado destinadas a la identificación de una amplia gama de microorganismos. A pesar de basarse en principios similares, estas galerías varían en cuanto al número y la clase de análisis que las componen. Esta variabilidad se debe a que la elección de una galería específica depende estrechamente de las características metabólicas del género del microorganismo que se desea identificar. Por ejemplo, los dispositivos API® miniaturizados ofrecen una técnica veloz para la identificación de microorganismos

mediante la ejecución de diversas pruebas bioquímicas. Estos sistemas se componen de un conjunto de microtubos de plástico los cuales albergan una variedad de medios de cultivo deshidratados o sustratos enzimáticos específicos, seleccionados en función de la prueba bioquímica que se necesita implementar y que se inoculan con una suspensión de la bacteria a identificar. La interpretación de los resultados se realiza luego de la incubación correspondiente y observando los cambios de color que ocurren, comparando el color manifestado en cada microtubo contra un patrón establecido en el protocolo del fabricante. Basándose en esta comparación, es posible determinar si el resultado de cada prueba es positivo (+) o negativo (-). De estos resultados se obtiene un código numérico que se coloca en un software que indica la especie bacteriana identificada con el correspondiente porcentaje de identidad. En muchos países del mundo estas baterías comerciales tienen un costo elevado y su implementación va a depender de las posibilidades del laboratorio. Cuando no se utilizan estas baterías, las diferentes pruebas bioquímicas implementadas para cada género y especie bacteriana se realizan de forma casera a partir de los diferentes medios de cultivos en tubos de vidrio por ejemplo e interpretando los resultados mediante la utilización de diferentes tablas de identificación presentes en los manuales de diagnóstico microbiológico. Esto implica una mayor inversión de tiempo por parte del analista y preparados del laboratorio pudiendo retrasar el resultado de ese análisis.

Si bien el uso de estas galerías comerciales o una buena realización de las pruebas bioquímicas de manera convencional nos puede permitir llegar a la identificación de una especie bacteriana, está reportado que muchas especies presentan variabilidad entre diferentes cepas llevando a una identificación errónea del microorganismo (Zadoks & Watts, 2009).

Un ejemplo de esta problemática en la presencia de variabilidad en la capacidad de *S. aureus* para producir β -hemólisis. Se ha reportado que solo alrededor de un 65% de las cepas de *S. aureus* producen β -hemólisis llevando a una mala identificación de aquellas cepas que no la producen (Britten, 2012). Por otro lado, también existe una gran variabilidad dentro de las especies del género *Streptococcus* llevando a una identificación errónea de estas bacterias a nivel de especie (Raemy et al. 2013).

Identificar correctamente el organismo responsable de la mastitis ofrece numerosas ventajas, como el empleo selectivo de antibióticos, la disminución del riesgo de transmisión de la infección en caso de patógenos contagiosos y la toma de decisiones sobre el descarte de animales. En muestras que presentan más de un patógeno, el desarrollo de una especie bacteriana puede suprimir el crecimiento de otras especies y además, muchas especies bacterianas requieren un largo período de tiempo para crecer, como las bacterias de la clase *Mollicutes* (*Mycoplasma/Acholeplasma spp*).

Actualmente se han desarrollado diversas técnicas diferentes al cultivo bacteriano para el diagnóstico como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de su sigla en inglés), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA por su sigla en inglés) basadas en proteínas, detección de proteínas de fase aguda, PCR cuantitativa, espectrofotometría de masa (MALDI-TOF por su sigla en inglés), entre otras, implican altos costos debido a la necesidad de técnicos calificados, laboratorios e infraestructuras sofisticadas. Sin embargo, ofrecen grandes beneficios gracias a su alta precisión y especificidad para identificar los patógenos que causan mastitis, incluso distinguir entre subespecies, lo que permite un enfoque más

efectivo en el tratamiento minimizando las pérdidas económicas (Chakraborty et al. 2019). Particularmente la técnica de PCR, en sus diversas variantes, se ha consolidado como la metodología más investigada y empleada para el diagnóstico de mastitis, ya sea desde la muestra de leche directamente o en la identificación de una bacteria a nivel de especie desde el cultivo puro. Esta técnica se destaca por su rapidez, así como por su elevada sensibilidad y especificidad en la identificación de patógenos. La utilización de la técnica de PCR puede ser de gran utilidad a la hora de identificar una bacteria a nivel de especie evitando de esta manera la necesidad de realizar un gran número de pruebas bioquímicas. Esto resulta especialmente relevante para aquellos agentes causantes de mastitis que presentan dificultades para ser cultivados, o incluso, son incapaces de proliferar en los medios y condiciones estándar de los laboratorios; en este contexto, la técnica de PCR ha emergido como una herramienta diagnóstica de invaluable utilidad. En particular, se ha dedicado un considerable esfuerzo en el desarrollo y optimización de diversas técnicas de PCR para el diagnóstico del *Mycoplasma*, un patógeno notoriamente difícil de cultivar debido a sus exigentes requerimientos de crecimiento (Boonyayatra et al. 2012). Por otro lado, la detección de varios patógenos en una sola prueba mediante la técnica de Multiplex PCR ha permitido un avance en el diagnóstico de la enfermedad. Esta técnica tiene muchas ventajas sobre las técnicas tradicionales en términos de facilidad, sensibilidad y especificidad (Charaya et al. 2015). Actualmente existe disponible en el mercado varios kits de real time PCR que detecta varios patógenos productores de mastitis: Pathoproof (Thermo Fisher Scientific, Ltd., Waltham, MA, EE. UU), DNA Diagnostic (Risskov, Dinamarca) y Mastitis 4, que ha mostrado una alta sensibilidad y especificidad siendo además rápido comparado con el método tradicional de cultivo (Koskinen et al. 2010). No obstante, al emplear técnicas de PCR para la detección de patógenos directamente de muestras de leche afectada por mastitis, se corre el riesgo de generar resultados positivos erróneos. Por otro lado, la PCR no es capaz de distinguir entre bacterias muertas y vivas. Considerando estos aspectos, se sugiere que los veterinarios tratantes de los tambos integren toda la información relevante disponible, que incluye antecedentes de mastitis, evaluación física de la ubre, tratamientos aplicados anteriormente y el conteo de células somáticas, con los hallazgos de la PCR, para formular un diagnóstico acertado (Steele et al. 2017; Kour et al. 2023).

Un avance reciente en técnicas moleculares es la tercera generación de la PCR, conocida como reacción en cadena de la polimerasa digital en gotas (*droplet digital* PCR, ddPCR). Esta innovadora metodología se realiza distribuyendo las moléculas de ácido nucleico entre un gran número de sub reacciones, denominadas particiones o gotas. Este proceso de división de los ácidos nucleicos de la muestra se basa en la distribución al azar de las moléculas del mismo dentro de la solución. Así, resulta que ciertas particiones albergan una (o unas pocas) copias de las moléculas de interés y otras particiones pueden no contener ninguna. Cada una de estas particiones de ddPCR contiene, además del ácido nucleico de interés, los reactivos básicos utilizados en una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y se someterá al ciclado de PCR correspondiente. Luego de este ciclado cada una de estas particiones generará una señal fluorescente en respuesta a la presencia de una secuencia blanco. Una partición positiva se identifica por una intensidad fluorescente aumentada en comparación con una partición negativa que solo muestra la señal de base (Whale et al. 2020). La medición de la intensidad de la fluorescencia en cada gota se realiza a través de un algoritmo de

Poisson, permitiendo clasificar cada gota como positiva o negativa (McDermott et al. 2013; Powell & Babady, 2018). Así, la ddPCR facilita la determinación cuantitativa de los amplicones y la carga de patógenos sin depender de curvas de calibración (Ramírez et al. 2018). En la ddPCR, la relación entre las moléculas de ADN diana y los componentes de la PCR es notablemente superior en volúmenes de nanolitros, en contraste con los volúmenes de microlitros usados en la PCR tradicional. Esto significa que las posibilidades de que se produzcan interacciones óptimas entre los primers y los ADN moldes son mayores, lo que podría resultar en una mayor eficacia, especificidad y sensibilidad de la ddPCR en comparación con la PCR convencional (Yang et al. 2014). Por otro lado, estudios preliminares parecen sugerir que la ddPCR es robusta frente a muchos de los factores que pueden influir negativamente en la PCR convencional e inclusive en la real-time PCR ya que el ADN molde, cuando está confinado dentro de la gota, se aísla de ADNs que reaccionen entre sí y de sustancias inhibitorias que puedan estar en la muestra (Dingle et al. 2013).

Esta técnica ha encontrado aplicación en la detección de virus, bacterias y parásitos de relevancia clínica y veterinaria en una amplia gama de muestras biológicas (Zheng et al. 2021; De Brun et al. 2022; Wu et al. 2022;) así como en la identificación de patógenos en alimentos (Cremonesi et al. 2016; Powell & Babady, 2018).

3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

El diagnóstico y la epidemiología de la mastitis bovina es un tema de preocupación a nivel mundial especialmente en los países que presentan una gran producción lechera. En nuestro país el diagnóstico de esta enfermedad es realizada tanto por laboratorios privados como públicos. Como se ha señalado anteriormente el diagnóstico de la mastitis en bovinos es crucial para que los productores lecheros y los veterinarios a cargo de los establecimientos puedan adoptar, con confianza, medidas de control y estrategias de tratamiento adecuadas, teniendo en cuenta las particularidades de cada explotación y su producción. En las últimas décadas, el avance tecnológico ha incentivado a investigadores a nivel mundial a concentrar sus esfuerzos y conocimientos en el perfeccionamiento de métodos diagnósticos, poniendo especial énfasis en las técnicas de biología molecular. Por lo tanto, esta tesis busca responder interrogantes clave, como si la técnica de *Droplet Digital* PCR constituye un método robusto y fiable para el diagnóstico adecuado de la mastitis y si puede, eventualmente, reemplazar en su totalidad a los métodos de cultivo tradicionales.

Como se ha destacado previamente, los informes más recientes sobre la epidemiología de la mastitis bovina en nuestro país, que datan de 2014, se basaron en métodos tradicionales de cultivo para la identificación de patógenos. Surge la interrogante sobre si la adopción de técnicas moleculares podría revelar cambios en la epidemiología de los patógenos causantes de mastitis. Se ha enfatizado anteriormente que el diagnóstico mediante cultivo puede generar una alta incidencia de resultados falsos negativos, debido a la incapacidad de algunos patógenos, como los *Mollicutes*, de crecer en medios de cultivo convencionales o a su presencia en cargas bacterianas bajas. Las técnicas de biología molecular, incluida la PCR, prometen reducir la cantidad de diagnósticos falsos negativos, mejorando así las

posibilidades de tratamiento y recuperación de los animales. La presencia de bacterias de la clase *Mollicutes* en nuestros sistemas de producción lechera es una cuestión de interés particular.

Responder a estas preguntas no solo podría mejorar significativamente el diagnóstico de la mastitis bovina en nuestro país, sino también proporcionar una visión más actualizada de su epidemiología, especialmente en lo que respecta a patógenos específicos como los del género *Streptococcus*. Este enfoque renovado hacia la comprensión y manejo de la mastitis bovina podría traducirse en estrategias de prevención y tratamiento más efectivas, adaptadas a la realidad actual de la enfermedad y sus agentes causales.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

La implementación de técnicas moleculares, como la PCR tiempo final y la *Droplet Digital* PCR, aumentará significativamente la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de patógenos causantes de mastitis bovina en comparación con las técnicas de cultivo tradicionales, lo que resultará en una detección más temprana y precisa de los patógenos.

4.2 Objetivo general

Evaluar la efectividad de técnicas moleculares, específicamente la PCR en tiempo final y la *Droplet Digital* PCR, en el diagnóstico de mastitis bovina, comparando su sensibilidad y especificidad con los métodos de cultivo tradicionales.

4.3 Objetivos específicos

1. Estandarizar una *duplex droplet digital* PCR (dddPCR) para el diagnóstico de *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* causante de mastitis y su comparación con la técnica de PCR en tiempo final (MANUSCRITO I: PUBLICADO).
2. Estandarizar una múltiplex PCR para la identificación de *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus agalactiae* a partir de cepas aisladas.
3. Identificar mediante múltiplex PCR en tiempo final cepas de *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus agalactiae* aisladas de leche proveniente de vacas con mastitis y su comparación con la identificación fenotípica (MANUSCRITO II: en revisión).
4. Detectar mediante múltiplex PCR a tiempo final a *S. aureus*, *S. uberis* y *S. dysgalactiae* en muestras de leche que resultaron negativas mediante métodos de cultivo convencionales. Detectar mediante PCR convencional la presencia de *Mollicutes* (*Mycoplasmas/Acholeplasmas*) en muestras de leche con cultivo negativo.

5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Esta tesis doctoral se enfocó en llevar a cabo cuatro experimentos, con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la mastitis en bovinos. Cada uno de los experimentos realizados serán tratados de aquí en adelante como capítulos.

Capítulo 1 (Experimento 1): se centró en la estandarización de un método de PCR digital en gotas duplex (*duplex droplet digital* PCR) para identificar y cuantificar dos de los agentes patógenos más significativos que provocan esta enfermedad: *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. Este estudio inicial intentó responder a dos interrogantes clave: ¿Representa la técnica de PCR digital en gotas un enfoque confiable y efectivo para la detección y cuantificación de estos patógenos? ¿Tiene el potencial de sustituir completamente a los métodos convencionales de cultivo para el diagnóstico de la mastitis?

Capítulo 2 (Experimento 2): se focalizó en la puesta a punto de una técnica de PCR múltiplex para la identificación específica de las diversas especies de *Streptococcus* responsables de mastitis, utilizando como muestra cultivos bacterianos. El propósito de este experimento fue abordar preguntas esenciales acerca de la exactitud y la eficiencia de los métodos diagnósticos para la mastitis provocada por *Streptococcus*. Las preguntas clave abarcaron: ¿Es factible que los métodos fenotípicos convencionales para la identificación de las tres especies de *Streptococcus* presenten fallas?, ¿La PCR múltiplex tiene la capacidad de realizar una identificación precisa de estas especies con elevada especificidad y sensibilidad?

Capítulo 3 (Experimento 3): se enfocó en emplear la metodología desarrollada en el experimento 2 para el reconocimiento de cepas silvestres obtenidas de casos de mastitis. En este contexto, la interrogante principal que buscó resolver es si la implementación de métodos de diagnóstico molecular podría cambiar nuestra percepción sobre la epidemiología de la mastitis en un tambo, en contraste con el uso de métodos de cultivo tradicionales.

Capítulo 4 (Experimento 4): en este experimento la tesis se concentra en el análisis de muestras de leche de animales con mastitis clínica que presentaron cultivos negativos al momento de realizar el diagnóstico. En este sentido mediante PCR convencional se detectaron tres patógenos clásicos: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente todas estas muestras fueron sometidas a una PCR para detectar *Mycoplasma sp.*

5.1 Capítulo 1:

“Detección mediante dúplex droplet digital PCR de Streptococcus uberis y Streptococcus dysgalactiae, principales agentes etiológicos de la mastitis bovina” (MANUSCRITO I)

“Duplex droplet digital PCR detection of Streptococcus uberis and Streptococcus dysgalactiae, major etiological agents of bovine mastitis”

Resumen

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes que afectan al ganado lechero en todo el mundo, resultando en pérdidas económicas significativas debido a los altos costos asociados principalmente con la disminución de la producción, el tratamiento antimicrobiano y el sacrificio temprano de los animales. El género *Streptococcus* está entre los principales patógenos bacterianos que causan mastitis bovina a nivel mundial. El diagnóstico correcto y oportuno de la mastitis es crítico para la industria láctea, no solo desde el punto de vista de la higiene de la leche sino también por razones económicas, de salud pública y de bienestar animal. En este sentido, desarrollamos una prueba diagnóstica de infección intramamaria bovina empleando una PCR digital dúplex en gotas (dddPCR) para detectar y cuantificar *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* en leche, la cual supera la técnica de cultivo estándar de oro y la PCR de punto final o convencional. Los resultados encontrados muestran que el límite de detección para cultivos y muestras simuladas fue cien veces menor para dddPCR que la PCR de punto final. Además, la CFU/mL estimada basada en el número de copias/uL obtenida a través de dddPCR mostró una fuerte correlación con la CFU/mL observada a partir del cultivo ($r^2 > 0.99$, valor $p < 0.001$), indicando que dddPCR proporciona una estimación confiable de este parámetro. Por otro lado, la sensibilidad de la PCR de punto final, determinada a partir de muestras artificiales, fue del 40% para *S. uberis* y del 55.4% para *S. dysgalactiae*; mientras tanto, la sensibilidad de dddPCR fue del 80% y del 100% para *S. uberis* y *S. dysgalactiae*, respectivamente, mientras que la especificidad fue del 100% para ambas técnicas y patógenos. En conclusión, proponemos una técnica robusta y confiable estandarizada para detectar y cuantificar dos de las bacterias más importantes que causan mastitis bovina. Este método dddPCR puede ser particularmente adecuado para detectar patógenos en muestras de leche con cargas bacterianas bajas o que se eliminan de manera intermitente y debería ser probado más a fondo con un tamaño de muestra mayor en investigaciones futuras.

Principales aportes de este trabajo:

- Se desarrolló una técnica molecular de última generación para el diagnóstico de la mastitis bovina a partir de muestras de leche sin necesidad del cultivo bacteriano.
- La técnica demostró ser una buena herramienta, con alta sensibilidad y especificidad para la detección de *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* pudiendo correlacionar la carga bacteriana presente en la muestra con la cantidad de copias del amplicon obtenidas.
- El método propuesto permite la implementación rápida de medidas de control, como

la segregación de animales infectados sin muestras de signos clínicos o un alto conteo de células somáticas.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Pasquale De Palo,
University of Bari Aldo Moro, Italy

REVIEWED BY
Marialaura Corrente,
University of Bari Aldo Moro, Italy
Grazia Greco,
University of Bari Aldo Moro, Italy

*CORRESPONDENCE
Leticia Diana
✉ leticia.diana@fvet.edu.uy

RECEIVED 11 November 2023
ACCEPTED 27 December 2023
PUBLISHED 16 January 2024

CITATION
Diana L, Traglia G, Diana V, Calvino L,
Laporta J, Iriarte A and Puentes R (2024)
Duplex droplet digital PCR detection of
Streptococcus uberis and *Streptococcus*
dysgalactiae, major etiological
agents of bovine mastitis.
Front. Anim. Sci. 4:1336816.
doi: 10.3389/fanim.2023.1336816

COPYRIGHT
© 2024 Diana, Traglia, Diana, Calvino, Laporta,
Iriarte and Puentes. This is an open-access
article distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License (CC BY).
The use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Duplex droplet digital PCR detection of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae*, major etiological agents of bovine mastitis

Leticia Diana^{1*}, German Traglia², Virginia Diana³, Luis Calvino⁴,
Jimena Laporta⁵, Andrés Iriarte² and Rodrigo Puentes¹

¹Laboratorio de Microbiología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ²Laboratorio Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ³Department of San Jose, Laboratorio de la Rural de San José, San José, Uruguay, ⁴Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina, ⁵Department of Animal and Dairy Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, United States

Bovine mastitis is one of the most important diseases affecting dairy cattle worldwide, resulting in significant economic losses due to high costs mainly associated with decreased production, antimicrobial treatment, and early culling of animals. The genus *Streptococcus* is among the primary bacterial pathogens causing bovine mastitis worldwide. The correct and timely diagnosis of mastitis is critical for the dairy industry, not only from the point of view of milk hygiene but also for economic, public health, and animal welfare reasons. Herein, we developed a diagnostic test of bovine intramammary infection employing a duplex droplet digital PCR (dddPCR) to detect and quantify *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* in milk, which outperforms the gold standard culture-based technique and the endpoint PCR. Indeed the detection limit for cultures and mock samples for dddPCR was a hundred times lower than the endpoint PCR. Additionally, the CFU/mL estimated based on the number of copies/uL obtained through dddPCR exhibited a strong correlation with the observed CFU/mL from the culture ($r^2 > 0.99$, p -value < 0.001), indicating that dddPCR provides a dependable estimate of this parameter. Moreover, the sensitivity of endpoint PCR, determined from artificial samples, was 40% for *S. uberis* and 55.4% for *S. dysgalactiae* meanwhile, the sensitivity of dddPCR was 80% and 100% for *S. uberis* and *S. dysgalactiae*, respectively, while the specificity was 100% for both techniques and pathogens. In conclusion, we propose a robust and reliable technique standardized for detecting and quantifying two of the most important bacteria that cause bovine mastitis. This dddPCR method may be particularly suitable to detect pathogens in milk samples with low bacterial loads or intermittently shedding and should be further tested with a larger sample size in future research.

KEYWORDS

dddPCR, molecular diagnosis, dairy cattle, bacterial pathogen, gram-positive

Introduction

Bovine mastitis is one of the most important diseases affecting dairy cattle worldwide, resulting in significant economic losses due to the high costs associated with milk production losses, antibiotic treatment, and early culling of animals (Ruegg, 2017). Mastitis can be classified in clinical or subclinical. The clinical form is diagnosed based on visual inflammation of the affected quarter and clots or flakes in the milk. On the other hand, the mammary gland and milk of subclinical cows are not visibly affected. Still, there is an increased number of polymorphonuclear leukocytes, which is reflected in greater Somatic Cell Count (SCC) in the milk (Koskinen et al., 2010). Mastitis is predominantly infectious, being bacteria the principal etiological agents. The agents that produce intramammary infections (IMI) are classically classified based on epidemiological studies in contagious and environmental (Garcia, 2004). Pathogens that are exclusively contagious, such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Mycoplasma spp.*, can be transmitted from an infected to a healthy animal during milking through hands, towels, or the milking machine, which act as fomites. In contrast, pathogens such as *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) and *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) come from the animal's environment, such as bedding material, soil, feces, and standing water or from an infected animal, categorizing them as environmental or contagious pathogens (Garcia, 2004). The genus *Streptococcus* is among the primary bacterial pathogens causing bovine mastitis worldwide, including Uruguay (Kaczorek et al., 2017; Giannechini et al., 2014; Giannechini et al., 2002). In particular, the species *S. dysgalactiae* and *S. uberis* are the most prevalent, leading to significant losses in dairy production in Uruguay (Giannechini et al., 2014). Mastitis caused by *S. uberis* is generally of environmental origin; however, cases of infection between animals have been observed (Garcia, 2004). This bacterium is primarily alpha-hemolytic, but some non-hemolytic strains have also been demonstrated (Kabelitz et al., 2021). Biochemical identification by culture is performed by determining the CAMP phenotype (Christine-Atkinson-Munch-Peterson test) and the degradation of aesculin, sodium hippurate, and inulin, which are variables among strains (Kromker et al., 2014; Kabelitz et al., 2021). The Lancefield classification of *S. uberis* is challenging, as some strains have been positive for several groups (E, G, P, or U) (Kabelitz et al., 2021).

On the other hand, the classification of *S. dysgalactiae* as environmental or contagious is not as precise, as it can survive within the host and the environment, so it is described as an intermediate pathogen (Wente & Krömker, 2020). Most strains of *S. dysgalactiae* are nonhemolytic, although there are alpha-hemolytic exceptions. Phenotypically, it is CAMP negative, does not degrade aesculin, belongs to Lancefield's group C and is mainly associated with bovine infections, but it can also infect other ruminants such as goats and sheep (Kabelitz et al., 2021).

Mastitis diagnosis should be early, rapid, and accurate in order to implement effective prophylactic or therapeutic treatments or management strategies to prevent the spread of the disease in the dairy herd (Sharun et al., 2021). Approximately 30% of mastitis cases cannot be diagnosed by culture since only viable pathogens

that grow in conventional culture media can be detected; hence, there is a high rate of false negative results (Król et al., 2009; Ashraf and Imran, 2018). In addition, the variability in the shedding rate of elimination of different pathogens from the cow's mammary gland may result from individual differences in the inflammatory response. Moreover, in animals experimentally challenged, it has been demonstrated that the total bacterial count in milk, measured as CFU/mL, increases rapidly at the beginning of the disease but falls to a lower level after that. Therefore classical culture techniques may not be useful for the final diagnosis (Carroll et al., 1964; Sears et al., 1990; Britten, 2012), and the development of new diagnostic tools are needed.

Current molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR), mass spectrometry (MALDI-TOF), or next-generation sequencing (NGS) are used for rapid and specific identification of mastitis-producing pathogens down to the species and subspecies level and have allowed considerable progress in the diagnosis of this disease (Gillespie & Oliver, 2005; Zadoks & Watts, 2009; Duarte et al., 2015; Chakraborty et al., 2019). Several studies have combined conventional microbiology with multiplex PCR to identify bacteria associated with IMI in cattle with promising results (Raemy et al., 2013; Carvalho-Castro et al., 2017). A molecular technique that has emerged in the last decade is the third generation of PCR, droplet digital polymerase chain reaction (droplet digital PCR/ddPCR). This technique allows the absolute measurement of nucleic acids by partitioning PCR reactions into hundreds of millions of partitions (i.e., droplets). The fluorescence intensity of each droplet is measured using a Poisson algorithm; each droplet will be classified as positive or negative (McDermott et al., 2013; Powell and Babady, 2018). In this way, ddPCR allows quantification of amplicons and the number of pathogens without a calibration curve (Ramírez et al., 2018). The ddPCR technique has been used to detect viruses, bacteria, and parasites of medical and veterinary importance from various biological samples (Zheng et al., 2021; De Brun et al., 2022; Wu et al., 2022). It has also been implemented to detect foodborne pathogens (Cremonesi et al., 2016; Powell & Babady, 2018; Du et al., 2022).

Herein, we developed an advanced diagnostic test for bovine IMI using duplex droplet digital PCR (dddPCR) in order to detect and quantify two of the four most prevalent primary pathogens that cause mastitis in dairy cows: *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae*.

Materials and methods

Bacterial strains and preparation of mock samples of mastitic milk

Two ATCC strains were used for analysis: *Streptococcus uberis* ATCC 9927 and *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 12394. Both strains were grown on Trypticase Soy Agar (TSA) medium enriched with 4% sheep blood and incubated in aerobiosis at 37°C ± 2°C for 48 hr. The isolated colonies were subsequently used for DNA extraction and inoculation of sterile milk. These

strains were used to contaminate 10% whole milk sterilized at 111°C for 30 min to evaluate the performance of dddPCR and conventional PCR. For this purpose, pure culture inocula, equivalent to 0.5 of the McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL) were used. The CFU/mL of each inoculum was confirmed by plate count on Blood Agar (BS) using the 6x6 drop plate method (Chen et al., 2003). Finally, 10 mL of sterile whole milk was contaminated with 1 mL of each prepared bacterial inoculum. Three mock samples of mastitic milk were generated, one for each pathogen (*Sube* Milk and *Sdys* Milk), and a third sample was prepared using both inoculums and making a pool (*Sube* Milk + *Sdys* Milk), then the CFU/mL was calculated based on Chen et al. (2003). Serial dilutions in base ten were made from dilution -1 to dilution -7 using milk as the diluent and subsequently used for DNA extraction.

DNA extraction from pure cultures and mock samples of mastitic milk

DNA was extracted from 1 mL of pure cultures and 1 mL of the mock samples previously prepared (*Sube* Milk, *Sdys* Milk, and *Sube* Milk + *Sdys* Milk), including dilutions from -1 to -7. GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (SIGMA-Aldrich) added with lysozyme (SIGMA-Aldrich) at a concentration of 9 mg/sample was used following the manufacturer's instructions. For mock samples, three consecutive centrifugations were performed at 13,300 rpm at 4°C for 5 minutes before extraction, and the pellet obtained was washed with sterile saline. The quantification of the DNA collected was determined by Qubit 4 fluorimeter using the 1X dsDNA HS (high sensitivity) assay kit (Thermo Fisher Scientific). Extracted DNA was stored at -20°C until subsequent use in PCR analysis.

Primers and probes design

A comparative genomics approach was applied to identify candidate molecular markers for *S. dysgalactiae* and *S. uberis* (Supplementary Figure 1). Briefly, all available genome sequences of *S. dysgalactiae* and *S. uberis* were downloaded from the NCBI genome database (Supplementary Table 1). Genome annotation was carried out by Prokka (Seemann, 2014). The set of conserved genes, i.e., the core-genome, was determined for each species using Roary software (Page et al., 2015). In order to identify species-specific genes, the core genome of both species was compared by tBLASTx (Altschul et al., 1990) using a minimum amino acid identity value of 30% and minimum coverage of 70%. Putative unique genes identified in both species were blasted against other *Streptococcus* genomes at the NCBI genome database using BLASTp with default parameters (Altschul et al., 1990). A gene was considered species-specific if the gene was not present in any other species of *Streptococcus* genus, with a minimum amino acid identity of 90%. Primers and probes design was performed using Primer3 software (Untergasser et al., 2012) with the following parameters: i) amplification product length < 180 bp; ii) G or C preference for starting nucleotide; iii) primers length between 18 and 24 bp; iv) probe length between 30 and 38 bp; v) GC content ≥

50%, vi) similar melting temperature between both primers and the probe, and vii) NCBI blast hits only with target species.

Endpoint PCR amplification

To validate the designed primers, an endpoint PCR was done using the DNA extracted from pure cultures of both *Streptococcus* strains. PCR reactions were performed using NZYTaQ II 2x Green Master Mix from NZYtech. The mixture for PCR reactions was performed in a final volume of 25 µL: 12.5 µL of master mix, 1 µL of each primer at a concentration of 10 µM, 9.5 µL of DNase- and RNase-free water, and 4 ng of DNA. The PCR runs were performed on a C1000 Touch™ thermal cycler (Bio-Rad). The conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 4 minutes followed by 30 cycles of 1 minute at 94°C, 1 min at 60°C, and 30 seconds at 72°C, ending with a final extension of 5 minutes at 72°C. To confirm the presence of the amplified fragment, the PCR mixture was subjected to 2% agarose gel electrophoresis in TAE buffer using 5 µL of Thermo scientific GeneRuler 100bp molecular weight marker. The run was performed at 100V for 45 minutes, and amplicons were visualized by staining with SYBER® Safe DNA gel stain from Invitrogen and exposure to UV light. PCR products were purified and sequenced using forward and reverse primers by Macrogen Inc, Seoul, South Korea. The chromatogram received from the sequencing service was edited using the Bioedit program (Hall, 1999), and typical Sanger sequencer errors were eliminated by visual inspection. The final consensus sequence for each pure culture was obtained using Bioedit.

Duplex droplet digital polymerase chain reaction assay

The ddPCR reactions were performed using the QX200™ Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Previously designed probes and primers were used for each pathogen (Table 1). The ddPCR reaction for the duplex (dddPCR) was performed in a final volume of 20 µL containing 10 µL of ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad), 900nM of each primer, 450 nM of each probe, and 1 µL of DNA. The total reaction volume was reached with DNA-RNase-free water. For partitioning the reaction and obtaining droplets, 20 µL of reaction and 70 µL of Droplet Generation oil for Probes (Bio-Rad) were placed in an eight-well cartridge that was subsequently placed in the QX200 droplet generator (Bio-Rad). The droplets obtained were subsequently transferred to ddPCR™ 96-Well Plates (Bio-Rad) and subjected to amplification cycles in a C1000 Touch™ thermal cycler (Bio-Rad). Amplification conditions were as follows: 10 minutes at 95°C for DNA polymerase activation, followed by 40 cycles of 30 seconds at 94°C for denaturation, and 1 minute at 60°C for hybridization and extension. Finally, enzyme deactivation and droplet stabilization were performed for 10 minutes at 98°C with subsequent cooling to 4°C. Using the QX200 droplet reader (Bio-Rad Laboratories), the number of resulting positive and negative events were determined by

TABLE 1 Primers and probes designed for endpoint PCR and duplex ddPCR techniques for the detection of *S. uberis* and *S. dysgalactiae*.

Species	Gene	Genome location*	Primers and probes	Sequence (5'-3')**	Tm (°C)
<i>S. dysgalactiae</i>	16144_00845	173587...173606	hyp_F	CCAGCGACAACCCTAGGACC	65.5
		173445...173468	hyp_R	GAGATCGGCGTCTACTTGACTCAG	65.1
		173492...173522	hyp_probe	FAM- GCAGATGGTACTTACCTTGAAGCAAATCGCG- BHQ1	62.4
<i>S. uberis</i>	mutS2	1703773...1703756	mutS_F	CATTGAACCTCGTGCCTT	52.9
		1703616...1703635	mutS_R	CTAGATGTCCCAAAGCCAT	52.3
		1703706...1703674	mutS_probe	HEX- GAAATTGCAAGGATACTCAAAGAGTTGTCACAG- BHQ1	59.3

*Reference genome: *Streptococcus uberis* strain NCTC4674(LS483408.1); *Streptococcus dysgalactiae* strain FDAARGOS_1087 (CP068478.1). hyp_F-R product size: 158 pb, mutS_F-R product size: 161 pb.

**Fluorophore and Quencher: FAM, carboxylfluorescein; HEX, hexachlorofluorescein; BHQ1, Black Hole Quencher 1.

fluorescence detection and the data were analyzed in the QuantaSoft v.1.7.4 software (Bio-Rad). Concentration was expressed in copies/ μ L from positive events using the Poisson distribution for analysis. All samples were analyzed in triplicate. The CFU/mL was calculated from the copies/ μ L obtained in the ddPCR and taking into account the volume of sample from which the DNA was extracted, the volume of DNA elution in the extraction, and that the amplified gene is only once in the genome (1 copy=1 CFU). The CFU/mL was determined from the DNA copies obtained for each pathogen.

Specificity and detection limit of primers and probes

The specificity of each primer pair was evaluated by endpoint PCR and dddPCR from purified genomic DNA of the previously mentioned ATCC reference strains. Reference strains of the genera *Staphylococcus* and *Streptococcus* were used as negative controls since they correspond to the other most prevalent bacterial genera that produces mastitis and may also be present in some field samples. The minimum detection limit (LoD) for endpoint PCR and dddPCR was established using pure cultures, starting from an initial concentration of 4 ng/ μ L (4000 pg/ μ L) of DNA template and subsequently diluting at a ratio of 1:10 until reaching a concentration of 0.04 pg/ μ L. Additionally, the LoD for both techniques was evaluated using artificially contaminated milk samples. This was achieved by diluting the contaminated milk samples at a 1:10 ratio, ranging from 3.5×10^7 CFU/mL to 35 CFU/mL.

Sensitivity and specificity of end-time PCR and ddPCR

To determine the sensitivity and specificity of end-time PCR and dddPCR, 10 mL of milk were inoculated with 1×10^8 CFU/mL of field strains of *S. uberis* (10 strains), *S. dysgalactiae* (9 strains) and *S. aureus* (10 strains) and diluted to dilution -5 since this was the last dilution at which we had growth in the culture. PCR previously

identified all these field strains in our laboratory. The sensitivity and specificity were determined (Martin, 1984) and the concordance index (kappa index) of both techniques with the classical culture diagnostic technique was also determined.

Field sample analysis of dairy milk

Milk samples were sent by veterinarians or dairy farmers from March to July 2021 from farms located in San José – Uruguay (34° 20'20"S 56°42'37"O). For milk samples SCC assessment the reference system for SCC assessment (*i.e.*, automated electronic cell counters based on flow cytometric methods) was implemented. Sixty-seven quarter milk samples with high SCC (>200.000 cel/mL) were cultured following the protocol recommended by the National Mastitis Council (Firdaus, 2017).

Results

Primer and probe design

The design of specific primers and probes for the determination of *S. dysgalactiae* and *S. uberis* was done based on comparative genome approaches. The pangenome analyses of 120 and 68 genomes of *S. dysgalactiae* and *S. uberis*, respectively, were done using Roary software (Page et al., 2015). The assembly accession number of each genome used in the present study is available in Supplementary Table 1. The core genome of *S. dysgalactiae* and *S. uberis* comprised 806 and 101 genes, respectively. The core genes were compared by tBLASTx software resulting in 716 and 22 putative unique genes found in *S. dysgalactiae* and *S. uberis*, respectively and 68 shared genes were found among the two species (Supplementary Table 1). To avoid the amplification of other *Streptococcus* species by the designed primers, the unique genes were compared to the *Streptococcus* genomes available at the GenBank database using the web protein BLAST tool (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Genes that only match with *S. dysgalactiae* or *S. uberis* were considered species-specific and used

for further analyses. A total of 166 species-specific genes were found in *S. dysgalactiae* and two in *S. uberis* (Supplementary Table 1). One chromosomal gene from each specie was chosen at random. Endonuclease mismatch repair protein MutS and putative class A beta-lactamase-related serine hydrolase protein (named *I6144_00845* gene) were selected as molecular markers of *S. uberis* and *S. dysgalactiae*, respectively. In the reference genome of *S. dysgalactiae*, *mutS* gene is located in a conserved region in the main chromosome, next to *TrxA_2* (thioredoxin) and *NCTC4674_01802* gene (membrane protein). The *I6144_00845* gene is located in a conserved region in the main chromosome of *S. uberis*, flanked by *tiIS* (tRNA lysidine(34) synthetase) and *I6144_00850* (a septum formation initiator family protein-coding gene). The primer annealing region was selected according to the conservation sequence (no more than 3 nucleotides differences (Table 1). The amplified sequences in *S. uberis* and *S. dysgalactiae* have an expected length of 158 bp and 161 bp, respectively. Both probes have a length of 32 bp.

Analysis of primer specificity

Endpoint PCR and dddPCR assays correctly identified both pathogens from the culture. The banding patterns obtained in the agarose gel electrophoresis showed that the designed primers do not generate nonspecific amplifications at the established temperature. Both observed PCR product bands are within the expected length for *S. uberis* and *S. dysgalactiae*. Neither amplification was obtained for any of the non-*Streptococcus* species analyzed, nor in the negative control (Supplementary Figure 2). The Sanger sequence of the amplified PCR product confirmed for both species that the target sequence is *mutS* and *I6144_00845* (Supplementary Figure 3). The quantification of bacterial load at -3 dilution from mixed and separated DNA isolation from culture samples of *S. uberis* and *S. dysgalactiae* showed similar results (Supplementary Figure 4). The dddPCR results support primer specificity and no inhibition between both target *Streptococcus* species. The similarity search by BLASTn in the Genbank database shows that both sequences are fully conserved within the species, with 100% identity at the

nucleotide level. Taken together, these results show that the designed primers are effectively species-specific.

Standardization of quantitative dddPCR

First, the LoD in pure cultures was established. Conventional PCR and duplex ddPCR were performed in triplicate, and the DNA extracts of both pathogens were mixed and diluted from -1 to -5. In the case of endpoint PCR, the amplification was observed up to a dilution -3 (4pg/μL), while the duplex ddPCR was able to quantify up to a dilution of -5 (0.04 pg/μl) for both pathogens (Table 2). To determine the detection capability of both PCR techniques from milk samples three mock samples of mastitic milk were analyzed: *Sube Milk*, *Sdys Milk*, and *Sube + Sdys Milk*. The product of endpoint PCRs showed a band of the expected size up to dilution -4 (1×10^3 CFU/mL) (Figures 1A, C). The duplex ddPCR was able to determine the copies/μl of *S. uberis* and *S. dysgalactiae* in all mock samples and replicates up to a dilution of -6 (10 CFU/mL) (Table 3; Figures 1B, D, E). The determination of CFU/mL in the mock *Sube + Sdys Milk* sample from the copies/μl obtained by duplex ddPCR for each pathogen is highly correlated with those calculated by plate count ($r^2 > 0.99$, p-value < 0.001; Figure 2).

Analysis of mock samples and dairy milk samples

The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of dddPCR and endpoint PCR for the detection of each of the pathogens could be determined by analyzing milk samples inoculated with field strains.

The Se of the end-time PCR for detecting *S. uberis* was 40%, while the Se for detecting *S. dysgalactiae* was slightly higher (55.4%). On the other hand, the Se for the dddPCR technique was 100% and 80% for *S. dysgalactiae* and *S. uberis*, respectively. The Sp was 100% for both techniques for both pathogens.

The Kappa indices obtained determined a moderate concordance (kappa = 0.47) for culture and end-time PCR in the

TABLE 2 Limit of detection (LoD) of endpoint PCR and duplex ddPCR for *S. uberis* and *S. dysgalactiae* from genomic DNA of pure cultures.

Duplex ddPCR [#]						
	UD: 4 ng/μl	-1: 400 pg/μl	-2: 40 pg/μl	-3: 4 pg/μl	-4: 0.4 pg/μl	-5: 0.04 pg/μl
<i>S. uberis</i> ATCC 9927	*	*	6305,0 ^(408,0)	196,8 ^(56,5)	11,3 ^(1,5)	1,2 ^(0,4)
<i>S. dysgalactiae</i> ATCC 12394	*	*	3498,0 ^(383,2)	179,5 ^(119,6)	19,9 ^(2,9)	2,5 ^(1,1)
Endpoint PCR						
	UD: 4 ng/μl	-1: 400 pg/μl	-2: 40 pg/μl	-3: 4 pg/μl	-4: 0.4 pg/μl	-5: 0.04 pg/μl
<i>S. uberis</i> ATCC 9927	P	P	P	P	N	N
<i>S. dysgalactiae</i> ATCC 12394	P	P	P	P	N	N

*Concentrations at which the signal was saturated (more than 20,000 copies/μl).

[#]The average and the standard deviation (in brackets) of copies/μl of the three replicates is indicated for each species in each concentration.

P, positive (amplification band of 161 bp for *S. dysgalactiae* and 158 bp for *S. uberis*).

N, negative (no amplification band observed).

UD, undiluted.

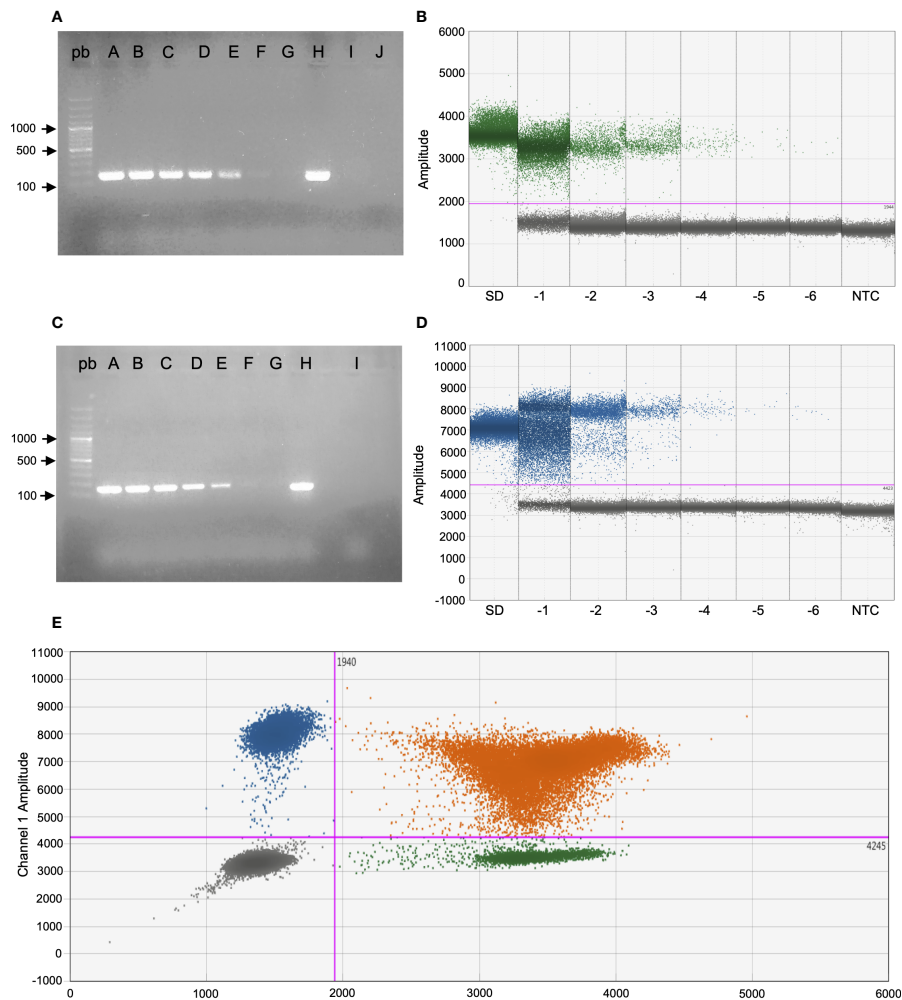


FIGURE 1
Sensitivity and specificity of end-time PCR and duplex ddPCR of *S. dysgalactiae* (A, B) and *S. uberis* (C, D) from the mock sample with both reference strains. (A, B) From lane A to G and SD to -6: dilutions of the mock sample from undiluted to -6 (3.5×10^7 CFU/mL - 3.5×10^1 CFU/mL), lane H: *S. dysgalactiae* DNA from culture, lane I: *S. uberis* DNA from culture, lane J: reaction control with milk sterile and bp: 100bp molecular weight marker, NTC: no template control. (C, D) From lane A to G and SD to -6: dilutions of the mock sample from undiluted to -6 (3.5×10^7 CFU/mL - 3.5×10^1 CFU/mL), lane H: *S. uberis* DNA from culture, lane I: *S. dysgalactiae* DNA from culture, lane bp: 100bp molecular weight marker, NTC: no template control. (E) 2D plot of ddPCR duplex: droplets positive only for *S. uberis* (blue), droplets positive only for *S. dysgalactiae* (green), and double positive droplets (orange).

diagnosis of *S. uberis*, while for the diagnosis of *S. dysgalactiae* it was a good concordance ($\kappa = 0.63$).

However, the concordance indices for dddPCR with culture were 1 and 0.84, determining a very good concordance for both pathogens.

Sixty-seven high SCC samples were analyzed using the two PCR techniques developed. Five culture samples were positive for *S. uberis*, twelve for *S. dysgalactiae*, and sixteen for *S. aureus* or coagulase-negative staphylococci (SCNS). Twenty-eight samples that did not present bacterial growth (negative culture) and six with isolation of *Streptococcus* sp. (species not determined) were

also analyzed. All (12/12) field milk samples with positive culture for *S. dysgalactiae* were negative for this pathogen by endpoint PCR, and the copies/ μ L obtained by dddPCR allowed us to determine that they had less than 340 CFU/mL (Table 4). Moreover, 87.5% (11/12) of those samples were positive by endpoint PCR for *S. uberis*, and from the copies/ μ L obtained by ddPCR, it was possible to determine that they had a high number of *S. uberis* (between 4.17×10^3 and 2.6×10^6 CFU/mL). One sample (SJ6344) was negative by endpoint PCR for *S. uberis* but showed a low *S. uberis* load (887 CFU/ml calculated from dddPCR results). Three samples with positive cultures for *S. uberis* (SJ2011, SJ1992, and SJ8296AD) were also

TABLE 3 Limit of detection (LoD) of endpoint PCR and dddPCR for *S. uberis* and *S. dysgalactiae* from milk DNA artificially inoculated with both pathogens (mock sample).

	SD: 10 ⁷ CFU/mL		-1: 10 ⁶ CFU/mL		-2: 10 ⁵ CFU/mL		-3: 10 ⁴ CFU/mL		-4: 10 ³ CFU/mL		-5: 10 ² CFU/mL		-6: 10 ¹ CFU/mL	
	<i>S. ube</i>	<i>S. dys</i>	<i>S. ube</i>	<i>S. dys</i>	<i>S. ube</i>	<i>S. dys</i>	<i>S. ube</i>	<i>S. dys</i>	<i>S. ube</i>	<i>S. dys</i>	<i>S. ube</i>	<i>S. dys</i>	<i>S. ube</i>	<i>S. dys</i>
Duplex ddPCR [#]														
<i>S. ube</i> + <i>S. dys</i>	#	#	2178,1 (94,3)	1397,6 (54,2)	430,3 (23)	180,7 (8,5)	71,3 (3,3)	90,7 (2,3)	7,7 (0,4)	10,5 (1,8)	1,0 (0,2)	0,9 (0,5)	0,1 (0,04)	0,2 (0,2)
<i>S. ube</i>	#	n/d	2629	n/d	425	n/d	86,1	n/d	8,8	n/d	0,7	n/d	0,301	n/d
<i>S. dys</i>	n/d	#	n/d	1335	n/d	157	n/d	86,4	n/d	10	n/d	0,7	n/d	0,2
Endpoint PCR														
<i>S. ube</i> + <i>S. dys</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N
<i>S. ube</i>	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	N	N	N	N
<i>S. dys</i>	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	N	N	N

[#]Concentrations at which the signal was saturated (more than 20,000 copies/ul).
The average and the standard deviation (in brackets) of copies/ul of the three replicates is indicated for each species in each concentration.
P: positive (amplification band of 161 bpb for *S. dysgalactiae* and 158 bpb for *S. uberis*).
N: negative (no amplification band observed).
n/d: not determined.

positive for this pathogen in the endpoint PCR. It is important to note that SJ1992 showed a relatively low amplification rate in the endpoint PCR (weak band in agarose gel electrophoresis). The quantification of *S. uberis* from dddPCR data for samples SJ1992 and SJ2011 was 8.87 copies/μl, corresponding to 8.87 x10³ CFU/ml and 32.6 copies/μl corresponding to 3.26 x10⁴ CFU/ml, respectively. Endpoint PCR and dddPCR showed that sample SJ2011 was also positive for *S. dysgalactiae*. Moreover, quantification by dddPCR suggested that the abundance of *S. dysgalactiae* in the sample was many times higher than that of *S. uberis* (Table 4).

93,75% (15/16) of the samples that presented positive culture for the *Staphylococcus* genus were negative for the two *Streptococcus* species in the endpoint PCR. In agreement, the load of *S. uberis* and *S. dysgalactiae* calculated from the dddPCR results for all these samples was low (< 496 CFU/mL). Only the sample SJ1528AP, yielded a quantification of 911 copies/μl of *S. uberis*, corresponding to 9,1 x10⁵ CFU/ml. Finally, 28 samples that resulted in no growth when cultured (negative culture) showed no amplification in the endpoint PCR of either pathogen and low quantification from duplex ddPCR (< 306 CFU/mL, Table 4).

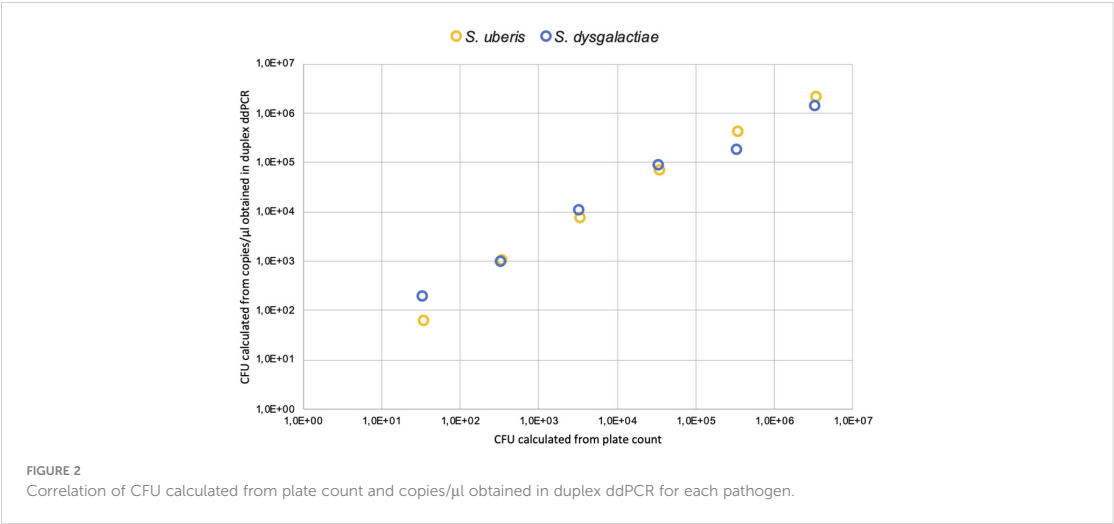


TABLE 4 Results obtained from the analysis of dairy milk samples by endpoint PCR and dddPCR for both pathogens.

		Streptococcus uberis		Streptococcus dysgalactiae	
Samples	Culture**	Endpoint PCR	Duplex ddPCR copies/ul (CFU/mL)	Endpoint PCR	Duplex ddPCR copies/ul (CFU/mL)
Field samples with positive cultures of S. uberis or S. dysgalactiae					
SJ8238	Sd	+	2607 (2,6 x 10 ⁶)	–	0 (0)
SJP270		+	72,5 (7,3 x 10 ⁴)	–	0,25 (250)
SJ6344		–	0,887 (887)	–	0 (0)
SJ3147TD		+	37 (3,7 x 10 ⁴)	–	0,167 (167)
SJ6768		+	37,4 (3,74 x 10 ⁴)	–	0,179 (179)
SJ2395		+	4,17 (4,17 x 10 ³)	–	0,167 (167)
SJ634		+	2252 (2,3 x 10 ⁶)	–	0 (0)
SJ3736		+	34,4 (3,44 x 10 ⁴)	–	0 (0)
SJ4258		+	15,9 (1,59 x 10 ⁴)	–	0 (0)
SJ19216		+	25,44 (2,54 x 10 ⁴)	–	0 (0)
SJ2753		+	24,1 (2,41 x 10 ⁴)	–	0,34 (340)
SJ5161		+	17,14 (1,71 x 10 ⁴)	–	0,0743 (74)
SJ1573		Str	–	0 (0)	–
SJ6467	+		1,9 (1,9 x 10 ³)	–	0 (0)
SJ2202341	+		19,3 (1,93 x 10 ⁴)	–	0 (0)
SJ2202342	–		0 (0)	–	0,0763 (76)
SJ2202343	–		0 (0)	–	0,82 (820)
SJ2202344	–		0,0863 (86)	–	0,259 (2,6 x 10 ²)
SJ2011	Su	+	32,6 (3,26 x 10 ⁴)	+	1264 (1,3 x 10 ⁶)
SJ1992		+	8,87 (8,87 x 10 ³)	–	0,268 (268)
SJ1635		–	0 (0)	–	0 (0)
SJ8296AD		+	30,1 (3,01 x 10 ⁴)	–	0,09 (90)
SJ8790		–	0,678 (678)	–	0,168 (168)
Field samples with positive cultures of S. aureus o CNS					
FV835PI	CNS	–	0 (0)	–	0,347 (3,4 x 10 ²)
FV835AI		–	0,080 (80)	–	0 (0)
FV835AD		–	0 (0)	–	0,497 (4,9 x 10 ²)
FV13PI		–	0 (0)	–	0,169 (1,6 x 10 ²)
FV584AD		–	0 (0)	–	200 (2 x 10 ²)
FV805AD	Sa	–	0 (0)	–	0,0912 (91)
FV824AI		–	0,180 (1,8 x 10 ²)	–	0,496 (4,9 x 10 ²)
FV738PD		–	0 (0)	–	0,418 (4,18 x 10 ²)
FV818AD		–	0 (0)	–	0,116 (1,16x 10 ²)
SJ1528AP		+	911 (9,1 x 10 ⁵)	–	0 (0)
SJ1848AI		–	0 (0)	–	0 (0)
SJ1778		–	0 (0)	–	0 (0)

(Continued)

TABLE 4 Continued

		<i>Streptococcus uberis</i>		<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	
Samples	Culture**	Endpoint PCR	Duplex ddPCR copies/ul (CFU/mL)	Endpoint PCR	Duplex ddPCR copies/ul (CFU/mL)
SJ1855		–	0 (0)	–	0 (0)
SJ2479		–	0 (0)	–	0 (0)
SJ1561		–	0 (0)	–	0 (0)
SJ1676		–	0 (0)	–	0 (0)
Field samples with negative cultures (no bacterial growth)					
FV824AD	NG	–	0,103 (1,03 x 10 ²)	–	0,103 (1,03 x 10 ²)
FV824PD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV824PI		–	0,113 (1,13 x 10 ²)	–	0 (0)
FV524PD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV524AD		–	0 (0)	–	0,0988 (99)
FV524PI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV524AI		–	0,123(1,23 x 10 ²)	–	0,123 (1,23 x 10 ²)
FV317PD		–	0,153 (1,53 x 10 ²)	–	0,154 (1,54 x 10 ²)
FV44AI		–	0,123 (1,23 x 10 ²)	–	0,123 (1,23 x 10 ²)
FV435PD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV435PI		–	0,306 (3,06 x 10 ²)	–	0 (0)
FV435AI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV850AD		–	0,156 (1,56 x 10 ²)	–	0 (0)
FV850PD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV850AI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV602AD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV602AI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV602PI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV602PD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV422PD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV915PD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV529AD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV921AI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV921AD		–	0 (0)	–	0 (0)
FV707AI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV721AI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV26AI		–	0 (0)	–	0 (0)
FV529PI		–	0 (0)	–	0 (0)

* faint band.

** *Sd*, *Streptococcus dysgalactiae*; *Su*, *Streptococcus uberis*; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Str*, *Streptococcus* sp.; CNS, coagulase-negative staphylococcus; NG, no growth.

–, negative; +, positive.

Discussion

A rapid and accurate tool for diagnosing pathogens that cause mastitis is fundamental for effectively treating and controlling this

infectious disease in dairy herd (Mahmmod, 2015). The gold standard technique for the diagnosis of mastitis is the microbiological culture; nonetheless, this methodology has some disadvantages. The number of bacteria released in the milk at

different stages of an IMI is highly variable among cows (Dohoo and Meek, 1982; Sears et al., 1990; Britten, 2012), causing culture-based diagnoses to be inaccurate and non-robust. The detection threshold of routine culture-based diagnosis is limited to a minimum bacterial load of 100 CFU/ml in milk (Britten, 2012). Thus, in cases where no growth is obtained in culture, increasing the seeding volume from 10 μ l to 100 μ l, it is recommended to decrease the risk of false negatives from 40% to 25% (Britten, 2012). Consequently, single sampling is not adequate for diagnosis. Indeed, it is recommended that a second sample is taken and the culture is repeated pre-incubating the milk sample at 37°C for 4 hrs before seeding or re-seeding the same sample at 24 hrs (Erskine and Eberhart, 1988). The proposed optimization procedures for diagnosis by culture-based methods lead to an increased diagnostic time, delaying on-farm decision-making.

Over the past decade, several molecular techniques have been developed to diagnose bovine IMI, either from culture isolates or mastitic milk samples. These techniques include endpoint PCR, qPCR, and MALDI-TOF, among others (Nonnemann et al., 2019). Compared with bacterial culture, these techniques are faster, easier to automate, and more sensitive; however, PCR techniques are typically designed for genomic DNA identification rather than the detection of viable cells, and additional evaluation is required to determine the clinical significance of their outcome (Koskinen et al., 2010).

To our knowledge, droplet digital PCR, the novel and latest PCR technique has not yet been utilized for IMI diagnosis, despite being state-of-the-art. As a first step in developing the proposed methodology, we demonstrated that the designed primers and probes were specific for *S. uberis* and *S. dysgalactiae*. First, by *in-silico* analyses of sequences deposited at GenBank, we determined that the selected marker genes were species-specific. The endpoint PCR from pure cultures, including *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, and *Staphylococcus* species frequently associated with mastitis, also supports the primers are specific and that there is no cross-amplification with other species. When analyzing the duplex ddPCR quantification of each pathogen at -3 dilution (1x 10⁴ CFU/mL) of the mixed or non-mixed pathogen's DNA, we observed that the estimated copies for both pathogens were similar. It is important to note that the DNA from both pathogens was mixed in equal quantities, and the total amount of DNA in these reactions was the same. Therefore, the number of copies/ μ l when DNA pathogens were analyzed separately was expected to be twice as high as when mixed. Since the analysis of mixed DNA was just barely lower than expected, we could not completely rule out some minimal inhibition in the reaction, which could decrease the number of expected copies obtained when the DNA of both pathogens was mixed. Taken together, the results of the ddPCR from pure cultures support the specificity of primers and the probes designed. This is relevant for its proper use as a diagnostic tool since the probes increase the specificity of this technique concerning endpoint PCR (Powell and Babady, 2018).

Phuektes et al. (2001) developed a multiplex PCR to detect *S. aureus*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, and *S. agalactiae* by endpoint PCR determining LoD of 5 pg/ μ l of DNA from pure cultures of each strain. Our results are in alignment with those reported, having

determined an endpoint PCR LoD of 4 pg/ μ l of DNA from pure cultures of *S. uberis* and *S. dysgalactiae*. In addition, the LoD of ddPCR was 0.04 pg/ μ l of DNA from pure cultures for both pathogens, indicating a higher sensitivity of ddPCR compared to endpoint PCR. On the other hand, the same authors determined that the LoD of the endpoint PCR for mock mastitic milk samples was 10³ CFU/mL for both pathogens, consistent with those obtained in our study (10³ CFU/mL).

Gillespie and Oliver (2005), determined the minimum level of detection by qPCR of *S. uberis* from inoculated UHT milk samples with pre-enrichment overnight at 37°C $\pm$ 2°C with trypticase soy broth (TSB) being 10 CFU/mL, while without enrichment, the limit of detection was 10² CFU/mL. For these authors, the pre-enrichment of milk would reduce the number of inhibitors present in the milk, allowing the detection of pathogens even if they are in small quantities. The dddPCR developed here demonstrated a minimum detection level of 10 CFU/mL for both pathogens without pre-enrichment. These results indicate that dddPCR is more sensitive than qPCR, with a sensitivity a hundred times higher than endpoint PCR for both pathogens. The higher sensitivity of dddPCR may be explained by the higher tolerance of this technique to different inhibitors usually present in milk samples (e.g., Ca²⁺, fats, proteins). This tolerance has been previously described and attributed to the partitioning of the reaction performed in this technique, which may reduce the interference of inhibitors (Huggett et al., 2013; Rački et al., 2014; Yang et al., 2014). It should be noted that in the mock samples, for all the dilutions and both pathogens, we determined the CFU/ml from the copies/ μ l obtained by dddPCR. This result agrees with the CFU/mL obtained by plate count-based techniques. Thus, we conclude that the bacterial load derived from dddPCR results is comparable to that of conventional plate count ($r^2 > 0.99$, p-value < 0.001).

A recent study compared qPCR with conventional bacterial culture in field samples (Koskinen et al., 2010). These authors used 780 animals and showed that 89% of the samples were positive for some pathogen by qPCR, while only 77% were detected by culture. To test the newly developed methodology, we analyzed 67 mastitic milk samples with high SCC using dddPCR. Although we expected these samples to be more heterogeneous than the analyzed mock samples in terms of the microorganisms present, the amount of DNA from somatic cells, and the variable concentration of protein and fat, all the *Streptococcus* culture-positive samples were positive for this pathogen by dddPCR. Previously, Koskinen et al. (2010) identified 73 samples with *S. dysgalactiae* and 81 samples with *S. uberis* by bacterial culture, and most of these samples were also identified by qPCR. A small fraction of these samples, 10.9% (8/73) and 12.3% (10/81), could not be assigned to either species, respectively. This suggests that the dddPCR method developed was more effective in detecting positive samples than the qPCR-based method described by Koskinen et al. (2010).

Surprisingly, all samples that were culture positive for *S. dysgalactiae* were not positive for this pathogen by endpoint PCR, while ddPCR quantified it below 250 CFU/ml. This result for endpoint PCR can be explained first by the low load of this pathogen in these samples, being below the detection limit of the

technique, which, as stated above, was 1,000 CFU/mL. Another reason for positive culture results and negative PCR outcomes is that the PCR might produce “false negatives” when species are misidentified during the culture process. Laboratories performing routine mastitis diagnostics experienced a misidentification rate of approximately 9% to 37% for bacteria (Pitkälä et al., 2005). Finally, but no less importantly, it has been reported that 12% of *S. uberis* strains isolated from clinical and subclinical mastitis samples exhibit significant phenotypic variability, making their identification challenging (Pitkälä et al., 2005). Moreover, more than 80% of these samples were positive by endpoint PCR for *S. uberis* and the CFU/mL determined from the copies/μl obtained from dddPCR quantification was between 10^3 and 10^6 CFU/mL.

These results highlight the importance of choosing the appropriate diagnostic techniques to detect mastitis pathogens. Our results showed that the diagnosis based on culture was inaccurate in the phenotypic identification of *Streptococcus* at the species level. This issue has already been reported and may be related to the fact that different strains of the same species are variable in the expression of widely used phenotypic traits used to determine species (Jiang et al., 1996; Riffon et al., 2001; Raemy et al., 2013; Kabelitz et al., 2021). A plausible explanation for our results is that the pathogen isolated in these samples was *S. uberis*, as demonstrated by molecular techniques, and that it was misidentified as *S. dysgalactiae* by the culture-based identification test. Reaching an incorrect diagnosis leads to inappropriate management decisions in the herd (Sharun et al., 2021). This is especially true for mastitis caused by *S. uberis*, as the existence of strains within this species exhibiting both environmental and contagious behavior has been described through proteomic and genomic approaches. (Davies et al., 2016; Esener et al., 2018; Sharun et al., 2021).

Second, it is possible that *S. dysgalactiae* was also present in these samples but with a load that was difficult to detect by culture or endpoint PCR, but successfully detected by dddPCR. This is particularly important if considering the variable Shedding of pathogens in milk in different animals that has previously been reported (Britten, 2012). Thus, we cannot rule out the possibility that *S. dysgalactiae* also contributed to mastitis but in a stage of lower release. To discard this possibility, it is necessary to study the animal's immunological status and to carry out studies over time. For sample SJ2011, in which both pathogens were identified by endpoint PCR and dddPCR. This could indicate a rare case of co-infection, where *S. dysgalactiae* is the most abundant pathogen according to dddPCR and is probably generating the disease. Another possibility is that *S. uberis* has an environmental origin, while *S. dysgalactiae* is the etiological agent of mastitis. In a study published by Steele et al. (2017), it was determined that the PCR technique is not indicated for diagnosing *S. uberis* in early lactation stages since the sensitivity decrease from 98% to 77% (Steele et al., 2017). Samples in which *S. uberis* was isolated by culture but were not detected by PCR could belong to animals in an early lactation stage; however, since the information on days on lactation of the cows from which the submitted samples were taken was not available, it is not possible to draw conclusions in this regard.

We identified samples with positive cultures for *Staphylococcus aureus* that were negative for both *Streptococcus* in the end point PCR. In these samples, loads of less than 4.7×10^2 CFU/mL were quantified by dddPCR. These results could indicate the presence of both pathogens in these animals but with a very low *Streptococcus* load relative to *Staphylococcus aureus*, making the culture-based detection of *Streptococcus* difficult. The same occurred with the culture negative samples for *Streptococcus*, in which the dddPCR quantified loads of both *Streptococcus* species lower than 1.5×10^2 CFU/mL. This load is well below the detection limit of end point PCR and culture. The high sensitivity of dddPCR may result in low quantification but positive results in animals that could be free of infection. This is one drawback of the dddPCR technique that could be tackled by establishing a threshold of quantification to consider an infected animal. In this regard, it is necessary to continue working by analyzing larger sample sizes along with additional animal – related information such as clinical signs, cow's history of mastitis cases, somatic cell count, as well as herd information.

Conclusion

We developed a specific and sensitive technique for detecting and quantifying two of the most important bacteria that cause bovine mastitis, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. The direct comparison of dddPCR with other commonly used techniques for bacterial detection (i.e., endpoint PCR and bacteriological culture) allowed us to determine the detection limit of all the techniques analyzed. This work represents the first step towards consolidating the application of dddPCR to identify the etiological agents causing mastitis. The dddPCR is especially suitable for milk samples with low bacterial load or intermittently release. The proposed method enables quick control measures, such as segregating infected animals if they show clinical signs or high SCC.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

Ethical approval was not required for the study involving animals in accordance with the local legislation and institutional requirements because Veterinarians or dairy farmers sent milk samples from March to July 2021 from farms located in San José – Uruguay (34°20'20"S 56°42'37"O).

Author contributions

LD: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration,

Resources, Software, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. GT: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Writing – review & editing. VD: Investigation, Methodology, Resources, Writing – review & editing. LC: Conceptualization, Writing – review & editing. JL: Conceptualization, Writing – review & editing. AI: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Software, Writing – review & editing. RP: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Supervision, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay FMV_3_2020_1_162241 and Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

Acknowledgments

GT, AI, and RP are members of the Sistema Nacional de Investigadores, Uruguay. LD is a scholarship recipient from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay.

References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Ashraf, A., and Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Trop. Anim. Health Prod.* 50, 1193–1202. doi: 10.1007/s11250-018-1629-0
- Britten, A. M. (2012). The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* 28, 187–202. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.006
- Carroll, E. J., Schalm, O. W., and LASMANIS, J. (1964). Experimental coliform (aerobacter aerogenes) mastitis: characteristics. *Am. J. Vet. Res.* 25, 720–726.
- Carvalho-Castro, G. A., Silva, J. R., Paiva, L. V., Custódio, D. A. C., Moreira, R. O., Mian, G. F., et al. (2017). Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. *Braz. J. Microbiol.* 48, 551–559. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.004
- Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Iqbal Yattoo, M., Khurana, S. K., Khandia, R., et al. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population—a review. *Vet. Q.* 39, 76. doi: 10.1080/01652176.2019.1642546
- Chen, C. Y., Nace, G. W., and Irwin, P. L. (2003). A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods* 55, 475–479. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00194-5
- Cremonesi, P., Cortimiglia, C., Picozzi, C., Minozzi, G., Malvisi, M., Luini, M., et al. (2016). Development of a droplet digital polymerase chain reaction for rapid and simultaneous identification of common foodborne pathogens in soft cheese. *Front. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01725
- Davies, P. L., Leigh, J. A., Bradley, A. J., Archer, S. C., Emes, R. D., and Green, M. J. (2016). Molecular epidemiology of streptococcus uberis clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 54, 68–74. doi: 10.1128/JCM.01583-15
- De Brun, M. L., Cosme, B., Petersen, M., Alvarez, I., Folgueras-Flatschart, A., Flatschart, R., et al. (2022). Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 34, 439–447. doi: 10.1177/10406387221085581
- Dohoo, I. R., and Meek, A. H. (1982). Somatic cell counts in bovine milk. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* 23, 119–125.
- Du, Y., Yan, Z., Song, K., Jin, J., Xiao, L., Sun, Z., et al. (2022). Development and evaluation of a multiplex droplet digital polymerase chain reaction method for simultaneous detection of five biothreat pathogens. *Front. Microbiol.* 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.970973
- Duarte, C. M., Freitas, P. P., and Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *J. Vet. Diagn. Invest.* 27 (6), 665–672. doi: 10.1177/1040638715603087
- Erskine, R. J., and Eberhart, R. J. (1988). Comparison of duplicate and single quarter milk samples for the identification of intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 71, 854–856. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(88)79627-7
- Esener, N., Green, M. J., Emes, R. D., Jowett, B., Davies, P. L., Bradley, A. J., et al. (2018). Discrimination of contagious and environmental strains of *Streptococcus uberis* in dairy herds by means of mass spectrometry and machine-learning. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-35867-6
- Firdaus, I. (2017). *Laboratory handbook on bovine mastitis* (Natl. Mastit. Coun.). Available at: https://www.academia.edu/50651208/Laboratory_Handbook_on_Bovine_Mastitis (Accessed September 21, 2022).
- Garcia, A. (2004). *Contagious vs. Environmental Mastitis*. Available at: http://openprairie.sdstate.edu/extension_extra/126 (Accessed September 15, 2022).
- Giannechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil, J., Salvarrey, L., and Rivero, R. (2014). Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. *Veterinaria* 50, 111–132.
- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., and Moreno López, J. (2002). Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* 43, 221–230. doi: 10.1186/1751-0147-43-221
- Gillespie, B. E., and Oliver, S. P. (2005). Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 88, 3510–3518. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73036-8
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 95–98.
- Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., et al. (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin. Chem.* 59, 892–902. doi: 10.1373/CLINCHEM.2013.206375

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fanim.2023.1336816/full#supplementary-material>

- Jiang, M., Babiuk, L. A., and Potter, A. A. (1996). Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. *Microb. Pathog.* 20, 297–307. doi: 10.1006/MPAT.1996.0028
- Kabelitz, T., Aubry, E., Van Vorst, K., Amon, T., and Fulde, M. (2021). microorganisms the role of streptococcus spp. in bovine mastitis. *Microorganisms* 9 (7), 1497. doi: 10.3390/microorganisms9071497
- Kaczorek, E., Malaczewska, J., Wójcik, R., Rękawek, W., and Siwicki, A. (2017). Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. *J. Dairy Sci.* 100 (8), 6442–6453. doi: 10.3168/jds.2017-12660
- Koskinen, M. T., Wellenberg, G. J., Sampimon, O. C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., et al. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J. Dairy Sci.* 93 (12), 5707–5715. doi: 10.3168/jds.2010-3167
- Król, J., Twardoń, J., Mrowiec, J., Podkowik, M., Dejneka, G., Debski, B., et al. (2009). Short communication: *Streptococcus canis* is able to establish a persistent udder infection in a dairy herd. *J. Dairy Sci.* 98, 7090–7096. doi: 10.3168/JDS.2015-9454
- Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J.-H., and Grabowski, N. (2014). Bovine streptococcus uberis intramammary infections and mastitis. *Clin. Microbiol.* 3. doi: 10.4172/2327-5073.1000157
- Mahmmod, Y. (2015). The future of PCR technologies in diagnosis of bovine mastitis pathogens. *Adv. Dairy Res.* 02. doi: 10.4172/2329-888X.1000E106
- Martin, S. W. (1984). Estimating disease prevalence and the interpretation of screening. *Prev. Vet. Med.* 2, 463–472. doi: 10.1016/0167-5877(84)90091-6
- McDermott, G. P., Do, D., Litterst, C. M., Maar, D., Hindson, C. M., Steenblock, E. R., et al. (2013). Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal. Chem.* 85, 11619–11627. doi: 10.1021/AC403061N
- Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennensen, L., Kristensen, K. A., Klaas, I. C., and Pedersen, K. (2019). Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 102, 2515–2524. doi: 10.3168/JDS.2018-15424
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., et al. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTV421
- Phuektes, P., Mansell, P. D., and Browning, G. F. (2001). Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84, 1140–1148. doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(01)74574-2
- Pitkälä, A., Gindonis, V., Wallin, H., and Honkanen-Buzalski, T. (2005). Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 88, 553–559. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72717-X
- Powell, E. A., and Babady, N. E. (2018). Digital PCR in the clinical microbiology laboratory: another tool on the molecular horizon. *Clin. Microbiol. News.* 40, 27–32. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2018.01.005
- Rački, N., Dreó, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., and Ravnikar, M. (2014). Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* 10. doi: 10.1186/S13007-014-0042-6
- Raemy, A., Meylan, M., Casati, S., Gaia, V., Berchtold, B., Boss, R., et al. (2013). Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. *Acta Vet. Scand.* 55, 53. doi: 10.1186/1751-0147-55-53/FIGURES/2
- Ramirez, J. D., Herrera, G., Hernández, C., Cruz-Saavedra, L., Muñoz, M., Flórez, C., et al. (2018). Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0007063. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0007063
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., and Lagacé, J. (2001). Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2584–2589. doi: 10.1128/JCM.39.7.2584-2589.2001
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 100 (12), 10381–10397. doi: 10.3168/jds.2017-13023
- Sears, P. M., Smith, B. S., English, P. B., Herer, P. S., and Gonzalez, R. N. (1990). Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 73, 2785–2789. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78964-3
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU153
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Bashir Gugioo, M., Iqbal Yatoo, M., Kumar Patel, S., et al. (2021). Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Vet. Q.* 41 (1), 107–136. doi: 10.1080/01652176.2021.1882713
- Steele, N. M., Williamson, J. H., Thresher, R., Laven, R. A., and Hillerton, J. E. (2017). Evaluating a commercial PCR assay against bacterial culture for diagnosing *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 100, 3816–3824. doi: 10.3168/jds.2016-11752
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115. doi: 10.1093/NAR/GKS96
- Wente, N., and Krömker, V. (2020). *Streptococcus dysgalactiae-contagious or environmental?* *Animals* 10 (11), 2185. doi: 10.3390/ani10112185
- Wu, J., Tang, B., Qiu, Y., Tan, R., Liu, J., Xia, J., et al. (2022). Clinical validation of a multiplex droplet digital PCR for diagnosing suspected bloodstream infections in ICU practice: a promising diagnostic tool. *Crit. Care* 26. doi: 10.1186/s13054-022-04116-8
- Yang, R., Paparini, A., Monis, P., and Ryan, U. (2014). Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *Int. J. Parasitol.* 44, 1105–1113. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.08.004
- Zadoks, R. N., and Watts, J. L. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet. Microbiol.* 134, 20–28. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.012
- Zheng, Y., Jin, J., Shao, Z., Liu, J., Zhang, R., Sun, R., et al. (2021). Development and clinical validation of a droplet digital PCR assay for detecting *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with suspected bloodstream infections. *Microbiologyopen* 10. doi: 10.1002/mbo3.1247

5.2 Capítulo 2:

Este capítulo se presenta en el formato de manuscrito pronto para enviar ya que aún no han sido sometido a revistas científicas arbitradas.

“Diagnóstico molecular de Streptococcus sp causantes de mastitis mediante multiplex PCR”

“Molecular diagnosis of Streptococcus sp. isolated from cases of mastitis through multiplex PCR”

Leticia Diana¹, Lucas Mastroianni¹, Rodrigo Puentes¹

¹Unidad Académica de Microbiología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria UdelaR. Correo electrónico: leticia.diana@fvet.edu.uy

Resumen

La mastitis bovina en nuestro país y en el mundo puede generar 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. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una PCR múltiplex para la identificación rápida y confiable de las tres especies de *Streptococcus* en simultáneo. Se utilizaron las cepas de referencia (ATCC, Washington DC, EE.UU) de cada una de las tres especies, *S. uberis* (ATCC 9927), *S. agalactiae* (ATCC 13813), *S. dysgalactiae* (ATCC 12394) y 9 cepas de campo de *Streptococcus sp.* elegidas al azar que se encuentran conservadas en el cepario de la Unidad Académica de Microbiología de la Facultad de Veterinaria. La extracción de ADN se realizó mediante lisis térmica complementada con la enzima achromopeptidasa y se utilizaron pares de primers especie específicos para cada una de las especies. La sensibilidad analítica de la múltiplex PCR fue alta ya que se pudieron detectar bandas claras hasta la dilución de 10^{-7} de la mezcla de ADN, equivalente a $4,1 \times 10^{-6}$ ng/ μ l de ADN. Las 9 cepas de *Streptococcus sp.* aisladas de casos de mastitis seleccionadas al azar pudieron ser identificadas mediante la múltiplex PCR. De estas cepas, seis resultaron identificadas como *S. uberis*, dos como *S. dysgalactiae* y una como *S.agalactiae*. En conclusión, fue posible estandarizar 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 quedando a disposición para su uso en nuestro país.

Introducción

La producción láctea en Uruguay es una de las más importantes posicionándolo como el mayor productor de leche de América Latina y el 7° a nivel mundial. El 30% de la leche producida es utilizada para consumo interno mientras que el 70% restante se exporta a más de 60 mercados a nivel mundial teniendo como prioridad Argelia, Brasil y Rusia (INALE, 2023).

La mastitis bovina (MB) es una de las enfermedades más importantes que afectan el ganado lechero en Uruguay y en el mundo. Se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria afectando la cantidad y la calidad de la leche producida, así como también el bienestar del animal. Es una enfermedad multifactorial por lo que resulta difícil de controlar ya que existen diversos patógenos asociados a ella. Puede manifestarse de dos maneras, clínica o subclínica. La forma clínica es de diagnóstico sencillo, ya que generalmente se evidencia una inflamación palpable en el cuarto de la ubre afectada y la leche muestra alteraciones visibles debido a la presencia de coágulos o descamaciones. En contraste, en las vacas que padecen la enfermedad de forma subclínica, no se observa ninguna afectación en la glándula mamaria ni en la leche a simple vista. Sin embargo, debido a la infección, hay un aumento en la cantidad de leucocitos polimorfonucleares, lo que se refleja en un incremento en el recuento de células somáticas (RCS) (Smith & Bradford. 2010). Se conocen más de 130 patógenos asociados con la mastitis bovina (Bradley. 2002) y pueden clasificarse en dos categorías: bacterias contagiosas y ambientales dependiendo del sitio que utilizan como reservorio principal (Ndahetuye et al. 2019).

Dentro del género *Streptococcus* se encuentra el *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) y *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) siendo las especies más relevantes que causan mastitis bovina (Kabelitz et al. 2021). Las características fenotípicas empleadas para su diagnóstico e identificación comprenden la tinción de Gram, la actividad catalasa, la detección de hemólisis en Agar Sangre, la capacidad de degradación de la esculina, el test de CAMP y la asignación al grupo de Lancefield (Markey et al. 2013). Estas bacterias grampositivas adoptan una forma esférica (0.5–2 µm) y suelen organizarse en pares o cadenas, siendo todas las especies del género catalasa negativas (Raemy et al. 2013b). No obstante, en relación con el resto de las pruebas de identificación, se observan resultados variables. El *S. dysgalactiae* ha surgido como un agente significativo en la mastitis bovina (Kromker et al. 2014). Las cepas de *S. dysgalactiae* exhiben negatividad en la prueba de CAMP y no hidrolizan la esculina (esculina negativa). Sin embargo, existe variabilidad en la producción de hemólisis en agar sangre y en la clasificación en el grupo de Lancefield, donde la mayoría de las cepas son no hemolíticas y pertenecen al grupo C de Lancefield (Kabelitz et al. 2021). A pesar de que inicialmente se consideraba menos virulento que el *S. agalactiae*, se ha observado que el *S. dysgalactiae* puede provocar infecciones severas en la glándula mamaria. Este descubrimiento genera preocupaciones en cuanto a la salud y bienestar de las vacas lecheras, así como a la calidad de la leche producida (Firdaus. 2017; NMC, 2017). Anteriormente, el *S. dysgalactiae* era clasificado como un patógeno ambiental; sin embargo, en la actualidad se lo puede clasificar también como contagioso, dado que su principal reservorio es la glándula mamaria, aunque aún no se comprenden completamente los mecanismos que le permiten persistir en ella (Markey et al. 2013; Wente & Krömker. 2020).

El *S. agalactiae* es clasificado como un patógeno contagioso, es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal de las vacas lecheras y puede sobrevivir indefinidamente en la glándula mamaria formando biofilm, siendo considerado un patógeno estrechamente asociado a la mastitis subclínica (Cheng & Han, 2020). Aunque *S. agalactiae* es clasificado como beta-hemolítico se han observado cepas no hemolíticas, es CAMP positivo y pertenece al grupo B de la clasificación de Lancefield (Raabe & Shane, 2019). Este patógeno se une a las células

epiteliales de la glándula mamaria, desencadenando la producción de enzimas y hemolisinas que provocan la degradación del tejido mamario sin penetrar el tejido intersticial. Su rápida multiplicación y la consiguiente lesión, junto con la abundante liberación de neutrófilos, resultan en una obstrucción de los conductos, conduciendo a la disminución de la función secretora de la glándula mamaria (Markey et al. 2013). Finalmente, el *S. uberis* se lo ha clasificado principalmente como ambiental; no obstante, se han identificado cepas que pueden ser categorizadas como contagiosas, e incluso se han registrado casos de contagio entre animales (Oliver et al. 2011; Davies et al. 2016; Esener et al. 2018). Esta especie produce predominantemente hemólisis alfa, aunque en ciertos casos se ha demostrado ser no hemolítica. Asimismo, presenta prueba de CAMP y degradación de la esculina variable siendo dos limitantes para el diagnóstico (Kabelitz et al. 2021). Además, su clasificación en el grupo de Lancefield puede ser variable, abarcando los grupos E, G, P o U (Oliver et al. 2011).

El correcto diagnóstico de la mastitis implica dos etapas fundamentales: en primer lugar, la detección de la presencia de la mastitis y, en segundo lugar, la identificación del agente patógeno responsable (Ashraf & Imran, 2018). El cultivo bacteriano convencional, llevado a cabo en un laboratorio microbiológico o en el mismo tambo, sigue siendo un procedimiento ampliamente utilizado para determinar los patógenos responsables de la mastitis. Este método se basa en la identificación fenotípica, respaldada por las propiedades bioquímicas del patógeno, que se evalúan a través de características como su crecimiento, morfología y capacidad para metabolizar sustratos (Zadoks & Watts, 2009; Duarte et al. 2015; Garcia et al. 2021). Una de las desventajas más importantes de este método de diagnóstico fenotípico es la elevada tasa de resultados falsos negativos (27-50%) seguido del análisis laborioso y lento (24-48 h) (Ashraf & Imran, 2018). Los métodos fenotípicos tradicionales no consiguen identificar el patógeno en aproximadamente el 30% de los casos de mastitis, ya que sólo pueden detectarse patógenos viables y aquellos que crecen en los medios de cultivo tradicionales (Ashraf & Imran, 2018).

El desarrollo de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha mejorado los resultados obtenidos en el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas entre ellas la mastitis bovina (Riffon et al. 2001; Ashraf et al. 2017). La técnica de PCR es más sensible y específica para el diagnóstico que los métodos convencionales lo que sugiere a esta técnica como una alternativa rápida y confiable para el diagnóstica de esta enfermedad (Kalin et al. 2017).

El objetivo de este estudio fue estandarizar una Multiplex PCR para la identificación molecular de cepas de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* aisladas de muestras de leche. Además, se buscó evaluar la especificidad y sensibilidad de dicha técnica, optimizándola para su implementación en el servicio de Diagnóstico Microbiológico de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Veterinaria.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas

Se trabajó con las cepas de referencia (ATCC, Washington DC, EE.UU.) de cada una de las tres especies, *S. uberis* (ATCC 9927), *S. agalactiae* (ATCC 13813) y *S. dysgalactiae* (ATCC 12394). Todas las cepas ATCC se encuentran conservadas en el cepario de la Unidad de Microbiología en caldo Trypticase Soya Broth (TSB) con 20% de glycerol a una temperatura de -80°C. Los cultivos en placa necesarios se realizaron en medio Agar Sangre al 5% e incubaron a 36°C durante 48hs. Una vez puesta a punto la múltiplex PCR se identificaron 9 cepas de *Streptococcus* sp seleccionadas al azar del cepario del laboratorio de la Unidad de Microbiología y aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica. La determinación del género de estas 9 cepas se realizó mediante tinción de Gram, la prueba de catalasa y la prueba de producción de hemólisis por crecimiento en agar sangre.

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de cada una de las cepas ATCC se llevó a cabo a partir de un cultivo puro en Agar Sangre al 5% con 48 hs de incubación. Este proceso se realizó utilizando el método de lisis térmica con la enzima Achromopeptidasa (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO) (Diana et al. 2019). La pureza y la cantidad del ADN extraído fueron evaluadas utilizando NanoDrop™ One (Thermo Scientific™), a través de la relación de absorbancia 260/280 y la medición de la concentración de ADN en ng/μl.

Puesta a punto de la Multiplex PCR

Para la puesta a punto de la Multiplex PCR se utilizaron tres pares de *primers* que amplifican una porción específica del ARNr 16s para la identificación de *S. dysgalactiae* y *S. agalactiae* y una porción específica del del ARNr23s para *S. uberis* de 624, 405 y 281pb respectivamente (Riffon et al. 2001) (Tabla 1). Como primer paso se determinó la temperatura óptima de pegado de los *primers* (*annealing*) mediante la realización de una PCR de gradiente, específicamente para cada una de las tres especies por separado. Este proceso implicó la definición de un intervalo de temperaturas comprendido entre 55°C y 65°C, el cual fue establecido teniendo en cuenta la información derivada de las temperaturas de *melting* (Tm) proporcionadas para cada uno de los *primers* (Tabla 1). La PCR fue realizada en un equipo Biorad (C1000 Touch™). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25μl de los cuales 14μl correspondieron a Mango Mix (Bioline), 0,4μM de cada uno de los tres pares de *primers* correspondientes a las tres especies, 200 ng de ADN y agua DPC necesaria para completar el volumen. El protocolo para la PCR de gradiente fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, luego se realizaron 35 ciclos de 94°C durante 45 seg, un gradiente de temperatura de 55°C a 65°C durante 1 min y una etapa de extensión a 72°C durante 2 min finalizando con una etapa de extensión final a 72°C por 1 min. Este protocolo de ciclado se utilizó para realizar los tres PCR de gradiente, uno por cada especie de *Streptococcus*. Los productos de PCR fueron observados mediante electroforesis, aplicando una corriente de 70V durante 1 hora en un gel de agarosa al 2%, el cual fue teñido con GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd) y posteriormente

visualizado bajo luz ultravioleta (UV). Se utilizó como referencia para la corrida un marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Scientific™). Utilizando la T_m determinada a partir de las tres PCRs de gradiente anteriores se realizó la múltiplex PCR utilizando una mezcla de ADN de las tres cepas ATCC. El protocolo de ciclado fue el siguiente: 94°C por 1 min, a continuación 35 ciclos de 94°C por 45s, 58°C por 1 min y 72°C por 2 min. Finalmente, una vez concluidos los ciclos, se agregó un paso extra de extensión final a 72°C por 1 min. Los productos de PCR se visualizaron de la misma manera que se describió anteriormente por las PCR de gradiente. Utilizando este protocolo descrito se identificaron las 9 cepas de *Streptococcus sp* del cepario seleccionadas al azar.

Tabla 1: *Primers* publicados por Riffon et al. (2001) para la identificación de *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *S. agalactiae* mediante PCR múltiple.

Especie	Primers	Secuencia (5'-3')*	Amplicon [#]	T _m ^{&}
<i>S. agalactiae</i>	Sag40	CGC TGA GGT TTG GTG TTT ACA	405	60
	Sag445	CAC TCC TAC CAA CGT TCT TC		
<i>S. uberis</i>	Sub1546	TGA TGG GGA GCG AAA ATA AG	624	59
	Sub 2170	CCC AAC AAC GCC TCA AAC GA		
<i>S. dysgalactiae</i>	Sdy105	AAA GGT GCA ACT GCA TCA CTA	281	57
	Sdy386	GTC ACA TGG TGG ATT TTC CA		

*Los cebadores amplifican regiones específicas del ADN que codifica para el ARNr 16S y 23S

[#]Tamaño del amplicon en pares de bases (pb), [&]Temperatura de *melting*

Determinación de la sensibilidad y especificidad analítica 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 frente a los tres primers en simultáneo. Para evaluar la sensibilidad la reacción se realizó utilizando 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 10⁻⁸ (4,1x10⁻⁸ ng/μl).

Resultados

Control de viabilidad de las cepas y extracción de ADN

Tanto las cepas ATCC como las 9 cepas identificadas posteriormente tuvieron muy buen crecimiento en medio Agar Sangre. Se observaron como cocos Gram positivos al microscopio y fueron catalasa negativo corroborando su pertenencia al género *Streptococcus*. Todos los ADN extraídos presentaron relaciones 260/280 aceptables (1,8 a 2,0) y concentraciones adecuadas para su utilización en una múltiplex PCR (promedio de 50 ng/μl)

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

A partir de las PCR de gradiente de temperatura efectuada para *S.uberis*, *S.dysgalactiae*, *S.agalactiae* en forma individual se determinó una temperatura de *annealing* para la multiplex PCR en 58°C. En esta temperatura se observaron bandas nítidas para las tres especies y no se observaron bandas inespecíficas para los diferentes patógenos.

La múltiplex PCR mostró una alta especificidad para los tres patógenos, evidenciada por la presencia de tres bandas de tamaño esperado en la muestra que contenía la mezcla de ADN

de dichos patógenos. Además, en cada una de las muestras de ADN individuales de los patógenos, se detectó exclusivamente una banda correspondiente a la especie correcta, confirmando la ausencia de amplificación cruzada (Figura 1). La sensibilidad analítica de la multiplex PCR resultó ser bastante alta ya que se pudieron detectar bandas claras hasta la dilución de 10^{-7} de la mezcla de ADN, equivalente a $4,1 \times 10^{-6}$ ng/ μ l de ADN (Figura 2). Las 9 cepas de *Streptococcus sp.* aisladas de casos de mastitis seleccionadas al azar pudieron ser identificadas mediante la multiplex PCR. De estas cepas, 6 resultaron identificadas como *S. uberis*, 2 como *S. dysgalactiae* y una como *S. agalactiae* (Figura 3).

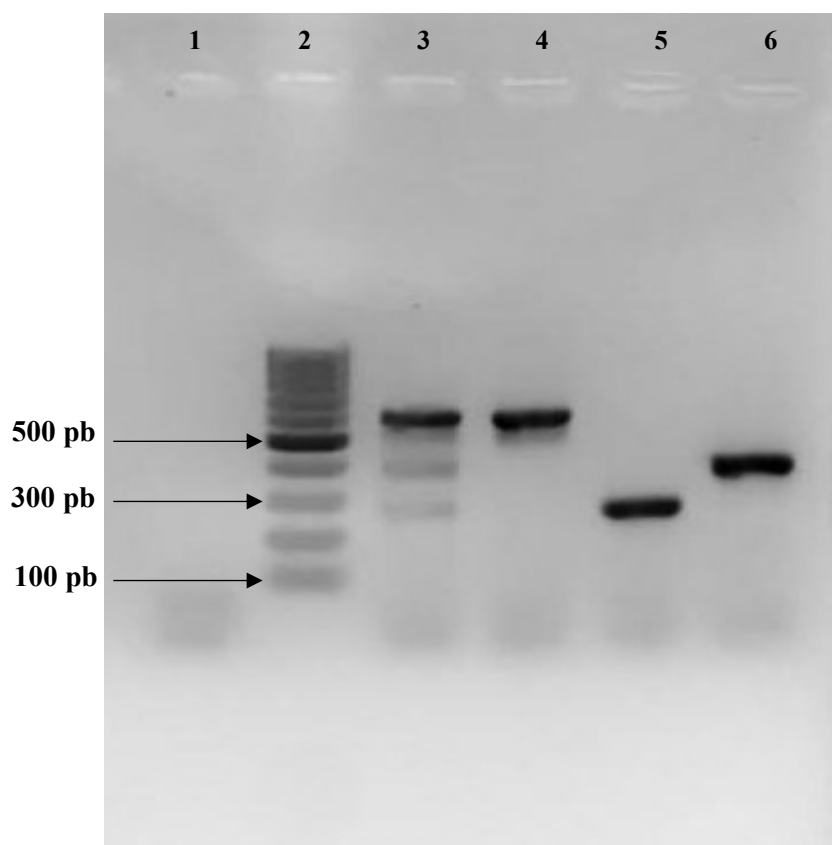


Figura 1: Amplificación mediante multiplex PCR para testear la especificidad de los primers de la Multiplex PCR puesta a punto. Carril 1: control de reacción con agua DEPC como muestra, carril 2: marcador de peso molecular (100 pb), carril 3: mezcla de ADN de las 3 especies, carril 4: ADN de *S.uberis* (624pb);, carril 5: ADN de *S.dysgalactiae* (281pb) y carril 6: ADN de *S.agalactiae* (405pb).

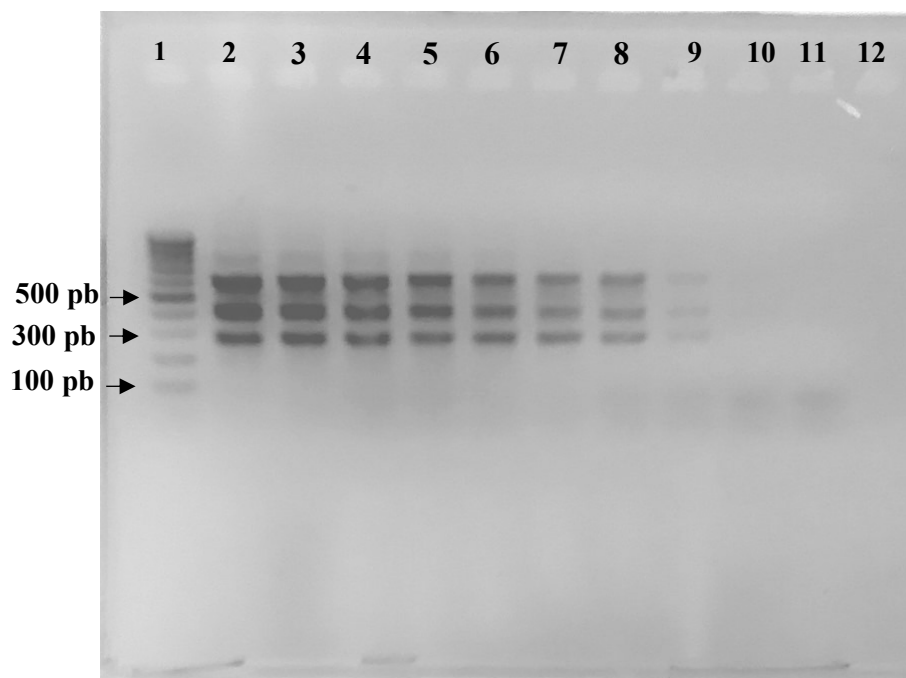


Figura 2: Sensibilidad analítica de la múltiplex PCR a partir de diluciones seriadas en base 10 de la mezcla de ADN de las tres especies. Carril: marcador de peso molecular (100pb), Carriles 2 al 10: diluciones en base 10 (1/10) desde la -1 hasta la -9 y carril 11: control de reacción con agua DEPC como muestra.

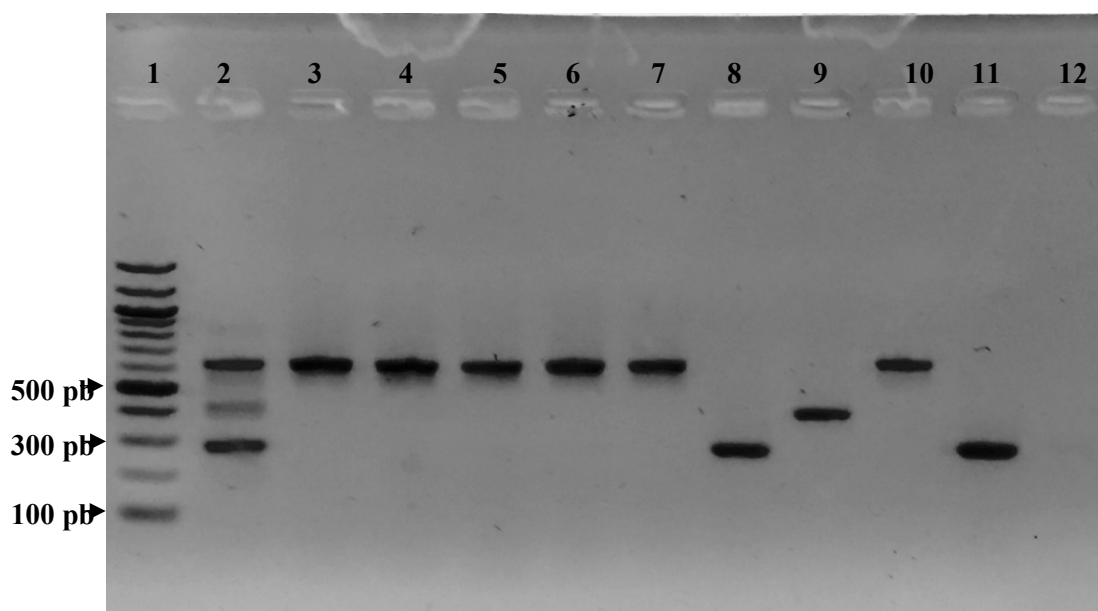


Figura 3: Identificación mediante la múltiplex PCR de 9 cepas de campo aisladas de leche pertenecientes al cepario del laboratorio de Microbiología. Carril 1: marcador de peso molecular (100pb), Carril 2: Mezcla de ADN de las tres cepas como control positivo, Carriles 3 al 11: cepas de campo de *Streptococcus sp.* carril 12: control de reacción con agua DEPC como muestra.

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 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 rRNA 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. 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 bioquímicas necesarias, asimismo es imprescindible la disponibilidad de personal capacitado para la realización de dichas pruebas debido a la complejidad de la manipulación. La identificación fenotípica de *S.uberis* por métodos convencionales ha demostrado que cuando se determina el grupo de Lancefield los resultados pueden ser variables, pudiendo indicar pertenencia al grupo E, G, P o U. Además, esta bacteria 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).

En este estudio se logró optimizar de manera exitosa una multiplex PCR que facilitó la detección e identificación específica y sensible de *S. agalactiae*, *S. uberis* y *S. dysgalactiae*, utilizando tanto aislamientos de cepas de referencia como 9 muestras obtenidas de vacas afectadas por mastitis. El método de extracción utilizado permitió obtener extractos de ADN de calidad aceptable 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 los tres microorganismos. 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 41×10^{-7} ng/μl. Es importante destacar que se ha reportado que el tratamiento, 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 lograr identificar eficazmente la bacteria presente. 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 resultados de este trabajo nos permiten concluir

que la complementación de las técnicas fenotípicas con la multiplex PCR aumentaría la precisión del diagnóstico y determinación de la especie bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6), 1193–1202.
<https://doi.org/10.1007/S11250-018-1629-0>
- 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>
- Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 164(2), 116–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699. <https://doi.org/10.5713/AJAS.20.0156>
- Davies, P. L., Leigh, J. A., Bradley, A. J., Archer, S. C., Emes, R. D., & Green, M. J. (2016). Molecular epidemiology of streptococcus uberis clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity and transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 68–74.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01583-15>
- Diana, L., Ciuffo, C., & Musto, H. (2019). Identificación y caracterización de Staphylococcus resistentes a meticilina aislados de perros. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212), 45–51.
<https://doi.org/10.29155/vet.55.212.1>
- Duarte, C. M., Freitas, P. P., & Bexiga, R. (2015). Technological advances in bovine mastitis diagnosis. *Https://Doi.Org/10.1177/1040638715603087*, 27(6), 665–672. <https://doi.org/10.1177/1040638715603087>
- Esener, N., Green, M. J., Emes, R. D., Jowett, B., Davies, P. L., Bradley, A. J., & Dottorini, T. (2018). Discrimination of contagious and environmental strains of Streptococcus uberis in dairy herds by means of mass spectrometry and machine-learning. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35867-6>
- Firdaus, I. (2017). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. *National Mastitis Council (NMC)*.
https://www.academia.edu/50651208/Laboratory_Handbook_on_Bovine_Mastitis

- Garcia, B. L. N., Fidelis, C. E., Freu, G., Granja, B. de M., & dos Santos, M. V. (2021). Evaluation of Chromogenic Culture Media for Rapid Identification of Gram- Positive Bacteria Causing Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.662201>
- INALE. (2023). *Instituto Nacional de la Leche. Uruguay Lechero*.
- Kabelitz, T., Aubry, E., Van Vorst, K., Amon, T., & Fulde, M. (2021). *microorganisms The Role of Streptococcus spp. in Bovine Mastitis*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>
- 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>
- Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J.-H., & Grabowski, N. (2014). *Bovine Streptococcus uberis Intramammary Infections and Mastitis*. <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000157>
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Clinical veterinary microbiology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- 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>
- Ndahetuye, J. B., Persson, Y., Nyman, A. K., Tukei, M., Ongol, M. P., & Båge, R. (2019). Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri- urban areas of Kigali in Rwanda. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 2037. <https://doi.org/10.1007/S11250-019-01905-2>
- NMC. (2017). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis 3rd Edition. *National Mastitis Council, Inc*, 1–148.
- 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, 3886–3890. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72431-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72431-6)

- Oliver, S. P., Pighetti, G. M., & Almeida, R. a. (2011). Environmental Pathogens. *Elsevier*, 3, 1728–1734.
- Raabe, V. N., & Shane, A. L. (2019). Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiology Spectrum*, 7(2).
<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0007-2018>
- 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, 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>
- Smith, Bradford, P. (2010). Medicina Interna de Grandes Animales. In Elsevier Inc. Wente, N., & Krömker, V. (2020). Streptococcus dysgalactiae—Contagious or Environmental? *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 10(11), 1–7.
<https://doi.org/10.3390/ANI10112185>
- 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>

5.3. Capítulo 3:

Los resultados de este experimento fueron enviados a la Revista Argentina de Microbiología (ELSEVIER) y al día de la fecha el manuscrito se encuentra en revisión por lo que se expone en el formato exigido por la revista.

“Resultados contradictorios en la identificación fenotípica y molecular de cepas de Streptococcus spp. en cepas aisladas de casos de mastitis bovina”

Resumen

La mastitis bovina constituye una amenaza significativa para la producción láctea global, ocasionando considerables pérdidas en la producción de leche. *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* son comúnmente asociadas con esta enfermedad. Un diagnóstico preciso es fundamental para implementar un tratamiento eficaz y minimizar su impacto en la producción lechera. Se analizaron 115 cepas de *Streptococcus* aisladas de casos de mastitis bovina identificando la especie mediante PCR. Además, se evaluó la resistencia a tetraciclina, eritromicina y penicilina en 81 de las cepas estudiadas. Se observaron disparidades significativas entre la detección fenotípica y genotípica en las tres especies, con solo un 31% de coincidencia entre ambas en las cepas estudiadas. La prevalencia fenotípica indicó que *S. dysgalactiae* fue la especie más común, seguida por *S. uberis* y *S. agalactiae*. Sin embargo, la identificación genotípica reveló que *S. uberis* era la más prevalente, seguida por *S. dysgalactiae*, mientras que *S. agalactiae* permaneció como la menos prevalente. La PCR demostró una alta sensibilidad y rapidez, sugiriendo su posible implementación rutinaria en el diagnóstico de la mastitis bovina causada por *Streptococcus*. A pesar de la escasa resistencia a la penicilina, se observaron niveles más altos de resistencia a tetraciclina y eritromicina en las tres especies. Estos hallazgos subrayan la importancia de métodos de diagnóstico precisos y resaltan posibles diferencias en la prevalencia basadas en identificaciones fenotípicas y genotípicas. Finalmente, el estudio destaca la relevancia del diagnóstico temprano, evidencia diferencias en la prevalencia bacteriana y sugiere la utilidad de la PCR como herramienta diagnóstica.

Palabras Clave: Diagnóstico, Reacción en cadena de la polimerasa, Cultivo, Resistencia Antimicrobiana.

Contradictory results in phenotypic and molecular identification of *Streptococcus spp.* strains in isolates from bovine mastitis cases.

Resultados contradictorios en la identificación fenotípica y molecular de cepas de *Streptococcus spp.* en cepas aisladas de casos de mastitis bovina.

Running title: Identification of *Streptococcus spp.* in bovine mastitis

Título abreviado: Identificación de *Streptococcus spp.* de mastitis bovina

Resumen

La mastitis bovina constituye una amenaza significativa para la producción láctea global, ocasionando considerables pérdidas en la producción de leche. *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* son comúnmente asociadas con esta enfermedad. Un diagnóstico preciso es fundamental para implementar un tratamiento eficaz y minimizar su impacto en la producción lechera. Se analizaron 115 cepas de *Streptococcus* aisladas de casos de mastitis bovina identificando la especie mediante PCR. Además, se evaluó la resistencia a tetraciclina, eritromicina y penicilina en 81 de las cepas estudiadas. Se observaron disparidades significativas entre la detección fenotípica y genotípica en las tres especies, con solo un 31% de coincidencia entre ambas en las cepas estudiadas. La prevalencia fenotípica indicó que *S. dysgalactiae* fue la especie más común, seguida por *S. uberis* y *S. agalactiae*. Sin embargo, la identificación genotípica reveló que *S. uberis* era la más prevalente, seguida por *S. dysgalactiae*, mientras que *S. agalactiae* permaneció como la menos prevalente. La PCR demostró una alta sensibilidad y rapidez, sugiriendo su posible implementación rutinaria en el diagnóstico de la mastitis bovina causada por *Streptococcus*. A pesar de la escasa resistencia a la penicilina, se observaron niveles más altos de resistencia a tetraciclina y eritromicina en las tres especies. Estos hallazgos subrayan la importancia de métodos de diagnóstico precisos y resaltan posibles diferencias en la prevalencia basadas en identificaciones fenotípicas y genotípicas. Finalmente, el estudio destaca la relevancia del diagnóstico temprano, evidencia diferencias en la prevalencia bacteriana y sugiere la utilidad de la PCR como herramienta diagnóstica.

Palabras Clave: Diagnóstico, Reacción en cadena de la polimerasa, Cultivo, Resistencia Antimicrobiana.

Abstract

Bovine mastitis poses a significant threat to global dairy production, resulting in substantial losses in milk production. *Streptococcus* bacteria, particularly *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, and *Streptococcus dysgalactiae*, are commonly implicated in this condition. An accurate diagnosis is crucial for implementing effective treatment and minimizing its impact on production. This study examined 115 *Streptococcus* strains isolated from bovine mastitis cases in Uruguay using PCR for species identification. Additionally, the resistance to tetracycline, erythromycin, and penicillin was assessed in 81 of the bacterial strains under study. The results were compared to conventional phenotypic tests, including the CAMP test, esculin hydrolysis, and hemolysis on blood agar. Significant disparities between phenotypic and genotypic detection were evident across all three species, with only 31% of strains identified phenotypically aligning with PCR results. Specifically, PCR identification of *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, and *S. agalactiae* matched phenotypic identification in 25%, 40%, and 33% of isolates, respectively. Phenotypic prevalence indicated *S. dysgalactiae* as the most prevalent, followed by *S. uberis* and *S. agalactiae*. However, genotypic identification revealed *S. uberis* as the most prevalent, followed by *S. dysgalactiae*, while *S. agalactiae* remained the least prevalent. PCR's high sensitivity and speed suggest its potential routine implementation for diagnosing bovine mastitis caused by *Streptococcus* in any laboratory. Notably, penicillin resistance is practically nonexistent, allowing continued antimicrobial use. However, tetracycline and erythromycin exhibit higher resistance levels across all three species. These findings underscore the importance of diagnostic methods and highlight potential differences in prevalence based on phenotypic and genotypic identifications.

Keywords: Diagnosis, Polymerase Chain Reaction, Culture, Antimicrobial Resistance

Introduction

Uruguay stands as the largest milk producer in Latin America, producing approximately 2.2 billion liters of milk annually. Notably, 70% of this production is exported to over 60 countries, positioning Uruguay as the 7th largest exporter of milk and dairy products worldwide¹⁵. This prominent economic position emphasizes the importance of preserving the health and productivity of the dairy cattle population in the country.

However, a persistent challenge within the dairy industry is Bovine Mastitis (BM), one of the most prevalent diseases in dairy cattle. BM manifests in clinical and subclinical forms, posing substantial threats to animal welfare and milk quality^{18,23}. *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*), and *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) emerge as critical pathogens contributing to the prevalence of mastitis, with their distinct characteristics and implications for dairy farming¹⁶. In Uruguay, the most commonly isolated bacteria in order of prevalence are *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Trueperella pyogenes*¹².

Although *S. dysgalactiae* was initially considered less virulent than *S. agalactiae*, it has been observed that *S. dysgalactiae* can cause severe mammary gland infections. *S. dysgalactiae* is considered by some authors as an environmental pathogen; however, it manages to persist in the mammary gland, using it as a reservoir. Therefore, it can also be classified as a contagious pathogen^{6,31}. Most strains of *S. dysgalactiae* are non-hemolytic (although there are some alpha-hemolytic strains), CAMP (Christine-Atkinson-Munch-Peterson test) negative, do not degrade aesculin and are usually classified in Lancefield group C¹⁶. *S. agalactiae* is closely associated with subclinical mastitis; it is a contagious pathogen capable of colonizing dairy cow's gastrointestinal tract and can survive indefinitely in the mammary gland forming biofilm⁷. It is considered beta-hemolytic, but non-hemolytic strains have been observed; it is CAMP positive and belongs to group B of the Lancefield classification²⁶. Finally, *S. uberis* is mainly environmental, although cases of transmission from an infected animal to a healthy one have been observed¹⁶. This species is primarily alpha-hemolytic but has also been shown to be non-hemolytic in some cases; CAMP and esculin degradation are variable and also present variability concerning the Lancefield group it belongs to, which can be E, G, P, or U¹⁶.

The Streptococci genus can be identified through growth on blood agar media and a negative catalase test. However, this diagnostic method has notable drawbacks, including a high rate of false negative results (27-50%) and the need for laborious and time-consuming analysis (48-

72h)³. Traditional phenotypic methods face limitations, with approximately 30% of mastitis cases remaining unidentified due to the reliance on detecting only viable pathogens³.

Due to the considerable phenotypic variability exhibited by these pathogens, molecular biology techniques such as polymerase chain reaction (PCR), mass spectrometry (MALDI/TOF), and next-generation sequencing (NGS) have started to be employed for their identification. These methods have proven to be faster, more sensitive, and more specific than conventional culturing for diagnosing mastitis-causing pathogens^{3,6,10,13,28,32}. It is suggested that the PCR technique can be combined with culture-based diagnostic techniques to identify bacteria responsible for mastitis^{5,17,27}.

Antimicrobials are often used for both the treatment and prophylaxis of bovine mastitis¹⁹. It is estimated that more than 50% of all antimicrobials used worldwide are used in veterinary medicine. The most commonly used are penicillins, sulfonamides, ampicillin, cloxacillin, and aminoglycosides^{7,30}. Moreover, antimicrobial therapy has raised significant public health concerns; their administration to animals increases the potential for spreading resistant microorganisms both along the food chain and in the various ecosystems². In Uruguay, Giannechini et al.¹¹ evaluated the sensitivity to penicillin, ampicillin, cephalothin, enrofloxacin, erythromycin, tetracycline, and sulfamethoxazole-trimethoprim in *Streptococcus* strains causing mastitis. These authors showed that both *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* were mainly resistant to tetracycline and enrofloxacin. Furthermore, *S. uberis* strains showed high sensitivity to all antibiotics tested. Another study conducted in Germany revealed that the *S. uberis* and *S. dysgalactiae* strains studied were resistant first to tetracycline, followed by erythromycin. In contrast, *S. agalactiae* strains were susceptible to these antibiotics²¹. In addition, sensitivity of all *Streptococcus* strains to β -lactam antibiotics was observed. However, an increase in the minimum inhibitory concentration (MIC) was noted, which could reflect a future change in the susceptibility of these microorganisms²¹.

This study aims to address the phenotypic and genotypic identification of *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis*, employing traditional phenotypic methods and advanced molecular biology techniques such as multiplex PCR. Additionally, the resistance profiles of the identified strains were analyzed.

Materials and Methods

Phenotypic identification and DNA extraction

A total of 127 strains isolated from milk samples obtained from cows diagnosed with clinical mastitis were identified phenotypically using biochemical tests following the National Mastitis Council guidelines²³. The genus was determined by Gram staining, catalase test, and hemolysis production test by growth on blood agar. The CAMP test, the esculin hydrolysis assay, and the Lancefield Group determination were used for species identification. These tests identified the strains as *S. agalactiae*, *S. uberis*, and *S. dysgalactiae*. All the strains identified in this study were stored in a freezer at -80°C in TSB broth with 20% Glycerol. Pure culture obtained in 5% Blood Agar through 48 hours of incubation at 37°C was used for the genomic DNA extraction, which was performed using the thermal lysis method with Achromopeptidase enzyme at a concentration of 10U/μl (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO). Briefly, 95μl of DEPC-treated water was incorporated into a 1.5ml tube, and then 5μl of Achromopeptidase solution was added. Two or three colonies were taken from the plate and incorporated into the microtube with the enzyme by vigorous vortexing. The microtubes were thermoblocked for 10 min at 50°C and then at 94°C. They were then centrifuged for 7 min at 17000 g, and 80μl of the supernatant was stored at -20°C until further use. The purity and amount of extracted DNA were evaluated in NanoDrop™ One (Thermo Scientific™), using the absorbance ratio 260/280 and DNA concentration measured in ng/μl.

Streptococcus sp. strain identification by Multiplex PCR

The *Streptococcus sp.* strains were identified by multiplex PCR using the Riffon protocol published in 2001²⁸ (Table 1). A DNA mixture, in equal concentration, of ATCC strains of the three *Streptococcus* species (ATCC, Washington DC, USA): *S. uberis* (ATCC 9927), *S. agalactiae* (ATCC 13813) and *S. dysgalactiae* (ATCC 12394) was used as a positive control, and DEPC-treated water was used as a negative control.

The PCR mixture was performed in a final volume of 25μl: 14μl of Mango Mix (Bioline®, Meridian Life Science, Inc), 0.4μM of each of the primers corresponding to the three species, 100 - 200 ng/μl of DNA, and DEPC-treated water until the final volume was completed. Following this, the mixture was thermally cycled once at 94°C for 1 min, then by 35 cycles, 45 sec at 94°C, 1 min at 58°C and 2 min at 72°C. Finally, once the cycles were completed, an extra extension step of 72°C for 1 min was added. The PCR-amplified products were observed by electrophoresis on a 2% agarose gel in 1X Buffer TAE at 100 volts for 1 hour, followed by

staining with GoodView™ (Beijing SBS Genetech Co., Ltd). A 100 bp molecular weight marker (Thermo Scientific™) was used to identify the products of interest.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial sensitivity was assessed in 81 strains previously identified through multiplex PCR using the Kirby-Bauer agar disc diffusion method following the guidelines of the Clinical Laboratory Standard Institute⁸. Discs containing antibiotics were employed at the following concentrations: penicillin (10U), tetracycline (30µg), and erythromycin (15µg). The isolates were cultured at 37°C on trypticase soy agar plates supplemented with 5% sheep blood. The cultured bacteria were suspended in normal saline, adjusting the suspensions to a 0.5 McFarland standard. The suspension was inoculated with a sterile swab onto Mueller-Hinton agar (Oxoid) supplemented with 5% sheep blood, followed by incubation at 37°C for 48 hours.

Data analysis

Individual samples were assigned unique identifiers using Microsoft Excel spreadsheets. The identification results for each bacterial strain were categorized as positive or negative at both phenotypic and molecular levels. To assess potential statistically significant differences in species determination between phenotypic and molecular genotypic methods, the chi-squared contingency test was employed. Additionally, Fisher's exact test was applied to identify any significant differences among the three species when comparing the two methods.

Results

Strain viability control and confirmation genus

Out of the 127 strains isolated and stored at -80°C, 115 were used in this study. They were cultured on 5% blood agar, confirming viability, and identified as *Streptococcus spp.* through Gram stain and catalase tests.

Genotypic identification of strains and comparison with phenotypic identification.

Significant differences were found between the results regarding phenotypic and genotypic identification of the 115 strains (p-value=0.0018). Although phenotypic identification suggests that *S. dysgalactiae* is the predominant pathogen, genotypic identification reveals that *S. uberis* is the most common. Moreover, it was observed that both *S. dysgalactiae* and *S.*

uberis identification by molecular methods differ significantly from phenotypic methods (p-value = 0.0059 for *S. dysgalactiae* and p-value = 0.00007 for *S. uberis*).

Multiplex PCR showed that 60.87% (70/115) of strains corresponded to *S. uberis*, 3.48% (4/115) to *S. agalactiae*, and 35.65% (41/115) to *S. dysgalactiae* (Figure 1). According to the phenotypic identification, out of the total 115 strains, 24.34% (28/115) were identified as *S. uberis*, 6.09% (7/115) as *S. agalactiae*, 44.35% (51/115) as *S. dysgalactiae*, and 25.22% (29/115) could not be categorized by species through phenotypic identification, reported as *Streptococcus sp* (Figure 1).

Excluding the 29 samples with unidentifiable species phenotypically, only 30.23% (26/86) had coincident results. There was a minimal overlap in the strains identified through phenotypic and genotypic methods.

Concerning strains identified phenotypically as *S. agalactiae*, only 14.3% (1/7) coincided with genotypic and phenotypic identification results. For non-coincident identifications, 71.4% (5/7) were identified as *S. dysgalactiae* and 14.3% (1/7) as *S. uberis* by Multiplex PCR (Figure 2). For *S. dysgalactiae*, only 23.5% (12/51) of phenotypic results coincided with genotypic results, while 72.5% (37/51) corresponded to *S. uberis* and 3.9% (2/51) to *S. agalactiae* (Figure 2). Regarding *S. uberis* strains, 46.4% (13/28) coincided in phenotypic and genotypic identification. Conversely, 53.6% (15/28) of strains initially identified as *S. uberis* phenotypically were identified as *S. dysgalactiae* through molecular methods. None of these strains were identified as *S. agalactiae* during molecular identification (Figure 2).

For strains identified phenotypically as *Streptococcus sp.* (29 samples), genotypic analysis categorized them as *S. agalactiae* 3% (1/29), *S. dysgalactiae* 31% (9/29), and *S. uberis* 66% (19/29) (Figure 2).

Antimicrobial susceptibility and resistance patterns.

In an overview of the 81 samples tested, 98.8% (80/81) were sensitive to penicillin, and only 1.2% (1/81) were resistant. Tetracycline sensitivity was observed in 66.7% (54/81) of strains, while 25.9% (21/81) displayed resistance, and 7.4% (6/81) exhibited intermediate resistance. For erythromycin, 85.2% (69/81) of strains were sensitive, 13.6% (11/81) were resistant, and 1.2% (1/81) displayed intermediate resistance (Figure 3).

Despite the limited number of *S. agalactiae* strains evaluated (n=4), all demonstrated susceptibility to penicillin and erythromycin, and resistance to tetracycline (Figure 4).

All *S. dysgalactiae* strains were susceptible to penicillin and erythromycin (Figure 4A and C). However, 41.2% (7/17) exhibited resistance, and 23.5% (4/17) displayed intermediate resistance to tetracycline (Figure 4B).

Furthermore, 98.5% (61/62) of *S. uberis* strains exhibited sensitive to penicillin, while only 1.6% (1/62) demonstrating resistance to this antimicrobial (Figure 4A). In this species, resistance to tetracycline was observed in 19% (12/62), and resistance to erythromycin was seen in 15% (9/62) (Figure 4B and C).

Finally, it is noteworthy that none of the strains analyzed from any of the three *Streptococcus* species exhibited resistance to all three antimicrobials simultaneously, indicating the absence of Multi Drug Resistance (MDR) strains.

Data analysis

Utilizing Pearson's χ^2 statistical test to assess the data derived from phenotypic and genotypic identification, significant differences in the results of conventional tests and the Multiplex PCR setup were identified, with a p-value 0.023, indicative of statistical significance ($p < 0.05$). Further examination through Fisher's exact test revealed that the most substantial disparities were observed in the identification of *S. uberis* and *S. dysgalactiae*, with p-values of 0.0007 and 0.0059, respectively.

Discussion

So far, conventional biochemical tests are the Gold Standard method for identifying bacteria causing bovine mastitis. These tests rely on morphological observations of colonies and the performance of the catalase test, Gram staining, and different routine biochemical tests such as the CAMP test, esculin hydrolysis, the determination of the Lancefield group, and the observation of hemolysis in 4% blood agar. Their effectiveness in accurately identifying *Streptococcus sp.* has been validated against other methods such as API® 20 Strep and RFLP-16S rRNA²⁴.

In another study, the identification of *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, and *S. agalactiae* was compared using phenotypic methods versus multiplex PCR. The reported efficiencies for each pathogen were 92%, 90%, and 100%, respectively. Therefore, they recommend a combined approach involving tests like catalase and Gram alongside multiplex PCR for accurate identification²⁷. It is noteworthy that treatment, management and disease characteristics vary epidemiologically based on the specific pathogen present. This holds practical significance as

cure rates differ, for instance, with penethamate hydriodide treatment specifically, achieving 87.7% for *S. uberis* and 64.7% for *S. dysgalactiae*²⁰.

The conducted analysis successfully classified each of the 115 studied strains into one of the three *Streptococcus* species, with no instances of non-amplification recorded. Genotypic identification indicated that *S. uberis* was the predominant species, followed by *S. dysgalactiae* and *S. agalactiae*. These findings align with what is commonly observed in most regions worldwide^{16,24}. However, prevalence studies in Uruguay have reported *S. dysgalactiae* as the most prevalent among *Streptococcus* species¹¹. It's crucial to note that, in the present study, samples were exclusively collected from cows with clinical mastitis, and this factor may have influenced the final result, particularly regarding the reported low prevalence of *S. agalactiae*. Clinical mastitis is primarily caused by 'environmental' pathogens, such as *S. dysgalactiae* and *S. uberis*, which could explain the observed distribution.

The results obtained from genotypic identification in this study did not align with those from the previously conducted phenotypic tests. According to the latter, *S. dysgalactiae* was identified as the most frequent species among the studied strains, followed by *S. uberis* and, finally, *S. agalactiae*. This concurs with Giannechini et al., 2014¹¹, who conducted the study using conventional culture methods. This suggests a potential misidentification of some pathogens, and these variations could be attributed to several factors, primarily the inherent characteristics of each test. While PCR relies on amplifying a conserved and species-specific genomic fragment, phenotypic methods involve laboratory tests that, in some cases, may introduce uncertainties in result interpretation and could lead to incorrect clinical treatment. Moreover, this type of test requires extensive time for the necessary reactions to occur, and the availability of trained personnel is essential for its performance due to the complexity of the manipulation. In the identification of *S. uberis* by conventional methods, it was found that when determining the Lancefield group, the results can be variable and may indicate belonging to groups E, G, P, or U. Furthermore, *S. uberis* can also exhibit variable responses to the CAMP test¹⁶. On the other hand, for *S. dysgalactiae*, considered non-hemolytic, there have been reported cases in which it presents alpha-hemolysis, similar to *S. uberis*¹⁶. Finally, although *S. agalactiae* is classified as beta-hemolytic, cases have been found where hemolysis does not occur, similar to *S. dysgalactiae*¹⁶. Considering the discrepancies discussed above, conducting further studies to delve deeper into the subject and understand its underlying causes would be advisable. This is particularly important given the practical significance of having

an easily applicable, sensitive, and specific technique that complements the currently employed methods.

Regarding penicillin resistance, most of the *Streptococcus* strains identified were sensitive to this antimicrobial (only one was resistant), which coincides with what was reported by Giannonechini in 2014 in Uruguay and other European countries such as Germany, France, Switzerland, and Finland^{4,14,25} but contrary to what has been reported in Asia and Argentina where penicillin resistance rates exceed 10%^{1,9,22}. Resistance to tetracycline and erythromycin was present in the isolated strains, coinciding with the results obtained by Minst in 2012 in Germany and Uruguay in 2014^{11,21}.

For *S. uberis*, resistant strains (15%) and intermediate resistance strains (2%) to erythromycin were reported, in contrast to those previously reported in Uruguay (0%)¹¹. For the *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* strains analyzed, no differences in resistance to this antimicrobial were found with those previously reported.

Finally, it is worth noting the absence of *Streptococcus* strains with a high degree of multiple resistance (MDR) in the present study, which contrasts with data reported in Germany in 2012, where a 13% incidence of MDR strains was found²¹.

According to all these results, penicillin continues to be an effective treatment against these pathogens in relation to tetracycline and erythromycin, which showed less effective responses, mainly for *S. uberis*.

Enhancing mastitis diagnosis at the species level for the *Streptococcus* genus could be achieved by combining phenotypic techniques with multiplex PCR. These results emphasize the significance of precise diagnostic methods and illuminate potential variations in prevalence when relying on phenotypic and genotypic identifications.

Bibliography

- [1] N.K. Abd El-Aziz, A.M. Ammar, H.M. El Damaty, R.A. Abd Elkader, H.A. Saad, W. El-Kazzaz, E. Khalifa, Environmental streptococcus uberis associated with clinical mastitis in dairy cows: Virulence traits, antimicrobial and biocide resistance, and epidemiological typing, *Animals*. 11 (2021) 1849.
- [2] R.D. Abdi, B.E. Gillespie, S. Ivey, G.M. Pighetti, R.A. Almeida, O.K. Dego, Antimicrobial resistance of major bacterial pathogens from dairy cows with high somatic cell count and clinical mastitis, *Animals*. 11 (2021) 1–14.
- [3] A. Ashraf, M. Imran, Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm, *Trop. Anim. Health Prod.* 50 (2018) 1193–1202.
- [4] B. Bengtsson, H.E. Unnerstad, T. Ekman, K. Artursson, M. Nilsson-Öst, K.P. Waller, Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows, *Vet. Microbiol.* 136 (2009) 142–149.
- [5] G.A. Carvalho-Castro, J.R. Silva, L. V. Paiva, D.A.C. Custódio, R.O. Moreira, G.F. Mian, I.A. Prado, A. Chalfun-Junior, G.M. Costa, Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds, *Braz. J. Microbiol.* 48 (2017) 551–559.
- [6] S. Chakraborty, K. Dhama, R. Tiwari, M. Iqbal Yatoo, S.K. Khurana, R. Khandia, A. Munjal, P. Munuswamy, M.A. Kumar, M. Singh, R. Singh, V.K. Gupta, W. Chaicumpa, Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population—a review, *Vet. Q.* 39 (2019) 76.
- [7] W.N. Cheng, S.G. Han, Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review, *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 33 (2020) 1699.
- [8] CLSI, CLSI VET01S ED6:2023-Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 6th Edition, 2023rd ed., 2023.
- [9] E. Crespi, A.M. Pereyra, T. Puigdevall, M. V. Rumi, M.F. Testorelli, N. Caggiano, L. Gulone, M. Mollerach, E.R. Gentilini, M.E. Srednik, Antimicrobial resistance studies in staphylococci and streptococci isolated from cows with mastitis in Argentina, *J. Vet. Sci.* 23 (2022) 1–10.
- [10] C.M. Duarte, P.P. Freitas, R. Bexiga, Technological advances in bovine mastitis diagnosis, <https://doi.org/10.1177/1040638715603087>. 27 (2015) 665–672.

- [11] R. Giannechini, C. Concha, I. Delucci, J. Gil, L. Salvarrey, R. Rivero, Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay, *Veterinaria*. 50 (2014) 111–132.
- [12] R. Giannechini, C. Concha, R. Rivero, I. Delucci, J. Moreno López, Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay, *Acta Vet. Scand.* 43 (2002) 221–230.
- [13] B.E. Gillespie, S.P. Oliver, Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction, *J. Dairy Sci.* 88 (2005) 3510–3518.
- [14] V. Guérin-Faubleé, F. Tardy, C. Bouveron, G. Carret, Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows, *Int. J. Antimicrob. Agents*. 19 (2002) 219–226.
- [15] INALE, Instituto Nacional de la Leche. Uruguay Lechero, (2023).
- [16] T. Kabelitz, E. Aubry, K. Van Vorst, T. Amon, M. Fulde, microorganisms The Role of *Streptococcus* spp. in Bovine Mastitis, (2021).
- [17] R. Kalin, M. Karahan, M.N. Acik, B. Tasdemir, B. Cetinkaya, Mastitisli inek sütlerinde önemli patojenlerin direkt tespiti için bir multipleks PCR yönteminin geliştirilmesi, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 23 (2017) 925–931.
- [18] V. Kromker, F. Reinecke, J.-H. Paduch, N. Grabowski, Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis, (2014).
- [19] T.F. Landers, B. Cohen, T.E. Wittum, E.L. Larson, A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential, *Public Health Rep.* 127 (2012) 4–22.
- [20] S. McDougall, D.G. Arthur, M.A. Bryan, J.J. Vermunt, A.M. Weir, Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics, *N. Z. Vet. J.* 55 (2007) 161–170.
- [21] K. Minst, E. Märklbauer, T. Miller, C. Meyer, Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents, *J. Dairy Sci.* 95 (2012) 6957–6962.
- [22] H.M. Nam, S.K. Lim, H.M. Kang, J.M. Kim, J.S. Moon, K.C. Jang, Y.S. Joo, M. Il Kang, S.C. Jung, Antimicrobial resistance of streptococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea, *J. Vet. Diagn. Invest.* 21 (2009) 698–701.
- [23] NMC, Laboratory Handbook on Bovine Mastitis 3rd Edition, Natl. Mastit. Counc. Inc. (2017) 1–148.
- [24] L. Odierno, L. Calvino, P. Traversa, M. Lasagno, C. Boggi, E. Reinoso,

- Conventional Identification of *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Argentinean Dairy Herds, *J. Dairy Sci.* 89 (n.d.) 3886–3890.
- [25] A. Pitkälä, J. Koort, J. Björkroth, Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples, *J. Dairy Sci.* 91 (2008) 4075–4081.
- [26] V.N. Raabe, A.L. Shane, Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*), *Microbiol. Spectr.* 7 (2019).
- [27] A. Raemy, M. Meylan, S. Casati, V. Gaia, B. Berchtold, R. Boss, A. Wyder, H.U. Graber, Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections, *Acta Vet. Scand.* 55 (2013) 53.
- [28] R. Riffon, K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, J. Lagacé, Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 2584–2589.
- [29] R. Riffon, K. Sayasith, H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, J. Lagacé, Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 2584–2589.
- [30] D. Tomanić, M. Samardžija, Z. Kovačević, Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review, *Antibiotics.* 12 (2023).
- [31] N. Wente, V. Krömker, *Streptococcus dysgalactiae*-Contagious or Environmental?, (n.d.).
- [32] R.N. Zadoks, J.L. Watts, Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping, *Vet. Microbiol.* 134 (2009) 20–28.

Tables and figures

Table 1: Primers for identifying *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, and *S. agalactiae* by multiplex PCR

Species	Primers	Sequence (5'-3')*	Amplification product size (bp)	Melting Temperature (°C)
<i>S. agalactiae</i>	Sag40	CGC TGA GGT TTG GTG TTT ACA	405	60
	Sag445	CAC TCC TAC CAA CGT TCT TC		
<i>S. uberis</i>	Sub1546	TGA TGG GGA GCG AAA ATA AG	624	59
	Sub 2170	CCC AAC AAC GCC TCA AAC GA		
<i>S. dysgalactiae</i>	Sdy105	AAA GGT GCA ACT GCA TCA CTA	281	57
	Sdy386	GTC ACA TGG TGG ATT TTC CA		

*The primers amplified specific regions of the DNA coding for 16S and 23S rRNA[29]

Figure 1: Phenotypic and genotypic determination of *Streptococcus* species for each strain.

Figure 2: Distribution of genotypic identification for each species in relation to their phenotypic identification. A) strains phenotypically identified as *S. agalactiae*. B) strains phenotypically identified as *S. dysgalactiae*. C) strains phenotypically identified as *S. uberis*. D) strains phenotypically identified as *Streptococcus sp.* The underlined numbers represent the strains that matched in both identification methods.

Figure 3: Overall resistance and sensitivity patterns of strains for the three antimicrobials tested. R: resistant, S: sensitive, and I: intermediate resistance

Figure 4: Resistance and sensitivity patterns of strains for each antimicrobial within the three species. A) Penicillin, B) Tetracycline, C) Eritomycin. R: resistant, S: sensitive, and I: intermediate resistant

FIGURE 1

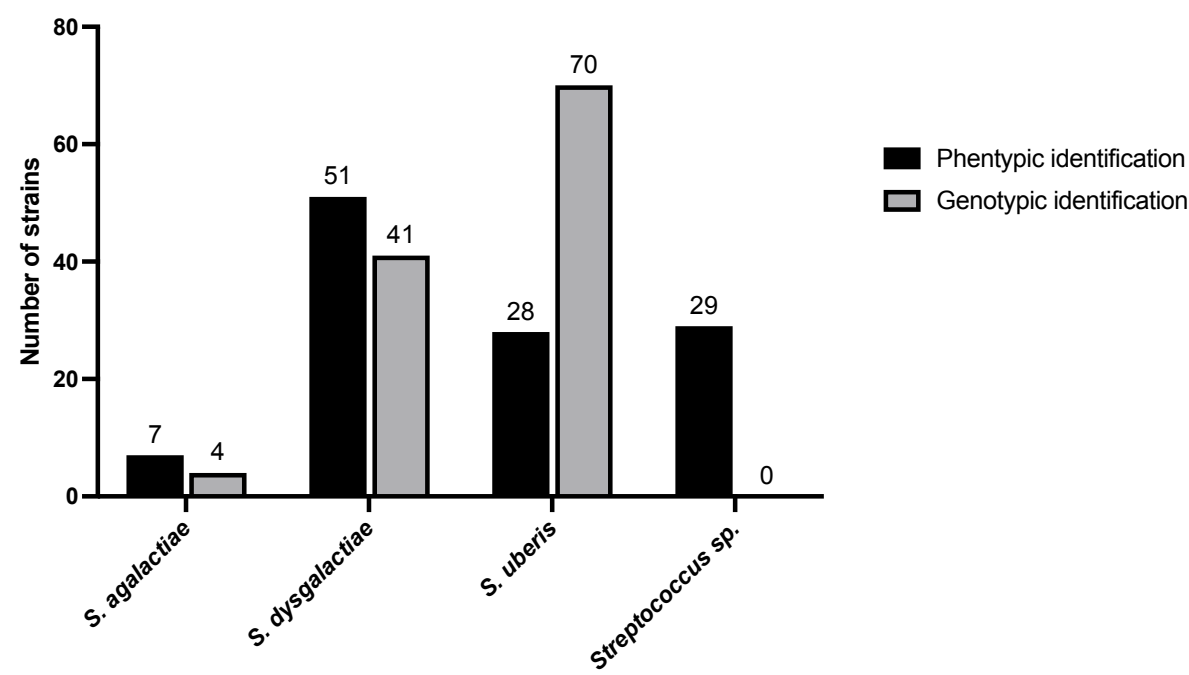


FIGURE 2

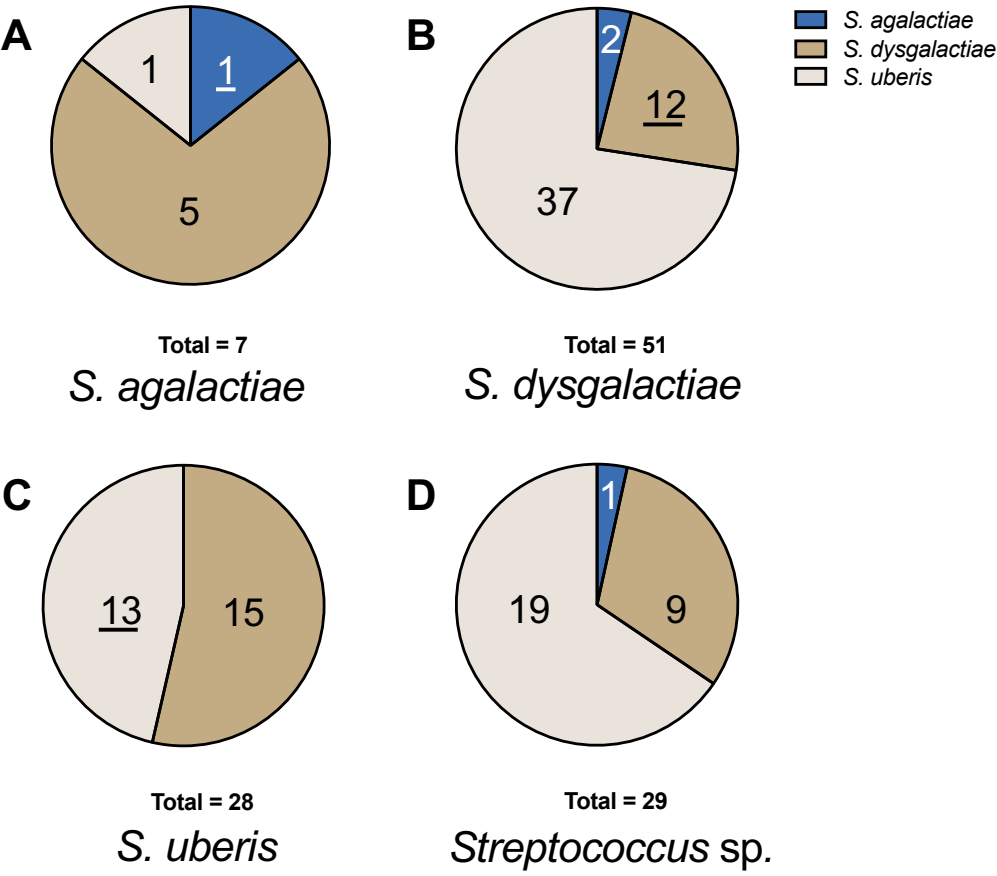


FIGURE 3

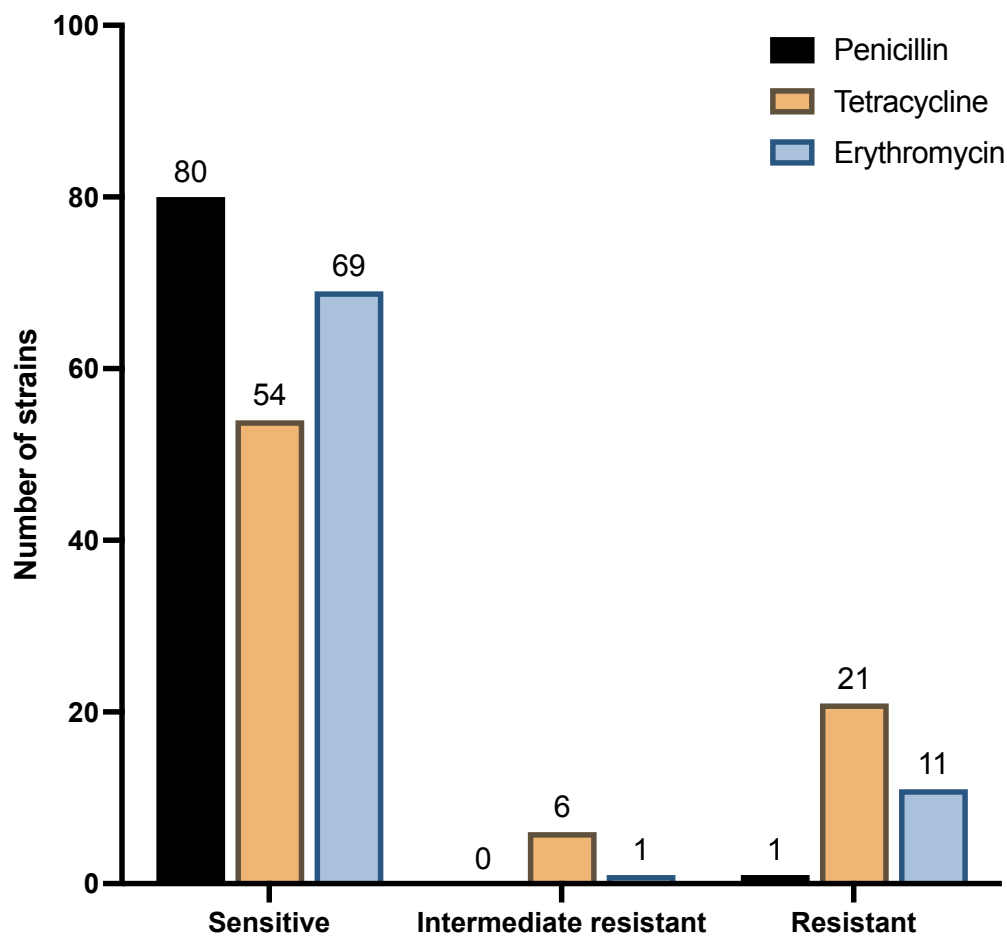
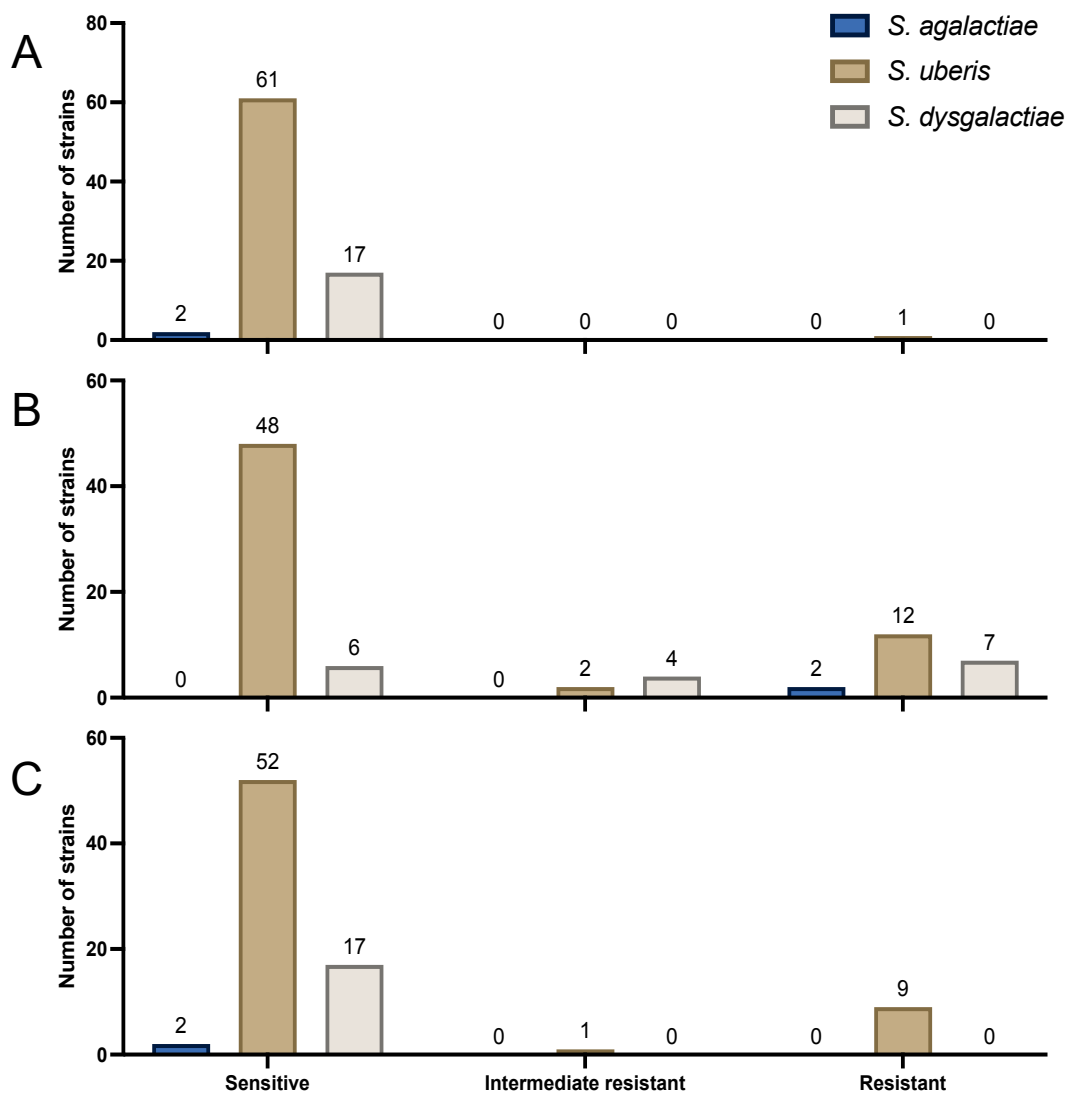


FIGURE 4



5.4 Capítulo 4:

“Minimizar los Cultivos sin crecimiento en Mastitis Bovina: Avances en el Diagnóstico mediante Técnicas Moleculares”

Introducción

Como ya hemos mencionado anteriormente el diagnóstico de la mastitis bovina es fundamental para poder tomar medidas de tratamiento y control de la enfermedad en el rodeo.

Actualmente se cuenta con técnicas de diagnóstico variadas que van desde los clásicos cultivos bacterianos hasta técnicas de biología molecular pasando por la proteómica o la nanotecnología. La posibilidad de uso de estas técnicas va a depender de cada país así como también de cada laboratorio y del personal capacitado. El cultivo bacteriano continúa siendo en la actualidad la técnica de oro para el diagnóstico de mastitis pudiendo ser complementado por ejemplo con técnicas de biología molecular que brindan mayor especificidad y sensibilidad. A pesar de ser el más utilizado, el cultivo bacteriano presenta algunas desventajas, ya mencionadas en esta tesis anteriormente. En este capítulo nos concentraremos en una de las principales desventajas del cultivo bacteriano que es la aparición de un gran número de cultivos sin crecimiento que se obtienen a la hora de realizar un diagnóstico.

Según datos previamente publicados, entre el 20 y el 30% de las muestras de leche obtenidas de animales con mastitis clínica no muestran crecimiento bacteriano. Este fenómeno se registró en un 26.5% de los casos en una investigación llevada a cabo en el Reino Unido (Bradley et al. 2007) mientras que en un análisis previo en Estados Unidos se observó en el 27.2% de las muestras (Hogan et al. 1989). En Finlandia se reportaron tasas de cultivos negativos de 23.7% (Koivula et al. 2007) mientras que en Canadá se reportó una cifra extremadamente alta del 43.9% (Riekerink et al. 2008). Varios factores pueden explicar la obtención de un cultivo sin crecimiento incluyendo por ejemplo la escasa cantidad de microorganismos presentes, que las muestras contengan patógenos con requerimientos nutricionales particulares como puede ser los *Mollicutes* (*Mycoplasma/Acholeplasma*) o que las condiciones para el cultivo no sean adecuadas (Fox, 2012). La presencia de antibióticos en la leche también puede ser un factor que afecte el crecimiento de las bacterias y por lo tanto se obtenga un cultivo negativo. Se suma a esto, la existencia de compuestos inhibidores de las bacterias en la leche como la lactoferrina, lisozima, componentes del complemento, e inmunoglobulinas así como también residuos de desinfectantes utilizados para limpiar el pezón (Boonyayatra et al. 2012).

La eficacia en el aislamiento de patógenos se ha incrementado progresivamente mediante la aplicación de diversas estrategias de prueba, incluyendo el uso de medios de cultivo selectivos, la incubación, la congelación y el incremento del volumen de inoculación (Lam et al. 2009). Un resultado sin crecimiento para una muestra de leche no solo resulta frustrante para el productor y el veterinario que envía la muestra, sino también para el laboratorio responsable de realizar el diagnóstico.

El alto porcentaje de cultivos sin desarrollo bacteriano en el mundo ha despertado el interés y la preocupación de los productores, veterinarios y científicos en un grupo de bacterias

particulares que son incapaces de crecer en los medios de cultivo convencionales, los *Mycoplasmas* y *Acholeplasmas*.

Las bacterias de estos géneros pertenecen a la clase *Mollicutes* y se caracterizan por la ausencia de pared celular, un bajo contenido de G+C (23%-40%) y un pequeño genoma (0.58-1.4 Mbp) (Parker et al. 2018). Los *Mycoplasmas* son considerados patógenos primarios y generan grandes pérdidas por brotes en los tambos (Boonyayatra et al. 2012). Mientras que los *Acholeplasmas* son contaminantes ambientales que pueden terminar en la muestra de leche debido a una técnica de muestreo incorrecta siendo desconocido si estos microorganismos tienen la capacidad de generar mastitis. Sin embargo, *Acholeplasma spp.* puede ser aislado de la leche ya sea como un contaminante (Boonyayatra et al. 2012) o como un coinvasor con otros *Mycoplasmas* de menor virulencia, necesitando un compromiso más significativo del huésped para inducir la enfermedad (Counter, 1978; Al-Farha et al. 2017; Parker et al. 2018).

Uno de los inconvenientes fundamentales en el diagnóstico de estas bacterias además de los estrictos requerimientos nutricionales es la lenta tasa de crecimiento que presentan. En un medio rico y específico para *Mycoplasmas* las colonias típicas con apariencia de huevo frito pueden observarse luego de 7 a 10 días de incubación (Quinn et al. 2003) lo que representa un problema en el diagnóstico impidiendo un resultado rápido y por lo tanto medidas de control a tiempo. Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de *Mycoplasmas* suelen restringir el desarrollo de distintas familias bacterianas por el agregado de diferentes antimicrobianos sin embargo permiten el crecimiento de los *Acholeplasmas* (Parker et al. 2018). La similitud morfológica considerable entre la mayoría de las especies de *Acholeplasma* y *Mycoplasma*, caracterizada por un aspecto similar al de un "huevo frito", hace inviable su distinción únicamente mediante técnicas de cultivo, lo que puede llevar a un diagnóstico erróneo de muestras como positivas para *Mycoplasma* cuando no lo son. En nuestro país particularmente no se ha descrito hasta ahora la presencia ni de *Mycoplasma* ni *Acholeplasma* como agente causante de mastitis.

Por todo lo antes expuesto las preguntas que busca responder este capítulo son:

- ¿Es posible que, utilizando técnicas más sensibles como PCR, aquellas muestras de leche con cultivo sin crecimiento sean positivas a algún patógeno?, ¿Cuál es la distribución de patógenos identificados mediante estos métodos?
- ¿Se identifican bacterias pertenecientes a la clase *Mollicutes* en las muestras de leche con cultivo sin crecimiento analizadas?, ¿Cuál es su frecuencia de aparición?

Objetivo general

Utilizar la PCR para la detección de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Mollicutes* en vacas con mastitis clínica sin desarrollo bacteriano en el cultivo convencional.

Objetivos específicos:

- Extraer y cuantificar ADN bacteriano a partir de muestras de leche de vacas con mastitis clínica y con cultivos negativos.
- Detectar *S. aureus*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* a partir de las muestras de leche con cultivo negativo.
- Detectar *Mollicutes* (*Mycoplasma/Acholeplasma*) a partir de las muestras de leche con cultivo negativo.
- Determinar la proporción de infecciones causadas por *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *Mollicutes* o infección mixta a partir de cultivos negativos.

Materiales y métodos

Muestras y extracción de ADN

Se analizaron un total de 153 muestras de leche, las cuales fueron tomadas de bovinos diagnosticados con mastitis clínica en un tambo comercial. Dentro del total de muestras recolectadas, 54 fueron obtenidas de animales que recibieron tratamiento con antimicrobiano 72 horas después de la toma de muestras. Por otro lado, 99 muestras procedieron de animales que no tuvieron la necesidad de tratamiento. El diagnóstico clínico de la mastitis se realizó mediante la técnica de "despunte" en cada pezón, evaluando las características anormales de la leche (presencia de grumos, sangre) así como los signos clínicos de inflamación en la ubre (aumento de temperatura, dolor, hinchazón).

La recolección de las muestras se llevó a cabo durante el proceso de ordeño y fue ejecutada por el veterinario a cargo del tambo. Posteriormente las muestras obtenidas fueron enviadas congeladas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Veterinaria y presentaban un diagnóstico previo mediante cultivo con resultado sin crecimiento en todos los casos.

Además se incluyeron 20 muestras de animales sanos, es decir que a criterio del veterinario responsable del tambo no tenían mastitis clínica.

La extracción de ADN bacteriano a partir de las muestras de leche se realizó utilizando el kit comercial GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits Sigma-Aldrich siguiendo las especificaciones del fabricante con el agregado de lisozima (9 mg/muestra) para una correcta degradación de la pared bacteriana. Previo a la extracción un volumen de 2 mL de leche se centrifugó a 13.300 rpm por 5 minutos con el fin de descartar la grasa y suero presente en la muestra. Posteriormente se realizaron lavados con 1000 µL de suero fisiológico estéril, hasta obtener una solución clara en el sobrenadante y un pellet a partir del cual se realizó la extracción de ADN. La pureza y concentración del ADN obtenido fue evaluada mediante NanoDrop™ One (Thermo Scientific™) y los extractos se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Detección de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* en las muestras de leche

La detección de los tres patógenos se realizó mediante una PCR tiempo final para cada patógeno. Para la detección de *Staphylococcus aureus* se utilizaron los primers y el protocolo

descrito por Gillespie et al. (2005) (Tabla 1). Mientras que para la detección de *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* se utilizaron los primers y el protocolo descrito por Diana et al. (2024) (Tabla 1).

En todos los casos la mezcla para las reacciones de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, compuesta por 12.5 µL de master mix (NZYTaQ II 2× Green Master Mix), 1 µL de cada primer a una concentración de 10 mM, 9.5 µL de agua libre de DNasa y Rnasa y 50 ng de ADN. Las corridas de PCR se llevaron a cabo en un termociclador C1000 TouchTM (Bio-Rad), bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos que consistieron en 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 30 segundos a 72°C, finalizando con una extensión final de 5 minutos a 72°C. Para confirmar la presencia del fragmento amplificado, la mezcla de PCR fue sometida a una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE, utilizando 5 µL del marcador de peso molecular GeneRuler 100bp de Thermo Scientific. La corrida se realizó a 100V durante 45 minutos y los amplicones fueron visualizados mediante tinción con SYBR Green Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz ultravioleta (UV).

Tabla 1: Primers utilizados para la identificación de *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *Mollicutes* (*Myco/Acheloplasma*) mediante PCR.

Especie	Primers	Secuencia (5'-3')	Amplicón
<i>S. aureus</i>	Sa-F	TCAACGATATTCTTCACGACTAA	160
	Sa-R	CCAGCTTCGGTACTACTAAAG	
<i>S. dysgalactiae</i>	Sd. hyp_F	CCAGCGACAACCCTAGGACC	161
	Sd. Hyp_R	GAGATCGGCGTCTACTTGACTCAG	
<i>S. uberis</i>	Su. mutS_F	CATTGAACCTCGTGCCTT	158
	Su. mutS_R	CTAGATGTCCCAAAGCCAT	
<i>Mollicutes</i> (<i>Myco/Acheloplasma</i>)	Myco16SF772	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	269
	Myco16SR1041	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCT	

Identificación de *Mollicutes* (*Mycoplasmatales* y *Acholeplasmatales*) en las muestras de leche a través de PCR y posterior secuenciación

La detección las bacterias de la clase *Mollicutes* se realizó mediante una PCR tiempo final. Se utilizaron los primers y el protocolo descrito por Gioia et al. (2016) (Tabla 1). Estos primers no diferencian *Mycoplasmatales* de *Acholeplasmatales* por lo que para su identificación se realizó la secuenciación, como se explica más abajo en este apartado, de 12 productos de PCR seleccionados al azar.

Las corridas de PCR se llevaron a cabo en un termociclador C1000 TouchTM (Bio-Rad), bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos que consistieron en 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, finalizando con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Para confirmar la presencia del fragmento amplificado, la mezcla de PCR fue sometida a una electroforesis en gel de

agarosa al 2% en buffer TAE, utilizando 5 µL del marcador de peso molecular GeneRuler 100bp de Thermo Scientific. La corrida se realizó a 100V durante 45 minutos y los amplicones fueron visualizados mediante tinción con SYBR Green Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz ultravioleta (UV). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Utilizando el programa Bioedit (Hall, 1999) el cromatograma y la secuencia recibida desde el servicio de secuenciación fue editado mediante inspección visual donde se eliminaron los errores típicos del secuenciador Sanger y se empalmaron las secuencias obtenidas de cada *primer* para conseguir una secuencia única. La identificación de las cepas mediante *blast* se realizó utilizando el servidor online www.ezbiocloud.net. Esta herramienta se utiliza en taxonomía, genómica, ecología y metagenómica de bacterias y archaeas. Ezbiocloud ha sido desarrollada y es mantenida y depurada por el laboratorio “ChunLab” (<http://chunlab.com>) (Yoon et al. 2017). Uno de los servicios brindados por esta herramienta es la identificación de cepas bacterianas utilizando las secuencias de ARNr16S, estableciendo un grado de confianza de los resultados. Una vez que se crea un usuario dentro del sitio, es posible realizar las identificaciones y guardar los resultados dentro de su propio usuario. Una vez realizada la identificación el resultado se muestra en columnas: el nombre de nuestra propia cepa (*Name*), porcentaje de cobertura (*Completeness %*), nombre de la especie con más similitud (*Top-hit taxon*), porcentaje de similitud (*Similarity %*) y la taxonomía de la especie que encontró más parecida.

Análisis de datos

Los datos obtenidos de las pruebas PCR, tanto positivos como negativos, se registraron en hojas de Excel y se sometieron a un análisis de estadística descriptiva. Se evaluó si cada especie estaba sobrerrepresentada en muestras donde se identificaba de manera exclusiva con respecto a las muestras en las que se detectaba junto a los otros grupos analizados. Para determinar la significancia del enriquecimiento, se aplicó el Test de Fisher, estableciendo un valor umbral de $p < 0,05$. Posteriormente se comparó la distribución de cada grupo detectado en las muestras de vacas que resolvieron la infección antes de las 72 hs y las que no la resolvieron mediante el Test de χ^2 . Considerando solo aquellas muestras en la que la identificación fue exclusiva.

Resultados

Extracción de ADN y detección de *S. aureus*, *S.dysgalactiae*, *S. uberis* y *Mycoplasma sp*

A pesar de la dificultad que presenta extraer ADN de muestras de leche debido a la presencia de grasa, proteínas, etc, se lograron obtener buenas cantidades de ADN en todas las muestras con un promedio de 200 ng/µl y una relación 260/280 entre 1,6 y 2,0.

De las 153 muestras analizadas el 83,7% (128) de las muestras fueron positivas por PCR a algún patógeno mientras que solo el 16,3% (25) de las muestras fueron negativas a todos los patógenos (Figura 1). Con respecto a la detección de los patógenos mediante PCR, de las 128 muestras positivas a algún patógeno en el 46,1% se detectó *S. aureus*, en el 42,2% el *S. dysgalactiae*, en el 11,5 % el *S. uberis* y en el 71,9% fueron detectados *Mollicutes* (Figura 2). Las 20 muestras utilizadas como controles negativos provenientes de vacas sanas que nunca habían tenido mastitis resultaron negativas a todas las PCR.

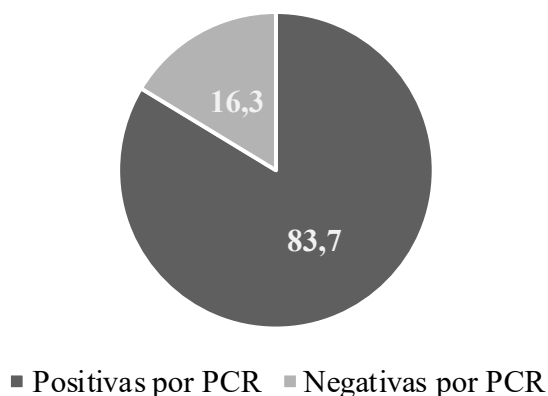


Figura 1: Porcentaje de cepas negativas y positivas por PCR para los patógenos en general

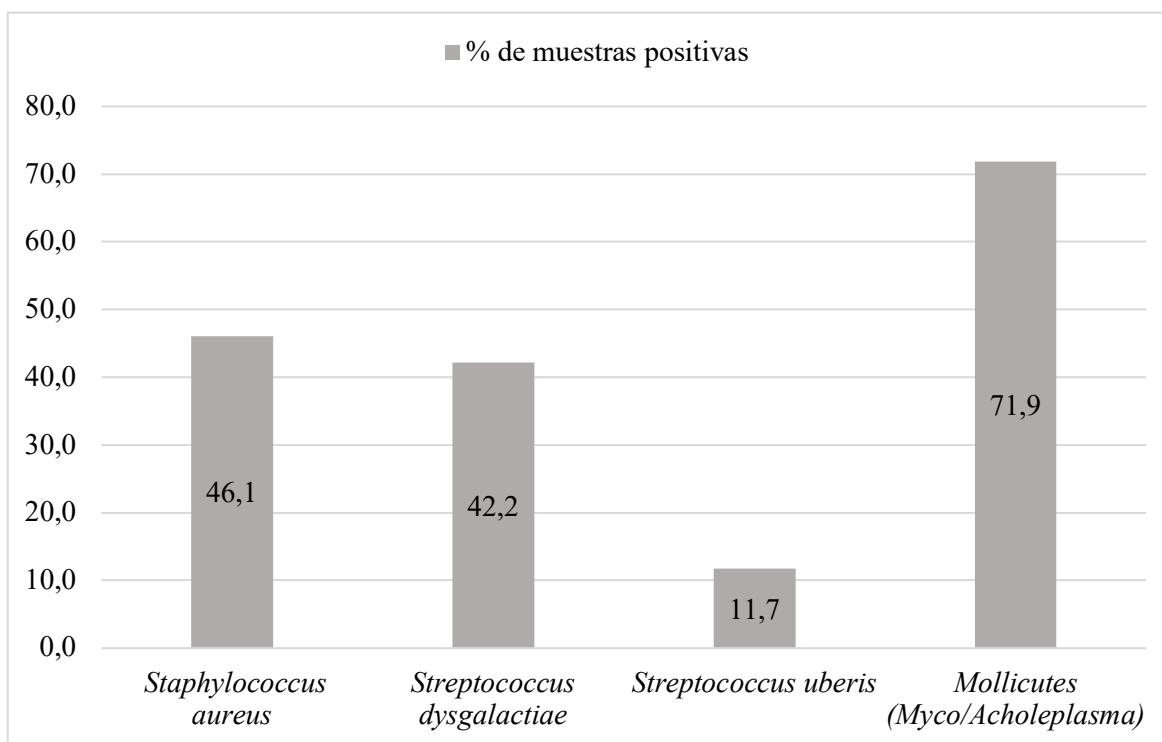


Figura 2: Porcentaje de muestras positivas por PCR para cada patógeno en el total de muestras positivas.

Detección de *Staphylococcus aureus*

De las 59 muestras en las que se detectó *S. aureus* en 14 de ellas (23,7%) se encontraba como único patógeno, mientras que en 45 muestras (76,3%) se detectó junto con algún otro patógeno. En la Figura 3A se representan los porcentajes de muestras positivas en las que el *S. aureus* se detectó junto con otro patógeno. Mediante test de Fisher se pudo determinar que *S. aureus* aparece significativamente sobrerrepresentado en muestras con múltiples patógenos (Fisher, $p < 0.00001$).

Detección de *Streptococcus dysgalactiae*

En relación a todas las muestras donde se detectó *S. dysgalactiae*, este se identificó como el único patógeno en 8 muestras (14,8%), mientras que en 46 muestras (85,2%) se lo encontró acompañado de al menos un patógeno adicional. La Figura 3B muestra los porcentajes variados de estas muestras en las que el *S. dysgalactiae* coexistió con otros patógenos. Similar a *S. aureus* esta especie aparece significativamente sobrerrepresentada en muestras que contienen múltiples patógenos (Fisher, $p < 0.00001$).

Detección de *Streptococcus uberis*

De las 15 muestras que dieron positivo a *S. uberis*, este patógeno fue el único identificado en 7 de ellas (46,7%), mientras que en las otras 8 muestras (53,3%) se encontró con al menos un patógeno adicional. En la figura 3C se muestra los diferentes porcentajes de detección del *S. uberis* junto con otro patógeno.

A diferencia de *S. aureus* y *S. dysgalactiae*, *S. uberis* tiende a aparecer tanto solo como en combinación con al menos uno de los otros patógenos mencionados. Esto se refleja en un valor de p de 1 en el Test de Fisher, indicando una distribución equitativa entre las muestras donde aparece solo y las muestras donde se encuentra con otro patógeno.

Detección de *Mollicutes* (*Mycoplasma* y *Acholeplasma*)

Un total de 92 muestras resultaron positivas para estos géneros bacterianos. En 33 (35,9%) de estas muestras positivas se los detectó como única bacteria presente, mientras que en el resto (64,1%) se los detectó en compañía de alguno de los otros patógenos. La figura 3D muestra los porcentajes de muestras donde los *Mollicutes* se detectaron junto con otro patógeno.

Con un valor en el Test de Fisher menor a 0.00001 se pudo observar una tendencia similar de sobrerrepresentación en muestras en las que se detectan más de un patógeno.

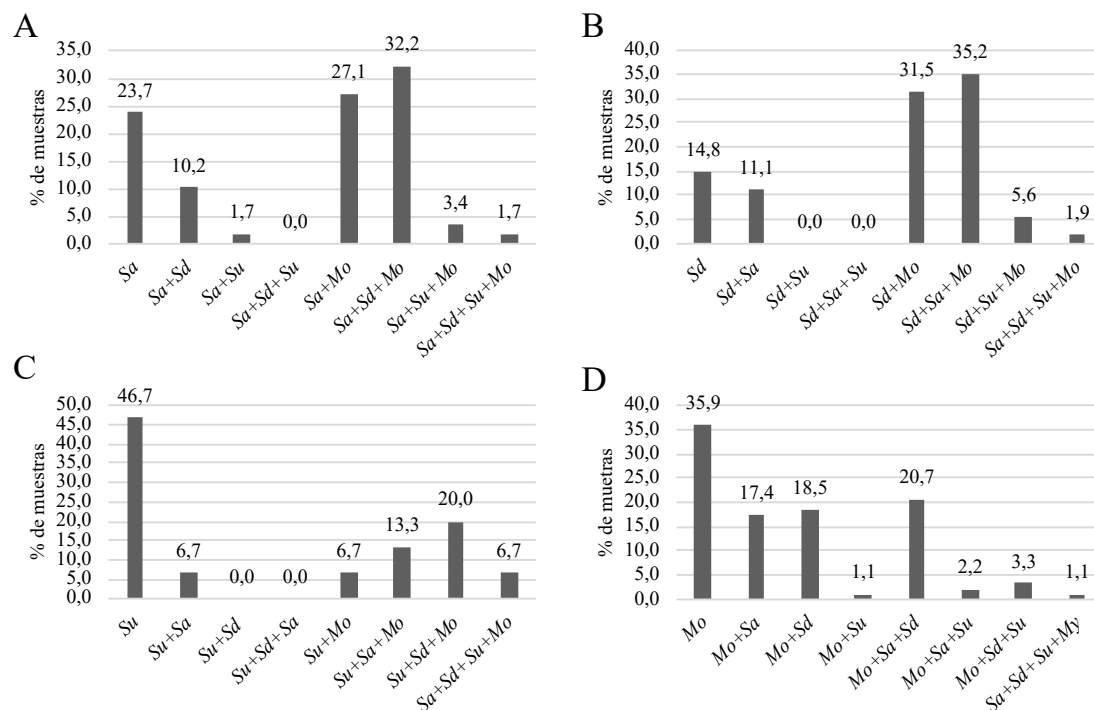


Figura 3: Porcentaje de muestras positivas para cada patógeno tanto en infecciones únicas como mixtas. A) Muestras positivas para *S. aureus*, B) Muestras positivas para *S. dysgalactiae*, C) Muestras positivas para *S. uberis* y D) Muestras positivas para *Mollicutes*. Sa: *S. aureus*, Sd: *S. dysgalactiae*, Su: *S. uberis* y Mo: *Mollicutes*

Secuenciación de los productos de PCR de la detección de *Mollicutes*

Los 12 productos de PCR seleccionados al azar de las 92 muestras positivas a *Mollicutes* se secuenciaron correctamente y se obtuvieron espectroferogramas que mostraron la presencia de un solo fragmento y picos aceptables.

Luego de la edición de las secuencias y la obtención de la secuencia consenso (secuencia única) mediante la herramienta del EzBioCloud se pudo determinar que los *Mollicutes* amplificados pertenecían todos al género *Acholeplasma* y no al género *Mycoplasma* con un porcentaje de similitud de 96-98% (Tabla 2). El EzBioCloud identificó las secuencias como pertenecientes a la bacteria *Haploplasma modicum*. Esta bacteria correspondía hasta el 2021 a *Acholeplasma modicum* que fue recientemente renombrado como *Haploplasma modicum* (Watanabe et al. 2021).

Tabla 2: Resultados de la identificación mediante secuenciaciones de *Mollicutes*

Muestra	Especie asignada	% de similitud	Taxonomía
65_Myco16SF772		92.03	
64_Myco16SF772		97.78	
63_Myco16SF772		96.31	
61_Myco16SF772		97.80	
60_Myco16SF772		97.80	
59_Myco16SF772	<i>Haploplasma</i>	96.38	Bacteria;Tenericutes;Mollicutes;
57_Myco16SF772	<i>modicum</i>	96.01	Acholeplasmatales;
56_Myco16SF772		98.16	Acholeplasmataceae
52_Myco16SF772		97.79	
4_Myco16SF772		97.79	
2_Myco16SF772		96.24	
1_Myco16SF772		97.41	

Por último, se pudo determinar que no existe diferencia significativa en la distribución de las bacterias detectadas entre los animales que tuvieron que ser tratados con antimicrobiano después de las 72 hs (no resolvieron la infección) frente a los que no se trataron (resolvieron la infección) (Chi-Square = 6.031, $p = 0.110112$).

Discusión

El diagnóstico de la mastitis bovina es un tema que preocupa tanto a los veterinarios como a los productores. Un buen diagnóstico incluyendo la identificación del patógeno causante de la enfermedad, permite la realización de un buen tratamiento y tomar las medidas de control adecuadas. El alto porcentaje de muestras de las que se obtiene un resultado negativo por cultivo frustra también a los laboratorios encargados de realizar el diagnóstico y genera dudas sobre si las técnicas que se están empleando son las más apropiadas. La técnica *Gold standard* para el diagnóstico de la mastitis continúa siendo el cultivo bacteriano, con sus ventajas y desventajas que ya hemos nombrado anteriormente al inicio de este trabajo. El avance de la tecnología y sobre todo de las técnicas moleculares, les ha permitido a los laboratorios de diagnóstico complementar la técnica *Gold estándar* con otras más sensibles y específicas para poder llegar a un diagnóstico de mastitis lo más certero posible.

La discrepancia entre los resultados de cultivos y la detección, por ejemplo, por PCR en el diagnóstico de mastitis bovina puede atribuirse a varias razones técnicas y biológicas. Mientras que los cultivos dependen de la capacidad de los patógenos para crecer en medios específicos bajo condiciones de laboratorio, la PCR detecta la presencia de ADN específico de dichos patógenos, independientemente de su viabilidad. El diagnóstico por cultivo requiere que los microorganismos estén viables al momento de realizar el diagnóstico. Es por esto que un resultado negativo también puede ser atribuido a la muerte del patógeno, ya

sea por una mala conservación de la muestra o por la presencia de algún agente bactericida como antimicrobianos o restos del alcohol que se utilizó para la limpieza de la ubre al momento de sacar la muestra.

La PCR es altamente sensible y específica, capaz de detectar cantidades mínimas de material genético de patógenos, incluso cuando estos están presentes en bajas concentraciones que podrían no ser cultivables. Esta capacidad de la PCR permite la detección de infecciones subclínicas o en etapas muy tempranas, donde los patógenos aún no se encuentran en cantidades suficientes para ser detectados por cultivos (Kour et al. 2023). Además, se ha reportado que algunas bacterias como *E. coli*, *Streptococcus. sp*, *Pseudomonas. sp*, etc. son capaces de responder al estrés ambiental mediante la entrada en un nuevo estado fisiológico, donde las células permanecen viables, pero ya no son cultivables en medios de laboratorio estándar conociéndose como “viables pero no cultivables” (VBNC) pudiendo ser detectados mediante PCR (Oliver, 2010).

Por otro lado, la presencia de una microbiota comensal competitiva o contaminantes en las muestras de leche puede inhibir el crecimiento de algunos patógenos llevando a resultados negativos. La PCR, está diseñada para amplificar secuencias específicas de ADN de los patógenos, lo que permite su detección incluso en presencia de contaminantes (Belák et al. 2013).

La diversidad genética de los patógenos puede afectar su crecimiento en determinados medios de cultivo, donde ciertas variantes pueden no crecer eficientemente en los medios seleccionados para el cultivo, por lo que la PCR es muy útil para detectar estas variantes por la utilización de *primers* específicos. La PCR, especialmente cuando se utilizan cebadores específicos de consenso, puede detectar una gama más amplia de variantes genéticas de un patógeno (Silva et al. 2021; Campos et al. 2022).

Un caso particular de bacterias productoras de mastitis complejas de cultivar son los *Mollicutes* (*Mycoplasmas* y *Acholeplasmas*). Estas bacterias son incapaces de sintetizar aminoácidos y ácidos grasos debido a su simplicidad. Para obtener estos compuestos y lograr crecer, los medios de cultivo utilizados deben estar enriquecidos con infusión de corazón, peptonas, extracto de levadura entre otros componentes. Además, se deben incluir al medio antimicrobianos para así evitar el desarrollo de otros microorganismos de crecimiento más rápido que los *Mollicutes*. Por otro lado, los cultivos de estas bacterias se obtienen luego de 7 a 10 días de incubación a 37°C y 5% de CO₂ obteniendo colonias características con forma de “huevo frito” (Quinn et al. 2003).

Otros *Mollicutes* que presenta cierta duda en cuanto a su capacidad patógena y que pueden confundirse con *Mycoplasmas* cuando se realiza el cultivo son los *Acholeplasmas*. Estas bacterias han sido consideradas frecuentemente como un contaminante saprofítico no patógeno parecido fenotípicamente a los *Mycoplasmas*, puede encontrarse en la leche, pero la fuente es el ambiente durante el clima húmedo o de la piel del pezón en lugar de provenir de una verdadera infección intramamaria (González & Wilson, 2003). Un grupo de investigadores en Japón aislaron únicamente *Acholeplasma sp.* de 100 muestras de leche obtenidas de vacas con mastitis en varias granjas en el área de Kanto (Takeshi, 1977). Basándose en los requerimientos biológicos para el crecimiento, estos investigadores distinguieron dos formas de *Acholeplasma* ("parasítica" y "saprofítica") pero concluyeron que era necesario determinar la capacidad patogénica de *Acholeplasma*. Durante un brote de

mastitis por *Mycoplasmas* en Gran Bretaña, muestras de leche de vacas con mastitis clínica arrojaron cultivos mixtos de *Mycoplasmas* y *Acholeplasmas* (Counter, 1978). Se han realizado varios estudios para determinar la capacidad patógena de *Acholeplasma* sobre la glándula mamaria mostrando resultados inconsistentes, sugiriendo la posibilidad de la existencia de cepas tanto patógenas como no patógenas, una posibilidad que los investigadores japoneses ya habían mencionado (Jasper, 1981).

El alto porcentaje (83,7%) de muestras positivas para al menos un patógeno, detectadas en este trabajo, indica una gran cantidad de muestras que están siendo erróneamente diagnosticadas como sin crecimiento lo cual implica que el método de cultivo podría estar subestimando los casos de mastitis. Esto hace que el veterinario responsable del establecimiento y el productor dejen a esos animales sin tratamiento.

La detección de *S. aureus* en el 38,6% de las muestras resalta la importancia de este patógeno como un agente causante común de mastitis, coherente con literatura previa que lo identifica como uno de los principales patógenos (Krishnamoorthy et al. 2021). Por otro lado, la detección de *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, aunque en menor medida, también concuerda con su conocida asociación con la enfermedad (Krishnamoorthy et al. 2021).

En relación a los patógenos del género *Mollicutes* en países de la región como por ejemplo Argentina el primer aislamiento de *Mycoplasma bovis* causante de mastitis se realizó en el 2000 a partir de muestras correspondientes a un brote en la Provincia de Buenos Aires (Cerdá et al. 2000). Existen más de once especies de *Mycoplasma* que se han aislado de bovinos, entre ellas, *M. bovis* que se considera la más prevalente en los EE.UU. y en algunos países de Europa (Calvinho & Neder, 2013). En un trabajo realizado en Colombia la prevalencia de *Acholeplasma* y de *Mycoplasmas spp* en mastitis subclínica fue de 1,4% y de 2,2% respectivamente (Becerra et al. 2014). En Estados Unidos la prevalencia de mastitis causada por *Mycoplasmas* reportada fue de un 3,2% (Fox, 2012). Sin embargo, también se determinó que al aumentar la cantidad de animales en los establecimientos a más de 500, la prevalencia de *Mycoplasma* podía ascender a un 14,4% (Fox, 2012).

El alto porcentaje de muestras con detección de *Mollicutes* en este trabajo (60,1%) sugiere una aparición inesperadamente alta de estos microorganismos, teniendo en cuenta que en nuestro país no se realiza el diagnóstico de estos patógenos, este resultado indica una subestimación de su rol en casos de mastitis no explorada anteriormente. Igualmente es importante destacar que la técnica de PCR utilizada en este caso no es capaz de diferenciar entre *Mycoplasma* y otros *Mollicutes* que se considerarían en principio no patógenos.

La inclusión y los resultados obtenidos de los controles negativos (vacas sanas sin historial de mastitis) son cruciales para validar la especificidad del método de PCR empleado. El hecho de que estas muestras resultaran negativas a todas las PCRs confirma la ausencia de contaminación cruzada y la alta especificidad del método para detectar la presencia de patógenos únicamente en muestras de leche afectadas por mastitis.

En relación a las muestras en las que se detectaron *S. aureus*, en la mayoría (23,7%) se encontraba como único patógeno. Esta información destaca la capacidad que tiene *S. aureus* para causar infecciones por sí solo gracias a la gran variedad de factores de virulencia que esta bacteria presenta permitiéndole la invasión y multiplicación en los tejidos (De Los Santos et al. 2014; Campos et al. 2022). La presencia de *S. aureus* junto con otros patógenos en diversas combinaciones ofrece una visión interesante sobre la complejidad que podría

existir en las mastitis. La coinfección más común fue entre *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, y *Myco/Acholeplasma*, representando el 32,2% de las muestras donde se detectó *S. aureus*. Esta alta tasa de coinfección sugiere una interacción potencialmente sinérgica entre estos patógenos, lo que podría complicar el tratamiento y manejo de la mastitis, debido a la necesidad de abordar múltiples agentes infecciosos simultáneamente.

La presencia de *S. aureus* con *Myco/Acholeplasma* en el 27,1% de las muestras y su asociación menos frecuente con *S. dysgalactiae* y *S. uberis* destaca la variabilidad en las combinaciones de patógenos en casos de mastitis.

Finalmente cabe señalar que solamente el 16,3% de las muestras de leche resultaron negativas por PCR a todos los patógenos. Este resultado podría sugerir que los signos clínicos y la reacción inflamatoria en el cuarto de ubre de estas vacas se debe a razones distintas a una infección bacteriana. Algunos factores ambientales, como traumatismos, lesiones causadas por la máquina de ordeño, una infección viral, o por bacterias como *Brucella* o *Leptospira* pueden, en teoría, causar una respuesta inflamatoria. Sin embargo, es más probable que los casos sin ADN bacteriano puedan ser igualmente de origen infeccioso, pero las bacterias podrían haber sido eliminadas del cuarto. Modelos experimentales han demostrado que los signos clínicos, en particular la reacción inflamatoria o un alto recuento de células somáticas en la leche, permanecen en el cuarto durante días después de eliminar la infección (Suojala et al. 2008).

Finalmente, uno de los hallazgos de este estudio sugiere que no hay diferencias significativas en la distribución de patógenos entre los animales tratados y no tratados. Este resultado implica que la decisión de administrar tratamiento tras 72 horas de la toma de muestras no parece estar influenciada por la presencia de un patógeno específico. Esta observación podría indicar que otros factores, posiblemente relacionados con la gravedad de los síntomas o el estado general del animal, podrían estar guiando la decisión de tratamiento más que la identificación de un agente patógeno particular. Esta información es crucial para evaluar las prácticas actuales de manejo y tratamiento en el contexto de la mastitis bovina, y sugiere la necesidad de un enfoque más integral en el diagnóstico y manejo de esta enfermedad.

6. CONCLUSIÓN FINAL

Durante el desarrollo de esta tesis se trabajó sobre diferentes técnicas moleculares que permitan mejorar el diagnóstico de la mastitis bovina especialmente en nuestro país. El desarrollo de una técnica altamente sensible y específica para la detección de *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis*, como la ddPCR, podría permitir particularmente la detección de animales que presentan una baja eliminación del patógeno, tomar medidas de control y tratamiento adecuadas, así como también poder segregar animales de manera efectiva. Además, la publicación de estos resultados representa el primer paso hacia la consolidación de la aplicación de ddPCR para identificar los agentes etiológicos que causan mastitis.

La identificación de aislamientos de *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus agalactiae* mediante PCR tiempo final comparada con la identificación fenotípica reslzad de rutina en nuestro país nos mostró que podría existir un cambio en la epidemiología de estos patógenos causantes de mastitis en nuestro país.

Las muestras de leche que no presentan crecimiento en cultivo representan una gran proporción de las muestras en bacteriología convencional y son frustrantes para el laboratorio, el veterinario y el productor. Las técnicas moleculares como PCR en tiempo final o ddPCR podrían proporcionar un diagnóstico bacteriológico para la mayoría de los casos donde el cultivo convencional resulta sin desarrollo. Los patógenos de mastitis más comunes fueron detectados en las muestras de leche incluyendo un miembro de la clase *Mollicutes* con desconocida significancia patógena. La detección de patógenos de mastitis bovina mediante PCR puede ofrecer ventajas significativas sobre los métodos de cultivo tradicionales, especialmente en términos de sensibilidad, especificidad y capacidad para detectar patógenos en una variedad de estados fisiológicos. Sin embargo, es importante considerar la complementariedad de ambos métodos para obtener un diagnóstico integral y preciso de la mastitis bovina.

El método basado en PCR es una herramienta útil para resolver la etiología bacteriana de muestras de leche sin crecimiento en cultivos convencionales.

7. PERSPECTIVAS

En las perspectivas futuras de esta tesis doctoral, se enfatizará en la continua mejora del diagnóstico de la mastitis bovina, explorando y desarrollando nuevas técnicas moleculares que amplíen la capacidad para detectar una gama más amplia de patógenos. Un enfoque específico será el trabajo en la detección y estudio de los *Mollicutes*, un grupo de bacterias hasta ahora no reportadas en nuestro país, lo que representa un área inexplorada que podría tener implicaciones significativas para la salud bovina y la producción lechera. Además, se pretende desarrollar y perfeccionar técnicas moleculares específicas para la detección de bacterias ambientales, como las Enterobacterias, complementando así las técnicas desarrolladas durante la ejecución de esta tesis. Este enfoque integrado no solo buscará llenar los vacíos existentes en el diagnóstico actual sino también contribuir a la elaboración de estrategias más efectivas para el manejo y control de la mastitis bovina, considerando la diversidad y complejidad de los agentes patógenos involucrados. Adicionalmente, se investigará cómo la conservación de las muestras de leche influye en la detección y el diagnóstico de la mastitis, reconociendo que la integridad de las muestras es crucial para obtener resultados diagnósticos precisos. Este análisis permitirá establecer protocolos de manejo y conservación de muestras que aseguren la fiabilidad de los diagnósticos en futuras investigaciones y aplicaciones prácticas.

Por último, cabe destacar que todas las técnicas desarrolladas en esta tesis doctoral están disponibles en el laboratorio de Microbiología ya sea para futuras investigaciones o para el Servicio de Diagnóstico que ofrece actualmente la Unidad.

8. BIBLIOGRAFÍA

Al-Farha, A. A.-B., Hemmatzadeh, F., Khazandi, M., Hoare, A., & Petrovski, K. (2017). Evaluation of effects of *Mycoplasma mastitis* on milk composition in dairy cattle

- from South Australia. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 351.
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1274-2>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6), 1193–1202.
<https://doi.org/10.1007/S11250-018-1629-0>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 36–49.
<https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
- Azooz, M. F., El-Wakeel, S. A., & Yousef, H. M. (2020). Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. *Veterinary World*, 13(9), 1750. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2020.1750-1759>.
- Andrade Becerra, Roy José; Caro Carvajal, Zonia Elizabeth; Dallos-Baez, Alix Eugenia
 Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras del altiplano boyacense (Colombia) Revista Científica, vol. XXIV, núm. 4, julio-agosto, 2014, pp. 305-310
- Belák, S., Karlsson, O. E., Leijon, M., & Granberg, F. (2013). High-throughput sequencing in veterinary infection biology and diagnostics. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 32(3), 893–915. <https://doi.org/10.20506/rst.32.2.2206>
- Boonyayatra, S., Fox, L. K., Gay, J. M., Sawant, A., & Besser, T. E. (2012). Discrimination between Mycoplasma and Acholeplasma species of bovine origin using digitonin disc diffusion assay, nisin disc diffusion assay, and conventional polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(1), 7–13. <https://doi.org/10.1177/1040638711425936>
- Bouman, M, Irigoyen, D y Bertón, A. (1999): Análisis de los resultados de 427 muestras remitidas para aislamiento de bacterias de mastitis y antibiograma. Jornadas de Salud de la ubre, Nueva Helvecia, Uruguay. p 59-68.
- Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(8), 253–258. <https://doi.org/10.1136/VR.160.8.253>
- Britten, A. M. (2012). The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 28, Issue 2, pp. 187–202). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.006>
- Calvinho L.F. (2005). Patógenos De Mastitis Bovina Y Evolución. *Veterinarias, Ciencias Rafaela, Inta*, 2002, 1–8.
- Calvinho L.F, Neder, V. (2013). Infecciones resistentes en el tambo. Mycoplasmas en el rodeo lechero. *Producir XXI*, BsAs., 21 (263):18-22.
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of Staphylococcus aureus from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 115.
<https://doi.org/10.1186/S12917-022-03197-5>.
- Cerdá R, Xavier J, Sansalone P, et al. Aislamiento de Mycoplasma bovis a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la provincia de Buenos Aires. Primera

- comunicación en la República Argentina.. *Microbiología*. 2000;42(1):7-12.
- CERES. (2021). *El sector lácteo como motor del desarrollo económico y social del Uruguay*. 1–12.
- Chakraborty, S., Dhama, K., Tiwari, R., Iqbal Yatoo, M., Khurana, S. K., Khandia, R., Munjal, A., Munuswamy, P., Kumar, M. A., Singh, M., Singh, R., Gupta, V. K., & Chaicumpa, W. (2019). Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population—a review. *The Veterinary Quarterly*, 39(1), 76. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1642546>
- Charaya, G., Sharma, A., Kumar, A., Goel, P., & Singh, M. (2015). Detection of major mastitis pathogens by multiplex polymerase chain reaction assay in Buffalo Milk. *Indian Journal of Animal Sciences*, 85(2), 122–125. <https://doi.org/10.56093/ijans.v85i2.46562>
- Chertcoff, R.E., C.N. Acuña & E. Izak. 2001. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of mastitis pathogens isolated from clinical cases of Argentine dairy cows. 2nd Int. Symp. on Mastitis and Milk Quality. Vancouver, BC, Canada. pp. 418-419
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 10(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ANI10122212>
- Counter, D. E. (1978). A severe outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma bovis* and *Acholeplasma laidlawii*. *The Veterinary Record*, 103(7), 130–131. <https://doi.org/10.1136/vr.103.7.130>
- Cremonesi, P., Cortimiglia, C., Picozzi, C., Minozzi, G., Malvisi, M., Luini, M., & Castiglioni, B. (2016). Development of a droplet digital polymerase chain reaction for rapid and simultaneous identification of common foodborne pathogens in soft cheese. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01725>
- Davies, P. L., Leigh, J. A., Bradley, A. J., Archer, S. C., Emes, R. D., & Green, M. J. (2016). Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity and transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 68–74. <https://doi.org/10.1128/JCM.01583-15>
- De Brun, M. L., Cosme, B., Petersen, M., Alvarez, I., Folgueras-Flatschart, A., Flatschart, R., Panei, C. J., & Puentes, R. (2022). Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 34(3), 439–447. <https://doi.org/10.1177/10406387221085581>
- De Los Santos, R., Fernández, M., Carro, S., & Zunino, P. (2014). Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine subclinical mastitis in two Uruguayan dairy farms. *Arch Med Vet*, 46, 315–320.
- De Torres, E., Giannechini, E., Sierra, G., Zorrilla, F., Lanza, A., y Diana, V. (2014). Epidemiología de las infecciones intramamaria en Uruguay y líneas de investigación. En Red Latinoamericana de Investigación en Mastitis (Ed.), II Congreso Red Latinoamericana de Investigación en Mastitis (Vol. II, pp. 34-37). Costa Rica: Red Latinoamericana de Investigación en Mastitis.
- Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L., & Jerome, K. R. (2013). Tolerance of droplet-

- digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical Chemistry*, 59(11), 1670–1672. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2013.211045>
- Dinsmore, R. P., English, P. B., Gonzalez, R. N., & Sears, P. M. (1992). Use of Augmented Cultural Techniques in the Diagnosis of the Bacterial Cause of Clinical Bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 75(10), 2706–2712. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78032-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78032-1)
- FAO. (n.d.). *Portal lácteo*. 2023. <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/es/>
- Faye, B., & Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector – “The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal*, 24(2), 50–56. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2011.12.011>
- Fox, L. K. (2012). Mycoplasma Mastitis: Causes, Transmission, and Control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 225–237. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2012.03.007>
- Garcia, A. (2004). *Contagious vs. Environmental Mastitis*. http://openprairie.sdstate.edu/extension_extra/126
- Giannechini, R., Concha, C., Delucci, I., Gil, J., Salverrey, L., y Rivero, R. (2014). Bovine mastitis, distribution of pathogens and antimicrobial resistance in the Southern Dairy Basin of Uruguay. *Veterinaria*, 50(196), 4-32.
- González, R. N., & Wilson, D. J. (2003). Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 19(1), 199–221. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00076-2)
- Gundelach, Y., Kalscheuer, E., Hamann, H., & Hoedemaker, M. (2011). Risk factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics. *J. Vet. Sci*, 12(3), 227–233. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.3.227>
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29(1), 18–31. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence. In *Nucleic Acids Symposium Series* (Issue 41, pp. 95–98).
- Harmon, R. J. (1994). Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 2103–2112. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8)
- Harmon (2001). Somatic cell counts; a primer. In: Annual Meeting National Mastitis Council Incorporated (40th., 2001, Reno). Proceedings. Madison, WI, s.e. pp. 3-9.
- Heikkilä, A. M., Liski, E., Pyörälä, S., & Taponen, S. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9493–9504. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-14824>
- Hogan, J. S., Smith, K. L., Hoblet, K. H., Todhunter, D. A., Schoenberger, P. S., Hueston, W. D., Pritchard, D. E., Bowman, G. L., Heider, L. E., Brockett, B. L., & Conrad, H. R. (1989). Bacterial Counts in Bedding Materials Used on Nine Commercial Dairies. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 250–258. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79103-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79103-7)

- INALE. (2023). *Instituto Nacional de la Leche. Uruguay Lechero*.
- Jones, G.M. (2011). Understanding the basics of Mastitis. *Journal of Management Development*, 30(1), 106–111. <https://doi.org/10.1108/02621711111098406>
- Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S., & Mäntysaari, E. A. (2007). Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences*, 57(2), 89–96. <https://doi.org/10.1080/09064700701488941>
- Koskinen, M. T., Wellenberg, G. J., Sampimon, O. C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., Van Haeringen, W. A., Lam, T. J. G. M., & Pyörälä, S. (2010). *Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria*. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3167>
- Kour, S., Sharma, N., Balaji, N., Kumar, P., Soodan, J. S., Santos, M. V. dos, & Son, Y. O. (2023). Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/VETSCI10070449>
- Krishnamoorthy, P., Suresh, K. P., Jayamma, K. S., Shome, B. R., Patil, S. S., & Amachawadi, R. G. (2021). An understanding of the global status of major bacterial pathogens of milk concerning bovine mastitis: A systematic review and meta-analysis (scientometrics). *Pathogens*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens10050545>
- Lam, T. J. G. M., Olde Riekerink, R. G. M., Sampimon, O. C., & Smith, H. (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: A practical approach. *Irish Veterinary Journal*, 62(4), 34–39. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S34>
- Larumbe, R., y Vidart, D. (2016). Agentes patógenos causantes de mastitis clínica en vacas lecheras en Uruguay años 2014 y 2015 (Tesis de grado). Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, Montevideo.
- McDermott, G. P., Do, D., Litterst, C. M., Maar, D., Hindson, C. M., Steenblock, E. R., Legler, T. C., Jouvenot, Y., Marrs, S. H., Bemis, A., Shah, P., Wong, J., Wang, S., Sally, D., Javier, L., Dinio, T., Han, C., Brackbill, T. P., Hodges, S. P., ... Lowe, A. J. (2013). Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Analytical Chemistry*, 85(23), 11619–11627. <https://doi.org/10.1021/AC403061N>
- McDermott, M. P., Erb, H. N., Natzke, R. P., Barnes, F. D., & Bray, D. (1983). Cost Benefit Analysis of Lactation Therapy with Somatic Cell Counts as Indications for Treatment. *Journal of Dairy Science*, 66(5), 1198–1203. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81919-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81919-5)
- MGAP, & 2023. (2023). Anuario Estadístico Agropecuario 2023. *DIEA*. <https://www.iea.org/reports/oil-market-report-may-2023>
- Middleton, J. R., Saeman, A., Fox, L. K., Lombard, J., Hogan, J. S., & Smith, K. L. (2014). The National Mastitis Council: A Global Organization for Mastitis Control and Milk Quality, 50 Years and Beyond. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19(3–4), 241–251. <https://doi.org/10.1007/S10911-014-9328-6>
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza-Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and Animal Science*, 21, 100306.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306>
- Nascimento, J. D. S., Fagundes, P. C., Brito, M. A. V. D. P., Netto Dos Santos, K. R., & Bastos, M. D. C. D. F. (2005). Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 106(1–2), 61–71. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.10.014>
- NMC. (2017). Laboratory Handbook on Bovine Mastitis 3rd Edition. *National Mastitis Council, Inc*, 1–148.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Parker, A. M., Sheehy, P. A., Hazelton, M. S., Bosward, K. L., & House, J. K. (2018). A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(3), 1241–1252. <https://doi.org/10.1111/jvim.15135>
- Powell, E. A., & Babady, N. E. (2018). Digital PCR in the Clinical Microbiology Laboratory: Another Tool on the Molecular Horizon. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(4), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.01.005>
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., & Leonard, F. C. (2003). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. *The Canadian Veterinary Journal*, 44(12), 986. [/pmc/articles/PMC340368/](https://doi.org/10.1139/cv-2003-012)
- 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, 53. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-53>
- Ramírez, J. D., Herrera, G., Hernández, C., Cruz-Saavedra, L., Muñoz, M., Flórez, C., & Butcher, R. (2018). Evaluation of the analytical and diagnostic performance of a digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) assay to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007063>
- Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Kelton, D. F., & Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1366–1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
- Royster, E., & Wagner, S. (2015). Treatment of Mastitis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 31(1), 17–46. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2014.11.010>
- Ruegg, P. L. (2017). *A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention*. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Schalm, O. W. (1957). Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *Javma-Journal of The American Veterinary Medical Association*, 130, 199–204. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:77608501>
- Schepers, A. J., Lam, T. J. G. M., Schukken, Y. H., Wilmink, J. B. M., & Hanekamp, W. J. A. (1997). Estimation of Variance Components for Somatic Cell Counts to Determine Thresholds for Uninfected Quarters. *J Dairy Sci*, 80(1), 1833–1840. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76118-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76118-6)
- Sears, P. M., Smith, B. S., English, P. B., Herer, P. S., & Gonzalez, R. N. (1990). Shedding

- Pattern of *Staphylococcus aureus* from Bovine Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2785–2789. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78964-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78964-3)
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *The Veterinary Quarterly*, 41(1), 107. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- Silva, N. C. C., Yang, Y., Rodrigues, M. X., Tomazi, T., & Bicalho, R. C. (2021). Whole-genome sequencing reveals high genetic diversity of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03031-4>
- Smolenski, G., Haines, S., Kwan, F. Y. S., Bond, J., Farr, V., Davis, S. R., Stelwagen, K., & Wheeler, T. T. (2007). Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 6(1), 207–215. https://doi.org/10.1021/PR0603405/SUPPL_FILE/PR0603405SI20061005_100103.XLS
- Steele, N. M., Williamson, J. H., Thresher, R., Laven, R. A., & Hillerton, J. E. (2017). Evaluating a commercial PCR assay against bacterial culture for diagnosing *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* throughout lactation. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3816–3824. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11752>
- Suojala, L., Orro, T., Järvinen, H., Saatsi, J., & Pyörälä, S. (2008). Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-18>
- Takeshi, N. (1977). New sero-types of *Mycoplasma laidlawii* isolated from mastitic milk and urogenital tracts of cattle. I. Isolation of *M. laidlawii*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 57(534), 364–370. <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., & Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2610–2617. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1729>
- Viguié, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O’Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27(8), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.05.004>
- Whale, A. S., De Spiegelaere, W., Trypsteen, W., Nour, A. A., Bae, Y. K., Benes, V., Burke, D., Cleveland, M., Corbisier, P., Devonshire, A. S., Dong, L., Drandi, D., Foy, C. A., Garson, J. A., He, H. J., Hellemans, J., Kubista, M., Lievens, A., Makrigiorgos, M. G., ... Huggett, J. F. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical Chemistry*, 66(8), 1012–1029. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125>
- Wu, J., Tang, B., Qiu, Y., Tan, R., Liu, J., Xia, J., Zhang, J., Huang, J., Qu, J., Sun, J., Wang, X., & Qu, H. (2022). Clinical validation of a multiplex droplet digital PCR for

- diagnosing suspected bloodstream infections in ICU practice: a promising diagnostic tool. *Critical Care*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04116-8>
- Yang, R., Paparini, A., Monis, P., & Ryan, U. (2014). Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 44(14), 1105–1113. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2014.08.004>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- 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>
- Zheng, Y., Jin, J., Shao, Z., Liu, J., Zhang, R., Sun, R., & Hu, B. (2021). Development and clinical validation of a droplet digital PCR assay for detecting *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in patients with suspected bloodstream infections. *MicrobiologyOpen*, 10(6). <https://doi.org/10.1002/MBO3.1247>