

Detección de *Streptococcus agalactiae* a partir de muestras de leche cruda

Detection of *Streptococcus agalactiae* from raw milk samples



<https://eqrcode.co/a/YEqadG>

①Anel Ledesma Rodríguez, ①Dervel Felipe Díaz Herrera, ①Ariel Ribot Enrique, ①Dianis Ramón Díaz, ①Ailín Martínez Vasallo, ①Odalys Uffo Reinoso*

Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad de los Alimentos (CENLAC), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) es uno de los microorganismos más importantes asociados a la mastitis bovina, enfermedad que provoca grandes pérdidas económicas y constituye un riesgo para la salud animal y humana. El cultivo microbiológico es la "técnica de oro" para el diagnóstico de *S. agalactiae*, sin embargo, requieren un trabajo intenso para obtener los resultados. Una alternativa a las pruebas microbiológicas es la detección de *S. agalactiae* mediante la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de ADN extraído de leche cruda, lo que disminuye el tiempo de diagnóstico del patógeno y reduce la aparición de resultados falsos positivos asociados al cultivo. El objetivo de este trabajo fue la detección de *S. agalactiae* por PCR a partir de ADN extraído de muestras de leche cruda. La extracción de ADN se realizó por extracción orgánica; paralelamente, se realizó el cultivo microbiológico de las muestras y su posterior análisis por la prueba de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP). Para el ensayo de PCR se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 153pb del gen *cfb*, que codifica para el factor CAMP. Un total de 13 muestras resultaron positivas a la prueba de CAMP. El ensayo de PCR amplificó el ADN extraído en 10 de las 50 muestras, que coincidieron con las muestras positivas del ensayo de CAMP. Tres muestras positivas a CAMP resultaron negativas por PCR. El uso del PCR permitió la detección de *S. agalactiae* en vacas con mastitis.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, leche, mastitis, PCR.

ABSTRACT: *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) is one of the most important microorganisms associated with bovine mastitis, a disease that causes great economic losses and represents a risk for human and animal health. Microbiological cultures constitute the "gold standard technique" for the diagnosis of *S. agalactiae*; however, they require intensive work to obtain the results. An alternative to the microbiological testing is the detection of *S. agalactiae* through amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) from DNA extracted from raw milk, which reduces the diagnosis time of the pathogen and decreases the occurrence of false positive results associated with the culture. The objective of this work was the identification of *S. agalactiae* by PCR from DNA extracted from raw milk samples. DNA extraction was performed by organic extraction. In parallel, the microbiological culture of the samples was carried out and their subsequent analysis by the Christie-Atkins-Munch-Peterson test (CAMP). For the PCR assay, primers amplifying a 153pb fragment of the *cfb* gene, encoding for the CAMP factor, were used. Thirteen samples were positive to the CAMP test. The PCR assay amplified the extracted DNA in 10 of the 50 samples, which coincided with the positive samples of the CAMP test. Three samples positive to CAMP were negative by PCR. The use of PCR allowed the detection of *S. agalactiae* in cows with mastitis.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, milk, mastitis, PCR.

*Autor para la correspondencia: Odalys Uffo Reinoso. E-mail: uffo@censa.edu.cu

Recibido: 07/05/2020

Aceptado: 10/09/2020

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria, causada por más de 150 patógenos distintos de origen contagioso o ambiental, que produce cambios físicos y químicos en la composición de la leche, como la presencia de coágulos o grumos, sabor desagradable y aumento de leucocitos, entre otros. Pueden aparecer manifestaciones clínicas (inflamación de la ubre y cambios en el tejido alveolar mamario del animal) o cursar de forma subclínica sin síntomas evidentes. Es la principal causa de las pérdidas económicas en la industria lechera, debido a la reducción de la calidad de la leche, el descarte de leche de los animales infectados y el elevado costo de los medicamentos y el tratamiento (1).

Entre los diversos patógenos que causan mastitis, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) (*Streptococcus* perteneciente al grupo B) tiene particular importancia por su rápida transmisión entre vacas y de estas a los seres humanos, al ser un patógeno contagioso que causa, generalmente, infecciones subclínicas que no pueden ser fácilmente identificadas por los ganaderos. Este microorganismo puede sobrevivir en los equipos de ordeño, el agua y la piel del ganado; también puede propagarse ampliamente y contaminar la leche colectada a partir de animales portadores asintomáticos o con mastitis subclínica, lo que constituye un riesgo para la salud del rebaño y del consumidor, por lo que es necesario detectar rápidamente su presencia (2).

Los métodos estándares de análisis de laboratorio para la identificación de *S. agalactiae* se basan en cultivos bacteriológicos y pruebas bioquímicas como la prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson (CAMP). Estas técnicas consumen tiempo y requieren un trabajo intenso para obtener los resultados. Las técnicas de ácidos nucleicos, en este caso la PCR, permiten la rápida detección e identificación de patógenos; es específica y sensible, puede realizarse sin necesidad de aislar el microorganismo y permite discriminar entre organismos relacionados. Además, no depende de la viabilidad de los microorganismos y los resultados se obtienen en menos de 24 horas, todo lo cual la convierte en una técnica ideal para la rápida detección de *S. agalactiae*, sobre todo si se utiliza la leche cruda como fuente para la obtención del ADN, técnica

no invasiva que permite la eliminación de la etapa de aislamiento en medio de cultivo sólido (3).

El gen *cfb*, que codifica para el factor CAMP, se utiliza para la detección molecular de *S. agalactiae*. Se conoce como factor CAMP estreptocócico del grupo B y es altamente específico para estreptococos de este grupo. Es una proteína extracelular que provoca la hemólisis en forma de flecha de los eritrocitos en placas de agar sangre cuando actúa sinérgicamente con la beta-hemolisina producida por *Staphylococcus aureus*. La reacción CAMP se usa ampliamente para la identificación presuntiva de *S. agalactiae* (4).

Según Herrera *et al.* (5), *S. agalactiae* es uno de los principales agentes causales de la mastitis bovina en Cuba; en la presente década, se informan valores de prevalencias superiores a 10 % del patógeno en rebaños bovinos, lo cual es una evidencia de la ausencia de medidas básicas para la prevención y el control del microorganismo (6), situación que obliga a realizar estudios dirigidos a esclarecer este complejo escenario. Para ello se requiere de métodos de diagnóstico que permitan reducir el tiempo de trabajo sin tener que depender de los cultivos microbiológicos. Por tanto, el objetivo fue utilizar la PCR para identificar la presencia de *S. agalactiae* a partir de leche cruda.

Se muestrearon 50 cuartos de 20 animales de la raza Siboney de Cuba provenientes de una unidad de producción del occidente del país, que resultaron positivos a mastitis subclínica por la prueba CMT (de sus siglas en inglés, *Californian Mastitis Test*). Se realizó la desinfección del esfínter del pezón con alcohol etílico a 70 % y se extrajeron 5 mL de leche, que se depositaron en un recipiente estéril (5). Las muestras se transportaron refrigeradas al Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad e Inocuidad de los Alimentos (CENLAC) del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) para su posterior análisis.

La extracción de ADN se realizó según lo descrito por Potou *et al.* (7), procedimiento basado en la extracción orgánica de ADN a partir de muestra de leche cruda, con la siguiente modificación: adición de 1/10 volúmenes de Acetato de sodio 3M (Sigma) y un volumen de

etanol puro (Sigma) a la fase acuosa resultante de la extracción con Fenol: Cloroformo (24:1). El precipitado se lavó dos veces con 500 µL de etanol a 70 %; se centrifugó, se eliminó el etanol, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente y reconstituyó en 100 µL de agua libre de nucleasas (Sigma).

La concentración de ADN se calculó a partir de la medición de la densidad óptica a 260 nm ($DO_{260\text{ nm}}$). La pureza se estimó mediante la relación de los valores de densidad óptica medidos a 260 nm y 280 nm, en un espectrofotómetro Ray Leigh (UV-2601). La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa a 0,8 % (Sigma) en solución tampón TBE 1x (Tris-Borato 0,045 M; EDTA 0,001 M) (Sigma) que contenía bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Sigma). Se utilizó un transiluminador UV (Macrovue 2011, LKB) para su visualización.

Paralelamente, se realizó el cultivo microbiológico de las muestras para la identificación de colonias con características presuntivas de *S. agalactiae* y su posterior análisis por la prueba de CAMP, según lo descrito por Herrera *et al.* (5).

Para el ensayo de PCR se utilizó el procedimiento descrito por Ke *et al.* (8), quienes sugieren el empleo de los cebadores Sag-59 (5'-TTTCACCAGCTGTATTAGAAGTA-3') y Sag-190 (5'-GTTCCCTGAACATTATCTTTGAT-3'), para amplificar un fragmento de 153 pb del gen *cfb*, que codifica para el factor CAMP de *S. agalactiae*. Como control positivo se utilizó una cepa ATCC 13813, proveniente de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC, de sus siglas en inglés); como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (Sigma). La mezcla de reacción contenía 1,25 U de Taq DNA polimerasa (Promega), 0,2 mM de oligonucleótidos (dNTPs) (Promega), 1 µM de cada cebador, 5 µL de solución tampón de PCR 5X (Promega), 2 mM de MgCl₂ (Promega), 3 µL del ADN extraído y agua libre de nucleasas (Sigma) para un volumen final de 25 µL. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemania). La desnaturalización inicial fue a 94°C durante tres minutos, seguida por 36 ciclos de tres etapas

cada ciclo: desnaturalización a 95°C durante un minuto, alineamiento a 55°C durante un minuto y extensión a 72°C durante dos minutos. La extensión final fue a 72°C durante 10 minutos (13).

Para observar los productos del ensayo se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Sigma) a 1,5 % en solución de TBE 1X (Tris-Ácido bórico-EDTA) (Sigma). La tinción del gel se realizó con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Sigma). Los productos de amplificación se visualizaron con un transiluminador UV (Macrovue 2011, LKB).

Se logró extraer ADN genómico de *S. agalactiae* a partir de muestras de leche cruda (Fig. 1). Para determinar la utilidad del protocolo empleado y la calidad del producto obtenido se tuvieron en cuenta parámetros como la integridad, pureza y cuantificación. Se obtuvo ADN íntegro, con concentración entre 170 y 600 ng/µL (que fue ajustada para PCR a 100 ng/µL para la PCR), con pureza óptima, con valores entre 1,8 y 2,0 para la relación $DO_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$.

La calidad del ADN es un aspecto importante, en el éxito de los ensayos posteriores, al incidir en la estabilidad del ADN durante su almacenamiento por tiempo indefinido, así como en la conservación de su estructura y propiedades físico-químicas (9). La purificación exitosa de ácidos nucleicos requiere de cuatro pasos importantes: lisis celular o tisular, desnaturalización de complejos de nucleoproteínas, inactivación de nucleasas, y eliminación de contaminantes biológicos y químicos (10). Muchos de los métodos de extracción de ADN siguen pasos básicos similares y emplean reactivos orgánicos e inorgánicos y métodos de centrifugación, pero escoger el método más adecuado implica tener en cuenta los recursos de los que se dispone, la disponibilidad de equipamiento y los costos, así como las muestras que se van a utilizar, los reactivos y la rapidez, calidad y cantidad del ADN extraído; estas dos últimas son las principales razones a tener en cuenta para la elección del método a utilizar.

Con el método empleado en este estudio, fue posible recuperar el ADN bacteriano a partir de las muestras de leche con buenos resultados, sin

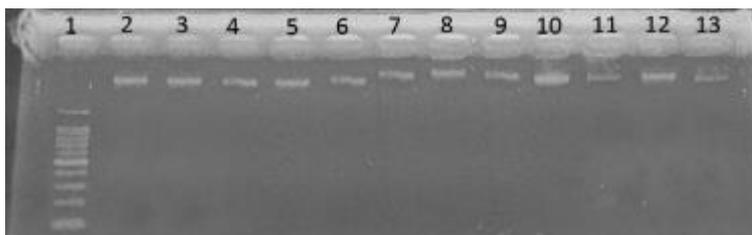


Figura 1. Gel de agarosa a 0,8 %: Resultado de la extracción orgánica del ADN genómico de *S. agalactiae* a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica. Línea 1: MPM 1Kb. Líneas 2-13: ADN genómico. / *Agarose gel at 0.8 %: Result of the organic extraction of the genomic DNA of S. agalactiae from cow milk samples with subclinical mastitis. Line 1: MWM 1Kb. Lines 2 -13. Genomic DNA.*

que fuera necesario realizar tratamientos posteriores a la extracción para eliminar la interferencia que puede ser causada por las grasas presentes en la leche. Con este método se logra obtener material genético purificado y separado del resto del material celular, libre de inhibidores (11), a pesar de que su empleo implica la utilización de materiales orgánicos, altamente tóxicos y contaminantes, además de consumir mayor tiempo de trabajo. Cardona *et al.* (12) emplearon esta metodología para la extracción de ADN a partir de leche y demostraron que se obtiene mayor concentración de ADN con respecto al empleo de juegos de reactivos comerciales para la extracción.

Con el cultivo microbiológico se identificaron 13 muestras (26 %) con colonias típicas de *S. agalactiae*, que mostraron un resultado positivo a la prueba de CAMP (Fig. 2).

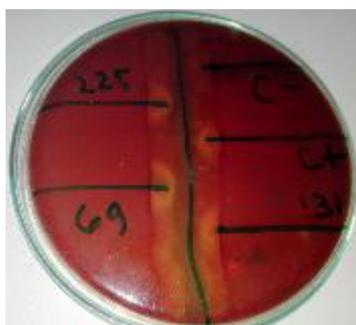


Figura 2. Resultados del ensayo CAMP para tres muestras de leche cultivadas. C-: control negativo. C+: control positivo. 69, 131 y 225: muestras positivas al CAMP. / *CAMP test results for three cultured milk samples. C-: negative control. C+: positive control. 69, 131 and 225: CAMP positive samples.*

Se identificaron 10 muestras positivas (20 %), las cuales también resultaron positivas al ensayo de CAMP y 40 muestras negativas, de ellas tres (7,5 %) fueron positivas a la prueba de CAMP (Fig. 3). Varios autores han referido resultados similares de muestras con diagnóstico microbiológico positivo a *S. agalactiae* y resultados negativos por PCR (13, 14).

Autores como Estuningsih *et al.* (15) plantean que la identificación de *S. agalactiae* puede confirmarse por la amplificación de secuencias especie-específicas, como son los genes que codifican la región ARNr 16S, la región intergénica ARNr 16S-23S y el factor CAMP (*cfb*). Estos genes se utilizan para una rápida y confiable identificación de *S. agalactiae*, ya que no varían dentro de la especie (8).

Los ensayos de PCR permiten disminuir considerablemente la aparición de resultados falsos positivos y negativos que, en ocasiones, se refieren en el diagnóstico microbiológico convencional. En este estudio se encontraron tres muestras positivas al ensayo de CAMP que resultaron negativas a la PCR. Se ha descrito que otras especies de estreptococos, como *S. pyogenes* resultan positivos al ensayo de CAMP bajo determinadas condiciones. Esta bacteria posee genes similares al *cfb* que codifican para proteínas con características análogas al factor CAMP de *S. agalactiae* y que pueden generar resultados positivos (16). En tal sentido, los resultados de este estudio pudieran deberse a la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* Coagulasa Negativo, microorganismos que aparecen con frecuencias 25 %, 16 %, y 12 %, respectivamente.

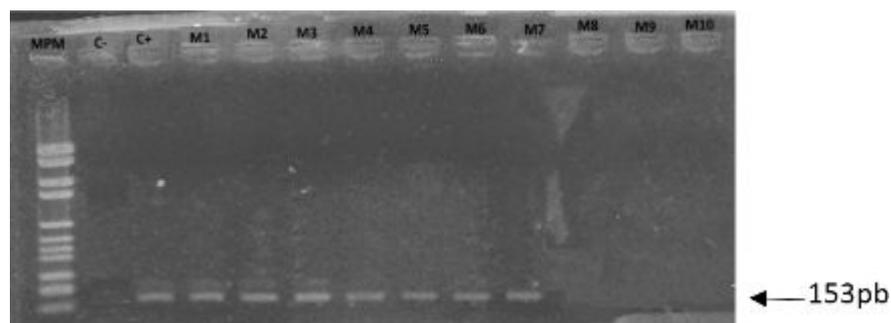


Figura 3. Gel de agarosa a 1,5 %: Resultados de la amplificación por PCR del gen *cfb* de *S. agalactiae*. Línea 1: Marcador de Peso Molecular (100 pb). C-: control negativo. C+: control positivo. M1-M7: muestras positivas. M8-M10: muestras negativas. / Agarose gel at 1.5 %: Results of PCR amplification of the *S. agalactiae cfb* gene. MPM: Molecular Weight Marker 100 bp ladder. C-: negative control. C +: positive control. M1-M7: positive samples. M8-M10: negative samples.

respectivamente, en rebaños lecheros cubanos (6).

En el presente estudio se logró la identificación rápida de *S. agalactiae* por PCR a partir de ADN extraído de muestras de leche cruda, en vacas afectadas con mastitis, al utilizar como diana un fragmento del gen *cfb*. Para futuras investigaciones se hace necesario la estandarización del ensayo de PCR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a José Zenón Capdevila Varela y Yamilka Riverón Alemán por el trabajo realizado en el procesamiento de las muestras.

REFERENCIAS

- Gomes F, Saavedra M, Enrique M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathog Dis.* 2016;74(1-7).
- Botelho ACN, Ferreira AFM, Fracalanza SEL, Teixeira LM, Pinto TCA. A Perspective on the Potential Zoonotic Role of *Streptococcus agalactiae*: Searching for a Missing Link in Alternative Transmission Routes. *J Korean Med Sci.* 2018;9:608.
- Nyman AK, Waller KP, Emanuelson U, Frössling J. Sensitivity and specificity of PCR analysis and bacteriological culture of milk samples for identification of intramammary infections in dairy cows using latent class analysis. *Prev Vet Med.* 2016;135:123-131.
- Lang S, Palmer M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38167-38173.
- Herrera DFD, Díaz DR, Alemán YR, Ribot A, Rodríguez AL, Vasallo AM, et al. Identificación de *Streptococcus agalactiae* en leche de bovinos afectados por mastitis en el occidente de Cuba. *Rev Salud Anim.* 2019;41(3):12.
- Alfonso D, Zanette J, Ruiz K, Peña J, González Y, Reinoso M. Situación de la mastitis subclínica y evaluación de los procesos lecheros en vaquerías de la provincia Villa Clara, Cuba. *Rev Salud Anim.* 2017;39(3):9.
- Poutou R, Burbano M, Sierra S, Torres K, Carrascal AK, Mercado M. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Univ Sci.* 2005;10(2):61-78.
- Ke D, Menard C, Picard FJ, Boissinot M, Ouellette M, Roy PH, et al. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem.* 2000;46(3):324-31.
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- Doyle K. *The source of discovery. Protocols and discovery and applications guide.* Ed Promega, Madison, Wisconsin, USA. 1996.

11. Hernández Y, Lobo E, Martínez S, Zamora L. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. Rev Salud Anim. 2009;31(2):108-114.
12. Cardona X, Echeverría J. Implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método de detección de *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche bovina en Antioquia, Colombia. V Congreso Internacional de Producción Animal Tropical. 2016.
13. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. J Dairy Sci. 2001;84(5):1140-1148.
14. Wu J, Liu Y, Hu S, Zhou J. Development of a rapid PCR test for identification of *Streptococcus agalactiae* in milk samples collected on filter paper disks. Asian Australasian J Anim Sci. 2008;21(1):124-130.
15. Estuningsih S, Soedarmanto I, Fink K, Lammler C, Wibawan IW. Studies on *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Indonesia. J Vet Med, Series B. 2002;49(4):185-187.
16. Zarate MS, Jorda Vargas L, Pacheco MV, Fernandez Canigia L, Smayevsky J. Modified Spot CAMP Test: A rapid, inexpensive and accurate method for identification of group B streptococci. Revista Argentina de Microbiología. 2005;37(3):126-128.

Conflicto de Intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses relacionados con el presente artículo.

Contribución de los autores: **Anel Ledesma Rodríguez:** realizó los muestreos y la etapa experimental, participó en el diseño y análisis de los resultados y realizó la escritura del documento. **Dervel Felipe Díaz Herrera:** diseñó los experimentos y participó en el análisis de los resultados y en la revisión del documento. **Ariel Ribot Enrique:** participó en el análisis de resultados. **Dianis Remón Díaz:** realizó los análisis de laboratorio y participó en la interpretación de los resultados. **Ailin Martínez Vasallo:** realizó el diseño de la investigación, participó en el análisis de resultados y realizó la revisión del documento. **Odalys Uffo Reinos:** participó en el diseño de la investigación, en el análisis de resultados y en la escritura y revisión del documento. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del manuscrito.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)