

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EMPLEANDO PCR-DGGE EN LECHE DE VACAS CON MASTITIS DE UN REBAÑO MESTIZO GYR-HOLSTEIN DEL MUNICIPIO OBISPO RAMOS DE LORA, MÉRIDA, VENEZUELA.

Datty Rosales-Zambrano^{1,2}, Yzoleth Torres-Vielma¹, Agustina Rojas-Estabal¹, Ana María Bolívar¹, José David Rosales³, Evelyn Alviarez⁴ y Pablo García-Lugo¹

Resumen

Recibido: 25 de Noviembre de 2014.

Evaluado: 15 de enero de 2015.

Aceptado: 11 de febrero de 2015.

Con el objetivo de caracterizar las bacterias presentes en muestras de leche mastíticas de vacas Girolando (Mestizas Holstein-Gyr), procedentes de un rebaño con una historia de mastitis clínica de 6 meses y baja en la producción lechera, se empleó la técnica PCR-DGGE usando como marcador la región V3 del ADN_r 16S, la cual es una metodología independiente de cultivo bacteriológico. La valoración de mastitis sub clínica se realizó por medio de CMT y las muestras se tomaron de vacas que tenían al menos 4 semanas sin terapia antibiótica. Las alícuotas fueron usadas para bacteriología e identificación molecular. Solo se seleccionaron las muestras negativas a cultivo para hacer la PCR-DGGE. El valor de mastitis sub-clínica por CMT al momento de la toma de muestra fue de 48.07% (225 cuartos). El PCR-DGGE permitió evidenciar la presencia de varios tipos de bacterias en las muestras estudiadas, las cuales se relacionaron más estrechamente a bacterias de los filos Firmicutes y Proteobacterias, donde destacó la presencia del género Acinetobacter. Muchos de estos microorganismos están implicados en multi-resistencia antibiótica, por lo cual la técnica se convierte en una herramienta útil para analizar estas poblaciones microbianas en vacas con mastitis clínica y cultivo negativo y establecer mejores medidas de control y prevención contra esta patología en las fincas lecheras. Se requieren otros estudios para establecer las posibles implicaciones de los microorganismos aislados sobre la salud humana y animal.

Palabras Clave: Bacterias, Mastitis, Cultivo negativo, PCR-DGGE.

¹ Venezolana. Médico Veterinario. Estudiante de Doctorado. Biotecnología de Microorganismos. Edif Sixto David Rojo. Universidad de los Andes (ULA). La Hechicera. Mérida. Venezuela.

² Veterinary Advance Technologies. Ejido. Mérida Venezuela.

³ Venezolano. Biólogo. IDECYT-Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Sector El Cují, Estado Miranda, Venezuela

⁴ Venezolano. Farmacéutico. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA. Mérida. Venezuela

BACTERIAL IDENTIFICATION USING PCR-DGGE IN MILK OF MASTITIC COWS FROM A HERD OF CROSS-BREED GYR-HOLSTEIN MUNICIPIO OBISPO RAMOS DE LORA, MERIDA. VENEZUELA.

Datty Rosales-Zambrano^{1,2}, Yzoleth Torres-Vielma¹, Agustina Rojas-Estaba¹, Ana María Bolívar¹, José David Rosales³, Evelyn Alviarez⁴ y Pablo García-Lugo¹

Abstract

Recibido: 25 de Noviembre de 2014.

Evaluado: 15 de enero de 2015.

Aceptado: 11 de febrero de 2015.

In order to characterize the composition of bacteria in samples of milk from crossbreed Gyr-Holstein cows affected with mastitis, from a herd with a history of clinical mastitis from six months ago and low milk production, a culture-independent PCR - DGGE technique using as a marker the V3 region 16S rDNA was carried out. The assessment of sub clinical mastitis was performed by CMT. Samples were taken from cows that had a least 4 weeks without antibiotic therapy, and aliquots were used for bacteriology and molecular identification. Only culture negative samples were selected for PCR - DGGE. The level of sub clinical mastitis by CMT at the moment of sampling was 48.07 % (225 quarter). PCR-DGGE, revealed the presence of several types of bacteria in the samples studied, which were more closely related to bacteria of the Firmicutes and Proteobacteria phylum, which highlight the presence of the genus *Acinetobacter*. Most of these microorganisms are involved in antibiotic multi-resistance, so the technique becomes a useful tool for analyzing these microbial populations in cows with clinical mastitis and negative culture and establish better recommendations for control and prevention of this pathology in dairy farms. Others researches are needed to determine the implications of microorganisms isolated in this work over animal and human health.

KEY WORDS: Bacteria, Mastitis, Negative culture, PCR-DGGE.

Introducción

La mastitis bovina es una infección de la glándula mamaria presente día a día en las explotaciones lecheras (Kuang, Tani, Synnott, Ohshima., Higuchi, Nagahata, y Tanji, 2009). Las mastitis pueden ser de tipo sub-clínicas y clínicas, afectando la salud y bienestar animal; lo cual se acompaña de disminución en la producción láctea, incremento en costos sanitarios, mayor tasa de descarte y en algunas ocasiones la muerte del animal (Melchior, Vaarkamp, y Fink-Gremmels, 2006). Anualmente, ocasiona millones de dólares en pérdidas a nivel mundial, asociadas básicamente a reducción en la producción y calidad, así como por descarte de leche en vacas tratadas (Kuang et al., 2009), los productores deben hacer grandes esfuerzos para reducir la incidencia de mastitis en sus rebaños, siendo la mastitis sub-clínica el mayor reto.

Esta patología puede ser causada por más de 150 patógenos distintos de tipo contagioso o ambiental, los cuales pueden ser clasificados en 5 grandes grupos: cocos Gram-positivos, cocos Gram negativos, *Corynebacterium*, *Mycoplasma* y misceláneos como *Nocardia*, *Prototheca* y levaduras (Rebhun, William., Guard, Chuck y Richards, Carolyn, 1995).

En muchos países, el patógeno más importante asociado a la infección intramamaria en vacas lecheras es *Staphylococcus aureus* (Graber, Casey, , Naskova, Steiner, y Schaeren, 2007; Kuang et al., 2009). Entre las especies de estreptococos, el *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* son los de mayor importancia en las mastitis ambientales (Dmitriev, Bhide, Y Mikula, 2006). *Escherichia coli* es uno de los principales patógenos relacionados con mastitis ambientales, con un amplio rango de diseminación y con distintos niveles de severidad que van desde la forma aguda a la sistémica (Günther, Esch, Poschadel, , Petzl, Zerbe,

Mitterhuemer, y Seyfert, 2011).

Los organismos coliformes como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, por lo general causan mastitis clínica, a veces aguda o hiperaguda, limitada a un cuarto y de corta duración. Estas infecciones son de difícil diagnóstico por medio de la bacteriología clásica, debido a los bajos contajes y la duración de la infección. Muchos de estos patógenos como estreptococos y enterococos se presentan con más frecuencia durante el período de secado de las vacas, siendo más prolongadas las causadas por coliformes (Scaramelli y González, 2005).

Los microorganismos que causan mastitis varían ampliamente entre países, regiones, fincas y de un momento a otro dentro de una finca, además la mastitis puede estar influenciada por el tipo de ordeño y las condiciones en las que el ordeño se practica, lo que hace necesario conocer la propia realidad de la mastitis en las diversas regiones y fincas lecheras para de esta forma implementar programas de control de mastitis, de acuerdo a los problemas específicos (Farías, García, D'Pool, Valero, Allara y Angelosante, , 2005).

Los estudios epidemiológicos revelan que luego de un tratamiento con agentes antimicrobianos, la tasa de curación varía en un rango de 0% a 80%, dependiendo de la edad, número de partos, fase de lactancia, posición del cuarto infectado y Contaje de Células Somáticas (CSS) (Sol, Sampimon, Snoep, y Schukken, 1997)

Las metodologías clásicas para el control y prevención de mastitis se basan en evaluación de la mastitis sub-clínica por medio del California mastitis test (CMT) en las fincas, el cual debe ejecutarse de manera periódica, y el CSS que realizan las plantas procesadoras de leche. La determinación de los microorganismos causales del problema se realiza por lo general usando aislamiento,

cultivo y antibiograma de leche de la glándula afectada y monitoreo en leche de tanque,; siendo esta metodología de amplio uso y dominio, tiene la desventaja de que hay poblaciones viables no cultivables (microorganismos que crecen en condiciones naturales y que aún no han podido ser cultivados en el laboratorio), que no pueden ser detectadas por esta vía.

En cuanto a las alternativas de identificación microbiana, hoy día existen distintos métodos de biología molecular que permiten tipificar las poblaciones microbianas presentes en una muestra compleja (orina, leche, heces, líquido ruminal, y fluidos fetales).

A partir del descubrimiento de los ácidos nucleicos por Watson y Crick en 1953, una revolución molecular empezó en el mundo orientada a saber si estas moléculas eran la mejor manera de establecer relaciones filogenéticas y determinar la identidad precisa de los individuos.

Sin embargo, la metodología que realmente generó un avance significativo en la biología molecular se la debemos a Kary Mullis en 1986, con la amplificación de fragmentos de ADN, llamada reacción en cadena de la polimerasa o PCR. A partir de entonces se han derivado numerosas técnicas de genotipificación a nivel de procariotes y eucariotes que han llevado a realizar cambios importantes en las relaciones filogenéticas, principalmente en el área microbiana, y que han logrado ser herramientas aplicables a la ciencia básica y aplicada (microbiología clínica humana, animal y en alimentos).

Uno de los procedimientos que es de gran utilidad en la microbiología clínica es el estudio del marcador de ADN 16S por medio de la electroforesis en gradiente desnaturizantes, mejor conocida como DGGE por sus siglas en inglés, que permite la identificación de

microorganismos cultivables y no cultivables porque es independiente de ello. (Muyzer, De Waal, y Uitterlinden, 1993; Kuang et al, 2009).

En ese particular se propuso el uso de la metodología PCR-DGGE, para conocer la población bacteriana presente en leche de vacas de un rebaño lechero con mastitis clínicas y negativas a cultivo bacteriológico.

Metodología

1. Determinación de Mastitis sub clínica y toma de muestras:

Se evaluó un rebaño lechero en el Municipio Obispo Ramos de Lora, estado Mérida, Venezuela, consistente en 117 vacas de la raza Girolando con un promedio de 15 litro/día y manejado mediante ordeño mecanizado. Al momento del estudio se determinó que este rebaño había presentado un descenso estimado del 30% en la producción y casos de mastitis clínicas en los últimos seis meses.

La determinación en campo se realizó empleando el California Mastitis Test (CMT), a todos los cuartos en producción, y los resultados fueron interpretados por un técnico entrenado. La escala utilizada fue la numérica usando los valores 0,1, 2 o 3, en donde el valor 0 indica que no hay reacción, el valor 1 es traza, siendo los valores 2 y 3 positivas en orden creciente (Dingwell, Leslie, Schukken, Sargeant y Timms, 2003).

Como se muestra en la tabla 1, se tomaron cinco muestras de vacas con signos de mastitis clínica (V2, V4, V5) y sub-clínica (V1 y V3) de acuerdo a las normas sugeridas por Scaramelli, para un muestreo adecuado para estudio microbiológico (Scaramelli, 2005; NMC, 1999). Para el estudio se hizo un pool (cuatro cuartos) de cada vaca; una alícuota de las

muestras fue enviada al Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Los Andes (Venezuela) y otra congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su procesamiento extracción de ADN y PCR-DGGE.

Tabla 1. Vacas seleccionadas sometidas al PCR-DGGE. Se incluyen datos relacionados con: CMT, días en lactancia, promedio de producción, presencia de signos clínicos y cultivo bacteriano.

Vaca	CMT	Promedio de Producción (Lts/día)	Días en Lactancia	Signos Clínicos	Cultivo
V1	2	18.55	452	Sub-clínica	Negativo
V2	3	13.84	453	Clínica. Leche alterada	Negativo
V3	2	13.84	245	Sub-clínica	Negativo
V4	3	18.55	59	Clínica. Ubre inflamada y leche alterada	Negativo
V5	3	13.84	108	Clínica. Leche coagulada	Negativo

Fuente: datos suministrados por el productor de las vacas

2. Extracción de ADN a partir de muestras de leche

Se descongeló una alícuota de leche a partir de la cual se tomaron, 500 microlitros (μL) de leche que se mezclaron con 100 μL de buffer NET (50 mM NaCl, 125mM EDTA, 50mM Tris-HCL [pH 7.6]), 100 μL de dodecil sulfato de sodio 24% (concentración final 3.4%), se incubó a 80 grados por 10 minutos y luego se enfrió en baño de hielo, se adicionó 325 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K sy e incubó a 37 grados por 1.5 horas,; la extracción de ADN se hizo por la metodología estándar de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), precipitación con isopropanol, lavado con etanol y secado al vacío (Romero y Lopez, 1999). El pellet de ADN se reconstituyó en 25 μL de agua estéril destilada, se evidenció el ADN genómico por medio de electroforesis con gel de agarosa al 0.8% (p/v) y tinción

con bromuro de etidium, luego se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se empleó 2 microlitros de ADN dilución 1/10 para cada mezcla de reacción.

3. DGGE en muestras de leche

Fueron extraídos 5 ADN genómicos de muestras de leche, para ser evaluados por medio del PCR-DGGE: se emplearon los iniciadores de la región V3 del ADN ribosomal 16S, que se detallan a continuación : cebador P1 , 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'; cebador P2, 5' -ATT ACC GCG GCT GG-3' y cebador P3 con cola de GC,5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' (Muyzer et al, 1993). La secuencia del P3 es la misma que el P1 pero con una cola de guanina-citosina. Para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa se emplearon una con los cebadores P1 y P2, para evaluar amplificación de la banda de interés de 200 pb, y luego se realizó un segundo PCR con los cebadores P3 y P2, las bandas fueron evidenciadas por medio de electroforesis con gel de agarosa al 1.5% (p/v) y teñidas con bromuro de etidium. La mezcla de reacción se realizó según el protocolo de Muyzer para PCR-DGGE (Muyzer et al, 1993), en un termociclador marca *Eppendorf Mastercycler® Gradient*, el ciclaje fue $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 minutos, 35 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto; $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 minutos y extensión final de $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 minutos. La corrida se efectuó durante 12 horas a 90 voltios y temperatura constante de 58°C en un equipo para DGGE marca *C.B.S Scientific*, utilizando geles de acrilamida al 8% (acrilamida:bis-acrilamida 37:5:1 (v/v)), con un gradiente de desnaturalización de 40 a 80% (obtenido de una mezcla de urea: 42,16% y formamida: 40% en 100% desnaturalizante).

Una vez finalizada la electroforesis se procedió a teñir con bromuro de etidium y visualizar en luz UV las bandas obtenidas, para cortarlas y colocarlas a

4°C en tubos de eppendorf de 1,5ml con 30µl de agua destilada por 48 horas. Se procedió luego a realizar una amplificación con volumen final de 50 µL, para evidenciar la amplificación de la banda de interés y purificar el ADN del producto de PCR con el kit *PCR CleanUp* (Invitrogen®) bajo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado fue enviado a secuenciación a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (UEGF-IVIC).

4. Análisis Filogenético:

Los datos obtenidos de la secuenciación fueron evaluados por la herramienta de alineación de secuencias local del NCBI-Blast, luego los software Clustal Omega, Mega 6 y Gel Comprador II 6.6, para alineamientos múltiples, filogenia y edición de fotos respectivamente.

Resultados

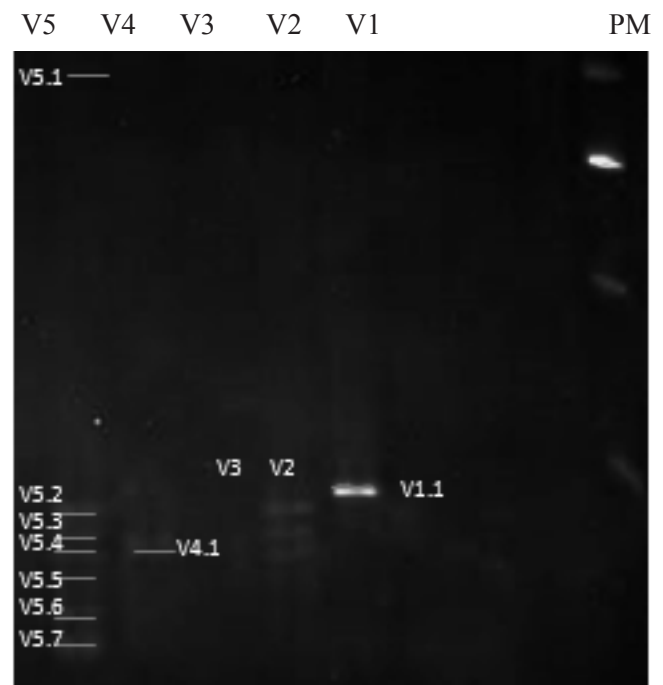
Se evaluaron 117 vacas lecheras (468 cuartos), de los cuales se detectaron: 226 cuartos sanos (48.29%), 13 cuartos perdidos (2.77%), 225 cuartos con mastitis sub-clínica (48.07%) y 4 cuartos con mastitis clínica (0.87%). Los resultados de laboratorio de las muestras de las vacas con mastitis clínica que fueron evaluadas por DGGE, reportaron cultivos negativos hasta 48 horas de incubación.

Las muestras V1, V2, V4 y V5 amplificaron a la región V3 del gen ADN ribosomal 16S, y los amplicones fueron sometidos al DGGE. La figura 1 detalla las bandas obtenidas para cada muestra, la vaca V3 no amplificó inicialmente y se corrió en el gel como vaca negativa. La V1 solo obtuvo una banda; la V2 presentó tres bandas que no se cortaron por tener un perfil similar a tres de las bandas de V5; la V4 presentó una

sola banda y V5 obtuvo el perfil de siete bandas, de las cuales la banda V5.1 no fue enviada a secuenciación por no amplificar luego de la purificación de la banda, ésta era de muy baja intensidad en el gel del DGGE.

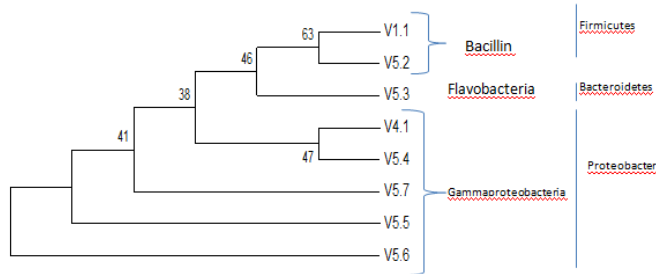
En base a las relaciones filogenéticas, las bandas fueron identificadas más cercanamente a los filos de Proteobacterias (Gamma-proteobacterias), Firmicutes (Bacillina) y Bacteroidetes (Flavobacterias), como se puede evidenciar en la figura 1., del árbol filogenético obtenido de las UTO, bajo el método UPGMA para establecer las relaciones entre secuencias de alineamientos múltiples.

Figura 1. Gel de DGGE para análisis de la composición bacteriana de leche cruda procedente de vacas Girolando con mastitis clínica y sub clínica.



Fuente: elaboración propia. PM: Peso molecular, V1 –V5 (vacas y bandas cortadas). Ej. Las 7 bandas de la vaca 5 se señalan como V5.1, V5.2, V5.3, V5.4, V5.5, V5.6 y V5.7

Figura 2. Árbol filogenético bacteriano a partir de secuencias de bandas de DGGE, de muestras leche cruda procedente de vacas Girolando con mastitis clínica y sub clínica.



Fuente: propia.

Es importante destacar que los microorganismos relacionados con el perfil la banda V5.2, V5.3 y V5.4 se repiten en la vaca V2 que no se cortaron, los cuales se corresponden a los géneros *Streptococcus*, y *Acinetobacter*, siendo la última la más común de las UTO que se encontraron presente en las vacas V2, V4 y V5. De las 4 vacas evaluadas, dos vacas estaban en el mismo lote de producción y las tres presentaban mastitis clínica con alteraciones en la leche, como se puede detallar en la tabla 2 (datos obtenidos del programa Gansoft®), al momento del estudio de campo.

De esa manera se logró determinar la presencia de bacterias ácido lácticas (*Lactococcus*), patógenos ambientales como *Streptococcus spp.*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*. La vaca V1 obtuvo una sola banda relacionada con *Lactococcus lactis*, y la vaca 4 una sola banda V4.1 cercana a *Acinetobacter calcoaceticus*, la banda V5.5 correspondiente a *Acinetobacter haemolyticus*, está ubicada similar a la V4, ambas pertenecen al género *Acinetobacter*, pero la región usada del ADNr 16S permitió tipificar dos especies diferentes. La banda V5.2 se relacionó con *Streptococcus suis* y la banda V5.7 fue identificada

como *Aeromonas hydrophila*, dos UTO no lograron ser identificadas debido a bajos índices de identificación en el BlastN, y otra fue catalogada como secuencia parcial del ADN 16S de bacteria no cultivable, lo cual sucede con cierta frecuencia en este tipo de metodología.

Los microorganismos más cercanamente identificados están desglosados en la tabla 2, donde se observa el porcentaje e identificación por el BlastN-NCBI, y el código de acceso a la secuencia más parecida con la cual alineó. Solo dos secuencias resultaron con porcentajes menores al 97% de identificación usando esta metodología, la secuencia V5.3 y V5.5 las cuales corresponden parcialmente a las especies de *Chryseobacterium* y *Moraxella*, pero serán reportadas como no identificadas y requerirán un segundo proceso de identificación. Todas las demás secuencias presentaron índices mayores a 97% de similitud con las secuencias reportadas.

Tabla 2. Secuencia y relación filogenética de las secuencias de bandas obtenidas de DGGE a partir de muestras leche cruda procedente de vacas Girolando con mastitis clínica y sub clínica

Código banda	Microorganismos más cercano	Acceso Genbank	% Identificación	Observación
V1.1	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	KJ173609.1	99	
V4.1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	EU921463.1	98	
V5.2	<i>Streptococcus suis</i>	AF014816	99	
V5.3*	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	FJ608252.1	75	No identificada
V5.4	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	KJ 806319.1	97	
V5.5*	<i>Moraxella sp</i>	AB48781.1	79	No identificada
V5.6	Secuencia parcial 16S ADNr Bacteria No cultivable	AM697031.1	97	
V5.7	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KF951050.1	100	

Fuente: elaboración propia

Discusión

Las investigaciones pioneras en Venezuela estimaron la prevalencia de mastitis sub clínica cercana a un 60% (Alonso, 1977), atribuida principalmente a pobres condiciones higiénico-sanitarias, considerándose escaso el efecto del sistema y las características del ordeño. El test CMT es una evaluación cualitativa del conteo de células somáticas en la leche, se emplea como prueba de tamizaje para detección de mastitis sub-clínica debido a su fácil uso y amplia difusión (Dingwell et al, 2003).

En este estudio, la presencia de mastitis sub clínica en la explotación fue reportada en el 48.07% de los cuartos bajo estudio (225 cuartos); representando un valor alto si se compara con valores reportados previamente en Venezuela de 30.18% en trabajos realizados en 6405 vacas lecheras de trece estados, donde además se pudo estimar que la prueba permite la identificación correcta del 69% de los cuartos afectados Ferraro, Scaramelli y Troya, 1999; Fariás et al, 2005). Los cuartos perdidos en este rebaño 2.77 % y la mastitis clínica de 0.84%, están por debajo del valor reportado por Ferraro, et al., de 3.99% y 2.69%, aunque es importante destacar que este valor puede ser no real, ya que previamente a la realización del estudio se habían descartado un importante número de animales con mastitis crónica.

Otros estudios recientes realizados empleando CMT, en la zona alta del estado Mérida, con vacas Holstein, Jersey y Pardo Suizo reportan un valor de 36,2%, resaltando la importancia del mismo ya que estos valores de mastitis sub clínica logran la disminución de hasta el 25% de la producción lechera en la explotación con las pérdidas económicas que esto acarrea. (Suniaga, Rojas, Hernández, Caamaño, Urbina y Tovar, 2009).

La importancia de analizar muestras de leches mastíticas con cultivos negativos ha sido estudiada anteriormente. La identificación de los microorganismos responsables del cultivo negativo, permite medir los cambios en las poblaciones bacterianas a lo largo de las infecciones y mejorar la comprensión de la enfermedad a fin, de establecer mejores estrategias preventivas y curativas. El uso de metodologías independientes a cultivo usando el gen del ADNr 16s, han permitido obtener datos importantes de estas comunidades bacterianas (Kuehn, Gorden, Munro, Rong, Dong, Plummer, y Phillips, 2013).

Los filos Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria, fueron los reportados en este estudio al igual que otro realizado en Japón con vacas mastíticas (Kuang et al. 2009), coincidiendo ambos en que el grupo de las Proteobacterias fue el más diverso y abundante en número de UTO.

Para el caso de *Acinetobacter*, en un estudio realizado entre el 2003 y 2008 en un total de 552 vacas lactantes, se logró aislar en un porcentaje de 8.2% tanto *Acinetobacter calcoaceticus* como *A. baumannii*, siendo resaltante que los géneros *Serratia*, *Acinetobacter* y *Enterobacter* son organismos multi-resistentes a la mayoría de los antimicrobianos evaluados, incluyendo Cefalosporina Y Ciprofloxacina, Lo Que Se Denomina Multi-Resistencia De Amplio Espectro (Nam, Lim, Kang, Kim, Moon, Jang, y Jung, 2009; Lockhart, Abramson, Beekmann, Gallagher, Riedel, Diekema, y Doern, 2007). Además, algunos de estos microorganismos pueden mantenerse en el tiempo como biofilms dentro del canal del pezón o dentro de los equipos de ordeño, complicando más su tratamiento y prevención (Melchior et al, 2006), lo cual concuerda con cuadros crónicos y resistentes a múltiples terapias antibióticas.

El *Lactococcus lactis* identificado en la banda V1.1, es considerado un comensal y con la capacidad de producir sustancias antimicrobianas que pueden prevenir la infección causada por bacterias Gram positivas, como los estafilococos. Es interesante que en el caso de esta banda, la intensidad de la banda se asocia a una concentración alta de microorganismos, lo cual coincide con lo que concluye Kuang que puedan estar jugando un rol antagónico (protector) a la infección de estos patógenos (Kuang et al., 2009). Es bien conocido que el *Lactobacillus lactis* produce bacteriocinas como el Lacticin 3147, que es capaz de inhibir microorganismos como estreptococos y estafilococos (Ryan, Meaney, Ross, y Hill 1998) y se ha empleado en infusión intramamaria para el control de la mastitis bovina (Klostermann, Crispie, Flynn, Ross, Hill y Meaney, 2008).

Tanto *Streptococcus suis* como *S. bovis* y los patógenos productores de mastitis *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, han sido descritos como microorganismos frecuentemente aislados de las tonsilas del ganado vacuno, siendo *S. suis* el dominante en terneros entre 1 mes y un año, pero infrecuente en becerros menores a un mes de nacidos (Colque et al., 1993) y es considerado un patógeno ambiental, eventualmente asociado a mastitis y capaz de producir biofilms (Olson, Ceri, Morck, Buret y Read, 2002).

Esa bacteria, tanto en la forma libre como en biopelícula, es sensible a drogas beta-lactámicas como (penicilina, ceftiofur, cloxacilina, ampicilina) y oxitetraciclina (Olson et al, 2002). Esto coincide con los días de lactancia (108) de la vaca 5 de donde fue detectada esta UTO y la presencia de *S.suis* en terneros de edad temprana, donde la leche juega un rol importante en la presencia de la bacteria.

Aeromonas hydrofila, ha sido descrita dentro de los bacilos aeróbicos, Gram negativos ambientales productores de mastitis bovina, generalmente aislada en bajo porcentaje entre y 1 y 6.1% (Watts, 1988; Rea, Cogan, y Tobin., 1992; NAM., KIM, LIM, JANG, y Jung, 2010).

Por otra parte, se observaron bandas no identificadas debido a bajos índices de homología, en la banda V5.3 posiblemente esté asociado a co-migración de bandas, lo cual genera la incapacidad de alinear correctamente al existir mezclas de ADN. La secuencia en el árbol se ubica en la rama de los Bacteroidetes, pero debe realizarse una posterior modificación de las condiciones de gradiente y tiempo que permita una mejor resolución (Kuang et al, 2009; Sekiguchi, Tomioka, Nakahara, y Uchiyama, 2001). Otro limitante son las bandas de baja intensidad, ya que al tener poco ADN el proceso de secuenciación se ve limitado y por ende la capacidad de identificación con la secuencia obtenida (Kuang et al, 2009).

Conclusiones

Las técnicas de identificación independientes de cultivo, en las últimas décadas se han constituido como poderosas herramientas para identificación de poblaciones microbianas en leche cruda individual o de tanque, permitiendo tener así un conocimiento más claro en patologías de etiología compleja como la mastitis bovina. El estudio de leches con mastitis sub-clínicas o clínicas y cultivo negativo, tiene disponibles herramientas para identificar los microorganismos responsables que no crecen bajo cultivo convencional, lo cual además nos permite mejorar los sistemas de cultivo para lograr las condiciones necesarias para su crecimiento. En el caso particular del DGGE usando la región V3 del ADNr 16S, permitió identificar

claramente, con un poder discriminatorio aceptable, microorganismos asociados a mastitis sub-clínica y clínica negativos a cultivo.

Muchas de las bacterias implicadas en estos procesos como *Acinetobacter* o *Aeromonas*, están asociadas a multi-resistencia y formación de biofilms, por lo cual este tipo de estudios puede contribuir a mejorar las maniobras de prevención y los abordajes de tratamientos anti-mastíticos. Hoy día los estudios basados en el ADNr 16S, empleando meta genómica están permitiendo una excelente tipificación de las poblaciones microbianas presentes en leche cruda y derivados lácteos.

Agradecimiento

A la colaboración y asesoría prestada por el Laboratorio Genmolab, en las personas de la Lic. Mary Acosta y Lic. Gerson Caraballo, y al Sr R.G.M., por permitir el estudio en su finca.

Referencias

ALONSO, FR. (1997). “Prevalencia de mastitis sub-clínica bovina en la cuenca del lago de Maracaibo I. Porcentaje de prevalencia y caracteres de la infección. Jornadas nacionales Sobre Ganadería de doble Propósito”. Machiques Perija.

DINGWELL, Randy., LESLIE, Ken., SCHUKKEN, Ynten., SARGEANT, Jany y TIMMS, Leo (2003). “Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows”. *The Canadian Veterinary Journal*, 44(5), 413.

DMITRIEV, A., Bhide, M., y MIKULA, I. (2006). “cpn60 gene-based multiplex-PCR assay for simultaneous identification of Streptococcal species”. *Acta Veterinaria Brno*, 75(2), 235-240.

FARIAS REYES, José., GARCÍA URDANETA, Aleida., D'POOL, Gerardo., VALERO LEAL, Kutchynskaya., ALLARA, María y ANGELOSANTE, Geovany. (2005). “Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas”. *Revista Científica*, 15(002).

FERRARO, Luciano., SCARAMELLI, Aura., TROYA, Héctor. (1999) “Prevalencia de la mastitis sub-clínica bovina en Venezuela y evaluación de la prueba de mastitis de California (CMT) como prueba diagnóstica”. *Revista Científica*. 9, (2), 81-90.

GRABER, H. U., CASEY, M. G., NASKOVA, J., STEINER, A., y SCHAEAREN, W. (2007). “Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk”. *Journal of dairy science*, 90(10), 4661-4669.

KUANG, Ying., TANI, Kaori., SYNNOTT, Aidan. J., OHSHIMA, Kazuhito., HIGUCHI, Hidetoshi., NAGAHATA, Hajime y TANJI, Yasunori. (2009). “Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method”. *Biochemical Engineering Journal*, 45(1), 76-81.

KUEHN, Joanna., GORDEN, Patrice., MUNRO, Daniel., RONG, Ruichen., DONG, Qunfeng., PLUMMER, Paul y PHILLIPS, Grerory. (2013) “Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis”. *PLoS*

one, 8(4), e61959.

KLOSTERMANN, Katja., CRISPIE, Fiona., FLYNN, James., ROSS, Paul., HILL, Colin y MEANEY, William. (2008). "Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: comparison with antibiotic treatment in field trials". *Journal of dairy research*, 75(03), 365-373.

LOCKHART, Shaun, ABRAMSON, Murray., BEEKMANN, Susan., GALLAGHER, Gale., RIEDEL, Stefan., DIEKEMA, Daniel y DOERN, Gary. (2007). "Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004". *Journal of clinical microbiology*, 45(10), 3352-3359.

MELCHIOR, M. B., VAARKAMP, H., y FINK-GREMMELS, J. (2006). "Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal*, 171(3), 398-407.

MUYZER, Gerard., DE WAAL, Ellen y UITTERLINDEN, Andre. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA". *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.

NAM, H. M., LIM, S. K., KANG, H. M., KIM, J. M., MOON, J. S., JANG, K. C., Y JUNG, S. C. (2009). "Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea". *Journal of dairy science*, 92(5), 2020-2026.

NAM, H. M., KIM, J. M., LIM, S. K., JANG, K. C., y JUNG, S. C. (2010). "Infectious aetiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008". *Research in veterinary science*, 88(3), 372-374.

OLSON, Marie., CERI, Howard., MORCK, Douglas., BURET, Andre y READ, Ronald. (2002). "Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics". *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86.

REA, Mary., COGAN, T. M., Y TOBIN, S. (1992). "Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland". *Journal of Applied Bacteriology*, 73(4), 331-336.

REBHUN, William., GUARD, Chuck y RICHARDS, Carolyn. (1995). *Diseases of dairy cattle*. Williams and Wilkins.

SCARAMELLI, Aura y GONZÁLEZ, Zuleima. (2005). Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. Disponible desde Internet en: http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manualganaderia/seccion5/articulo_9_s5.pdf (con acceso 20/07/09). [Links].

SOL, J., SAMPIMON, O. C., SNOEP, J. J., y SCHUKKEN, Y. H. (1997). "Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*". *Journal of dairy science*, 80 (11), 2803-2808.

SUNIAGA, José., ROJAS, Golfredo., HERNÁNDEZ, Javier., CAAMAÑO, Janeth., URBINA, Analcelmira y TOVAR, Luis. (2009). "Estudio de prevalencia de mastitis subclínica en la zona

alta del estado Mérida”. Universidad de Los Andes (Venezuela). Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

WATTS, Jeffrey. L.(1988). “Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary microbiology*”, 16(1), 41-66.