

## **TÉCNICAS ALTERNATIVAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE MASTITIS**

### **INTRODUCCIÓN**

El término "mastitis" se utiliza para referirse a la inflamación de la glándula mamaria independientemente de la causa. La primera consecuencia de la mastitis es una disminución de la producción de leche la cual presentará cambios físicos, químicos y bacteriológicos además de cambios patológicos en la ubre.<sup>1, 2</sup> Existen varios factores de riesgo que influyen en el tipo y frecuencia de los microorganismos causantes de mastitis como son: higiene en la ordeña, fase de lactación, ubicación geográfica, manejo y etapa de lactación.<sup>3-5</sup>

### **TIPOS DE MASTITIS Y SÍGNOS CLÍNICOS**

La mastitis puede ser clasificada según la gravedad de las lesiones o intensidad de la reacción inflamatoria en clínica y subclínica.<sup>6</sup>

#### **1. MASTITIS CLÍNICA**

En la mastitis clínica se observan signos como cambios en la glándula ya que el cuarto afectado puede tener aumento de tamaño y también alteraciones en la leche que puede contener grumos, coágulos y cambios de color.<sup>2</sup>

Los casos agudos se caracterizan por una presentación súbita, dolor, inflamación, enrojecimiento, disminución y alteraciones en la secreción láctea de las glándulas afectadas. La secreción de coágulos, grumos y leche con aspecto de agua son los cambios más comunes y en algunos casos la infección puede llegar a ser fatal. La inflamación aguda de la ubre puede producir claudicaciones, porque el miembro posterior roza con la glándula afectada. Si la mastitis es unilateral, la glándula afectada puede estar más grande que la sana.<sup>2, 7,</sup>

#### **2. MASTITIS SUBCLÍNICA**

En la mastitis subclínica no se observan signos visibles de enfermedad y la leche es aparentemente normal. Este tipo de mastitis sólo puede ser detectada midiendo el contenido celular de la leche (células somáticas).<sup>2, 7</sup>

La presentación subclínica es importante, debido a:<sup>2</sup>

- Tiene de 15 a 40 veces más prevalencia que la forma clínica.

- Usualmente precede a la forma clínica.
- Es de larga duración.
- Es difícil de detectar.
- Reduce la producción láctea.
- Afecta la calidad de la leche.
- Constituye un reservorio de microorganismos que pueden llevar a la infección de otros animales del rebaño.

La mastitis puede ser causada por agentes infecciosos como bacterias, hongos, virus, y rickettsias o por origen traumático. Si se trata de una mastitis bacteriana, que es la más común, debe realizarse la identificación del agente y el antibiograma para indicar el tratamiento específico.<sup>3, 8</sup>

Las bacterias causantes de mastitis, pueden dividirse en dos grandes grupos:

1. Patógenos mamarios en los cuales se incluyen a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.
2. Patógenos ambientales en los que se encuentran bacterias Gram negativas y otras especies de estreptococos.<sup>4, 5</sup>

La importancia de la mastitis es principalmente económica y de salud pública.<sup>10</sup> Para mantener la calidad sanitaria de la leche, se deben de controlar varias fuentes de contaminación que pueden ser endógenas (organismos que contaminen la leche *in vivo*) o exógenas (manejo de la leche después del ordeño).<sup>9</sup>

## **DIAGNÓSTICO**

Tradicionalmente, los métodos de diagnóstico incluyen una estimación del conteo de células somáticas, indicadores de inflamación, medición de biomarcadores asociados a la enfermedad como son las enzimas N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAGasa) y lactato deshidrogenasa, así como la identificación de los microorganismos causantes a través de métodos bacteriológicos tradicionales. Todos estos métodos diagnósticos presentan limitantes por lo que existe la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que sean rápidas, sensibles y confiables. Recientemente se han alcanzado avances significativos en la identificación de ácidos nucleicos y otros biomarcadores utilizando distintas técnicas de microbiología molecular.<sup>10</sup>

A continuación se mencionan las técnicas diagnósticas utilizadas a nivel de campo que pueden ser realizadas por médicos veterinarios y productores ya que generalmente requieren de poco entrenamiento para aplicarlas y las técnicas utilizadas en el laboratorio para hacer el diagnóstico de esta enfermedad. <sup>10</sup>

**TÉCNICAS UTILIZADAS A NIVEL DE CAMPO**

<p><b>MÉTODOS FÍSICOS</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observación y palpación de la ubre             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tazón de ordeño</li> </ul> </li> <li>• Prueba del paño negro             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Taza probadora</li> <li>• Cámara térmica</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>MÉTODOS QUÍMICOS</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conductividad eléctrica de la leche             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Papel indicador</li> </ul> </li> <li>• Concentración de cloro en leche             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba de Whiteside</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>MÉTODOS BIOLÓGICOS</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prueba de California</li> <li>• Prueba de Wisconsin y Wisconsin modificada             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hy-Mastitis test</li> </ul> </li> </ul>

## TÉCNICAS UTILIZADAS A NIVEL DE LABORATORIO

<b>CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Microscopía directa</li><li>• Método fluoro-opto-electrónico (Fossomatic)</li><li>• Counter coulter</li><li>• Delaval cell counter</li></ul>
<b>CULTIVO BACTERIOLÓGICO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Demostración, aislamiento e identificación a través de pruebas bioquímicas.</li></ul>
<b>DETERMINACIÓN DE ENZIMAS</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAGasa)<ul style="list-style-type: none"><li>• Otras enzimas como lactato deshidrogenasa, estereasas, lipasas.</li></ul></li></ul>
<b>INDICADORES DE LA INFLAMACIÓN</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Adenosin trifosfato (ATP)<ul style="list-style-type: none"><li>• Lactosa</li></ul></li></ul>
<b>PRUEBAS SEROLÓGICAS</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)</li></ul>
<b>PRUEBAS MOLECULARES</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• PCR convencional</li><li>• PCR Tiempo real</li><li>• PCR Múltiplex</li></ul>
<b>OTRAS TÉCNICAS</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Determinación de metabolitos volátiles bacterianos en leche.</li></ul>

## **DIAGNÓSTICO DE MASTITIS: PRUEBAS DE CAMPO**

### **I. MÉTODOS FÍSICOS**

#### **a) OBSERVACIÓN Y PALPACIÓN DE LA UBRE**

En la mastitis subclínica, la ubre de la vaca permanece aparentemente sana, la leche a simple vista es normal, pero una infección incipiente puede estar dañando el tejido glandular y provocar alteraciones en la leche que se está produciendo. La infección puede provocar inflamación de uno, varios cuartos o de toda la glándula aumento de la temperatura en el área afectada, así como enrojecimiento de la zona y dolor. Cuando se encuentran todos o algunos de los síntomas enumerados se puede interpretar como un caso de mastitis clínica, donde además se encuentran cambios importantes en la leche que se produce en el tejido afectado, estos cambios pueden consistir en alteración del color, aparición de grumos, coágulos de sangre, coágulos con púas o una leche más acuosa entre otros. <sup>11</sup>

#### **b) TAZÓN DE ORDEÑO**

Para leches anormales, se recoge la leche sobre un tejido negro extendido encima del tazón, haciendo así los grumos visibles. <sup>11</sup>

#### **c) PRUEBA DEL PAÑO NEGRO**

Se realiza durante la preparación de la vaca para la ordeña, consiste en la detección de grumos en la leche (tolondrón) haciendo pasar los primeros chorros a través de una malla negra o bien utilizando una cubetilla especialmente diseñada para eso. Es recomendable realizar este procedimiento en todos los ordeños, ya que además de detectar leche anormal, se eliminan bacterias que normalmente se encuentran en mayor cantidad en estos primeros chorros y se estimula la "bajada" de la leche. <sup>11</sup>

#### **d) TAZA PROBADORA**

Se examinan los primeros chorros de leche en cada ordeño sobre un recipiente de fondo oscuro, los coágulos, escamas, hilos, materia fibrosa, secreciones acuosas o color anormal indican que la leche no es normal. En la mastitis crónica la leche no tiene apariencia anormal visible en todos los ordeños. <sup>11</sup>

### **e) CÁMARA TÉRMICA**

También llamada termografía infrarroja, es un método no invasivo en el cual por absorción de radiación infrarroja se generan imágenes de la cantidad de calor generado por la piel.<sup>12</sup> El calor emitido por la ubre puede ser detectado en los casos de mastitis clínicas, esta cámara detecta cambios de 1 a 1.5 °C y además de poder ser utilizada para detectar mastitis, se puede utilizar para detectar otras enfermedades febriles en los animales.<sup>12, 13</sup>

## **II. MÉTODOS QUÍMICOS**

### **a) CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DE LA LECHE**

La evaluación de la conductividad eléctrica como un método para la detección de mastitis se basa en el aumento de la cantidad de sodio, cloro, potasio, calcio y magnesio presentes en la leche cuando existe una alteración en la glándula mamaria, provocándose entonces un aumento en la conductividad de la misma.<sup>10, 11, 14</sup>

Existe un detector de conductividad portátil (DCP) que tiene un recipiente de electrodos de metal, donde se coloca la leche. Dichos electrodos transmiten la información a una unidad electrónica que mide la conductividad, la cual aparece en un visor, expresada en unidades. El DCP tiene un solo recipiente colector y la expresión en el visor del resultado se mantiene mientras la leche esta presente en la copa, de modo que este dato debe ser registrado manualmente en un anotador en forma inmediata antes de poder volcar la leche y limpiar el recipiente para realizar otra medición, para completar el análisis de los cuatro cuartos de cada vaca. Este sistema que detecta fallas en la conductividad de la leche, diagnostica mastitis antes de que existan alteraciones en la leche. Este método tiene la ventaja sobre otros procedimientos de diagnóstico porque la información que se obtiene es inmediata, logrando hacerlo muy practico y automatizado., la desventaja que presenta es que pueden presentarse variaciones en la conductividad eléctrica que no están asociados a problemas de mastitis.<sup>10, 11,</sup>

### **b) PAPEL INDICADOR**

Este método consiste en un papel sobre el que se hace caer directamente del pezón algunas gotas de leche, se consideran sospechosas las leches que dan una coloración correspondiente a un pH igual o superior a 7 ya que la leche proveniente de glándulas mamarias afectadas por mastitis tiene pH alcalino, lo que se le atribuye a la disminución de lactosa e incremento de sales que pasan de la sangre a la leche. <sup>14</sup> La prueba descubre el 50% de los cuartos infectados. <sup>11</sup>

#### **c) CONCENTRACIÓN DE CLORO EN LECHE**

En la leche la relación lactosa:cloro es influenciada por el estado lactacional y presentación de mastitis. En casos de mastitis el contenido de cloro en la leche tiende a incrementarse en proporción a la lactosa lo que ocasiona en la leche un sabor ligeramente salado. Para determinar el contenido de cloruros en leche, se ha desarrollado el método químico que se basa en una prueba de titulación que consiste en cambio de color en la leche al agregar nitrato de plata (0.1N) a la leche, en presencia de dicromato de potasio como indicador, Cuando hay exceso de iones de plata se forma el cromato de plata resultando un color rojizo; en tanto que cuando el cloro con la plata forman el cloruro de plata en presencia de cromato de potasio resulta un color amarillo. <sup>14</sup>

#### **d) PRUEBA DE WHITESIDE**

La mezcla de leche con una solución de NaOH al 4% ocasiona que la leche se gelifique formando grumos que son visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas, Para hacer más visible la reacción es conveniente utilizar una placa de acrílico negra que puede tener dibujada 4 cuadros de 3 \* 3 cm, uno por cada cuarto. <sup>11</sup>

### **III. MÉTODOS BIOLÓGICOS**

#### **a) PRUEBA DE CALIFORNIA**

Esta prueba ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en ganado lechero. <sup>11</sup> Esta prueba refleja la cantidad de células somáticas (leucocitos y células epiteliales) en leche. La combinación del ADN de las células en la leche con un detergente (Alquil-Aril-Sulfonato de sodio) y el colorante púrpura de bromocresol como indicador de pH en un recipiente de la paleta especial produce un gel, los

resultados se leen como negativos, Traza, 1+, 2+ y 3+ según la cantidad del gel.<sup>14</sup> La prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%.<sup>11, 14</sup>

#### **INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA DE CALIFORNIA PARA MASTITIS<sup>14</sup>**

<b>INTERPRETACIÓN</b>	<b>REACCIÓN</b>	<b>NÚMERO DE CÉLULAS POR ML</b>
Negativo	Sin evidencia	0-200 000
Traza	Precipitación leve	150 000 – 500 000
1+	Sin formación de gel	400 – 1 500 000
2+	Mezcla espesa	800 000 – 5 000 000
3+	Formación de pico central	Más de 5 000 000

#### **b) PRUEBA DE WISCONSIN Y WISCONSIN MODIFICADA**

Es la segunda técnica más utilizada para el diagnóstico de mastitis subclínica<sup>14</sup> es una prueba cuantitativa, sensible y económica<sup>15</sup> y es utilizada para estimar el contenido de células somáticas de muestras de leche fresca mezclada o leche de tanques de enfriamiento, así como para muestreo de vacas individuales. Se utiliza una solución similar a la que se emplea con la prueba de California pero en contraste con esta última, los resultados se miden cuantitativamente dependiendo de la viscosidad.<sup>11</sup> Debido a que es difícil conseguir los tubos originales para la prueba de Wisconsin, hace algunos años se diseñó la modificación de la técnica utilizando tubos distintos la cual ya tiene algunos años de ser utilizada con éxito.<sup>15</sup>

#### **c) Hy-MASTITIS TEST**

Es un laboratorio bacteriológico portátil para muestras de leche, con una paleta de plástico con dos vistas que contienen medios de cultivo para bacterias Gram positivas y negativas, con esta prueba los cultivos son sencillos de realizar, eficaz, fácil de transportar, económico y rápido para el diagnóstico.<sup>16</sup>



## **DIAGNÓSTICO DE MASTITIS: PRUEBAS DE LABORATORIO**

### **I. CONTEO DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

EL contenido de células somáticas en la leche nos permite conocer el estado funcional y de salud de la glándula mamaria, debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante.

En el laboratorio de cuentan con distintos métodos que permiten realizar una determinación directa o indirecta de células somáticas.<sup>17</sup>

#### **a) MICROSCOPIA DIRECTA**

Se realiza el recuento directo con un microscopio óptico utilizando el objetivo de 100X, es un ensayo cuantitativo de laboratorio por el cual se examinan bajo el microscopio utilizando frotis teñidos de leche problema y se cuenta el número de células somáticas, para una mejor observación y un adecuado teñido de la muestra, se recomienda utilizar el reactivo de Newman-Limpert que permite observar las células somáticas de color naranja en el frotis.<sup>14</sup> Este método es de poca utilidad cuando se trata de un gran número de muestras y se debe trabajar con una metodología más rápida, Sin embargo, aún mantiene su utilidad para los trabajos de investigación.<sup>11</sup>

#### **b) MÉTODO FLUORO-OPTO-ELECTRÓNICO (FOSSOMATIC)**

Basa su cálculo en la tinción fluorométrica del material nuclear utilizando bromuro de etidio el cual penetra y se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN, por lo que cada célula produce un impulso eléctrico que se amplifica y se registra. Mide con alto grado de precisión y exactitud y además da la posibilidad de registrar los datos automáticamente. La desventaja de este equipo es su alto costo, sin embargo, al estar preparado para analizar un gran número de muestras, el costo por muestra es mucho más bajo que otros métodos utilizados para el recuento de células somáticas.<sup>10, 11</sup>

#### **c) COUNTER COULTER**

Este aparato cuenta el número de impulsos eléctricos resultantes de las partículas que pasan entre dos electrodos, es decir, cuenta partículas de un diámetro determinado, en este caso las células somáticas, pero en el rango de recuento extraían otras partículas, aumentando ligeramente el valor resultante.<sup>11</sup>

#### **d) DeLAVAL CELL COUNTER**

Es un equipo portátil, que funciona con batería y posee un medidor óptico de células somáticas de la leche. Esto permite estudiar el estado de salud de la ubre de la vaca, el equipo utiliza cartuchos los cuales succionan cantidades pequeñas de leche, ya dentro del cartucho, la leche se mezcla con reactivos que llegan al núcleo de las células somáticas, lo cual permite su conteo, mediante un sensor de fluorescencia. Esto se traduce en el número de células somáticas en leche, el cual aparece rápidamente en la pantalla del equipo. Su principio es similar al utilizado por el Fossomatic y arroja datos precisos sobre el estado de salud de la ubre.<sup>10, 11</sup>

## **II. CULTIVO BACTERIOLÓGICO**

El aislamiento de bacterias en leche de animales con mastitis es considerada como el diagnóstico definitivo para esta entidad. La colección de muestras de leche en forma aséptica para los exámenes bacteriológicos puede proveer un diagnóstico válido y correcto para el tratamiento, pronóstico, prevención y control de la mastitis en rumiantes.<sup>14</sup> Las muestras de leche deberán ser recolectadas en tubos estériles y dentro de las primeras 24 horas cultivarse en medios enriquecidos, selectivos y diferenciales.<sup>14</sup> En la mayoría de los laboratorios clínicos, los métodos de identificación se basan en el cultivo microbiológico de la leche y en pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas. Las ventajas del cultivo microbiológico son que las bacterias causantes pueden ser identificadas y realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos para orientar a los productores acerca del tratamiento que pueden llevar a cabo para controlar la enfermedad en el rebaño.<sup>18, 19</sup>

Sin embargo, también hay varias desventajas asociadas al cultivo microbiológico ya que los animales con mastitis subclínica pueden eliminar al microorganismo causante de manera intermitente durante la lactación, por lo que el cultivo microbiológico de la leche no garantiza el aislamiento del agente causal de los cuartos afectados con mastitis subclínica debido a que el número de microorganismos es muy bajo al momento de coleccionar la muestra.<sup>20</sup> De acuerdo al

National Mastitis Council (NMC) la cantidad mínima detectable de bacterias es de 100 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) cuando se siembran 10 µl de leche en medios de cultivo.<sup>21</sup> Los cultivos negativos también pueden deberse a la aplicación de antibióticos, presencia de leucocitos y un alto CCS en leche que inhiben el crecimiento bacteriano *in vitro*, además los cultivos microbiológicos de leche toma más de 48 horas en lograr el aislamiento e identificación bacteriana utilizando pruebas bioquímicas.<sup>18, 19, 22, 23</sup>

### **III. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS**

#### **a) N-acetyl-beta-D-glucosaminidasa (NAGasa)**

Es una enzima intracelular lisosomal que es liberada en leche a partir de neutrófilos durante la fagocitosis y lisis celular y en algún grado por células epiteliales dañadas. Es una enzima que ha demostrado altas correlaciones entre su presencia y el número de células somáticas en la leche.

14

Existen métodos basados en la fluorimetría para obtener valores de esta enzima, así como métodos electroquímicos, pero aún se necesitan más estudios sobre como utilizar el valor de esta enzima para detectar de manera automática la presencia de mastitis.<sup>24</sup>

#### **b) OTRAS ENZIMAS**

Existen varias enzimas que incrementan su valor en los casos de mastitis y podrían ser utilizadas para su detección, entre estas enzimas se encuentran diferentes lipasas, estereasas, fosfatasa, lactato deshidrogenasa, etc. Sin embargo aún no existe evidencia de su utilidad diagnóstica. La concentración de plasmina, la cual es una enzima proteolítica, también incrementa su nivel en los casos de mastitis y podría utilizarse como un indicador, sin embargo, la concentración de plasmita en la leche varía debido a factores fisiológicos y ambientales.<sup>24</sup>

### **IV. INDICADORES DE LA INFLAMACIÓN**

#### **a) ADENOSIN TRIFOSFATO (ATP)**

El adenosin trifosfato (ATP) está presente en todas las células del cuerpo incluyendo a las células somáticas, el ATP en leche puede ser de origen interno y externo, este ATP se puede medir utilizando una técnica de bioiluminiscencia donde se utiliza el complejo enzima-coenzima de luciferasa y luciferina. El ATP tiene una fuerte correlación con el CCS y se ha considerado como una alternativa como indicador de mastitis. El parto y el estado de lactación tienen

efectos significativos en el contenido de ATP de la leche similar al que presenta con un alto contenido de células somáticas, a pesar de que se podría utilizar como indicador, en la actualidad no se utiliza como monitoreo de la presencia de mastitis.<sup>24</sup>

#### **b) LACTOSA**

La lactosa se podría utilizar como indicador ya que disminuye durante el proceso inflamatorio, la asociación entre la lactosa, el CSS y la mastitis se ha estudiado desde los años 80s y debido a que el porcentaje de lactosa es monitoreada rutinariamente podría ser utilizada como uno de los marcadores más útiles para detectar mastitis en un futuro, sin embargo aún se requiere de mayor investigación para utilizar sus valores como indicador de mastitis.<sup>24</sup>

### **V. PRUEBAS SEROLÓGICAS**

#### **a) ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

Se han caracterizado más de 100 microorganismos causantes de mastitis en rumiantes, sin embargo, la técnica de ELISA solo se ha desarrollado para los patógenos con mayor prevalencia como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.<sup>10</sup>

Estos inmunoensayos también pueden utilizarse para detectar biomarcadores presentes en la leche en las diferentes etapas de una mastitis subclínica por ejemplo la interleucina 6 (IL-6) que es una citocina inflamatoria la cual esta presente en la glándula mamaria al comienzo del proceso inflamatorio. Se cree que el incremento de la IL-6 indica la duración de la inflamación en la glándula mamaria debido a infecciones bacterianas y en estudios realizados por Sakemi *et al.* la detección de IL-6 en muestras de leche predijo con mayor exactitud la inflamación de los cuartos afectados que el conteo de células somáticas.<sup>25</sup>

### **VI. PRUEBAS MOLECULARES**

La introducción de métodos de biología molecular en los laboratorios de microbiología clínica es de gran apoyo a la hora de obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor intervalo de tiempo posible. Estos métodos no sustituyen, sino que complementan los métodos microbiológicos tradicionales. El análisis integrado de todos ellos está llevando a resultados más confiables. De entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la Reacción en Cadena de la

Polimerasa (PCR) ha adquirido un gran valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes etiológicos, y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez.<sup>26</sup>

#### **a) PCR CONVENCIONAL**

Estas técnicas generalmente son más caras que los inmunoensayos, sin embargo, son altamente sensibles y específicos y permiten la identificación de los microorganismos en horas.

10

El PCR es en si un técnica muy simple: dos oligonucleotidos son sintetizados cada uno como secuencia complementaria de una hebra opuesta (secuencia de un segmento en cada una de las hebras) del ADN blanco en posiciones que estén mas allá de aquellas donde termina el segmento a ser amplificado. Los oligonucleotidos sirven como cebadores con sus extremos 3' orientados en direcciones opuestas.<sup>27</sup>

El ADN aislado que contiene el segmento a ser amplificado es calentado levemente para ser desnaturalizado (separado en hebras sencillas), después se enfría en presencia de grandes cantidades de los oligonucleotidos sintéticos, lo que permite que por hibridización, se encuentren las secuencias complementarias. En este momento se agregan los cuatro desoxiribonucleotidos trifosfato y el segmento hibridizado sirve como cebador para iniciar la amplificación. El proceso de calentamiento y enfriamiento se lleva a cabo unas 25-30 veces en algunas horas en un aparato que lo hace automáticamente, hasta que el fragmento puede ser analizado o clonado.<sup>27</sup>

Los segmentos son amplificados utilizando una ADN polimerasa resistente a los cambios de temperatura como la Taq polimerasa (aislada de una bacteria hipertermófila).<sup>27</sup>

#### **b) PCR TIEMPO REAL**

Es un sistema cuantitativo que utiliza un fluorocromo unido a los oligonucleótidos, conforme se sintetizan los nuevos fragmentos, aumenta la fluorescencia de la reacción. Con esta técnica se puede cuantificar ADN bacteriano presente en la muestra de leche, por lo que además de ser una técnica diagnóstica rápida nos proporciona información sobre la cantidad de ADN

bacteriano que se encuentra presente en el caso de que se hayan identificado dos o más especies.<sup>28</sup>

### **c) PCR MULTIPLEX**

Desde hace algunos años, ha tomado gran interés el desarrollo de las denominadas PCR múltiplex, reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias blanco, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés.<sup>29, 30</sup> En el caso de una PCR múltiplex, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada blanco y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de iniciadores, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo. En el caso de los iniciadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias premisas:<sup>26</sup>

- Escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen dímeros.
- Tener temperaturas de alineamiento similares.
- Cada par de iniciadores debe amplificar una única secuencia blanco.
- Deben generar amplificaciones de un peso molecular diferente como para poder ser separados y diferenciados tras la amplificación.

En un principio, los protocolos partían del ADN extraído a partir de colonias bacterianas o de cultivos líquidos puros, sin embargo, actualmente el objetivo es realizar la identificación directamente a partir de las muestras clínicas, con lo que el diagnóstico sería mucho más rápido.<sup>26</sup>

En México, en el año 2010 Ruiz *et al.* desarrollaron y estandarizaron un PCR múltiplex donde a partir de leche de cabra diagnosticada con mastitis clínica o subclínica se realizó la extracción

de ADN y a partir de este amplificar simultáneamente segmentos de genes específicos de *Staphylococcus* coagulasa negativo y *S. aureus* principales agentes involucrados en la mastitis caprina logrando hacer el diagnóstico en 6 horas.<sup>31</sup>

La combinación óptima en la temperatura de alineamiento y la concentración de sales es esencial para obtener amplificadores específicos en la PCR, La concentración de cloruro de magnesio debe ser proporcional a la cantidad de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs).<sup>28</sup>

El PCR y sus variantes se proyectan como una herramienta de diagnóstico muy útil y aunque los métodos clásicos (pruebas de rutina y aislamientos) no pueden dejarse de lado y deben ir en paralelo, para corroborar los resultados de las pruebas moleculares.<sup>26, 29, 30</sup>

## **VI. OTRAS TÉCNICAS**

### **a) DETERMINACIÓN DE METABOLITOS VOLÁTILES BACTERIANOS EN LECHE**

Este método se basa en la premisa de que las muestras de leche que son negativas a crecimiento bacteriano presentan un número menor de componentes volátiles que aquellas de animales que presentan mastitis clínica, se han determinado estos metabolitos en 5 géneros bacterianos frecuentemente causantes de mastitis como *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulasa-negativo, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Escherichia coli*, estos géneros producen distintos patrones en los metabolitos volátiles por lo que se puede llegar a identificar a estos géneros utilizando cromatografía de gases para separar a los metabolitos y se proyecta como una técnica muy prometedora.<sup>32</sup>

## BIBLIOGRAFÍA

1. Buxadé C. Zootecnia. Bases de Producción Animal. Tomo IX Producción caprina. Ed. Mundi-Prensa. España, 1998.
2. Shearer JK, Harris B. Mastitis in Dairy Goats. University of Florida, IFAS Extensión. June 2003.
3. Ndegwa EN. Risk factors associated with subclinical subacute mastitis in kenyan dairy goats. *Isr J Vet Med* 2001; 56: 4-8.
4. Min B, Tomita G, Hart S. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts and chemical composition of goats milk. *J Dairy Res* 2007; 74: 204-210.
5. Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res* 2003; 34: 689-716
6. Concha BC. Mastitis Bovina: Nuevos Aspectos de Diagnóstico, Tratamiento y Control. Disponible en URL: <http://agronomia.uchile.cl>
7. Ruiz GE. Mastitis Caprina: Estudio Recapitulativo. (Tesis de Licenciatura) México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1989.
8. Clavijo AM, Meléndez B. Efecto del sistema de explotación sobre la aparición de mastitis caprina en dos fincas del estado Falcón, sus agentes etiológicos y la resistencia a antimicrobianos. *Zoot Trop* 2002; 20: 383-395.
9. Boden M, Flock JI. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1989; 57: 2358-2363.
10. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Keneddy R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology* 2009; 27: 486-493.
11. Bedolla C. Métodos de detección de la mastitis bovina. Sitio Argentino de Producción Animal 2007; Disponible en URL: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907.html>
12. Colak A, Polat B, Okumus Z, Kaya M, Yanmaz L, Hayirli A. Short Communication: Early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *J Dairy Sci* 2008; 91: 4244-4248.



13. Hovinen M, Siivonen J, Taponen S, Hanninen L, Pastell M, Aisla M, Pyörälä S. Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *J Dairy Sci* 2008; 91: 4592-4598.
14. Blanco MA, Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. 21-23 de junio de 2001, León, Gto, México.
15. Hernández AL. Diagnóstico de la mastitis subclínica bovina por medio de la prueba modificada de Wisconsin. *Tecnologías llave en mano, División Pecuaria, Serie 1999, Página 14, Edición 1999: INIFAP-SAGARPA.*
16. Cano CP. Nuevas alternativas en el diagnóstico clínico de campo y en el tratamiento de mastitis. *Bovinotecnia, Boletín Técnico Virtual.* Disponible en URL: [www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgCliC004.htm](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgCliC004.htm)
17. Figueroa MLG. Cuenta de células somáticas en leche de cabra mediante las pruebas diagnósticas: Prueba de California, Wisconsin, cuenta microscópica y contador infrarrojo. (Tesis de licenciatura) México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2008.
18. Phuektes P, Mansell D, Browning F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1140-1148.
19. Gillespie BE, Oliver SP. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 2005; 88: 3510-3518.
20. Artursson K, Nilsson-Öst-M, Persson K. An improved method to culture *Staphylococcus aureus* from bovine milk. *J Dairy Sci* 2009; 93: 1534-1538.
21. National Mastitis Council Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis" (1987). Disponible en URL: <http://www.nmconline.org/articles/nogrowth.htm>
22. Bexiga R, Koskinen MT, Holopainen J, Carneiro C, Pereira H, Ellis KA, Vilela CL. Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *J Dairy Res* 2011; 78: 49-55

23. Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen MT, Pyörälä S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci* 2009; 92: 2610-2617.
24. Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 2003; 34: 565-578.
25. Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res* 2011; 78: 118-121.
26. Méndez AS, Pérez RE. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 183-192.
27. Vázquez CE. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Bioquímica y Biología molecular en línea*. Disponible en URL: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/pcr.html>
28. Koskinen MT. Comparison of real-time PCR and conventional bacterial culturing in bovine mastitis test. Disponible en URL: [www.canwestdhi.com/pdf\\_files/staph%20id/comparison%20of%20realtime%20pcr.pdf](http://www.canwestdhi.com/pdf_files/staph%20id/comparison%20of%20realtime%20pcr.pdf)
29. Markoulatos P, Siafakas N, Mocany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 47-51.
30. Elnifro EM, Ashshi MA, Cooper JR, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 559-560.
31. Ruiz RRA. Desarrollo de una herramienta molecular (PCR múltiple) para la detección de los principales agentes de mastitis caprina. (Tesis de maestría) México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2010.
32. Hettinga KA, Van Valenberg HJF, Lam TJG, Van Hooijdonk CM. Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *J Dairy Sci* 2007; 91: 3834-3839.