
EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL *Staphylococcus aureus* EN LECHE DE VACAS AFECTADAS POR MASTITIS

Juan Restrepo^{1, 2}
Luisa Ortiz¹
Ximena Cardona²
Martha Olivera³

RESUMEN

Entre los agentes contagiosos que inducen mastitis severas en la vaca, se encuentra el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), de difícil cura bacteriológica y alta resistencia antimicrobiana. Debido a que el cultivo microbiológico de las muestras clínicas, solo ofrece resultado en un 50% de los casos (1) el diagnóstico por PCR es una alternativa. El objetivo de este estudio fue probar si los cebadores descritos por Cremonesi et al. (2) para el diagnóstico de *S. aureus*, como de buena sensibilidad y especificidad, sirven para ser usados en muestras clínicas. Los resultados demostraron que las siguientes secuencias de nucleótidos como cebadores: F 5' AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG 3' y R 5' TCG CTC GCT CAC CTT AGA A 3', para obtener un amplificado de 499 pb no sirven en muestras clínicas por su baja especificidad (62,95%). Se requiere buscar nuevos cebadores que amplifiquen regiones del *S. aureus* que no se compartan con otras bacterias, en especial aquellas que producen mastitis en vacas productoras de leche.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, PCR, mastitis.

EVALUATION OF SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF MOLECULAR DIAGNOSIS FOR *Staphylococcus aureus* IN MILK OF COWS AFFECTED BY MASTITIS

ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the infectious agents that induce severe mastitis in cows with a difficult bacteriological cure and high antimicrobial resistance. Because the microbiological culture of clinical samples only shows results in 50% of the cases (Koskinen et al., 2009), diagnostic through PCR is an alternative. The aim of this study was to prove if the primers described by Cremonesi et al. (2006) for the *S. aureus* diagnosis, with good sensitivity and specificity, could be used in clinical samples too. The results showed that the following nucleotide sequences can be used as primers: F 5' AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG 3' and R 5' TCG CTC GCT CAC CTT AGA A 3' in order to obtain a 499 pb enlargement are not useful in clinical samples due their low specificity (62.95%). It is required to search new primers to amplify *S. aureus* regions not shared with other bacteria, especially those causing mastitis in dairy cows.

Key words: *Staphylococcus aureus*, PCR, mastitis.

¹ Escuela de Ciencias Agrarias, Grupo Vericel, Universidad de Antioquía

² Colanta Ltda. Departamento de Asistencia Técnica

³ Biogénesis, Universidad de Antioquia. juanrb@colanta.com.co, cel.310 407 11 40. Teléfono (4) 445 3000. Dirección Carrera 64c # 72 157 luifernanda@gmail.com cel 317 817 95 02, ximenacl@colanta.com.co cel 321 799 40 41 , syngamia@gmail.com cel 317 538 39 21.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina, definida como la inflamación de la glándula mamaria, es la enfermedad más costosa y común del ganado lechero; y se presenta en forma endémica en gran parte del mundo (3, 4). Las mastitis contagiosas son producidas por los patógenos *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (5, 6). Cuando el patógeno es *S. agalactiae* son mastitis controlables que se pueden erradicar del hato (7), mientras que las producidas por *S. aureus* presentan baja cura bacteriológica por su resistencia a los antibacterianos (8, 9) y por la capacidad que tiene de producir biopelícula (10).

La patogenicidad del *S. aureus* se debe a su adhesión intercelular (10), su capacidad de colonizar las células epiteliales y macrófagos de la glándula mamaria (10, 11), así como a su habilidad de producir fibrosis y micro abscesos que dificultan el acceso de agentes antimicrobianos (12). Produce mastitis crónicas recurrentes y cuando son agudas, generalmente se producen recidivas después del tratamiento (13).

El diagnóstico de *S. aureus* es importante para implementar la estrategia de manejo del hato frente a la enfermedad previniendo la diseminación de este patógeno en el resto del hato, revisando las prácticas de ordeño, mejorando el uso de preselladores y selladores, propiciando que los operarios usen guantes de látex (7), organizando el orden de ordeño para que las vacas con un diagnóstico positivo a *S. aureus*, entren de últimas, para posteriormente ser eliminadas lo más pronto del hato (3).

La mastitis en la vaca es una de las enfermedades más costosas en la industria lechera. En EE.UU., se estima que el costo por año a los productores de leche oscila entre 1,2 a 1,7 billones de dólares (1), que es aproximadamente el 6% del valor total de la producción del país (14). Se estiman las pérdidas anuales por vaca en 184 dólares; este valor incluye la disminución en la producción

de leche, la leche que se descarta, el gasto en medicamentos, los honorarios del médico veterinario y animales con un descarte prematuro (1). El volumen de leche dejado de producir de acuerdo a la severidad de la mastitis subclínica oscila entre el 2,8 y el 45% de la producción por cuarto/día (3). Las pérdidas económicas en Colombia se estiman en diferentes estudios a partir de los hallazgos en mastitis subclínica. En diez fincas de la Sabana de Bogotá se calculó que lo dejado de producir en leche costaba en pesos colombianos \$41.580 diarios (15), en Boyacá se calcularon las pérdidas en \$1'130.226 al día en 34 empresas ganaderas (16), y en Antioquia se reportaron pérdidas estimadas de \$4'608.000 mensuales en siete hatos (17).

Prevalencia de la enfermedad

La prevalencia de la enfermedad por el patógeno *S. aureus* ha sido objeto de estudio en diferentes trabajos de investigación. En Colombia se tienen reportes de Corpoica en el Valle del Cauca, donde de 235 muestras recolectadas se aisló *Staphylococcus* spp. en el 37,45%, *Streptococcus* sp. en 17,87% y *E. coli* en 8,94% (18). Los autores sugieren que la mayor prevalencia del género *Staphylococcus* spp. puede ser atribuida a la persistencia del agente en la glándula mamaria (18, 19). Ramírez et al. en investigaciones realizadas en San Pedro de los Milagros (Antioquia), encontraron una prevalencia de *S. aureus* del 13%, de un total de 1.679 cultivos (19). Calderón y Rodríguez realizaron la prueba de California Mastitis Test (CMT) en 2.854 vacas en 40 hatos de la sabana cundiboyacense, tomaron muestras de leche de las vacas CMT positivo y de allí aislaron *S. aureus* en el 29,09% de los casos (4). Calvinho y Tirante revisaron la prevalencia de *S. aureus* en los últimos 25 años, en diferentes regiones de Argentina y encontraron rangos entre el 17% y el 54% en las diferentes cuencas lecheras (20). En la región del sur de Chile reportan que la prevalencia de mastitis clínica causada por *S. aureus* era del 27% (21). Ferraro, Scaramelli y Troya, en trece estados de Venezuela realizaron CMT en 60 fincas lecheras, a 24.599

cuartos, cultivaron los positivos y encontraron *S. aureus* en el 28,4% (22). Sabour et al. en Ontario (Canadá) hallaron una prevalencia entre el 7 y el 44% (23), y Sumathi, Veeregowda y Amitha en Bangalore (Canadá) encontraron el 24% de *S. aureus* (24).

Estudios de diagnóstico molecular del *S. aureus*

Según la Organización Internacional de Epizootias -OIE- (2008), la experiencia de las últimas dos décadas indica que la técnica de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) con el tiempo remplazará a muchos de los métodos clásicos de detección directa de agentes infecciosos, especialmente sustituyendo el aislamiento de virus o bacterias así como en la detección de agentes que son difíciles o imposibles de cultivar (25). Según varios autores, la sensibilidad y especificidad de la PCR es generalmente mayor que el aislamiento (2, 26). La aplicación de esta técnica, con un formato sencillo y rápido, es adecuada a la rutina diaria de un laboratorio de microbiología y contribuye a realizar un diagnóstico precoz. Si se detecta más temprano el microorganismo podría prevenirse la aparición de brotes y permitiría implementar controles previos a la ocurrencia de la enfermedad. Sin embargo, la especificidad y la sensibilidad de los cebadores para el diagnóstico del patógeno se deben validar (1). Hasta la fecha se han publicado diferentes tipos de cebadores para la amplificación de una región del genoma del *S. aureus*, los cuales se ilustran en la Tabla 1.

El diagnóstico convencional de la leche proveniente de glándulas mamarias afectadas con mastitis para las infecciones por *S. aureus*, de acuerdo con las directrices del "National Mastitis Council" Wisconsin (1998), es la siembra en agar sangre y tipificación con pruebas bioquímicas: oxidasa negativa, catalasa positiva, coagulasa positiva, no descarboxila ornitina y con lectura tres a cinco días después de la siembra (14). En la búsqueda de realizar diagnósticos más rápidos con alta sensibilidad y especificidad, Cremonesi et al. así como otros investigadores (2,

26-31), han propuesto el uso de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para identificación de la bacteria en cuestión de horas (2, 24, 30). Esta rutina aún no se ha implementado debido a que lo que reportan estos autores es el uso de cebadores aplicados a cultivos puros y no en muestras clínicas. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico molecular del *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis clínica, utilizando los cebadores reportados por Cremonesi et al. (2).

METODOLOGÍA

Análisis *in silico*

Se realizó una simulación de PCR empleando el programa *in silico* -simulation of molecular biology experiment- (<http://insilico.ehu.es/>) (32), para probar diferentes cebadores reportados en la literatura (Tabla 1). Con el programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se determinó la especificidad de los mismos. Se seleccionaron los cebadores descritos por Cremonesi et al. (2) porque al realizar el *in silico* amplificaron todas las cepas de *S. aureus* reportadas.

Estandarización de la prueba

Cepas controles

Se usaron además de una cepa de *S. aureus* ATCC 29213, diez cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche, cuatro cepas de referencia ATCC *Streptococcus equisimilis* ATCC 35666, *Enterococcus* spp. ATCC 151299, *Klebsella pneumoniae* ATCC 70063, *Streptococcus uberis* ATCC 9927C, y seis cepas de patógenos cultivados e identificados como causantes de mastitis clínica: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus intermedius*. A todas estas cepas se les realizó extracción de DNA.

Extracción de DNA

Para la extracción del DNA de las muestras de leche, se empleó el kit de DNeasy® Tissue de Qiagen, empleando la metodología de columnas a partir de tejidos celulares, siguiendo el instructivo descrito por el fabricante.

Sensibilidad y especificidad

Para determinar la sensibilidad y la especificidad de los cebadores a utilizar, se trabajó con la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 con una concentración de $1,2 \times 10^8$ UFC según la escala de McFarland. La extracción de DNA se realizó y se obtuvo una concentración de 815,6 ng/ul medida en un Nanodrop 2000. Partiendo de esta concentración se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 16,31 atogramos (10^{-18}) y a cada una de estas se le realizó una prueba de PCR con el fin de determinar el límite de detección de la prueba.

Muestras clínicas

Para calcular la sensibilidad y la especificidad de la PCR para el *S. aureus* en muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínica, se tomaron 43 muestras por duplicado. La primera, para cultivo y aislamiento, en agar sangre y tipificación con pruebas bioquímicas: oxidasa negativa, catalasa positiva, coagulasa positiva y prueba de decarboxilación de la ornitina negativa. La segunda muestra se usó para la prueba molecular. El protocolo de extracción fue descrito anteriormente.

PCR

Para la reacción de PCR se siguió el protocolo descrito por Cremonesi et al. (2), que amplifica una región específica del genoma del DNA que corresponde al gen 16S rRNA. Se utilizaron las siguientes secuencias de nucleótidos como cebadores: F 5' AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG 3' y R 5' TCG CTC GCT CAC CTT AGA A 3' para obtener un amplificado de 499 pb.

El volumen final de la PCR fue de 25 μ L que contenían 200 ng de DNA extraído, buffer 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, 1U de Taq polimerasa Fermentas®, dNTPS 0,2 mM, cebadores 0,25 μ M. El proceso se realizó en un termociclador DNA Engine PTC 200. Las condiciones para la PCR fueron 5 minutos de precalentamiento a 94°C, seguido de 32 ciclos compuestos de un minuto de desnaturalización a 94°C, un minuto de anillamiento de los cebadores a 56°C, un minuto de extensión a 72°C y una extensión final de diez minutos a 72°C.

Electroforesis

Los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 2%, teñidos con 0,3 μ g/ml de bromuro de etidio, corrido a 80 voltios durante 45 minutos y visualizado bajo luz ultravioleta. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb de laboratorio Molecular Bio Laboratory®.

Análisis estadístico

El diseño estadístico que usó fue un doble ciego, utilizando una tabla de contingencia de 2×2 , comparando los resultados de la prueba de cultivo microbiológico, como prueba de oro, con los resultados de la PCR. Para el análisis de sensibilidad y especificidad se empleó el programa SPSS versión 18 (Tabla 3) (5, 33).

RESULTADOS

De las 43 muestras de leche provenientes de vacas afectadas con mastitis y cultivadas, se obtuvo crecimiento en 36 de ellas con diferentes tipos de bacterias—de las cuales se obtuvo amplificación en 24 (Tabla 2). El límite de detección de la prueba cuando se usó el DNA de cepas puras de *S. aureus* fue inferior a 16,31 atogramos (10^{-18}).

En la Figura 1 se presentan los productos del amplificado de las cepas de *S. aureus* que se usaron como controles y de la cepa de referencia;

todas amplificaron el fragmento de 499 pb con el cebador F 5' AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG 3' y R 5' TCG CTC GCT CAC CTT AGAA 3'.

Una foto de un gel con 12 muestras de DNA extraído de las leches de casos clínicos se presenta en la Figura 2; 19 muestras no amplificaron (Tabla 3). Ninguna de las muestras que dio negativo para el *S. aureus* en el cultivo produjo amplificado en la PCR.

Los resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR cuando se comparan con la prueba de oro, se calcularon con base en la Tabla

3. Para la tabulación se tomaron en cuenta los datos de aislamiento bacteriológico tanto puro, como mixto, para un total de 15 muestras con aislamiento de *S. aureus*.

La sensibilidad para la prueba de PCR con estos cebadores fue del 93,8% y la especificidad del 66,7%.

Cuando se probó con todas las cepas de referencia diferentes al *S. aureus*, si el cebador estudiado amplificaba otras bacterias, se encontró que amplifica también *Enterococcus* spp. ATCC 151299.

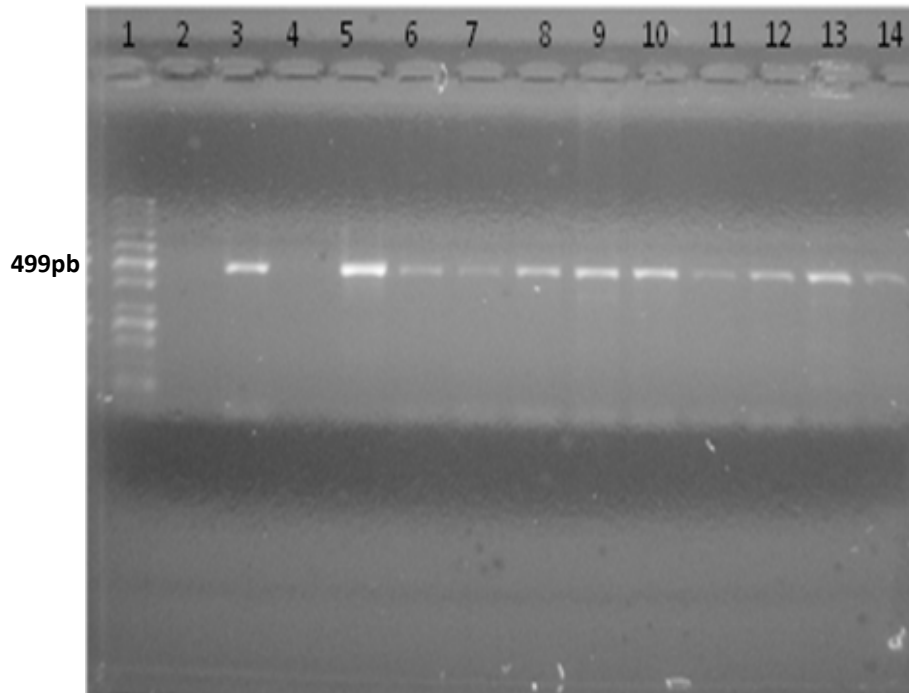


Figura 1. Productos de 499 pb del amplificado de las cepas ATCC 29213 (carril 3) y de las diez cepas de *S. aureus* aisladas e identificadas por cultivo microbiológico de muestras de leche mastítica (carril 5 al 14). El carril 1 muestra el marcador de peso molecular de 50 pb de Molecular Bio Laboratory® (rango molecular 50-1000 bp) y el carril 2 control negativo que es mezcla para PCR sin DNA. Carril 4 sin muestra.

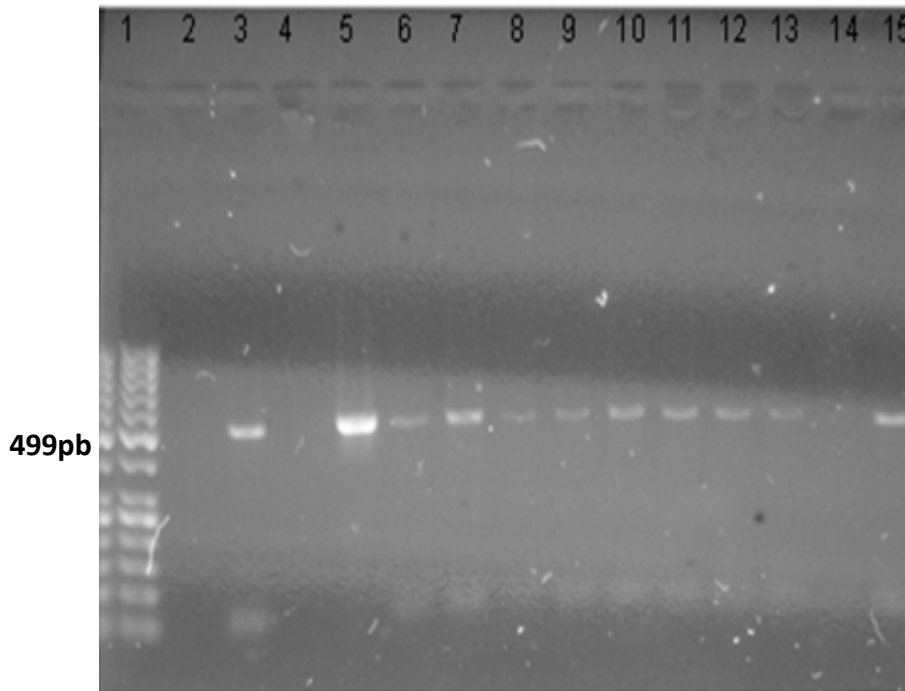


Figura 2. Resultados de amplificación de DNA de muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínica. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular de 50 pb de Molecular Bio Laboratory® (rango molecular 50-1000 bp). Carril 2 control negativo con DNA de leche sin crecimiento bacteriológico, carril 3 control positivo con DNA de la cepa *S. aureus* ATCC 29213, carril 4 al 15 muestras de DNA de 12 de 43 leches. Carril 4 *Streptococcus* spp.; carriles 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 *S. aureus*; carril 14 *Streptococcus pyogenes*. Nótese que las muestras 4 y 14 no amplifican.

DISCUSIÓN

Según los resultados que se muestran en la Tabla 2, cuando en el cultivo microbiológico crece *S. aureus* puro, la prueba de PCR identifica el 92,3% de los casos. Sin embargo, cuando crece en un cultivo mixto se puede confundir con *Streptococcus pyogenes* o *Streptococcus agalactiae*. Además, el cebador usado también fue capaz de amplificar muchas otras bacterias (Tabla 2), entre ellas una de las contagiosas importantes como es el *Streptococcus agalactiae*. Cuando el Veterinario requiere un diagnóstico rápido y confiable para la toma de decisión sobre el manejo de la vaca con mastitis con un patógeno contagioso, el resultado de la prueba de PCR con este cebador no es adecuado.

Es claro que cuando Cremonesi et al. usan estos cebadores en cepas de cultivo puro tiene un 100% de certeza, como también lo obtuvimos en este trabajo con la cepa ATCC 29213, las cepas control y los aislamientos de *S. aureus* de campo, pero tratándose de pruebas clínicas que se compararon con la prueba de oro (aislamiento), el resultado indica que el DNA de muestras clínicas en presencia de otras cinco bacterias también se amplificó el mismo segmento: *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* y el *Staphylococcus haemolyticus*.

Sin embargo, cuando se aplicó el cebador a las cepas de referencia puras de *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*, no amplificaron

la secuencia esperada como se hubiese esperado según lo obtenido de algunas cepas de campo.

Según lo demuestran algunos autores los cultivos de muestras clínicas aunque tienen una alta especificidad, tienen baja sensibilidad, ya que solamente hay crecimiento bacteriano entre un 50 y 76% de los casos cultivados de mastitis (1, 4, 25, 34, 37).

Aunque Cremonesi et al., Sindhu et al., Granda et al. y Abu y Radstrom (2, 34-36), habían demostrado que la PCR es un método eficiente para la detección de microorganismos y puede ser útil en el diagnóstico partiendo de cultivos puros, podemos deducir a partir de nuestros resultados que dicho cebador es compartido con otras bacterias (1, 36, 38).

Los resultados anteriores soportan la baja especificidad encontrada, cuando se comparan con las obtenidas con otros cebadores como los descritos con Koskinen et al. (1) y por Kim et al. (5), que fueron del 99% y del 100%, respectivamente.

Es posible que la inespecificidad de la prueba, como lo reportan Ramesh et al. (39), se deba a los cebadores de unen inespecíficamente a fragmentos de DNA diferentes al del *S. aureus*, generando dando falsos positivos.

En este trabajo se encontró que al utilizar una concentración de 16,31 atogramos (10^{-18} g) de DNA bacteriano, los cebadores son capaces de amplificar las diferentes cepas, mostrando una alta sensibilidad en el límite de detección. Si los cebadores fuesen específicos para el *S. aureus*, el límite de detección hubiese sido muy apropiado ya que puede detectar fragmentos de DNA de al menos una bacteria. Para Abu y Radstrom (36) las concentraciones mínimas de detección (0,1 ng) fueron mayores que las encontradas en este trabajo.

En cuanto a la técnica de extracción del DNA de muestras de leche, usando el kit de DNeasy® Tissue de Qiagen, se concluye que produce DNA de buena calidad que permite amplificar la banda esperada y no produce interferencia en el proceso. Ercolini et al. (38) proponen, antes de realizar la metodología de la extracción de DNA, enriquecer la muestra de leche con una preincubación para aumentar las UFC (38). Otros métodos para extracción de DNA a partir de leche, han reportado una extracción eficiente del DNA, como lo es el método de fenol-cloroformo (2, 5, 33), el de kit Chelex-100 modificado por Cremonesi et al. (2) al adicionar guanidina tiocianato para aumentar la calidad del DNA; la ebullición a la cual Khan et al. (40) le adicionaron cuatro lavados con PBS obteniendo resultados satisfactorios.

Tabla 1. Cebadores utilizados por diferentes autores para la amplificación del *S. aureus* y de los cebadores evaluados *in silico*

Número de muestras de leche evaluadas	Cebadores	Pares de bases	Autor	PCR <i>in silico</i>
Muestras de 30 cuartos de 24 vacas	F: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' R: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	270 bp	(Kuzma et al., 2003) (28)	No amplifica en todas las cepas de <i>S. aureus</i>
No reportada	F: 5'-TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA-3' R: 5'-TAA GTC AAA CGT TA ACA TAC G-3'	418-510 bp	(Sindhu et al., 2007) (34)	Solo amplifica una cepa <i>S. aureus</i>
187 muestras	F: 5'-ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G-3' R: 5'-TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC-3'	-	(Aarestrup, Wegener y Rosdahl, 1995) (27)	No amplifica ninguna cepa de <i>S. aureus</i>
30 muestras	F: 5'-AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG-3' R: 5'-TCG CTC GCT CAC CTT AGA A-3'	499 bp	(Cremonesi et al., 2006) (2)	Amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> , pero también <i>S. epidermidis</i> , <i>S. lungdunensis</i> , <i>S. pseudointermedius</i>
No reportada	F: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GT-3' R: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	279 bp	(Brakstad, Aasbak y Maeland, 1992) (41)	Más específico, solo <i>S. aureus</i> pero deja por fuera una cepa de <i>S. aureus</i>
20 cepas de diferentes <i>Staphylococcus</i> sp.	F: 5'-ATG GTT TTG GTA GAA TTG GTC GTT TA-3' R: 5'-GAC ATT TCG TTA TCA TAC CAA GCT G-3'	933 bp	(Yugueros et al., 2001) (31)	Amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> y no las otras especies de <i>Staphylococcus</i>
52 muestras	F: 5'-TCG CTC AAA ACA ACG ACA CC-3' no describe R	300 bp	(Reinoso et al., 2007) (29)	No se puede análisis porque no tiene RV
555 muestras 362 vacas CMT positivo	F: 5'-ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G-3' R: 5'-TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC-3'	964 bp	(Vieira-da-Motta, Folly y Sakyama, 2001) (30)	Estos cebadores no dan ningún resultado; no amplifica nada
No reportada	F: 5'-CCG TTT CAT AAG GCG AGT TG-3 R: 5'-CTG TTC GGGTAT TTG AAG ATG G-3'	405 bp	(Park, Lee y Kim, 2006) (26)	Solo amplifica una cepa de <i>S. aureus</i> , <i>in silico</i> amplifica 156 pb
9 cepas aisladas	F: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' R: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	279 bp	(Yang et al., 2007) (42)	No amplifica una cepa de <i>S. aureus</i>
No reportada	F: 5'-GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3' R: 5'-CGC ACA TCA CGC TAC G-3'	228 pb	(Manfredi, Leotta y Rivas, 2010) (43)	No amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> y amplifica otros <i>Staphylococcus</i>
24 cepas mastitis clínica 16 de mastitis subclínica 113 CMT	F: 5'-ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC-3' R: 5'-AGC TCA GCC TAA ACG AGT AC-3'	1251 pb	(Castañeda et al., 2009) (44)	El cebador Reversa no amplifica
	F: 5'-CGG TCC AGA CTC CTA CGG G-3' R: 5'-TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3'	204 pb	(Granados, 2011) (45)	Amplifica <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. pseudointermedium</i>
No reportada	F: 5'-TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G-3' R: 5'-CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG-3'	162 pb	(Oliveira y de Lencastre, 2002) (46)	No amplifica todas las cepas de <i>S. aureus</i> , amplifica <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. pseudointermedium</i> y otros <i>Staphylococcus</i>

Tabla 2. Resultado microbiológico y de amplificación por PCR con cebadores específicos para el gen 16S rRNA de *S. aureus* en 43 muestras de leche de vacas con mastitis clínica

Cultivo microbiológico	Número de aislamientos	PCR	
		Amplificó	No amplificó
Crecimiento bacteriano			
<i>S. aureus</i>	13	12	1
<i>Streptococcus</i> spp.	2	2	0
<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa	1	0	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	8	4	4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	1	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	1	2
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	0	1
No crecimiento bacteriológico	7	0	7
Crecimiento mixto bacteriano			
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> - <i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0	1
<i>Streptococcus agalactiae</i> - <i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	0
<i>S. aureus</i> - <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1	0
<i>S. aureus</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i>	2	2	0
Total	43	24	19

Tabla 3. Número de muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínica que amplificaron el fragmento de 499 pb, comparadas con el resultado del cultivo

	Cultivo microbiológico		Total
	Crecimiento <i>S. aureus</i>	Sin crecimiento	
Amplifica	15	9	24
PCR			
No amplifica	1	18	19
Total	16	27	43

CONCLUSIONES

Se requiere buscar nuevos cebadores que amplifiquen regiones del *S. aureus* que no se

compartan con otras bacterias, en especial aquellas que producen mastitis en vacas productoras de leche.

BIBLIOGRAFÍA

1. Koskinen M, Holopainen J, Pyörälä S, Bredbacka P, Pitkälä A, Barkema H, et al. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 2009; 92(3):952-959.
2. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni P, et al. *Technical Note*: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *Journal of Dairy Science* 2006; 89(1):163-169.
3. Philpot WN. Relación entre el manejo del hato y la mastitis. <http://www.cnmweb.bizland.com/publicaciones/DrPhilpot1>. 2001, 3, 2003.
4. Calderón A, Rodríguez VC. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2008; 21(4):582-589.
5. Kim CH, Khan M, Morin D, Hurley W, Tripathy D, Kehrl Jr M, et al. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 2001; 84:74-83.
6. Philpot WN, Nickerson SC. Ganando la lucha contra la mastitis. Naperville, USA; 2001.
7. Keefe TM, Ceballos A, Jaramillo M, Londoño M, Chaffer M, Montoya M. Prevalencia del *Streptococcus agalactiae* en tanques de enfriamiento de la Cooperativa COLANTA. En: VII Seminario Internacional Competitividad Carne y Leche. COLANTA ed. Medellín Octubre 21, 22, 2010. Vol. 1, p. 53.
8. Russi NB, Bantar C, Calvino LF. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Revista Argentina de Microbiología* 2008; 40(2):116-119.
9. San Martín B, Kruse J, Morales M, Agüero H, León B, Espinoza S, et al. Resistencia bacteriana en cepas patógenas aisladas de mastitis en vacas lecheras de la V Región, Región Metropolitana y X Región, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2002; 34:221-234.
10. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 2001; 183(9):2888-2896.
11. Melchior M, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *The Veterinary Journal* 2006; 171(3):398-407.
12. Loeza-Angeles H., López-Meza JE, Ochoa A. Efecto del medio condicionado de células endoteliales que expresan el péptido antimicrobiano tionina Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* sobre aislamientos de *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2010; 41(2):36-41.
13. Sharma N, Pandey V, Sudhan, N. Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2010; 13(2):98-103.
14. National-Mastitis-Council. Current Concepts of Bovine Mastitis In: National Mastitis Council, Madison, WI 1998; Vol. 4ª ed.
15. Rodríguez G. Comportamiento de la Mastitis Bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria* 2006; 12:35-55.
16. Pinzón A, Moreno FC, Rodríguez, G. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del Alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria* 2009; 17:23-36.

17. Trujillo CM, Gallego AF, Ramírez N, Palacio Baena L.G. Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2011; 24:11-18.
18. Corpoica. Prevalencia de los principales microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras del Centro del Valle del Cauca en los años 2003 a 2006. 2007. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos59/microorganismos-mastitis-vacas-lecheras/microorganismos-mastitis-vacas-lecheras3.shtml>
19. Ramírez N, Gaviria G, Arroyave O, Sierra B, Benjumea J. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2009; 14:76-87.
20. Calvino LF, Tirante L. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev. FAVE Sección Cs. Vet.* 2005; 4:29-40.
21. Shim EH, Shanks RD, Morin DE. Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87(8):2702-8.
22. Ferraro L, Scaramelli A, Troya H. Prevalencia de la mastitis subclínica bovina en Venezuela y evaluación de la prueba de mastitis de California (CMT) como prueba diagnóstica. *Revista Científica FCV-LUZ* 1999; IX(2):81-90.
23. Sabour P, Gill J, Lepp D, Pacan J, Ahmed R, Dingwell R, Leslie K. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42:3449-3455.
24. Sumathi B, Veeragowda B, Amitha RG. Prevalence and antibiogram profile of bacterial isolates from clinical bovine mastitis. *Veterinary World* 2008; 1(8):237-238.
25. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals : Validation and quality control of Polymerase Chain Reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. OIE: Ginebra, Suiza. 2008 vol 1., chapter 1.1.5. 46- 55
26. Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *Journal Microbiol* 2006; 44(1):92-97.
27. Aarestrup FM, Wegener H, Rosdahl V. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Veterinary Microbiology* 1995; 45(2-3):139-50.
28. Kuzma K, Malinowski E, Lassa H, Klossowska A. Detection of genes for enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2003; 47:419-426.
29. Reinoso E, Betterra S, Odierno L, Bogni C. rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. *Vet. Res. Anim. Sci.* 2007; 40:115-121.
30. Vieira-da-Motta O, Folly MM, Sakyama CCH. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brazilian Journal of Microbiology* 2001; 32(1):27-31.
31. Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Luengo JM, Naharro G. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-Restriction fragment length polymorphism of gap gene. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(10):3693-3695.
32. San Milln R, Garaizar J, Bikandi J. In silico simulation of fingerprinting techniques based on double endonuclease digestion of genomic DNA. *In silico biology* 2005; 5(3):341-6.
33. Poutou R, Burbano M, Sierra S, Torres K, Carrascal A, 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. Pontificia Universidad Javeriana: *Revista de la Facultad de Ciencias* 2005; 10(2):61-78.

34. Sindhu N, Sharma A, Kumar S, Jain V. Polymerase chain reaction assay for detection of *Staphylococcus aureus* in buffalo milk. *Italian Journal of Animal Science* 2007; 6(2):862-864.
35. Gandra Á, Silva A, Macedo R, Ribeiro M, Mata M, Silva W. Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PCR. *Alimentos e Nutrição Araraquara* 2005; 16(2):99-103.
36. Abu AS, Radstrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64:3748-3753.
37. Rainard P, Fromageau A, Cunha P, Gilbert FB. *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid triggers inflammation in the lactating bovine mammary gland. *Veterinary Research* 2008; 39(5):52.
38. Ercolini D, Blaiotta G, Fusco V, Coppola S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 96(5):1090-1096.
39. Ramesh A, Padmapriya B, Chrashekar A, Varadaraj M. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Molecular and Cellular Probes* 2002; 16:307-314.
40. Khan M, Kim C, Kakoma I, Morin E, Hansen R, Hurley W, Tripathy D, Baek, B. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase-chain-reaction analysis. *American Journal of Veterinary Research* 1998; 59(7):807-813.
41. Brakstad O, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30(7):1654-1660.
42. Yang Y, Su X, Yuan Y, Kang C, Li Y, Zhang W, Zhong X. Detection of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products by Polymerase Chain Reaction Assay. *Agricultural Sciences in China* 2007; 6(7):857-862.
43. Manfredi E, Leotta G, Rivas M. PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Revista Argentina de Microbiología* 2010; 42(3):212-215.
44. Castañeda Vázquez H, El Sayed A, Jager S, Joachim A, Lammler C, Woter W. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. *Veterinaria México* 2006; 37(2):165-179.
45. Granados Beltrán E. Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en las localidades de Cotzio y Tajaro, mediante secuenciación del gen de arn ribosomal 16s. Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo, 2011. <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/422/1/CARACT~2.PDF>
46. Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46:2155-2161.