

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ORGANISMOS PATÓGENOS A PARTIR DE LECHE DE TANQUE DE DIFERENTES ESTABLECIMIENTOS LECHEROS DE LA PROVINCIA DE SANTA FE

Torres, Irina¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias-UNL
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada
Directora: Dallard, Bibiana E
Codirectora: Beccaria, Camila

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Organismos patógenos, leche de tanque, Santa Fe

INTRODUCCIÓN

La obtención de leche de calidad en los tambos depende de minimizar la contaminación bacteriana, disminuir los niveles de infecciones intramamarias (IIM) y evitar la presencia de contaminantes químicos. La contaminación bacteriana de la leche se origina en tres fuentes: (1) el medio ambiente, (2) el interior de la glándula mamaria y (3) el exterior de la ubre. La contaminación bacteriana de la leche a partir del medio ambiente está comúnmente asociada con la presencia de bacterias en el equipo de ordeño debido a una deficiente limpieza y desinfección del mismo, así como a una inadecuada refrigeración de la leche.

La leche extraída de vacas sanas contiene un muy bajo número de bacterias, generalmente menor de 1.000 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Sin embargo, en casos de IIM, particularmente por *Streptococcus agalactiae* y por otros estreptococos, la eliminación de bacterias puede ser muy alta, contribuyendo significativamente a un aumento del recuento de bacterias en leche. La tercera fuente de contaminación está constituida por aquellos organismos que habitan normalmente la piel de la ubre y pezones (como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativos*) y por aquellos que llegan como resultado de contaminación externa con estiércol, barro o suciedad (*Enterococcus spp.*, organismos coliformes, otros bacilos Gram negativos, gérmenes esporulados, levaduras y hongos). Por último, en referencia a los contaminantes químicos, éstos pueden provenir de la alimentación, tratamientos de infecciones de la glándula mamaria u otros órganos, o por contacto de la leche con productos químicos presentes en el equipo de ordeño o piel del pezón.

Título del proyecto: EMERGENCIA DE MICROORGANISMOS RESISTENTES A LOS ANTIMICROBIANOS EN CADENAS AGROALIMENTARIAS Y SU IMPACTO SOBRE LOS CONSUMIDORES: ESTUDIO INTERDISCIPLINARIO CON EL ENFOQUE UNA SALUD.

Instrumento: PICT Salto Institucional

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: Agencia I+D+I

Director/a: Frizzo, Laureano



El análisis de la leche de tanque (ALT) de frío brinda información tanto sobre el nivel de mastitis subclínicas en el rodeo y los organismos patógenos involucrados, como así también sobre el nivel de higiene de los procedimientos de ordeño y la efectividad de los programas de limpieza del equipo de ordeño. Las usinas lácteas en nuestro país, normalmente brindan al productor información sobre la calidad sanitaria y bacteriológica de la leche de tanque, medida por los recuentos de células somáticas (RCS) y de organismos mesófilos, respectivamente. Ambas pruebas son indicativas de la calidad, pero no cumplen la función diagnóstica de establecer el origen de los problemas. A partir de la década del 70 comienzan a desarrollarse en EE.UU. métodos diagnósticos que complementan las pruebas de calidad antes mencionadas, con el objetivo de reducir el número de muestras necesarias para detectar los organismos patógenos causantes de IIM en un rodeo y las causas de problemas higiénicos. Con el transcurso del tiempo se fueron desarrollando nuevas técnicas y criterios de interpretación y a principios de los años 90 el ALT comenzó a utilizarse como herramienta de diagnóstico en rodeos con problemas de mastitis y calidad de leche. La interpretación adecuada de estos análisis y el uso estratégico de los mismos, permite no solamente localizar las posibles causas de problemas, sino también anticiparse a su aparición.

En los establecimientos lecheros de Argentina, *S. aureus* es uno de los principales patógenos causante de mastitis bovina y el más difundido (Calvinho, 2017). Las IIM producidas por dicha bacteria no son efectivamente controladas por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008), tendiendo a producir infecciones crónicas. Además, en los últimos años la aparición y propagación de cepas de *S. aureus* resistentes a los antimicrobianos (RAM) en ganado lechero, especialmente las cepas resistentes a múltiples fármacos, se ha convertido en un motivo de alarma para la salud pública en varios países (Abdi et al., 2018; Mphahlele et al., 2020). Por lo tanto, aislar y cuantificar este patógeno a partir de leche de tanque en diferentes establecimientos lecheros de Santa Fe, es de interés para futuros trabajos donde se evaluará la prevalencia de microorganismos RAM.

OBJETIVO

Identificar y cuantificar *S. aureus*, organismos coliformes y *Enterococcus spp.* a partir de leche de tanque de diferentes establecimientos lecheros de Santa Fe.

METODOLOGÍA

Se recolectaron muestras de leche de tanque de refrigeración de 8 establecimientos lecheros ubicados en diferentes localidades de la provincia de Santa Fe (Tabla 1). Para cultivo microbiológico, se obtuvieron 50 ml de leche en recipientes de plástico estériles utilizando un muestreador de acero inoxidable previamente sumergido en alcohol 96° e inmediatamente flameado antes de su uso. Utilizando el mismo procedimiento, se recolectaron 50 ml de leche para RCS. Las muestras fueron inmediatamente refrigeradas y transportadas al laboratorio para su procesamiento dentro de las 24 horas.

Para la identificación y recuento de *S. aureus* se realizaron diluciones en base 10 de las muestras de leche y se sembraron 100 µl utilizando una espátula de Drigalsky en placas de agar base Columbia (Britania) adicionado con 5% de sangre bovina y en placas de agar Baird-Parker (Oxoid) enriquecido con emulsión de yema de huevo al 5% y telurito de potasio al 1 % (Britania). Las placas fueron incubadas durante 24-48 h a 37°C en condiciones de aerobiosis. Las colonias sospechosas de *S. aureus* crecidas en agar sangre fueron identificadas por la morfología colonial, por la presencia de hemolisinas y pruebas bioquímicas convencionales (catalasa y coagulasa). Las colonias crecidas en agar Baird-Parker de color grisáceo-negro (reducción de telurito a telurio),



convexas y con halo claro alrededor de la colonia (actividad lecitínica) fueron identificadas como estafilococos coagulasa positiva.

Para la identificación y recuento de organismos coliformes (incluyen: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*), se realizaron diluciones en base 10 de las muestras de leche, se sembraron 100 µl en placas de agar MacConkey (Britania) y se incubaron durante 24-48 h a 37°C en condiciones de aerobiosis. Se contaron las colonias rosadas-rojizas que representan a los microorganismos fermentadores de lactosa.

Para la identificación y recuento de *Enterococcus spp.*, se realizaron diluciones en base 10 de las muestras de leche, se sembraron 100 µl en placas de agar Streptococcus KF (Oxoid) y se incubaron durante 24-48 h a 37°C en condiciones de aerobiosis. Se contaron las colonias con centro rojo.

Luego de contar las colonias, se calculó el número de microorganismos (N) por mililitro de leche, utilizando la siguiente ecuación: $N = C \times d \times 10$

Dónde: C: es la suma de todas las colonias contadas en las placas, d: es el factor de dilución utilizado en la siembra y 10 para extrapolar el recuento a ml.

Posteriormente, de cada muestra de leche de tanque cultivada con los diferentes medios mencionados, se seleccionaron 3 colonias de *S. aureus*, 4 colonias de organismos coliformes y 3 colonias de *Enterococcus spp.* Las mismas fueron conservadas a -80°C en caldo tripteína soya (CTS) (Britania) y glicerol 15% (v/v), como agente crioprotector, para ser utilizadas en trabajos posteriores (fenotipificación, genotipificación, pruebas de sensibilidad antibiótica e identificación de genes de RAM).

El RCS se realizó por citometría de flujo utilizando un contador automático de células (Somacount 300, Bentley Instruments-USA) en el laboratorio de A.L.E.Co.L. (Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se detallan los recuentos de UFC/ml para *S. aureus*, coliformes y *Enterococcus spp.* y el RCS en leche de tanque para cada establecimiento.

En cuanto al recuento de UFC/ml de *S. aureus*, de las 8 muestras de tanque analizadas, el 37,5% (n=3) presentaron valores <100 UFC/ml, mostrando estándares de calidad muy bueno a excelente. El 37,5% (n=3) presentaron recuentos entre 100-500 UFC/ml mostrando estándares de calidad buenos, mientras que el 25% restante (n=2) mostraron calidad pobre (>500 UFC/ml). Los dos establecimientos (tambo 1 y 2) que mostraron recuentos >500 UFC/ml para *S. aureus* fueron los que presentaron los mayores RCS.

En cuanto al recuento de organismos coliformes, el 100% (n=8) de las muestras de leche de tanque analizadas presentaron valores >50 UFC/ml. Indicando estándares de calidad pobres. En cuanto al recuento de *Enterococcus spp.*, el 87,5% (n=7) de los establecimientos mostraron valores <500 UFC/ml, indicando excelentes estándares de calidad.

En relación al RCS, el 50% (n=4) de las muestras de leche de tanque analizadas mostraron una calidad estándar buena (200.000-400.000 cél./ml); mientras que el 50% restante (n=4) mostró una calidad pobre (>500.000 cél./ml).

Tabla 1: Ubicación de los establecimientos, recuentos de los diferentes microorganismos analizados (UFC/ml) y recuento de células somáticas (RCS) en leche de tanque.

Nº de tambo	Ubicación	<i>S. aureus</i> ^a (UFC/ml)	Coliformes ^b (UFC/ml)	<i>Enterococcus spp.</i> ^c (UFC/ml)	RCS ^d (Cél./ml)
1	Nuevo Torino	650	1000	650	571.000
2	Pilar	165	300	400	366.000
3	Recreo	300	2300	235	448.000
4	Pujato Norte	95	60	200	373.000
5	Grutly	700	2000	225	978.000
6	Grutly	20	2300	100	207.000
7	Grutly	160	200	250	513.000
8	Esperanza	50	1500	200	258.000

Estándares de calidad (expresado en UFC/ml o cél./ml y adaptado de *Quality Milk Production Service*, Cornell, EE.UU., 2005: a) *S. aureus* (<1 excelente, 100-500 bueno; >500 pobre); b) coliformes (<10 excelente, 10-50 bueno, >50 pobre); c) *Enterococcus spp.* (se incluyen dentro de los *Streptococcus like organism*; <500 excelente, 500-1000 bueno, >1000 pobre) y d) RCS (<200.000 excelente, 200.000-400.000 buena, >400.000 pobre).

CONCLUSIONES

En base a los resultados se podría concluir que, en general, los establecimientos que registraron altos RCS en leche de tanque también presentaron elevado número de UFC/ml para *S. aureus* y organismos coliformes. Esto indicaría la presencia de IIM por *S. aureus* en el tambo y una higiene deficiente durante los procedimientos de ordeño y/o durante los programas de limpieza del equipo de ordeño. El análisis microbiológico y el RCS de la leche de tanque son herramientas que aportan datos que deben ser analizados de manera conjunta para tener una visión general de la calidad de leche producida en el tambo. Además, contribuyen al diagnóstico de situación y al monitoreo de los tambos que tengan problemas de mastitis y/o higiene.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Abdi, RD, Gillespie, BE, Vaughn, J, Merrill, C, Headrick, SI, Ensermu, DB, D'Souza, DH, Agga, GE, Almeida, RA, Oliver, SP.**, 2018. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and genetic diversity of resistant isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*. 15:449-458.
- Calvinho, LF.**, 2017. Mastitis bovina: evolución del control en Argentina y nuevos horizontes de investigación. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, LXX, p. 151–165.
- Mphahlele, MP, Oguttu, JW, Petzer, IM, Qekwana, DN.**, 2020. Prevalence and antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from cow milk samples. *Veterinary World*. 13:2736-2742.
- Zhao, X., Lacasse, P.**, 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*. 86:57-65.