

PREVALENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS DE MASTITIS BOVINA EN LECHE DE TANQUE DE FRÍO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL RECuento Y LA IDENTIFICACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

NEDER, V. E.¹; SIGNORINI, M. L.^{1,3}; CUATRIN, A.¹;
GIANRE, V.¹; & CALVINHO, L. F.^{1,2}

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue estimar la prevalencia de bacterias patógenas de mastitis en muestras de leche de tanque en tambos ubicados en la cuenca lechera central Argentina. Además, se evaluó el desempeño de tres medios de cultivo, dos estándar (Baird Parker y agar sangre) y uno comercial (Compact Dry "Nissui"), para realizar el recuento, aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*. Entre las muestras con aislamiento de patógenos mayores, la prevalencia de *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* fue del 50%, 5,45%, 31.82% y 12.72% respectivamente. Ninguna muestra fue positiva para *Mycoplasma* spp. Al comparar los medios para aislamiento de *S. aureus* se observó una concordancia moderada a baja entre Baird Parker (BP) y Agar Sangre (AS), mayor que la observada entre Baird Parker y Compact Dry "Nissui" (CSA). Al comparar el porcentaje de recuperación, ninguna de las dos técnicas AS y CSA difirió de BP la cual fue intermedia a las otras dos, obteniéndose recuentos más bajos en AS que en CSA. Estos resultados evidencian que aún persisten elevadas prevalencias de los principales agentes patógenos de mastitis y su control es importante para mejorar la calidad microbiológica de la leche cruda. Los tres medios ensayados fueron adecuados para la detección de *S. aureus* en leche de tanque.

Palabras claves: Leche cruda, mastitis, medios de cultivos, *Staphylococcus aureus*.

1.- Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Ruta 34 Km 227. (2300) Rafaela, provincia de Santa Fe. Email: neder.veronica@inta.gob.ar

2.- Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. Esperanza, provincia de Santa Fe.

3.- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

*Trabajo financiado con fondos de la Asociación Cooperadora de INTA Rafaela

Manuscrito recibido el 27 de marzo de 2014 y aceptado para su publicación el 16 de junio de 2014.

SUMMARY

Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk and evaluation of culture media performance for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*.

The objective of this study was to determine the prevalence of major mastitis pathogens in bulk tank milk from dairy herds located in the central dairy area of Argentina. In addition, performance of three culture media, two standard (Baird Parker and blood agar) and one commercial (Dry Compact "Nissui") for *Staphylococcus aureus* detection and enumeration was evaluated. Prevalence of *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* was 50%, 5.45%, 31.82 and 12.72, respectively, while *Mycoplasma* spp. was not detected. Regarding culture media performance, accordance between Baird Parker and blood agar was moderate to low, although higher than the one observed between Baird Parker and Compact Dry "Nissui". Colony recovery percent on blood agar or Compact Dry "Nissui" did not differ from Baird Parker, being higher on Compact Dry "Nissui" and lower on blood agar. These results stress the need to control major mastitis contagious pathogens in the central dairy area. All culture media evaluated were found suitable for detection and enumeration of *S. aureus* in bulk tank milk.

Key word: bulk tank milk, bovine mastitis, culture media, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero que mayores pérdidas económicas causa al productor y a la industria procesadora, ya que provoca disminución de la secreción láctea y deterioro de la calidad de la leche (Booth, 1981). Esta enfermedad sigue siendo una de las principales limitantes de la producción lechera en Argentina. Desde fines de la década del 90 hasta mitad de la primera década de 2000 se observaron importantes progresos en el control de la enfermedad, evidenciados por descenso de los recuentos de células somáticas (RCS) en leche de tanque, con valores de 300.000 células/ml en octubre de 2004 (n=6.794 tambos) (SAGPYA, 2005). Sin embargo, en los últimos años no se han advertido mayores progresos, ya que de febrero de 2011 al mismo mes de 2012 el promedio de valores de RCS fue 382.800 cél/ml (MAGYP, 2012), con incrementos marcados en los recuentos durante el verano.

En Argentina no existen datos actualizados acerca de la prevalencia de patógenos causantes de mastitis bovina. Estudios realizados en las décadas del 80 y 90 en distintas cuencas lecheras a partir de muestras de leche compuesta o de cuartos mamarios obtenidas de mastitis clínicas y subclínicas, mostraban fundamentalmente un predominio de patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, así como distintas especies del género *Streptococcus*, hallándose porcentajes relativamente menores de organismos coliformes (Calvinho y Tirante, 2005; Dieser *et al.*, 2014).

Estos estudios utilizaron métodos para el cultivo de los patógenos clásicos de mastitis bovina, los cuales no permiten el crecimiento de *Mycoplasma*. Este organismo es un patógeno contagioso aislado frecuentemente de infecciones intramamarias (IIM) bovinas (González & Wilson, 2003). Si bien el aislamiento de *Mycoplasma bovis* fue informado por primera vez en Argentina hace más de 10 años a partir de un brote de mastitis en

un tambo de la provincia de Buenos Aires (Cerdá *et al.*, 2000), solo recientemente se ha comenzado a realizar diagnóstico de esta infección en forma rutinaria en Argentina, detectándose en muestras de leche de vacas con mastitis, de tanque de frío y clínicas extramamarias (Allassia *et al.*, 2012; Neder *et al.*, 2013; Tirante *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen muestreos sistemáticos que permitan conocer su prevalencia en los rodeos lecheros.

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista involucrado usualmente en brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), entre ellos leche y derivados lácteos (Balaban *et al.*, 2000). Puede encontrarse en leche sin pasteurizar como resultado de contaminación a partir de su eliminación por animales con IIM (Neder *et al.*, 2011), por lo cual su detección es de importancia tanto para el campo de la salud mamaria como para la salud pública. Si bien existen varios métodos de detección de *S. aureus* en leche, en la actualidad no hay una normativa oficial para el análisis de leche sin procesar.

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de organismos patógenos de mastitis en muestras de leche de tanque de tambos ubicados en la cuenca lechera central de Argentina. Además, considerando que *S. aureus* es el patógeno contagioso más frecuentemente aislado de IIM en Argentina, se evaluó el desempeño de tres medios de cultivo, dos estándares y uno comercial, para realizar el recuento, aislamiento e identificación de *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de leche de tanque

El número de tambos a muestrear se determinó en función del número total de

establecimientos que entregaban su producción a una empresa lechera ubicada en el Departamento Castellanos de la Provincia de Santa Fe (n=565). Se realizó un muestreo irrestricto aleatorio, considerando una prevalencia de muestras positivas a *Mycoplasma* del 50% por no disponer de información previa, con un error absoluto del 10% y una confianza del 95%. Sobre esta base fueron seleccionados 129 establecimientos lecheros ubicados en los Departamentos Castellanos y Las Colonias.

Las muestras de leche de tanque fueron tomadas en recipientes estériles por los transportistas que recolectaban la leche de los establecimientos lecheros seleccionados. Inmediatamente, las muestras fueron refrigeradas a una temperatura entre 4 y 6°C hasta su llegada al laboratorio.

Análisis microbiológicos

Se realizó el recuento e identificación a nivel de especie de los organismos patógenos de mastitis, *S. aureus*, *Str. agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*, en agar base Columbia (Britania) adicionado con 5% de sangre de ternero. Además, se realizó cultivo de *Mycoplasma* en medio Hayflick modificado. En ambos casos las muestras fueron procesadas de acuerdo con metodología estándar (Oliver *et al.*, 2004). No se consideraron en este estudio patógenos menores y enterobacterias.

Comparación de metodologías para aislamiento de *S. aureus*

Se utilizaron tres medios de cultivo: agar base Columbia enriquecido al 5% con sangre de ternero (AS), agar Baird Parker (BP) enriquecido con emulsión yema de huevo al 5% y telurito de potasio al 1% y placas Compact Dry "Nissui" X SA (Medica- Tec) (CSA). La lectura de las placas fue realizada de acuerdo con las indicaciones del fabricante, mientras

que las lecturas de AS y BP fueron realizadas de acuerdo con metodología estándar (Oliver *et al.*, 2004; Baird Parker, 1962). Se sembró 0,1 ml de leche correspondiente a la dilución 10⁻¹. Las placas fueron incubadas durante 24 hs a 37° C en condiciones de aerobiosis. Las Colonias sospechosas fueron identificadas por pruebas bioquímicas convencionales, enumeradas y los recuentos obtenidos a partir de cada medio fueron transformados a logaritmo para su análisis estadístico.

Análisis estadísticos

Se utilizó como metodología estadística para evaluar el desempeño de los medios de cultivo, la detección del agente (presencia o ausencia), por lo cual se evaluó la concordancia a través del coeficiente Kappa.

RESULTADOS

Prevalencia de organismos patógenos

De las 129 muestras procesadas, el patógeno predominante fue *S. aureus* (42.60%) seguido de *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae* y *Str. agalactiae* con una prevalencia de 27.10%, 10.90% y 4,70%, respectivamente. Un 14.7% de las muestras de leche no se aislaron patógenos mayores. La frecuencia de aislamiento de los patógenos mayores seleccionados fue calculada sobre el total de muestras bacteriológicamente positivas. Se observó un predominio de *S. aureus* (50%), seguido por especies pertenecientes al género *Streptococcus*, *Str. uberis* (31.82%), *Str. dysgalactiae* (12.73%) y *Str. agalactiae* (5.45%). No se aisló *Mycoplasma* spp.

Comparación de medios para aislamiento de *S. aureus*

En la Figura 1 se presentan los resultados de las coincidencias de las técnicas evaluadas, cultivo en AS y en CSA, con la de referencia, cultivo en agar BP. Del total de muestras detectadas como negativas por la técnica de referencia BP, la técnica CSA detectó también como negativas el 73%. Para el caso de las positivas hubo una coincidencia en un 77% de las muestras. Del total de muestras detectadas como negativas por la técnica de referencia BP, la técnica AS detectó también como negativas el 81% de las muestras. Para el caso de las positivas hubo una coincidencia en casi el 66% de las muestras. De acuerdo con el coeficiente Kappa obtenido la concordancia fue de moderada a baja para ambos métodos con relación al de referencia (CSA =0,50 0,08 y AS=0,47 0,08).

En aquellos casos en los cuales se detectaron colonias en los tres 3 medios, se determinó la correlación entre ellos. La concordancia entre BP y AS fue buena y mayor que la observada entre BP y CSA. Al comparar el porcentaje de recuperación (Fig. 2) se observó que ninguna de las dos técnicas AS y CSA difirió numéricamente de BP, la cual fue intermedia a las dos anteriores, ya que en AS se obtuvieron recuentos más bajos que CSA, que presentó los recuentos de bacterias más altos.

DISCUSIÓN

La presencia de bacterias patógenas en leche de tanque está asociada con la prevalencia de infección intramamaria del rodeo y se correlaciona, aunque no estrechamente, con el RCS (Jayarao *et al.*, 2004). Existen

pocos estudios previos realizados en la Argentina sobre prevalencia de patógenos de mastitis en leche de tanque de frío. En un estudio sobre 266 muestras de leche de tanque provenientes de rodeos con altos (>500.000 cél./ml) y bajos (<500.000 cél./ml) RCS, se encontró una prevalencia significativamente mayor de *Str. agalactiae* en el primer grupo (32,6% vs 16,8%), mientras que la prevalen-

cia de *S. aureus* y *Streptococcus* no agalactiae fue similar para ambos grupos (Calvinho *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados no pueden ser comparados en forma directa ya que debe tenerse en cuenta que en ese estudio fue utilizada una muestras de conveniencia, mientras que en el presente estudio el muestreo fue aleatorizado. Además, entre ambos estudios median más de 10 años, tiempo en

Fig. 1: A - Coincidencia entre la técnica CSA y BP en la detección de *S.aureus*.
B - Coincidencia entre la técnica AS y BP en la detección de *S.aureus*

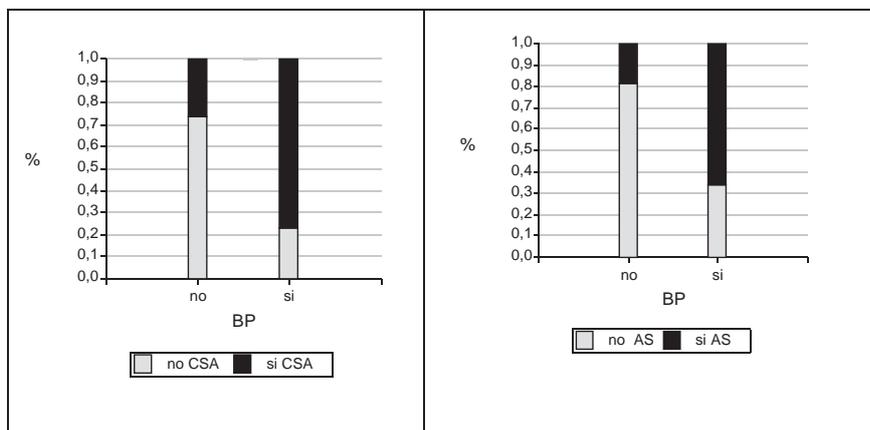
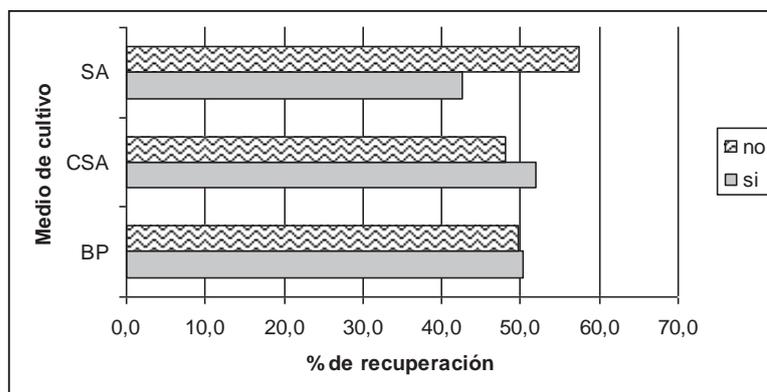


Fig. 2: Porcentaje de recuperación de *S. aureus* en los medios de cultivo agar sangre, agar Baird-Parker y evaluados.



el cual las condiciones de control de mastitis en los tambos de la zona han cambiado sustancialmente (Calvinho, 2009).

Los resultados obtenidos coinciden con investigaciones realizadas en otros países donde el patógeno predominante en leche de tanque fue *S. aureus*, seguido por distintas especies de estreptococos (Miranda-Morales *et al.*, 2008; Riekerink *et al.*, 2006). Entre estos últimos organismos, en estudios desarrollados en la República Checa y en México, la especie predominante fue *Str. uberis*, con 18,28% (Rysanek *et al.*, 2009) y 37,5% (Miranda Morales *et al.*, 2008), mientras que para *S. aureus* se hallaron valores de 19,8% y 30%, respectivamente. Ambos valores fueron más bajos que los reportados en el presente relevamiento para este último organismo.

Por otra parte, estos resultados se ubicaron por debajo de los informados por Riekerink *et al.* (2006) en establecimientos lecheros de la Isla del Príncipe Eduardo (Canadá), con una prevalencia de *S. aureus* del 74% y menor prevalencia de *Str. agalactiae* un 1.6%, a la hallada en el presente estudio, 4.7%. En investigaciones realizadas en EE.UU., *S. aureus* se halló en un 84% de las muestras de leche de tanque de 50 tambos pertenecientes al estado de Minnesota (Haran *et al.*, 2011), mientras que en el estado de Nueva York se aislaron *Str. uberis* y *Str. agalactiae* en un 81 y 31%, respectivamente (Zadoks *et al.*, 2004). Cabe destacar que dentro de estos agentes, *Str. agalactiae* y *S. aureus* provienen de glándulas mamarias infectadas; mientras que *Str. uberis* y *Str. dysgalactiae* pueden provenir tanto de glándulas infectadas como del medio ambiente (Farnsworth, 1993).

A nivel mundial existen reportes sobre prevalencia de *Mycoplasma spp* en muestras de leche de tanque como Miranda Morales (2008), Riekerink (2006) que reportan una

prevalencia del 55% y 1.9% respectivamente.

En nuestro país, existe poca información acerca de su presencia en rodeos lecheros de Argentina. El primer reporte fue realizado por Cerda *et al.* (2000), aislando *M. bovis* a partir de un brote de mastitis clínica en un rodeo lechero ubicado en la provincia de Buenos Aires donde la prevalencia de vacas infectadas fue estimada en un 4%. En el presente relevamiento no se detectó este patógeno mamario en las muestras de leche de tanque; sin embargo en los últimos años se han informado aislamientos tanto de muestras de leche de tanque, cuartos mamaros y órganos de terneros a partir de casos en los cuales se sospechaba la presencia de este organismo (Allassia *et al.*, 2012; Neder *et al.*, 2013). Se necesitan nuevos estudios involucrando mayor cantidad de establecimientos para estimar la prevalencia real de este microorganismo.

Del análisis realizado sobre el comportamiento de los medios de cultivo para aislamiento de *S. aureus*, se pudo observar que el porcentaje de recuperación en los medios BP y AS fue bajo comparado con un estudio realizado en Canadá donde se halló una sensibilidad para el medio BP del 89,7% (Ollis *et al.*, 1995). En cuanto a la concordancia entre los medios BP y CSA fue de moderada a baja, aunque el método CSA detectó *S. aureus* de una manera más fácil y rápida, al ser menos laboriosa su preparación comparada con BP, que es el medio de cultivo selectivo para la detección del agente. Considerando tanto muestras con recuperación positiva como negativa, la concordancia con BP, tomado como referencia, fue pobre. Al considerar solamente las muestras que dieron detección positiva en los tres medios, la concordancia entre BP y AS fue buena. Cabe destacar que, desde el punto de vista operativo, AS es un medio de cultivo más

económico que BP, de fácil preparación y de calidad controlable; sin embargo, ambos medios son adecuados para la detección de *S. aureus* en leche de tanque.

Si bien la leche de tanque contiene gran cantidad de microorganismos ambientales y estos organismos pueden llegar a multiplicarse cuando la temperatura de almacenamiento de la leche no es la adecuada dificultando su aislamiento en medios convencionales no selectivos como las placas de AS (Oz *et al.*, 1986), la ventaja comparativa respecto de BP para su uso rutinario radica en la facilidad de preparación al no requerir suplementos especiales y menor costo.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Marcelo Romero por su colaboración en la remisión de las muestras al laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- BAIRD-PARKER, A.C.** 1962. A Classification of Micrococci and Staphylococci Based on Physiological and Biochemical Tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30, 409-427.
- ALLASSIA, M.; R. MAZZINI; S. MACHADO; N.B. RUSSI; V.E. NEDER & L.F. CALVINHO.** 2012 Aislamiento de *Mycoplasma* spp. en un ternero de tambo. Resúmenes de la XIX Reunión Científica Técnica de la AAVLD. Buenos Aires, 7-9/11/2012. Pp. 164-165.
- BALABAN, N. & RASOOLY, A.** 2000. Staphylococcal enterotoxins: review. *International Journal Of Food Microbiology* 61, pag. 1-10.
- BOOTH, J. M.** 1981. The importance of udder health in relation to milk quality improvement and control. *Milk Quality Improvement and Control*. Eds. J.D. Collins and J. Hannan. University College Dublin. pp. 1-11.
- CALVINHO, L.F.; V.R. CANAVESIO; N.P. AGUIRRE; R.A. ALMEIDA AND S.P. OLIVER.** 2000. Bacteriological bulk tank milk quality from dairy farms with high and low somatic cell counts in the central dairy area of Argentina. *Proc. 39th Annual Mtg. N.M.C.* Pg. 174-175.
- CALVINHO, L. & TIRANTE, L.** 2005. 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. Veterinarias*, 4 (1-2).
- CALVINHO, L.F.** 2009. Simposio: Estrategias exitosas para producir leche de calidad. Reseña del control de mastitis en Argentina. En: *Memorias de las Terceras Jornadas Internacionales de Calidad de Leche (JICAL III)*. Pág. 8-15. Vte. López. Pcia. Buenos Aires. Organizadas por APROCAL.
- CERDÁ, R.; XAVIER, J.; SANSALONE, P.; DE LA SOTA, R. & ROSENBUSCH, R.** 2000. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la Provincia de Buenos Aires. Primera comunicación en la República Argentina. *Rev Latinoam Microbiol.* 42:7-11.
- DIESER, S.A.; VISSIO, C.; LASAGNO, M. C.; BOGNI, C.I.; LARRIESTRA, A.J. & ODIERNO, L.M.** 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *PakVet J.* 34: 124-126.
- FARNSWORTH, R.J.** 1993. Microbiological examination of tank milk. *Vet. Clinics North America: Food Animal Practice.* 9:469-475.
- GONZÁLEZ, R.N. & D.J. WILSON.** 2003. *Mycoplasma mastitis* in dairy herds. *Vet Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19:199-221.

- HARAN, K.; GODDEN, M.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J. & SREEVAT-SAN, S.** 2011. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Milk from Minnesota Dairy Farms. JCM p.688-695.
- JAYARAO, B.; PILLAI, S.; SAWANT, A.; WOLFGANG, D. & HEDGE, N.** 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. J. Dairy Sci. 87:3561-3573.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA.** 2012. Precio promedio de la leche cruda informado por la industria. http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/06_precio%20al%20productor/_archivos/040000_Precio_Productor_2012.pdf
- MIRANDA-MORALES, R.E.; ROJAS-TREJO, V.; SEGURA-CANDELAS, R.; CARRILLO-CASAS, E.R.; SANCHEZ-GONZALES, G.; CASTOR, R. & TRIGO-TAVERA, F.** 2008 Prevalencia of Pathogens Associated with Bovine Mastitis in Bulk Tank Milk in Mexico. Animal Biodiversity and Emerging Diseases, 1149: 300-302
- NEDER, V.E.; V.R. CANAVESIO & L.F. CALVINHO.** 2011. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. Rev. Argent. Microbiol 43:104-106.
- NEDER, V.; GIANRE, V. & CALVINHO, L.** 2013. Detección y Caracterización molecular de Mycoplasma aislados de leche de tanque de frío e infecciones mamarias en la cuenca lechera central de Argentina. Poster. Congreso Argentino de Microbiología 24-26 de septiembre de 2013.
- OLIVER, S.; GONZALEZ, R.; HOGAN, J.; JAYARAO, B. & OWENS, W.** 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality; 4th edition; National Mastitis Council, Verona, WI, USA.
- OLLIS, G.; RAWLUK, S.; SCHOONDERWOERD, M. & SCHIPPER, C.** 1995. Detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified bairst-parker culture media. Can Vet Journal Vol 36: 619-623.
- OZ, H.; FARNSWORTH, R. & COX, H.** 1986. Growth of Gram-Positive Mastogenic Bacteria in Normal, Simulated Bulk Tank, and Mastitic Milk Held at Simulated Fluctuating Temperatures of Farm Bulk Tank. J. of Dairy Science, vol 69, p: 2060-2065.
- RICHARD, G.M.; OLDE RIEKERINK, HERMAN W. BARKEMA, STEFAN VEENSTRA, DORISE POOLE, RANDY T. DINGWELL, GREGORY P. KEEFE.** 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. Can Vet J;47:567-572
- RYSANEK, D.; ZOUHAROVA, M. AND BABAK, V.** 2009. Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. J. of dairy Research. 76, 117-123.
- SAGPyA.** 2005. Propuestas para el mejoramiento de la competitividad de la lechería argentina. Ed. por Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. pp. 17.
- TIRANTE, L.; NEDER, V.; MAITO, J.; GAVIDIA, M.; BAUMBERGER, C.; CHAVES, J.; POL, M.; CANAVESIO, V. & CALVINHO, L.** 2013. Mycoplasma mastitis in dairy cattle in Argentina. Proceedings National Mastitis Council 52nd Annual Meeting. San Diego, EE.UU. Pg. 213-214.
- ZADOKS, R.; GONZALEZ, R.; BOOR, K. & SCHUKKEN, Y.** 2004. Mastitis-Causing Streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. Journal of food protection, vol. 67, N°12, pág. 2644-2650.