

Caracterización de *Streptococcus* causantes de mastitis bovina en Argentina, mediante métodos fenotípicos y genotípicos

Silvina François *
Adriana Limansky **,***
Inés Toresani ***
Guillermo Ebner ***
Alejandro Viale **,***
Emma Sutich ***,†

Abstract

Streptococcus isolates present in milk of dairy cows presenting mastitis from the dairy areas of Santa Fe and Córdoba, Argentina, were characterized. From 169 milk samples, 30 isolates were recovered, and identified by both biochemical and serological studies as *S. agalactiae* (22 isolates), *S. dysgalactiae* (6 isolates) and *S. uberis* (2 isolates). RAPD genotypic analysis showed that 4 distinct clones were present in the *S. agalactiae* population, 6 in that of *S. dysgalactiae*, and 2 in *S. uberis*. Interestingly, each of the 4 different herds analyzed was colonized by a single and distinct clone of *S. agalactiae*, whilst different clones of *S. dysgalactiae* were found to coexist in a herd. A DNA fragment common to all assayed isolates of *S. agalactiae* was identified; it was absent in the other species. Results above indicate that the employed methodologies constitute a powerful tool for diagnostic and epidemiological surveillance of Streptococci in dairy cows.

Key words: *STREPTOCOCCUS*, *BOVINE MASTITIS*, *MOLECULAR EPIDEMIOLOGY*, *GENOTYPIC MARKERS*.

Resumen

En este trabajo se han caracterizado aislamientos de *Streptococcus* de leche de vacas con mastitis de la cuenca lechera de Santa Fe y Córdoba, Argentina. Se recuperaron 30 aislamientos de 169 muestras de leche, que fueron identificados bioquímica y serológicamente como *Streptococcus agalactiae* (22 aislamientos), *S. dysgalactiae* (seis aislamientos) y *S. uberis* (dos aislamientos). El análisis genotípico por RAPD mostró cuatro cepas distintas en la población de *S. agalactiae*, seis en la de *S. dysgalactiae* y dos en *S. uberis*. Cada uno de los cuatro rodeos analizados se mostró colonizado por una única cepa de *S. agalactiae*, mientras que cepas diferentes de *S. dysgalactiae* coexistieron en un rodeo. Se identificó un fragmento de ADN común a todos los aislamientos de *S. agalactiae* estudiados, ausente en las otras especies. Estos resultados indican que las metodologías empleadas constituyen una herramienta eficaz para el diagnóstico y la investigación epidemiológica de estreptococos en ganado bovino.

Palabras clave: *STREPTOCOCCUS*, *MASTITIS BOVINA*, *EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR*, *MARCADORES GENOTÍPICOS*.

Recibido el 31 de octubre de 2000 y aceptado el 27 de marzo de 2001.

* Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias.

** Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR, CONICET).

*** Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, 2000, Rosario, Argentina.

† Autor para correspondencia: E-mail: esutich@fbioyf.umr.edu.ar, Tel-Fax: 54-341-4408392.

La mastitis bovina es, comúnmente, consecuencia de la infección de la ubre por uno o más microorganismos. En Argentina, los patógenos más frecuentemente aislados son *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus*. Estos agentes suelen encontrarse en la piel de los pezones, en la leche y en el ambiente, por lo que son éstas las principales fuentes de transmisión y probables responsables de la colonización de las vacas durante el ordeño.¹

La aplicación de programas para el control de la mastitis bovina ha reducido la incidencia de infecciones por *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae*.² No obstante, esta enfermedad sigue siendo un problema, debido a la falta de conocimiento de la epidemiología de sus agentes etiológicos.¹ Por ello, es indispensable la identificación certera de los microorganismos causantes de esta enfermedad, para su diagnóstico, vigilancia y control.³ Existe, además, una clara necesidad de instrumentar métodos que posibiliten la subtipificación de los patógenos responsables, lo cual permitirá conocer sus nichos ambientales y vías de diseminación, permitiendo controlar la cadena de transmisión.

Si bien técnicas como biotipificación y serotipificación son comúnmente usadas para la identificación de microorganismos, la falta de estabilidad y poder discriminatorio de los marcadores fenotípicos constituye una importante limitante para su empleo en investigaciones epidemiológicas. En contraparte, técnicas moleculares basadas en la caracterización del genoma presentan elevada sensibilidad y reproducibilidad.³ Particularmente, los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presentan ventajas sustanciales respecto de otras metodologías genotípicas; por ejemplo, su simplicidad y rapidez.³

En este estudio se analizó la diversidad genómica y diseminación de cepas de estreptococos en vacas con mastitis de distintos rodeos; también se investigó la presencia de fragmentos de ADN marcadores de género y especie. Para ello se emplearon técnicas fenotípicas como biotipificación y serotipificación, y genotípicas como la amplificación de ADN, mediante PCR, empleando cebadores degenerados,⁴ o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, por sus siglas en inglés).

Aislamientos bacterianos. Caracterización fenotípica⁷

Se analizaron 169 muestras de leche de vacas con mastitis, provenientes de siete rodeos diferentes de la

región pampeana de Argentina. Cinco de ellos pertenecían a la provincia de Santa Fe: rodeos SF, CSF, FC, O, B, y los dos restantes: rodeos LP y Ca a la provincia de Córdoba. Las muestras se obtuvieron en colectores estériles antes del ordeño, y se sembraron en agar Base Columbia sangre y caldo Todd-Hewitt, suplementado con 15 µg/mL de ácido nalidíxico y 10 µg/mL de colistina.⁵ Las colonias β-hemolíticas y no hemolíticas, catalasa negativas, se identificaron, presuntamente, mediante hidrólisis de hipurato, tolerancia al NaCl 6.5%, y test de bilis-esculina.⁶ La identificación confirmatoria se realizó mediante aglutinación específica de grupo (Pastorex Streptogroup, Oxoid) y ensayos de fermentación de hidratos de carbono (arabínosa, glicerol, inulina, lactosa, manitol, sacarosa, sorbitol y trehalosa). Para los aislamientos de *S. agalactiae* se determinó, además, el serotipo mediante coaglutinación con antisueros específicos.* La actividad hialuronidasa se detectó en Agar cerebro corazón suplementado con albúmina sérica bovina y ácido hialurónico.⁷

Se incorporaron, como testigo, aislamientos de *S. agalactiae* de origen humano pertenecientes a los serotipos I, II, III, IV y V, así como cepas de referencia de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* de la colección española de cultivos tipo (CECT).

Extracción del ADN y RAPD

El ADN bacteriano se obtuvo mediante tratamiento de las células con mutanolisina y proteínasa K, seguido de extracción fenólica.* Posteriormente, se visualizó el ADN en geles que contenían bromuro de etidio, mediante comparación con cantidades conocidas de ADN del fago lambda.*

La PCR se realizó en un termociclador.* La mezcla de reacción (50 µl) contenía 50 ng de ADN, 2.5 U de *Taq* ADN polimerasa (Promega), 2 µM de cebador oligonucleótido, 200 µM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 50 mM KCl, y 10 mM Tris-HCl (pH 8.4). Se empleó el siguiente protocolo: Después de cinco minutos de desnaturalización a 95°C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de 1 minuto a 93°C, 1.5 minutos a 36°C y dos minutos a 72°C, seguido por diez minutos a 72°C. En todos los casos, se analizaron 20 µl de la mezcla de reacción por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio.⁸

Para la técnica de RAPD se utilizaron dos oligonucleótidos parcialmente degenerados: Cebador 19 (5'-GGTCGACYTTNGYNGGRTC-3') y 10N (5'-TNGYNGGRTC-3'), descritos en la referencia 4. Los aislamientos de *Streptococcus* de una misma especie fueron considerados distintos cuando diferían en dos o más bandas.

Se recuperaron 30 aislamientos caracterizados como estreptococos mediante pruebas bioquímicas y antígeno

* Modelo 480 de Perkin-Elmer Cetus, <http://www.perkin-elmer.com/>

polisacárido de grupo, a saber: *S. agalactiae*, 22; *S. dysgalactiae*, seis; *S. uberis*, dos (Cuadro 1). En el caso de *S. agalactiae*, tres aislamientos relacionados epidemiológicamente resultaron serotipo I/a (rodeo LP, Cuadro 1); dos aislamientos no relacionados resultaron III (rodeo SF y O), mientras que los 17 restantes resultaron no tipificables (NT).

Todos los aislamientos de *S. agalactiae* estudiados expresaron actividad hialuronidasa, mientras que sólo 50% de los de *S. dysgalactiae* lo hicieron, no se detectó esta actividad en *S. uberis*.

El análisis genotípico mediante el cebador 19, permi-

Cuadro 1
CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS
DE *Streptococcus* spp PROVENIENTES DE MASTITIS BOVINA

Código*	Fecha	Rodeo**	Especie	Serogrupo***	Serotipo†	Perfiles
						RAPD‡
194168	4-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
9072B	4-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
9072A	4-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	Ia	a
9050	4-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
12644	4-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	Ia	a
13065	4-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
13050	5-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
9374	5-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
13689	5-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
1677	5-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
13563	5-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
13065	6-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
12766	6-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
12097	6-98	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
13045	5-99	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
9915	5-99	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
12321	5-99	LP	<i>S. Agalactiae</i>	B	Ia	a
8518	5-99	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
11048	5-99	LP	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	a
6	3-99	SF	<i>S. agalactiae</i>	B	III	b
145CPD	9-99	O	<i>S. agalactiae</i>	B	III	c
1036	8-99	B	<i>S. agalactiae</i>	B	NT	d
585CAD	10-98	FC	<i>S. dysgalactiae</i>	C	—	a
585CAI	10-98	FC	<i>S. dysgalactiae</i>	C	—	b
VacaCPI	10-98	C	<i>S. dysgalactiae</i>	C	—	c
Pol	10-98	LP	<i>S. dysgalactiae</i>	C	—	d
12490	12-98	LP	<i>S. dysgalactiae</i>	C	—	e
12733	5-98	LP	<i>S. dysgalactiae</i>	C	—	f
671	12-98	LP	<i>S. uberis</i>	N D	—	a'
VacaCPD	10-98	C	<i>S. uberis</i>	N D	—	b'

* Código de identificación del aislamiento.

** Rodeos: SF, O, B, FC (en la Provincia de Santa Fe) y C y LP (en la Provincia de Córdoba).

*** ND: serogrupo no detectable.

† NT: No tipificable; —: metodología no efectuada

‡ Perfiles RAPD (del inglés, *Random Amplification of Polymorphic DNA*) empleando el cebador 19 (ver Figura 1A y Figura 2).

Figura 1. Perfiles RAPD de aislamientos de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* empleando cebadores 19 o 10N. A. Cebador 19. Carriles 1-4: perfiles a, b, c y d, correspondientes a las cepas de *S. agalactiae* de origen bovino 9374, 6, 145 CPD y 1036 (Cuadro 1); carril 5: cepa de *S. agalactiae* de la CECT (colección española de cultivos tipo). B. Cebador 10N. Carriles 1-4: cepas de *S. agalactiae* de origen bovino 9374, 6, 145 CPD y 1036 (Cuadro 1); carriles 5-9: cepas de *S. agalactiae* de origen humano, de serotipos: I/a; II; III; IV y V, respectivamente; carriles 10-12: cepas de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis* (CECT). A la izquierda de la figura se indica el marcador de tamaños moleculares (ADN del fago lambda digerido con *Hind* III).

Figura 2. Perfiles RAPD de aislamientos de *S. dysgalactiae* y *S. uberis* provenientes de mastitis bovina empleando el cebador 19. Carriles 1-6: perfiles a'-f' correspondientes a las cepas de *S. dysgalactiae* (Cuadro 1); carril 7: cepa de *S. dysgalactiae* (CECT); carriles 8 y 9: perfiles a''-b'' de las cepas de *S. uberis* (Cuadro 1); carril 10: cepa de *S. uberis* (CECT).

tió observar cuatro cepas distintas de *S. agalactiae* (Cuadro 1 y Figura 1A, carriles 1-4). Éstas se denominaron cepas a (19 aislamientos), b, c y d (un aislamiento de cada una de las tres últimas), respectivamente. Todos los aislamientos de la cepa a pertenecieron a vacas del rodeo LP. Las cepas restantes (b, c y d) pertenecieron a tres rodeos diferentes (SF, OyB, respectivamente). Todas las cepas recuperadas fueron distinguidas de la cepa tipo mediante esta metodología (Figura 1A, carril 5).

La técnica RAPD permitió distinguir seis cepas diferentes entre los aislamientos de *S. dysgalactiae* provenientes de cuatro rodeos (a'-f', Cuadro 1 y Figura 2, carriles 1-6), así como diferenciar la cepa tipo analizada (Figura 2, carril 7). Entre los dos aislamientos de *S. uberis* analizados, pudieron observarse dos perfiles distintos (a'', b'', Cuadro 1 y Figura 2, carriles 8 y 9), y diferentes de la cepa tipo correspondiente (Figura 2, carril 10).

Como se muestra en la Figura 1B, el uso del cebador 10N permitió observar un fragmento amplificado de ADN de aproximadamente 1 350 pb en las cepas de *S. agalactiae* de origen bovino (carriles 1, 2, 3 y 4); en cinco serotipos distintos de *S. agalactiae* de origen humano (serotipos I/a, II, III, IV y V; carriles 5, 6, 7, 8 y 9; respectivamente), así como en la cepa testigo de *S. agalactiae* (carril 10, Figura 1B). Dicha banda no estuvo presente en las cepas testigo de *S. dysgalactiae* y *S. uberis* (carriles 11 y 12; Figura 1B); tampoco en los aislamientos de *S. dysgalactiae* y *S. uberis* de origen bovino (no mostrado), cuando se empleó el mencionado cebador.

Los aislamientos de *S. agalactiae* de origen bovino y humano se han dividido en diferentes ecovares, basándose en sus propiedades fenotípicas.¹ Se encontró que

la caracterización bioquímica de aislamientos de estreptococos, productores de mastitis bovina fue útil para identificar estos patógenos en cada especie, aunque insuficiente para distinguir biotipos entre aislamientos de una misma especie. La serotipificación mostró ser también de escasa utilidad, a juzgar por la existencia mayoritaria de cepas NT en los aislamientos pertenecientes a *S. agalactiae* (Cuadro 1). Esto último fue informado previamente por otros autores, quienes mostraron que aislamientos de *S. agalactiae* de origen bovino de distintos lugares geográficos son deficientes en la expresión de antígenos polisacarídicos.^{9,10} Además, los resultados del presente estudio muestran la detección de un idéntico antígeno polisacarídico capsular en aislamientos distinguibles genotípicamente (cepas byc, Cuadro 1), lo que revela la escasa capacidad discriminatoria de la serotipificación.

Así, sólo la metodología genotípica permitió efectuar la subtipificación de los aislamientos de estreptococos dentro de cada especie encontrada (Cuadro 1). En este sentido, se han diferenciado claramente cuatro cepas de *S. agalactiae* provenientes de cuatro rodeos diferentes, situados en las localidades de Santa Fe y Córdoba, lo que sugiere una elevada variabilidad genómica en la población de este patógeno. Asimismo, muestra una gran capacidad discriminatoria para la distinción de polimorfismos entre aislamientos no relacionados epidemiológicamente. En este sentido, la técnica RAPD también ha permitido distinguir los aislamientos de *S. dysgalactiae* y de *S. uberis* estudiados. Estos resultados sugerirían que el método genotípico utilizado es capaz de revelar diversidad en estas especies. Una elevada variabilidad genómica ha sido descrita en estas especies, de acuerdo con lo documentado en otras áreas geográficas.^{11,12}

Se observó, asimismo, la diseminación de una única cepa de *S. agalactiae* entre las vacas del rodeo LP. Lo anterior estaría indicando la transmisión cruzada del microorganismo entre las vacas del mismo rodeo, y su contaminación con una fuente común. Además, dicha cepa ha sido recuperada en dos oportunidades de una misma vaca tratada con antibióticos (números 6 y 12, Cuadro 1); esto último indica su probable persistencia. Tales hallazgos sugieren la endemia de dicha cepa en el rodeo, y hacen necesaria la instrumentación de medidas higiénicas precisas y una terapéutica adecuada para su erradicación, así como el muestreo bacteriológico de todas las vacas en ordeño.

La metodología genotípica empleada permitió la identificación de un fragmento de ADN común en aislamientos de *S. agalactiae* de distintos orígenes. Así, la técnica RAPD se constituye en una herramienta promisoriosa para el desarrollo de sondas y cebadores de ADN, útiles para el diagnóstico sensible y específico de este microorganismo.

Lamastitisbovinapor *S. agalactiae* continúa siendo la infección más relevante entre las producidas por *Streptococcus*, probablemente debido a su elevada virulencia.² En este contexto, es interesante destacar que todas las cepas de *S. agalactiae* analizadas expresaron actividad hialuronidasa, este hecho podría estar relacionado con la virulencia que confiere la expresión de este factor.¹³

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado mediante subsidios de la Universidad Nacional de Rosario y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, de Argentina. Se agradece especialmente a los médicos veterinarios que colaboraron en la extracción de las muestras, así como a los propietarios de los rodeos estudiados.

Referencias

1. Baseggio N, Mansell P, Browning JW, Browning GF. Strain differentiation of isolates of Streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Cell Probes* 1997;11:349-354.
2. Keefe GP. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J* 1997;38:429-437.
3. Jayarao BM, Gillespie BE, Oliver SP. Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. *J Food Protection* 1996;59:615-620.
4. Limansky A, Sutich E, Guardati MC, Toresani I, Viale A. Genomic diversity among *Streptococcus agalactiae* isolates detected by a degenerate oligonucleotide-primed amplification assay. *J Infect Dis* 1998;1:1308-13.
5. Gray BM, Pass MA, Dillon HC. Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of group B Streptococci. *J Clin Microbiol* 1979;9:466-470.
6. Facklam RR, Washington J. *Streptococcus* and related catalase negative Gram positive cocci. In: Balows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of clinical microbiology*. Washington (DC): American Society for Microbiology, 1991;238-257.
7. Smith RF, Willett NP. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase producing microorganisms. *Appl Microbiol* 1968;16:1434-1436.
8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
9. Jensen NE, Aarestrup FM. Epidemiological aspects of group B Streptococci of bovine and human origin. *Epidemiol Infect* 1996;11:417-422.
10. Wessels MR. Biology of streptococcal capsular polysaccharides. *J Appl Microbiol* 1987;83(Suppl):205-315.
11. Aarestrup FM, Jensen NE. Genotypic and phenotypic diversity of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Vet Microbiol* 1996;53:315-323.
12. Gillespie BE, Jayarao BM, Pankey JW, Oliver SP. Subtyping of *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions by DNA fingerprinting. *J Vet Med* 1998;45:585-593.
13. Pritchard DG, Lin B, Willingham TR, Baker JR. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys* 1994;315:431-437.