

## Identificación de *Streptococcus agalactiae* en leche de bovinos afectados por mastitis en el occidente de Cuba



### Identification of *Streptococcus agalactiae* in western Cuba cattle milk affected by mastitis

<http://opn.to/a/jEibC>

Dervel Felipe Díaz-Herrera <sup>1</sup>, Dianys Remón-Díaz <sup>1</sup>, Yamilka Riverón-Alemán <sup>1</sup>, Ariel Ribot <sup>1</sup>, Anel Ledesma-Rodríguez <sup>1</sup>, Ailin Martínez-Vasallo <sup>1</sup>, Odalys Uffo Reinoso <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Laboratorio de Ensayo para el Control de la Calidad de los Alimentos (CENLAC), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** *Streptococcus agalactiae* es uno de los principales agentes causantes de mastitis en el ganado lechero, con importantes implicaciones para el humano; por tanto, el diagnóstico, el control y la prevención de este microorganismo resulta fundamental para la salud animal, humana y la economía. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *S. agalactiae* en leche de rebaños bovinos afectados con mastitis. Se colectaron 574 muestras de leche de cuartos afectados con mastitis (840 bovinos en producción de las razas Siboney de Cuba, Holstein y Jersey en 14 lecherías del occidente de Cuba). Se realizó el diagnóstico bacteriológico a todas las muestras. A partir de las colonias con características morfológicas y pruebas bioquímicas indicativas de *S. agalactiae*, se realizó la extracción de ADN y PCR con cebadores, que amplificaban un segmento de la región intergénica 16S-23S rRNA. El 43,45 % de los animales mostró síntomas de mastitis clínica o subclínica. En 57 muestras (9,97 %) se aislaron colonias características de *S. agalactiae*; 43 (75,43 %) resultaron positivas por PCR. De estas últimas, 26 (60,46) correspondieron a cuartos con tres cruces, 14 (32,55 %) a dos cruces y 3 (6,97 %) a cuartos clínicos. *S. agalactiae* fue aislado en ocho lecherías y las razas más afectadas fueron Holstein y Siboney de Cuba. Se aislaron e identificaron cepas de *S. agalactiae* en vacas afectadas con mastitis, lo cual indica la necesidad de programas para el control de la mastitis causada por *S. agalactiae* para mitigar los efectos causados por este microorganismo en las interfaces hombre-animal-medio ambiente.

**Palabras clave:** *Streptococcus agalactiae*, mastitis, leche, bovinos, PCR.

**ABSTRACT:** *Streptococcus agalactiae* is one of the main agents causing mastitis in dairy cattle, with important implications for humans; whereby the diagnosis, control and prevention of this microorganism is fundamental to animal and human health as well for the economy. The objective of this work was to detect the presence of *S. agalactiae* in milk from cattle herds affected by mastitis. Five hundred and seventy-four samples of milk were collected from quarters affected with mastitis (840 production cattle of Siboney de Cuba, Holstein and Jersey breeds of 14 dairy farms in western Cuba). Bacteriological diagnosis was performed in all samples. DNA and PCR were extracted with primers that amplified a segment of the 16S-23S rRNA intergenic region, from colonies with morphological characteristics and biochemical tests indicative of *S. agalactiae*. The 43.45 % of animals showed symptoms of clinical or subclinical mastitis. In 57 samples (9.97 %), colonies characteristic of *S. agalactiae* were isolated, and 43 (75.43 %) were positive by PCR. Of the latter, 26 (60.46 %) corresponded to quarters with three crossings, 14 (32.55 %) to two crossings and 3 (6.97 %) to clinical rooms. *S. agalactiae* was isolated in eight dairy farms and the most affected breeds were Holstein and Siboney de Cuba. Strains of *S. agalactiae* were isolated and identified in mastitis-affected cows, indicating the need for programs to control mastitis caused by *S. agalactiae* to mitigate the effects caused by this microorganism on human-animal-environment interfaces.

**Key words:** *Streptococcus agalactiae*, mastitis, milk, cattle, PCR.

\*Autor para correspondencia: Dervel Felipe Díaz-Herrera. E-mail: [felipe@censa.du.cu](mailto:felipe@censa.du.cu)

Recibido: 10/08/2019

Aceptado: 30/10/2019

## INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances en el desarrollo de programas estratégicos para el control y la prevención de la mastitis, esta es una de las enfermedades infecciosas más comunes y económicamente perjudiciales que afecta al ganado lechero a nivel mundial (1,2,3). Esta compleja enfermedad multietiológica de la glándula mamaria se caracteriza, principalmente, por la reducción de la producción y la calidad de la leche (1). La principal causa de la mastitis bovina es la infección intramamaria por bacterias patógenas, como son *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Mycoplasma* spp., y algunos coliformes como *Escherichia coli* (2).

*Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) es uno de los principales agentes etiológicos causante de la mastitis clínica y subclínica en los bovinos. Es un patógeno dependiente de la ubre y susceptible a una amplia variedad de antibióticos. Sin embargo, su prevalencia en rebaños lecheros afectados con mastitis varía de menos de 10 % en Canadá y países del norte de Europa, más de 90 % en China y aproximadamente 50 % en América del Sur (4,5,6). Esta bacteria es altamente contagiosa entre las vacas, se disemina principalmente durante el ordeño, ya que puede sobrevivir por periodos cortos en las manos del ordeñador, en equipos de ordeño y otros instrumentos (7). Recientes trabajos han demostrado que *S. agalactiae* no es un micorganismo intramamario obligado y han identificado su presencia en muestras ambientales y de heces fecales de rebaños afectados por mastitis (8).

Esta bacteria se describe como un importante patógeno en mujeres embarazadas y neonatos; frecuentemente se ha asociado a casos de meningitis y sepsis neonatal; también puede afectar la inmunocompetencia en edades tempranas y adultos mayores. Por tal razón, la identificación y el diagnóstico temprano de este microorganismo, así como su control y prevención resultan fundamentales para la salud animal, humana y la economía (9,10,11).

El diagnóstico microbiológico de este microorganismo a partir de la leche es un método de rutina y se considera la prueba “gold standard”

para su identificación; sin embargo, se limita por la naturaleza dinámica de las infecciones y el tiempo que se requiere para su culminación. En las últimas décadas se han desarrollado varios métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en Inglés polymerase chain reaction), para la identificación directa de *S. agalactiae* en la leche con una alta especificidad y sensibilidad; que pueden desarrollarse en menos de 24 h y resultan particularmente útiles con muestras de tanques de leche (12,13).

En Cuba, *S. agalactiae* es uno de los principales agentes causales de la mastitis bovina; en la presente década, se informan valores de prevalencias superiores a 10 % del patógeno en rebaños bovinos, lo cual es una evidencia de falta de medidas básicas para la prevención y el control del microorganismo (2,14,15), situación que obliga a realizar estudios dirigidos a esclarecer este complejo escenario.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar la presencia de *S. agalactiae* en leche de rebaños bovinos afectados con mastitis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, no probabilístico, de conveniencia y corte transversal en 14 vaquerías, en el periodo de septiembre a diciembre de 2018 en el occidente de Cuba. Las lecherías analizadas se encontraban en la misma zona geográfica; tres estaban conformadas por animales de la raza Holstein (205), siete con animales de la raza “Siboney de Cuba” (310) y cuatro con vacas Jersey (325). Los criterios de inclusión fueron bovinos hembras en edad reproductiva y en periodo de lactancia. Todos los rebaños estaban sometidos a doble ordeño, mecanizado.

Para determinar los animales sospechosos de presentar mastitis clínica y subclínica, se examinaron 3360 cuartos provenientes de 840 animales. Se tomaron 2 mL de leche de cada cuarto de la ubre y se realizó la prueba de *California Mastitis Test* (CMT) (CENMAST®, Cuba). Se colectaron 574 muestras de leche con criterio de inclusión que fueran positivos a la prueba de CMT (con grados de reaccionante entre ++ y +++ y casos clínicos) y que las vacas estuvieran entre 30 y 280 días de lactancia.

Se calculó la prevalencia de mastitis general (clínica+subclínica), clínica y subclínica, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = (\text{Número de animales positivos} / \text{Número de animales muestreados}) * 100$$

Se realizó el análisis de comparación de proporciones binomial entre las muestras y las diferentes formas de presentación de la enfermedad mediante el paquete estadístico Compaprop (16).

A todos los cuartos de las ubres considerados con mastitis clínica y subclínica de grado dos y tres, se les desinfectó la punta de los pezones con un algodón embebido en una solución de etanol a 70 % y se colectaron aproximadamente 10 mL de leche en tubos estériles con tapa de rosca de 15 mL. Las muestras se conservaron en congelación a -20°C hasta su análisis en el Laboratorio de Microbiología del Laboratorio de Ensayos para el Control de la Calidad de los Alimentos (CENLAC) del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

### Cultivo bacteriológico de las muestras de leche

Las muestras de leche se descongelaron a 37°C y se homogenizaron por agitación; posteriormente se sembraron 100 µL de cada una en placas de agar base (BIOLIFE, Italia) suplementada con 7 % de sangre desfibrinada de carnero (CENPALAB, Cuba). Las placas se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C. Las colonias con características morfológicas típicas de *S. agalactiae* (pequeñas, claras de aproximadamente 2 mm de diámetro, lisas y con β-hemólisis leve) se analizaron con las pruebas de catalasa, oxidasa y tinción de Gram. Los cultivos que revelaron cocos Gram positivos en forma de cadena, oxidasa y catalasa negativos, se sembraron en medio selectivo de Edward (OXOID, Inglaterra) suplementado con 7 % de sangre desfibrinada de carnero. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C. Las colonias con características presuntivas de *S. agalactiae* (pequeñas, con tonalidad azul) se sometieron a la prueba de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP), donde se sembró una estría de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) en el medio de placas de Agar base sangre y las líneas

de cada una de las cepas sospechosas, así como las cepas de control positivo y negativo se estiraron perpendicularmente a la de *S. aureus*. Las cepas *S. agalactiae* (ATCC13813) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. La distancia entre dos líneas perpendiculares fue aproximadamente de 1-2 mm. Las placas se incubaron aeróbicamente a 37°C por 18-24 h. La reacción de CAMP positiva se observó en forma de punta de flecha de beta-hemólisis en la unión de las líneas perpendiculares (17).

### Extracción de ADN a partir de colonias de *S. agalactiae*

Para la extracción de ADN se empleó la metodología descrita por Perreten *et al.* (18) con modificaciones. Se partió de cultivos en Agar Nutriente (BIOCEN, Cuba) de cada cepa identificada presuntivamente como *S. agalactiae*, incubadas por 48 horas a 37°C. Se tomó ½ asada del cultivo y se introdujo en 450 µL de tampón de lisis (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5; Tween 20 (0,05 %) y 0,24 mg / mL de proteinasa K) durante 1 hora a 60°C, seguido de una desnaturalización de 15 minutos a 95°C. A continuación, se centrifugó a 10 000 rpm (Centrifuge Eppendorf 5415; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) por cinco minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf. El ADN se precipitó en dos volúmenes de etanol absoluto (Merck, Alemania) y 0,1 volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y se incubó a -20°C durante 24 horas. A continuación, se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento de ADN se lavó una vez con etanol a 70 % y, después de 5 minutos de centrifugación a 10 000 rpm, se secó al vacío y se resuspendió en 100 µL de agua estéril libre de nucleasas.

La pureza e integridad del ADN extraído se verificó por electroforesis en gel agarosa a 0,8 %, teñido con bromuro de etidio y posterior visualización en un transiluminador de luz ultravioleta (Macrovue 2011, LKB). La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm con espectrofotómetro (ETX-F20-L).

Se realizó la identificación por PCR mediante la amplificación de un fragmento de 270 bp del segmento intergénico 16S - 23S rRNA específico para *S. agalactiae*. Se utilizaron los cebadores STRA-AgI F-5' - AAGGAAACCTGCCATTTG - 3'; STRA-AgII R - 5'-TTAACCTAGTTTCTTTAAAAGTAGAA - 3', (13). La reacción se realizó en un volumen final de 2,5 µL que contenía: 0,625 U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), 5µL de solución tampón 5X Green GoTaq® Flexi, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 0,5 µL de la mezcla de dNTPs 10mM, 0,4 µM de cada cebador y 3 µL de ADN. La PCR se realizó en un termociclador eppendorf Termal cycler C1000®, con el siguiente perfil térmico: un ciclo inicial de 94°C por tres minutos, 40 ciclos en condiciones de 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos y 72°C por un minuto y un ciclo final de 72°C durante siete minutos. Los productos resultantes se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en 0,5X Tris -Borato-EDTA. Los geles se tiñeron con una solución de 0,5 g/mL de bromuro de etidio; posteriormente, se visualizaron en un transiluminador UV (Macrovue 2011, LKB) y se fotografiaron.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Prevalencia de mastitis

Los valores de prevalencia de mastitis (general), clínica y subclínica (grado dos y tres), a nivel de animales en cada una de las razas estudiadas se muestran en la [Tabla 1](#).

De acuerdo a los resultados de la prueba de CMT y al examen clínico realizado al momento

del ordeño, la prevalencia general de mastitis fue superior a 43 % para el total de animales y entre 30 y 50 % en las tres razas de animales analizados con cualquiera de las manifestaciones de la enfermedad ([Tabla 1](#)).

Los valores de mastitis por animal resultaron ligeramente superiores a 39,1 %, valor referido por Ruiz *et al.* (15) en 383 animales con ordeño mixto. Sin embargo, fueron inferiores a los valores superiores a 60 %, reportados con anterioridad en Cuba (19,20,21,22) en rebaños con ordeño mecanizado. De igual manera, resultaron inferiores a 45,4 % referido por Sanchez *et al.* (23) en Colombia y a datos de África superiores a 60 % (24).

Los valores de prevalencia para mastitis clínica general obtenidos en este estudio se encuentran entre los datos reportados en Cuba por Armenteros *et al.* (25) y Novoa *et al.* (21), de 3,0 y 5,0 %; así como los de Ruiz *et al.* (15,19) de 0,9 % y 1,8 % en rebaños predominantemente Siboney y con ordeño mecánico, respectivamente. Sin embargo, cuando este parámetro se analizó por raza se observaron coincidencias entre los bajos valores obtenidos en este estudio para el Siboney de Cuba y Jersey con los datos referidos por Ruiz *et al.* (15,19), al igual que el 5,36 % observado en la raza Holstein y los valores encontrados por Armenteros y *et al.* (25), Relova *et al.* (20) y Novoa *et al.* (21), quienes refirieron valores superiores a 4 %. El diagnóstico clínico y/o subclínico depende de cuán detenidamente se observe a la vaca y sugiere que los valores muy bajos de mastitis clínica se debe, en ocasiones, a falta y/o deficiencias de diagnóstico (15).

**Tabla 1.** Prevalencia de mastitis clínica y subclínica según el tipo de raza. Periodo septiembre-diciembre 2018. / *Prevalence of clinical and subclinical mastitis according to breed type. Period September-December 2018.*

Criterios	Razas de los animales			
	Raza Holstein	Raza Siboney	Raza Jersey	Total de animales
Animales examinados	205	310	325	<b>840</b>
Animales Positivos CMT	88	164	113	<b>365</b>
Prevalencia general mastitis (%) x animal	42,92 <sup>b</sup>	<b>52,92<sup>a</sup></b>	34,76 <sup>b</sup>	<b>43,45</b>
No. MCL (%)	<b>11 (5,36)<sup>a</sup></b>	3 (0,96) <sup>b</sup>	4 (1,23) <sup>b</sup>	<b>18 (2,14)</b>
No. MSC (%)	77 (37,56) <sup>b</sup>	<b>161 (51,93)<sup>a</sup></b>	109 (33,53) <sup>b</sup>	<b>347 (41,3)</b>

Leyenda: MCL (mastitis clínica), MSC (mastitis subclínica)

Filas de la tabla, con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

La prevalencia de mastitis subclínica, calculada solo a partir de los resultados grado 2 y 3 del CMT, mostró un valor general por encima de 40 %.

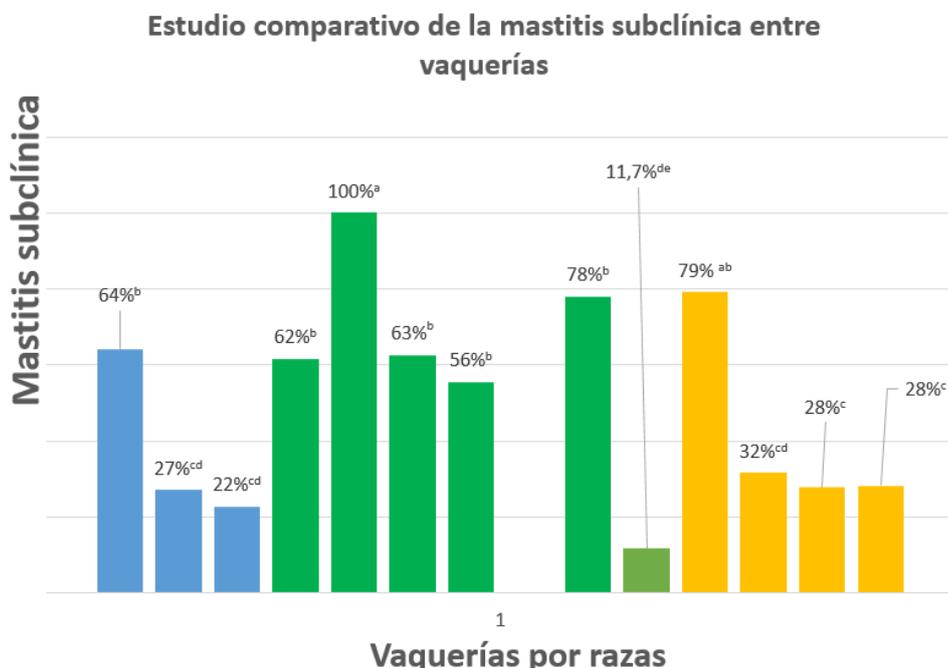
En los lecherías estudiadas se obtuvieron diferentes valores de prevalencia que abarcan un rango desde 11,7 a 100 %; además, se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre estas, con respecto a los valores de prevalencia de mastitis (Fig. 1), lo cual demuestra que, además de la raza, existen otros elementos predisponentes entre los rebaños estudiados, asociados con prácticas de manejo, el número de partos o lactancias, la etapa de la lactancia, el nivel de producción y la rutina e higiene del ordeño que, sin duda, influyeron en estos resultados. La enorme cantidad de vacas con mastitis presentes en algunos de los rebaños es muestra de un ineficiente control de la mastitis infecciosa y de un pobre manejo de la mastitis mediambiental, problemas que también se señalan por otros autores en trabajos recientes en Cuba (14).

La mastitis subclínica es de 15-40 % más prevalente que la mastitis clínica en rebaños afectados (19). En el presente estudio la

diferencia observada, de manera general, fue de aproximadamente 40 %. De modo más específico, en las razas Holstein y Jersey fue cerca de 30 %; sin embargo, en la raza Siboney de Cuba se observó 51 %.

Los valores promedio de mastitis subclínica general y a nivel de razas de este estudio, a pesar de no incluir los valores de grado traza y 1 de CMT, resultaron similares o superiores al 38,2 % referido por trabajos recientes (15) y a los 28,3 y 18,1% reportados en la década pasada (26,27), respectivamente. En trabajos anteriores realizados en Cuba en el siglo pasado, y mencionados por Ruiz *et al.* (2), también se encontraron prevalencias superiores (45,1 y 45,5 %); de igual manera, en la década pasada fueron referidos 62,2 y 76,9 % (20,22).

Trabajos más recientes mostraron valores superiores al obtenido en esta investigación, como es el caso de 47,3 y 59 % en ganado Siboney con ordeño mecanizado (14,19), inferior también a 60 % referido por García *et al.* (3) en un estudio realizado igualmente en el occidente de Cuba con animales Holstein y ordeño mecanizado.



Leyenda: Columnas azules: (Vaq. Holstein), Columnas Verdes: (Vaq. Siboney), Columnas Amarillas: (Vaq. Jersey)

Columnas, con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

**Figura 1.** Estudio comparativo de la prevalencia de mastitis bovina subclínica por vaquerías./ *Comparative study of the prevalence of subclinical mastitis per units.*

El análisis estadístico de los datos de prevalencia de mastitis encontradas en las razas estudiadas confirmó con valores estadísticamente significativos las diferencias observadas. Para la mastitis general y subclínica, las razas Holstein y Jersey no mostraron diferencias entre ellas, pero sí respecto a la raza Siboney de Cuba y, para el caso de la mastitis clínica las razas Siboney y Jersey, no fueron diferentes entre ellas, pero sí con relación a Holstein (Fig. 2).

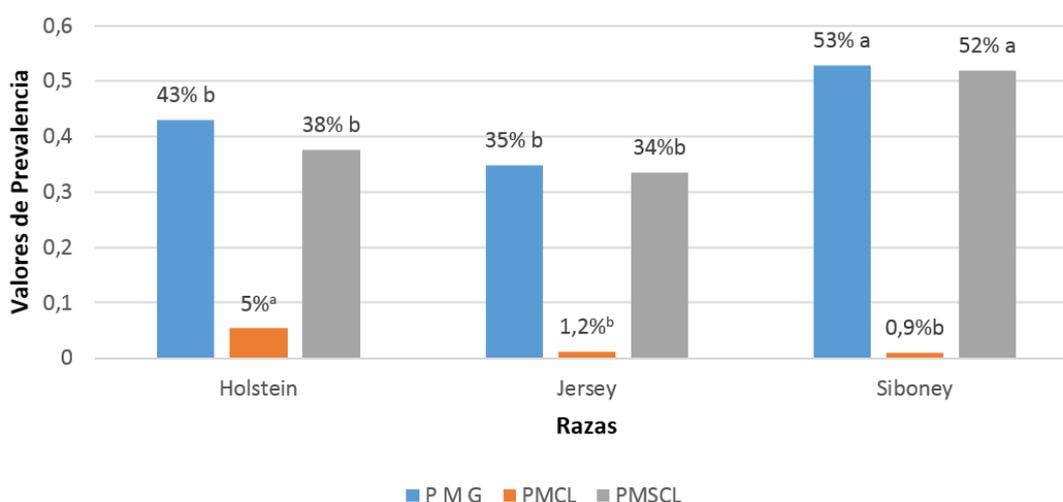
Este resultado es una evidencia de la influencia de la raza sobre la prevalencia de la enfermedad. Varios autores han comentado acerca de la influencia racial en la mastitis bovina y se ha evidenciado la elevada susceptibilidad de razas como la Holstein con respecto a otros cruces (20,28). Coincidiendo con estos reportes, en el presente estudio los mayores valores de mastitis clínica se observaron en rebaños de esta raza. Sin embargo, los mayores valores de mastitis general y subclínica estuvieron asociados a los rebaños mestizos (5/8Holstein -3/8Cebú) de Siboney de Cuba, con valores similares a los mostrados por autores cubanos en años recientes (14,19).

En este sentido, autores como Lakew *et al.* (24) refirieron prevalencias de mastitis estadísticamente superiores en ganado de cruce

(Holstein-Cebú) con respecto al ganado Cebú en Etiopía. Algunos factores intrínsecos del animal asociados a la mastitis, como son la forma de los pezones, el tono del esfínter, la anatomía del canal del pezón y la susceptibilidad al debilitamiento del ligamento suspensorio (ubre pendulosa), están predispuestos genéticamente (24,29). Se ha demostrado que la selección genética dirigida al aumento de la producción de leche tiene un efecto perjudicial sobre el estado de salud de la glándula mamaria. Por lo tanto, la enfermedad es un problema, principalmente en rebaños de alta producción que se crían de forma intensiva (30).

Se estima que un rebaño lechero en apariencia sano tiene entre 15 y 45 % de sus vacas en producción con mastitis subclínica en algún momento de su periodo de producción y que la capacidad potencial para producir leche se reduce hasta 35 % (31). Los valores promedio de prevalencia de mastitis subclínica obtenidos en este estudio fueron inferiores a 40 %, lo que parece sugerir una cierta mejoría en la salud de la ubre, principalmente en los rebaños de las razas Holstein y Jersey, a diferencia de los rebaños Siboney de Cuba, en los cuales resulta preocupante la elevada prevalencia observada, ya

Razas Vs Prevalencia de mastitis por animal



Leyenda: PMG: Prevalencia mastitis general, PMCL: Prevalencia mastitis clínica, PMSCL: Prevalencia mastitis subclínica.

Columnas, de igual color, con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

**Figura 2.** Estudio comparativo de la prevalencia de mastitis bovina (General, Clínica y Subclínica) por animal entre razas./ *Comparative study of the prevalence of bovine mastitis (General, Clinical and Subclinical) by animal among breeds.*

que se supone que están mejor adaptados a las condiciones tropicales de Cuba y componen la mayoría de los rebaños lecheros cubanos. Estos resultados pueden estar asociados a la falta de higiene durante la rutina de ordeño, mal funcionamiento o mal estado de las máquinas y accesorios utilizados durante el ordeño de estos rebaños, además de las afectaciones en el fluido eléctrico que pueden provocar demoras o suspender el proceso de ordeño (19).

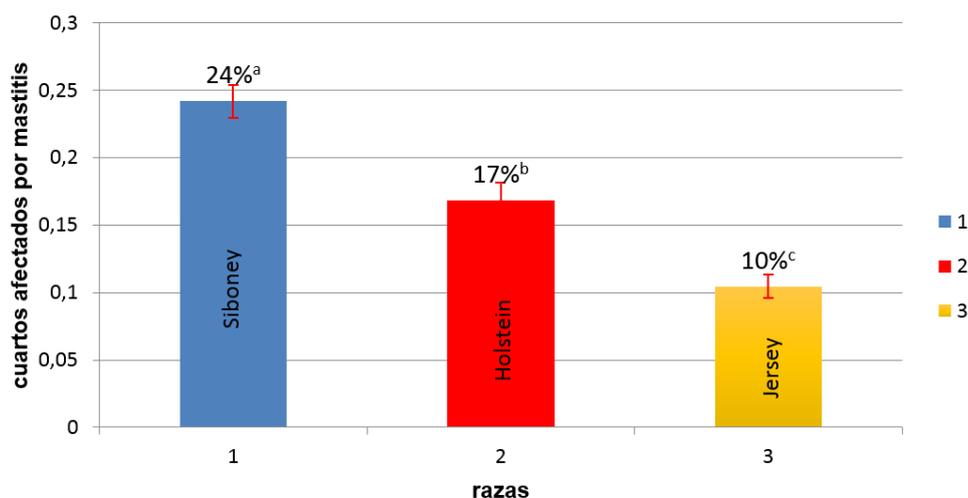
La variabilidad en los reportes de prevalencia de cualquiera de las manifestaciones de mastitis sugiere la complejidad de esta enfermedad, la cual envuelve la interacción de múltiples factores, principalmente los relacionados con las prácticas de manejo del rebaño, la rutina e higiene de los sistemas de ordeño, la raza de los animales del rebaño, las condiciones ambientales, los factores de riesgo para el animal, los agentes causales y los dependientes del animal, como son la estructura de la ubre, la edad, los días y la cantidad de lactancias; por tanto, es de esperarse que las prevalencias varíen entre los diferentes escenarios donde se evalúe este parámetro (24,30).

Se observó una prevalencia general de 4,22 % de cuartos atrofiados, donde el mayor por ciento se detectó en animales de la raza Siboney de Cuba. El análisis de comparación de proporciones para los cuartos atrofiados indicó diferencias significativas entre las razas Siboney

y Jersey, pero no se encontró entre estas y la raza Holstein. Esta elevada prevalencia de cuartos atrofiados demuestra la presencia de mastitis crónica en estos rebaños que conlleva a cuartos atrofiados, así como la no aplicación de antibióticos para el tratamiento inmediato de mastitis clínica o el inadecuado manejo de los animales afectados y de esta manera evitar la pérdida del cuarto. Este valor resulta superior a 3,8; 3,1 y 3 % reportados con anterioridad (14,15,19) y es muy similar a datos referidos en la década pasada (4,8 %) en rebaños con ordeño mecánico en la provincia Mayabeque (32).

Coincidentemente, la raza Siboney fue también la que más cuartos afectados por mastitis mostró. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres razas al analizar el número de cuartos afectados por mastitis, en cualquiera de sus variantes (Fig. 3). Desde el punto de vista de los cuartos, los valores de prevalencia de mastitis observados resultan muy inferiores a los reportados en Cuba en los últimos años (14,15,19); lo anterior pudo estar dado a que en el presente análisis no se consideraron los resultados de traza y grado 1 de mastitis por el CMT.

En la Tabla 2 se ilustran los cuartos afectados por animal y por raza. El 43,46 % de los animales analizados tenía al menos un cuarto afectado por mastitis. El 29,52 % (248) de las muestras colectadas correspondieron a animales



Columnas, con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )  
**Figura 3.** Estudio comparativo de la prevalencia de cuartos afectados por razas. / Comparative study of the prevalence of breed-affected quarters

**Tabla 2.** Distribución de cuartos afectados por mastitis bovina en los rebaños estudiados según a la raza./ *Distribution of milk quarters affected by bovine mastitis in the studied herds according to breed*

Razas	Vacas sin cuartos afectados	Vacas C/ 1 cuarto afectado	Vacas C/ 2 cuartos afectados	Vacas C/ 3 cuartos afectados	Vacas C/ 4 cuartos afectados	Total
Siboney	146	92	28	25	19	310
Holstein	117	58	14	12	4	205
Jersey	212	98	9	6	0	325
<b>Total</b>	475	248	51	43	23	840



**Figura 4.** Tinción de gram y prueba de CAMP positivos indicativos de cultivos con colonias de características típicas de *S. agalactiae*. / *Gram stain and positive CAMP test indicative of cultures with colonies of typical characteristics of S. agalactiae*.

individuales, 6,01 % de los animales mostró dos cuartos afectados, 5,11 % tres cuartos afectados y 2,73 % de las vacas muestreadas tenían los cuatro cuartos afectados. Es importante señalar que, de estos últimos animales, el mayor por ciento correspondió a animales Siboney de Cuba y no se encontraron animales de la raza Jersey con cuatro cuartos afectados. Siboney de Cuba fue la raza que más animales presentó con más de un cuarto afectado, seguido de las Holstein y, en menor medida, las vacas de la raza Jersey.

En algunos estudios las vacas de la raza Holstein han mostrado un riesgo mayor de sufrir mastitis, en comparación con vacas de las razas Jersey y de otros cruces (28). La selección intensa por parámetros de producción en algunas razas lecheras podría influir negativamente en su propensión a mastitis, es decir, que las vacas con altos registros de producción son más propensas a contraer mastitis (33).

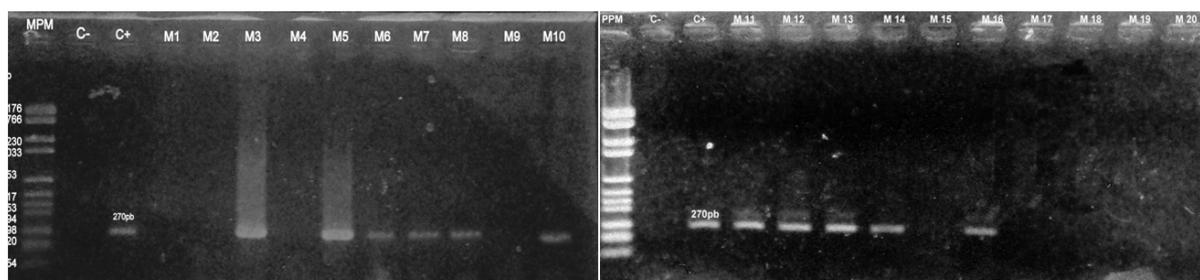
### Identificación de *S. agalactiae*

De las 574 muestras de leche analizadas por cultivo microbiológico, en 9,93 % (n=57) se aislaron cepas con características morfológicas y bioquímicas distintivas de *S. agalactiae* (Fig. 4). Los resultados de prevalencia del

microorganismo fueron superiores a 6,8 % que mencionaron Nova *et al.* (22) en trabajos realizados en rebaños con ordeño mecanizado en provincias del occidente de Cuba. Sin embargo, resultaron inferiores a 12 % mencionado por Relova *et al.* (20) en ganado Holstein de la provincia Mayabeque; al 16 % reportado por Alfonso *et al.* (14) en rebaños Siboney de Cuba en la provincia Villa Clara y a 68 % referido por Ruiz *et al.* (19). Estos resultados están en concordancia con los referidos por Ruiz *et al.* (15) con 10 % de prevalencia de este patógeno en rebaños con ordeño mixto de diferentes zonas geográficas de Cuba.

El análisis, por el ensayo de PCR, de las 57 aislados diagnosticados presuntamente como *S. agalactiae* reveló una banda de 270 pb en 43 y resultó negativo en 14 de ellos (Fig. 5). Los cebadores para la amplificación del segmento intergénico 16S-23S RNA de *S. agalactiae* empleados en este estudio se usan ampliamente en el diagnóstico específico del patógeno en muestras de leche (13,34).

Phuektes *et al.* (13) y Wu *et al.* (34) han referido que 5,9 % (1/17) y 3,8 % (7/182) de las muestras con diagnóstico microbiológico positivo a *S. agalactiae*, revelaron un resultado por PCR



**Fig. 5.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5 %. Productos de la PCR para *S. agalactiae* con cebadores STRA AgI / STRA AgII (Fragmento de 270 pb). Muestras positivas: 3,5,6,7,8,10,11-14, y 16. Muestras negativas: 1, 2, 4, 9, 15, 11,15, 17-20. MPM: Marcador de peso molecular (MWM -VI). / *Agarose gel electrophoresis 1.5 %. PCR products for S. agalactiae with primers STRA AgI / STRA AgII (Fragment of 270 bp). Positive samples: 1, 2, 4, 9, 15, 11,15, 17-20. Molecular Weight Marker (MWM -VI)*

negativo. En el presente estudio, 24,56 % (14/57) de las muestras, inicialmente diagnosticadas como *S. agalactiae*, mostró este comportamiento.

Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico microbiológico del *S. agalactiae* se basó en características del cultivo, la negatividad para las pruebas catalasa y oxidasa y positividad a la prueba de Camp. Las dos primeras son ensayos que definen al género *Streptococcus*, mientras el factor CAMP se considera una prueba presuntiva para identificación de *S. agalactiae* (15,17).

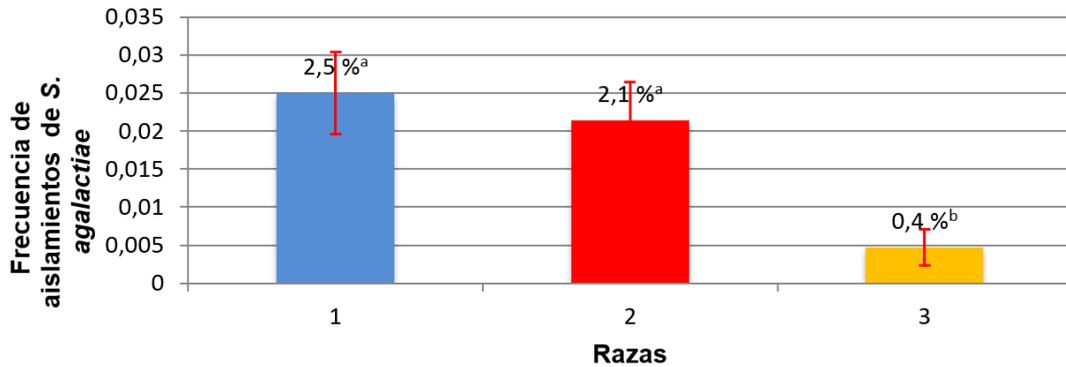
Según varios autores, el factor CAMP es altamente específico para *S. agalactiae*, por lo que casi la totalidad de las cepas de esta especie muestran una reactividad positiva al ensayo (17). Sin embargo, se describe que otras especies de *Streptococcus* poseen genes similares al *cfb* que codifica para este factor; como *Streptococcus piogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus bovis*, las cuales bajo determinadas condiciones muestran una reactividad similar a la del *S. agalactiae* en este ensayo (35,36).

Las 14 muestras negativas a la PCR pudieran corresponder a algunas de las otras especies de *Streptococcus* mencionadas anteriormente. En la última década se han referido prevalencias de *Streptococcus* spp. en rebaños afectados por mastitis en Cuba, con valores que oscilan entre 2,9 y 75 % (2,3,14,15,19), razón por la cual se puede inferir la circulación de algunas de estas cepas de *Streptococcus* spp. en los rebaños estudiados.

Los aislados positivos se obtuvieron de 40 (10,95 %) vacas provenientes de ocho de las lecherías estudiadas, lo que evidencia que más de 50 % de los rebaños estudiados estaban afectados por *S. agalactiae*. La diferencia entre el número de aislamientos realizados y animales infectados se debe al aislamiento del microorganismo en dos de sus cuartos en tres animales (dos Holstein y uno Siboney); se aisló el microorganismo en dos de sus cuartos.

La mayor frecuencia de aparición del microorganismo se encontró en los rebaños Siboney con 20 animales procedentes de cuatro unidades, seguido de los rebaños Holstein con 16 ejemplares de dos unidades y Jersey con cuatro vacas de dos unidades. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de aislados encontrados entre las razas Holstein y Siboney, aunque sí entre estas dos respecto a la raza Jersey (Fig. 6). La lechería con mayor frecuencia de aislados y animales infectados fue de la raza Holstein, con 13 aislamientos provenientes de 11 animales, el resto de las lecherías osciló entre tres y 10 aislamientos.

En el Tabla 3 se puede observar la relación entre los aislamientos de *S. agalactiae*, la clasificación por CMT y la raza de los animales de donde se aisló la bacteria. El 7,2 % (40/555) de los cuartos con mastitis subclínica y el 15,8 % (3/19) de los cuartos clínicos resultaron infectado por *S. agalactiae*. Se observó la mayor prevalencia de la bacteria en los cuartos con mastitis subclínica grado tres y dos, los cuales



Leyenda: Columnas azules: Siboney, Columnas Verdes: Holstein, Columnas Amarillas: Jersey  
Columnas con superíndices diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

**Fig. 6.** Estudio comparativo de la prevalencia de *S. agalactiae* por razas/ *Comparative study of the prevalence of S. agalactiae by breed.*

**Tabla 3.** Aislamientos de *S. agalactiae* vs cuartos analizados por razas y clasificación por CMT. / *S. agalactiae* insulates vs quarters analyzed by breed and classification by CMT.

Razas	Cuartos muestreados	No. aislamientos <i>S. agalactiae</i> (%)	2X	3X	CI
Holstein	138	18 (3,13) <sup>a</sup>	7	9	2
Siboney	300	21 (3,65) <sup>a</sup>	6	15	0
Jersey	136	4 (0,52) <sup>b</sup>	1	2	1
<b>Total</b>	<b>574</b>	<b>43 (7,49)</b>	<b>14 (0,3)<sup>b</sup></b>	<b>26 (0,6)<sup>a</sup></b>	<b>3 (0,06)<sup>c</sup></b>

representaron el 93,02 % del total de aislados identificados, el resto se identificó en cuartos clínicos.

Las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre las tres clasificaciones de cuartos analizados y los aislamientos con *S. agalactiae* coinciden con autores que refieren que, por lo general, las infecciones con este microorganismo son causa de casos subclínicos y solo son responsables de un pequeño porcentaje de los cuartos con mastitis clínicas. Si se considera la inflamación de las ubres, los problemas sistémicos de la vaca o la pérdida de cuartos mamarios, las infecciones con *S. agalactiae* son relativamente leves. Normalmente, estas infecciones no resultan en mastitis agudas o en la muerte del animal. Sin embargo, algunos de los cuartos infectados pueden dejar de producir leche (31).

Para controlar eficazmente la mastitis bovina se requieren pruebas sensibles, rápidas y específicas que permitan detectar e identificar, de manera certera, los principales patógenos que la causan. Los valores de prevalencia de mastitis, y específicamente de la infección por *S. agalactiae*

encontrados en el presente estudio, no resultan alarmantes si se comparan con trabajos similares en Cuba (2) y con reportes internacionales (4,24); no obstante, es importante recordar que *S. agalactiae* se considera una de las causas más comunes del incremento en el recuento de células somáticas en leche de tanque, lo que implica que disminuya la calidad físico-química e higiénico sanitaria de la leche y conduzca a pérdidas económicas considerables para el productor (31).

El empleo de herramientas moleculares para la identificación de este importante patógeno durante este estudio permitió incrementar la especificidad en la identificación del mismo, corroborando una vez más la utilidad de este tipo de metodologías en el diagnóstico de microorganismos de interés para la salud y la economía.

La naturaleza altamente contagiosa de este microorganismo, desde animales infectados hacia no infectados durante las rutinas de ordeño y manejo del rebaño (6), así como las recientes evidencias de nuevas rutas de transmisión zoonótica y/o antropozoonótica entre humanos y vacas (8,10), sugieren que deben implementarse

con urgencia programas preventivos y de diagnóstico de forma regular con el objetivo de controlar o mitigar la infección de *S. agalactiae* en rebaños lecheros afectados, para así disminuir los riesgos que este microorganismo implica para la salud humana y animal en estas interfaces.

## REFERENCIAS

1. Jamali H, Barkema HW, Jacques M, Lavallée-Bourget EM, Malouin F, Saini V, et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2018;101(6):4729-4746. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13730>
2. Ruiz Gil A, Peña Rodríguez J, Remón Díaz D. Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. *Rev Prod Anim.* 2016;28(2-3):39-50.
3. García F, Sánchez T, López O, Álvarez M. Prevalence of subclinical mastitis and associated microorganisms. *Pastos y Forrajes.* 2018;41(1):33-38.
4. Ramírez Vásquez N, Fernández-Silva JA, Palacio LG. Tasa de incidencia de mastitis clínica y susceptibilidad antibiótica de patógenos productores de mastitis en ganado lechero del norte de Antioquia, Colombia. *Rev Med Vet (Bogotá).* 2017;(36):75-87.
5. Carvalho-Castro GA, Silva JR, Paiva LV, Custódio DAC, Moreira RO, Mian GF, et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. *Brazilian J Microbiol.* 2017;48:551-559.
6. Jørgensen HJ, Nordstoga AB, Sviland S, Zadoks RN, Sølverød L, Kvitle B, et al. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds - rewriting the textbooks?? *Vet Microbiol.* 2016;184:64-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.014>
7. Tomazi T, de Souza Filho AF, Heinemann MB, dos Santos MV. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. *PLOS ONE.* 2018;13(6):e0199561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199561>
8. Cobo-a C, Sanchez J, Rodriguez-lecompte JC, Ceballos- A, Zadoks RN. *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds. *PLOS ONE.* 2018;13(12):e0208990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208990>.
9. Chen SL. Genomic insights into the distribution and evolution of group B streptococcus. *Front Microbiol.* 2019,1:1447.doi:10.3389/fmicb.2019.01447
10. Botelho ACN, Ferreira AFM, Fracalanza SEL, Teixeira LM, Pinto TCA. A perspective on the potential zoonotic role of streptococcus agalactiae: Searching for a missing link in alternative transmission routes. *Front Microbiol.* 2018;9:1-5.
11. Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci.* 2017;100(12):10381-10397. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
12. Ahmadi M, Rohani SMR, Ayremlou N. Evaluation of *Streptococcus agalactiae* detection by PCR in Milk and its comparison to other microbiological methods. *Iran J. Microbiol.* 2009;1(4):28-31. <http://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/view/36>
13. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 2001;84(5):1140-8. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74574-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74574-2)
14. Alfonso D, Zanette J, Ruiz K, Peña J, González Y, Reinoso M. Situación de la mastitis subclínica y evaluación de los procesos lecheros en vaquerías de la provincia Villa Clara, Cuba. *Rev Salud Anim.* 2017;39(3):pp.9.
15. Ruiz AK, González D, Peña J. Situación de la mastitis bovina en Cuba. *Rev Electron Vet.* 2012;13(12).
16. Castillo Duvergel Y, Miranda I. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. *Rev Protección Veg.* 2014;29(3):231-234.
17. Guo D, Xi Y, Wang S, Wang Z. Is a positive Christie-Atkinson-Munch-Peterson (CAMP) test sensitive enough for the identification of *Streptococcus agalactiae*? *BMC Infect. Dis.* 2019;19(7). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3561-3>
18. Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehrlich R, Kuhnert P, Frey J. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance

- genes of gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2291-2302.
19. Ruiz AK, Peña J, González D, Ponce P. Prevalence, somatic cell count and etiology of bovine mastitis in Cuban herds from Mayabeque province using hand and machine milking. *Rev. Salud Anim.* 2014;36(1):7-13.
  20. Relova D, Armenteros M, Capdevila JZ. Caracterización de la situación clínico-epizootiológica de la mastitis bovina en vacas primerizas Holstein de una lechería especializada. *RedVet.* 2008;IX(9).
  21. Novoa, R. Evaluación epizootiológica y económica de la mastitis bovina en rebaños lecheros especializados de la provincia de Cienfuegos. (Tesis en Opción al Grado Científico de Máster en Ciencias, Especialidad de Medicina Preventiva Veterinaria( Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez", Cuba. 2003. p.116.
  22. Novoa R, Armenteros M, Abeledo MA, Casanovas E, Valera R, Pulido CCJ. Clínica Y Subclínica Risk Factors Associated To Clinical and Subclinical Mastitis. *Rev Salud Anim.* 2005;27(2):84-88.
  23. del Pilar Sánchez Bonilla M, Murillo NPG, Almanza IJP. Prevalence of bovine mastitis in the anaime canyon, a colombian dairy region, including etiology and antimicrobial resistance. *Rev Investig Vet del Peru.* 2018;29(1):226-239.
  24. Lakew BT, Fayera T, Ali YM. Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 2019;51(6):1507-1513.
  25. Armenteros M, Ponce P, Capdevila J, Zaldívar V, Hernández R. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras de primer parto y patrón de sensibilidad de las bacterias aisladas en una lechería especializada. *Rev Salud Anim.* 2006;28(1):8-12.
  26. Insua A. Evaluación epizootiológica de la mastitis bovina en cuatro vaquerías. *RedVet.* 2008;IX(7):1-9.
  27. Cepero O, Camacho C, Castillo JC, Salado J. Conductividad Eléctrica y California Mastitis Test en la detección de la Mastitis Subclínicas. *RedVet.* 2005;VI:1-5
  28. Santivañez CS, Gómez OE, Cárdenas LÁ, Escobedo MH, Bustinza RH, Peña J. Prevalencia y factores asociados a la mastitis subclínica bovina en los Andes peruanos. *Vet Zootec.* 2014;7(2):92-104.
  29. Abdel-Shafy H, Bortfeldt RH, Reissmann M, Brockmann GA. Validating genome-wide associated signals for clinical mastitis in German Holstein cattle. *Animal Genetics.* 2018;49(1):82-85.
  30. Kibebew K. Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View. *J Biol Agric Healthc.* 2017;7(2):1-14.
  31. Kirk J, Mellenberger R. Programa de control de mastitis para vacas lecheras infectadas con *Streptococcus agalactiae*. DAIREXNET (actualizado el 16 de Agosto de 2019; citado el 11 de Noviembre de 2019). Disponible en <https://dairy-cattle.extension.org/>
  32. Soca PM, Suárez FYE, Soca PM, Pestano OM, Puro CA. Evaluación epizootiológica de la mastitis bovina en dos unidades ganaderas de la Empresa Pecuaria "El Cangre." *REDVET Rev Electrónica Vet.* 2005;VI(8):1-10.
  33. Oltenacu PA, Broom DM. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim Welf.* 2010;19(S):39-49.
  34. Wu J, Liu Y, Hu S, Zhou J. Development of a rapid PCR test for identification of *Streptococcus agalactiae* in milk samples collected on filter paper disks. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2008;21(1):124-130.
  35. Denamiel G. Mastitis bovina: variaciones en la detección de  $\beta$ -hemolisina y factor CAMP para la identificación. *Rev Med Vet. (B Aires).* 2013;94:24-27.
  36. Zárata MS, Jordá VL, Pacheco MV, Fernández CL, Smayevsky J. Modified spot CAMP test: A rapid, inexpensive and accurate method for identification of group B streptococci. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37(3):126-128.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Los autores de este trabajo declaran presentar una participación igualitaria en la concepción, ejecución y escritura de la investigación.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)