

19/06/2019

Aplicación de MALDI-TOF para la identificación de patogenos causantes de mastitis en vacas lecheras



En este estudio se demuestra como MALDI-TOF, un ensayo basado en cultivos, que facilita la identificación de una gran variedad de bacterias que hayan sido aisladas, permite identificar y diferenciar las especies NAS (*non-aureus staphylococci*) en muestras de leche recolectadas asépticamente de la mastitis bovina (infección de las glándulas mamarias). Sin embargo, también demuestra la necesidad de otros ensayos que confirmen la identificación precisa en muestras no lácteas o ambientales.

La técnica de MALDI-TOF ("Matrix-assisted laser desorption /Ionization time of Flight") es un ensayo dependiente de cultivo, rápido y fiable que permite identificar una gran variedad de bacterias aisladas. Funciona mediante el uso de excitación de proteínas con un láser para crear un patrón de proteínas de espectro único para cada microorganismo. Esta técnica se basa en la adquisición directa de impresiones digitales de proteínas a partir de microorganismos intactos, ya que estos perfiles varían considerablemente entre los microorganismos. Los resultados son comparados con miles de espectros en una base de datos de referencia y a partir de la cual, se llega a una identificación bacteriana. El ensayo proporciona una nueva plataforma de diagnóstico que supera las limitaciones de los diagnósticos tradicionales, que son laboriosos y

requieren mucho tiempo, y elimina la necesidad de fermentación de azúcares o el uso de kits de identificación. En los últimos años, los estudios de investigación han demostrado que MALDI-TOF es una herramienta de diagnóstico potente y fiable para la identificación y discriminación de los patógenos causantes de mastitis en ganado vacuno, incluyendo el *Staphylococci non-aureus* (NAS) de mastitis bovina. En resultados previos de estudios de investigación se ha visto que el uso del ensayo MALDI-TOF para la identificación de NAS a partir de la leche. Sin embargo, el ensayo nunca ha sido investigado por la identificación de NAS de muestras ambientales o no lácteas.

El objetivo de este estudio era validar la capacidad de tipificación del ensayo MALDI-TOF para la identificación y diferenciación de especies NAS de bovinos en muestras de leche y muestras de piel de los pezones asépticamente recolectadas de rebaños lecheros.

Para este estudio, se seleccionaron al azar entre 14 y 20 vacas con un elevado recuento de células somáticas (indicador de mastitis) de 8 rebaños lecheros. De estos animales se recogieron hisopos de piel de pezones y muestras de leche cruda de los cuartos traseros derecho e izquierdo. Estas muestras se recogieron de forma aséptica para su identificación preliminar utilizando el cultivo bacteriano. Las colonias de muestras con sospecha clínica de tener NAS se identificaron a nivel de especie mediante MALDI-TOF.

Se seleccionaron aleatoriamente de 14 a 20 vacas con un elevado recuento de células somáticas (indicador de mastitis) de 8 rebaños lecheros. De estos animales se recogieron hisopos de piel de pezones y muestras de leche cruda de los cuartos traseros derecho e izquierdo. Estas muestras se recogieron de forma aséptica para su identificación preliminar utilizando el cultivo bacteriano. Las colonias de muestras con sospecha clínica de tener NAS se identificaron a nivel de especie mediante MALDI-TOF.

De los 511 aislados de 284 cuartos (142 vacas), el 78% ($n = 399$) fueron identificados por MALDI-TOF. El porcentaje de NAS correctamente identificado de la leche (91%, 105/115) con MALDI-TOF fue mayor que el porcentaje de la piel de los pezones (68%, 268/396). De los aislados identificados, el 93% ($n = 373$) se identificaron con éxito como NAS, mientras que los 26 restantes (7%) mostraron ser otras especies bacterianas. De esos 26 aislamientos diferentes, 1 se originó a partir de leche (*Corynebacterium stationis*), mientras que 25 se originaron a partir de piel de pezón: *Aerococcus viridans* ($n = 7$), *Bacillus pumilus* ($n = 13$), *Enterococcus saccharolyticus* ($n = 1$), *Clostridium septicum* ($n = 1$), *Corynebacterium stationis* ($n = 2$) y *Corynebacterium casei* ($n = 1$). El MALDI-TOF identificó 85 (98/115) y 62% (245/396) de los aislados en la primera prueba. Los aislados que no se identificaron a nivel de especie en la primera prueba se sometieron a una segunda prueba y se identificaron 47 (8/17) y 32% (48/151) de piel de leche y pezón, respectivamente. Después de 2 rondas de MALDI-TOF, el 22% ($n = 112$) de los aislamientos no se identificaron, lo que representa 103 de la piel de los pezones y 9 de la leche. Dieciocho aislamientos sin identificación por MALDI-TOF se identificaron con éxito a nivel de especie mediante la secuenciación, donde 16 se identificaron correctamente como NAS, mientras los otros dos resultaron ser *Corynebacterium stationis*.

Nuestros resultados indican que MALDI-TOF es una herramienta útil para la identificación y tipificación de las especies NAS a partir de muestras de leche pero no es tan útil para la identificación de aislados de muestras no lácteas. Además, tanto en la primera como segunda ronda, el rendimiento de MALDI-TOF para la identificación de los aislados procedentes de la

leche (85 y 47%) fue mayor que para los procedentes de la piel de los pezones (62 y 32%). Una posible explicación es que estas bacterias no identificadas de la piel de los pezones provienen de su microbiota natural (bacterias comensales), las cuales no habían sido incluidas previamente en la base de datos BDAL (Bruker daltónicos); como no interesan a los diagnósticos microbiológicos no fueron considerados en la base de datos del MALDI-TOF. Además, nuestros resultados mostraron que la gran mayoría de los aislamientos de NAS no identificables se originaban a partir de la piel de los pezones. Una explicación razonable podría ser que estos aislamientos son nuevas especies de NAS. Otra razón es que estos aislamientos podrían ser especies NAS conocidas pero no estaban incluidas en la base de datos BDAL. Hay que tener en cuenta que los aislamientos de NAS originados en la piel de los pezones requieren de rondas extra para su identificación con MALDI-TOF en comparación con aquellos originados a partir de la leche. Este fenómeno se basa en el alto número de aislados a partir de la piel de mama que siguen sin identificar después de la primera y segunda ronda de identificación. Una posible explicación podría ser que las bacterias aisladas del ambiente podrían haber desarrollado una capa extra o una cápsula con material proteico como un medio de protección contra condiciones ambientales desfavorables.

Concluimos que MALDI-TOF es un ensayo fiable para la identificación y diferenciación de las especies NAS de muestras de leche recolectadas asépticamente. El ensayo podría ser utilizado para la identificación de las especies de NAS a partir de hisopos de piel de pezones, pero la confirmación con herramientas basadas en ácidos nucleicos es vital para la identificación precisa de algunas especies y cepas.

Este estudio fue parte del proyecto de investigación "STOPMAST" financiado por la Danish Milk Levy Foundation (Aarhus, Dinamarca). Además, el Dr. Yasser Mahmmod disfrutó de una beca del Programa de Becas Postdoctorales de Mérito (IDB-MSP), Banco de Desarrollo Islámico, Jeddah, Arabia Saudí.

Yasser Mahmmod
CReSA
Universitat Autònoma de Barcelona
Yasser.Mahmmod@uab.cat

Referencias

Mahmmod YS, Nonnemann B, Svennesen L, Pedersen K, Klaas IC. (2018). **Typeability of MALDI-TOF assay for identification of non-aureus staphylococci associated with bovine intramammary infections and teat apex colonization.** *Journal of Dairy Science*. DOI: [10.3168/jds.2018-14579](https://doi.org/10.3168/jds.2018-14579).

[View low-bandwidth version](#)