

Detección de anticuerpos frente a estafilococos en sangre y morfología colonial correspondiente en leche bovina

M. Monzón¹, M. Pérez¹, J.M. Hernandorena², M. Romeo³, J. Marco³, G. Bertrand⁴, A. Esnal⁵, I. Escobal⁵, C. Andrés⁶, J.L. Alabart¹, L. M. Ferrer⁷ y B. Amorena¹

¹CSIC-SIA (DGA) Unidades de Sanidad y Producción Animal, Montañana, 50080 Zaragoza; ²ITGV de Navarra, Ctra. del Sadar S/N, Edificio EL Sario, Pamplona, 31006 Navarra; ³SIMA, Gobierno Vasco, Derio, 48016 Vizcaya; ⁴Leche Pascual, Ctra. de Palencia S/N, Aranda de Duero, 09400 Burgos; ⁵Analítica Veterinaria; Mungivet, S.L., Aritz Bidea 18 Bajo, Mungía 48100 Vizcaya; ⁶Fincas Margen Izquierda-SIA (DGA), B. Movera, 50194 Zaragoza; ⁷Dpto. de Patología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50013, Zaragoza

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.- Las mastitis estafilocócicas crónicas representan una fuente de contagio, por lo que conllevan la eliminación del animal en cuestión. Para detectarlas, no siempre resulta factible aislar el germen, habiendo de recurrirse a indicadores indirectos como el mantenimiento de un elevado recuento de células somáticas y de anticuerpos séricos específicos (Chuard et al., 1991. J. Infect. Dis. 16: 1369-1373). En la actualidad, solo se comercializan tests de doble difusión en agarosa para la detección de anticuerpos séricos frente a ácidos teicoicos estafilocócicos (Ref 290100, Meridian Diagnostics. Ohio). El objetivo de este trabajo es detectar anticuerpos frente a estafilococos en sangre de animales con estafilococias mamarias, aplicando un test ELISA en un momento puntual de la vida del animal, y averiguar si la producción de slime (mucus) por *Staphylococcus aureus* está asociada a la cronicidad.

MATERIAL Y MÉTODOS.- Se utilizaron 253 hembras bovinas ubicadas en explotaciones catalanas, aragonesas, navarras y del País Vasco. Según los análisis clínicos, bacteriológicos, test de California (CMT) y recuento de células somáticas (RCS), se establecieron previo a este estudio las siguientes categorías entre las hembras implicadas: **novillas** (28 hembras no lactantes) **sanas** (50 vacas con ubres clínicamente sanas, con mamas libres de *S. aureus*), **crónicas** por *S. aureus* (89 vacas con mastitis crónica por *S. aureus* claramente establecida), **crónicas?** (63 vacas en las que comienza un proceso de cronicación de mastitis por *S. aureus*), y con **nuevas infecciones** por *S. aureus* (23 vacas con infección nueva reciente, sin cronicidad evidente). Una vez establecidas las categorías, se recogieron de cada animal en una misma fecha muestras de sangre (para estudio de anticuerpos en el ELISA) y leche, cuando la producía el animal, para el aislamiento del germen y detección de la producción de slime en agar rojo Congo, colonias ARC+ (según Baselga et al., 1993. Infect. Immun. 61: 4857-4862). **Test ELISA.** Se tapizaron los pocillos de las placas ELISA con un extracto de estafilococos conteniendo slime, se lavaron y se incubaron 30 min con 150 µl de tampón borato bloqueante (conteniendo albúmina sérica bovina al 0,25% y Tween 20 al 0,05%). Tras lavados, se añadieron 100 µl de los sueros diluidos en PBS-Tween (1/100, 1/500, 1/1000, 1/10000 y 1/20000), utilizando como controles suero de bovino sano y suero de bovino crónico con anticuerpos específicos. Tras 1 h de incubación y lavados con PBS-Tween, se añadió proteína

G. Transcurrida 1 h, y tras lavados con PBS-Tween, se añadió O-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma), evaluándose la densidad óptica (D.O.) a una absorbancia de 405 nm.

Análisis estadístico. Las medias de D.O. de las diferentes categorías se analizaron mediante ANOVA y test de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.- Presencia de *S. aureus* en leche. Las muestras de las categorías *novillas* y *sanas* estaban libres de *S. aureus*, a excepción de dos de las muestras en la categoría de *sanas* en las que en el momento de la toma de muestra se detectó dicho germen. Por ello, estas dos muestras (y sus correspondientes animales) fueron trasladados a la categoría de *nueva infección* (n definitivo *sanas* = 48, y *nueva infección* = 25).

Dilución discriminante. La dilución sérica más discriminante en el test ELISA entre categorías fue 1/100, por lo que se ésta se utilizó para los datos de los apartados siguientes.

Comparación entre categorías de muestras. Los valores medios (media aritmética, \bar{x}) y los rangos de D.O. para la dilución sérica 1/100 fueron diferentes entre categorías (Tabla 1), siendo significativas las diferencias al comparar la media de *sanas* o *novillas* con la de *nuevas infecciones* o *crónicas?* ($P < 0,05$) y correspondiendo los valores más bajos a las *novillas*.

Tabla 1. Rangos y medias aritméticas ($\bar{x} \pm$ error estándar, e.s.) de densidad óptica (D.O.) según categorías.

Categoría	Nº de animales	$\bar{x} \pm$ e.s.*	D.O. Mínima	D.O. Máxima
Novillas	28	$0,19 \pm 0,01$ a	0,12	0,44
Sanas	48	$0,37 \pm 0,02$ b	0,15	0,78
Crónicas	89	$0,43 \pm 0,02$ bc	0,16	1,2
Crónicas?	63	$0,45 \pm 0,02$ c	0,13	1,09
Nuevas infecciones	25	$0,49 \pm 0,05$ c	0,22	1,35

* Letras diferentes indican significación estadística.

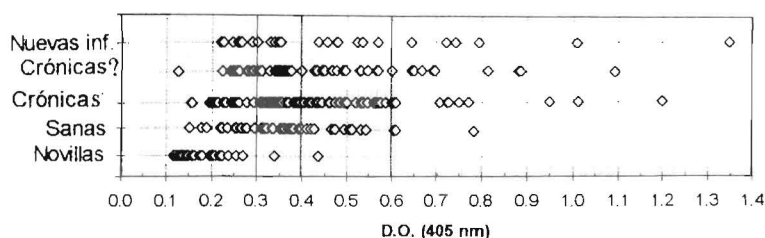


Fig. 1. Detección de anticuerpos frente a estafilococos (D.O. A405) en suero de animales de las categorías *novillas*, *sanas*, *crónicas*, *crónicas?* y *nuevas infecciones*.

Según se observa en la Fig. 1, existe un solapamiento en las distribuciones de D.O. entre categorías. A pesar de ello, se observó que ninguna muestra de las categorías *novillas* y *sanas* presentaba una D.O. $> 0,6$ y $> 0,8$, respectivamente. La mayoría de las *novillas* (92,9%) presentó una D.O. $\leq 0,3$. Asimismo, la mayoría de las *novillas* y de las *sanas* (96,5% y 68,8%, respectivamente) presentó una D.O. $\leq 0,4$, mientras que en las restantes categorías la proporción de muestras con esta D.O. descendió al $\sim 50\%$. Una D.O. más elevada ($> 0,6$) se encontró en el 8,3%, 12,4%, 17,5% y 24% de las muestras *sanas*, *crónicas*, *crónicas?* y con *nuevas infecciones*, respectivamente. De estos datos en conjunto se concluye que, aun siendo la

media de absorbancia más reducida en animales sanos, no se pueden discernir con el test ELISA aplicado a una sola muestra por animal entre animales infectados y animales sanos. Algunos animales *sanos* no presentaron anticuerpos, posiblemente al no haber sido infectados por las bacterias o al haber eliminado la infección hace tiempo (meses), mientras que otros animales sanos (sin bacterias en la leche) presentaron anticuerpos frente a *S. aureus*, quizás al haber combatido la infección muy recientemente (reacciones más fuertes en el ELISA dentro de esta categoría y dentro de otras categorías) o hace pocas semanas (reacciones intermedias) o quizás, por estar de hecho infectados, a pesar de que las muestras de leche no presentaban estafilococos. El sistema inmunitario de los animales crónicos no elimina bacterias acantonadas en la mama, por lo que éstos pueden mantener un cierto nivel de anticuerpos frente a dichas bacterias. De ahí la necesidad de estudiar, en un futuro, no solo la absorbancia del ELISA en una situación puntual, sino el mantenimiento de reactividad en el ELISA se durante un período de la vida del animal, antes de calificar una infección por *S. aureus* como crónica.

Morfología colonial en agar rojo Congo (ARC). Del total de las 177 muestras de leche en las que se aisló *S. aureus* (crónicas + crónicas? + nuevas infecciones; Tabla 1), 150 (84,7% de los aislamientos) mostraban colonias ARC- y 27 (15,24% de los aislamientos) mostraban bacterias con morfología colonial ARC+ (Tabla 2), perteneciendo un 63% y un 37% de estas últimas a las categorías *crónicas* (17 muestras, un 19% de las *crónicas*) y *crónicas?* (10 muestras, un 15,9% de las *crónicas?*), respectivamente, pero ninguna de ellas a *nuevas infecciones*. Estos resultados demuestran que la morfología colonial ARC+ está asociada con la cronicidad y concuerdan con nuestras previas observaciones sobre el mayor poder de colonización por bacterias ARC+ (Baselga et al., 1993). En todas las muestras con colonias ARC+ (probablemente ubicadas en el animal vivo entre bacterias acantonadas) también había, y frecuentemente (en el 80% de los casos) en mayor porcentaje, colonias ARC- (que probablemente eran las bacterias liberadas a la leche o accesibles al sistema inmune). Ello es compatible con la existencia en un mismo animal un germen con dimorfismo ARC+ y ARC-. Así, la mayor intensidad de reacción en el ELISA correspondería a la época en la que el animal posee un mayor número de bacterias como fuente antigénica y no necesariamente a aquella en la que la leche presenta bacterias ARC+ (Tabla 2). Todo ello explicaría el hecho de que el 63% (17/27) de las muestras con colonias ARC+ corresponden a una D.O. en suero $\leq 0,4$, mientras que la cifra desciende al 46,7% (70/150) para las que solo muestran colonias ARC-.

Tabla 2. Distribución de muestras ARC+ según su rango de densidad óptica (D.O.) en suero sanguíneo y categoría(tipo). (En paréntesis, porcentaje entre infectados, n = 177.)

Tipo	D.O.0,19-0,3	D.O.0,31-0,4	D.O.0,41-0,6	D.O.0,61-0,8	D.O.>0,8	Total (%)
Crónicas	7 (3,95)	4 (2,26)	2 (1,13)	3 (1,69)	1 (0,60)	17 (9,63)
Crónicas?	3 (1,69)	3 (1,69)	2 (1,13)	0 (0)	2 (1,13)	10 (5,61)
Total	10 (5,64)	7 (3,95)	4 (2,26)	3 (1,69)	3 (1,69)	27 (15,24)

AGRADECIMIENTOS.- Agradecemos a los ganaderos y Centros responsables de los animales estudiados. Financiado por FIS (Nº 96/0230) y CONSID (Nº PCM1694).