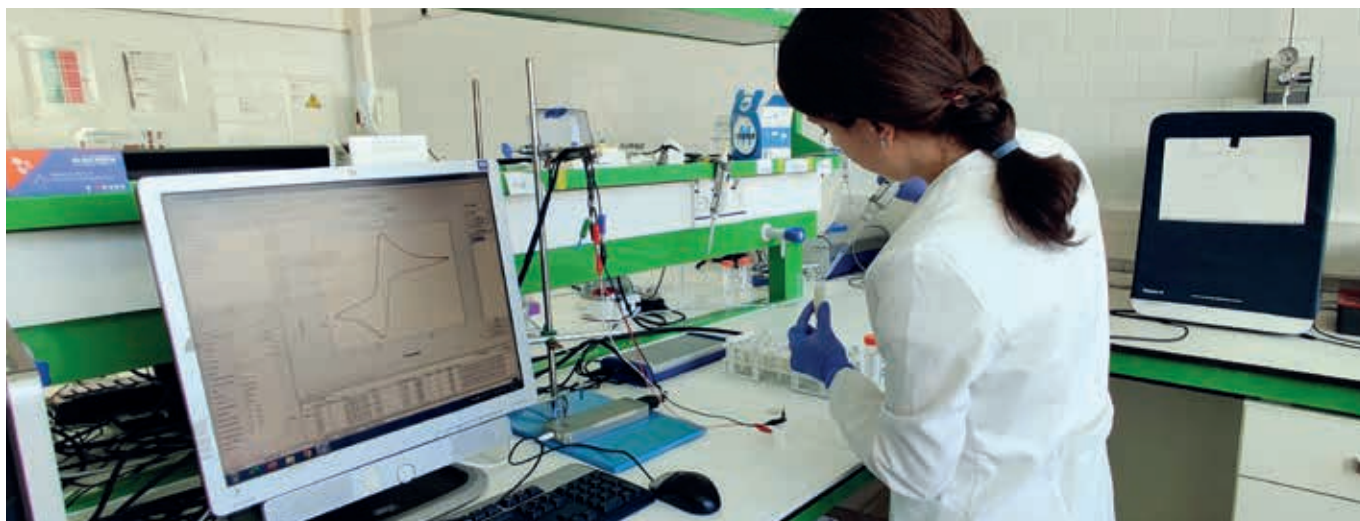


La importancia del diagnóstico temprano de la mastitis bovina: estrategias hacia una ganadería de precisión

El sector lácteo es clave para la economía de la Unión Europea. Para garantizar la sostenibilidad del sector, el bienestar y la salud de las vacas lecheras son esenciales. La mastitis es uno de los principales problemas que afectan a las vacas lecheras. Esta infección provoca la inflamación de las glándulas mamarias y altera los tejidos de la ubre, provocando hinchazón y molestias. También afecta a las propiedades fisicoquímicas de la leche.

Beatriz Prieto Simón, investigadora ICREA en la Universidad Rovira i Virgili



La carga económica de la mastitis bovina es enorme. Además de reducir la producción de leche, también afecta a su calidad. En este contexto, la prevención y la detección temprana de esta infección son clave para mejorar la sostenibilidad y la rentabilidad de la industria láctea europea.

La mastitis es una infección principalmente bacteriana, que puede manifestarse en su estado clínico o subclínico. La mastitis clínica comúnmente se diagnostica cuando la consistencia y la calidad de la leche se ven afectadas: la leche se vuelve acuosa, espesa, escamosa o contiene pus o coágulos de sangre. En respuesta a la inflamación, la ubre de la vaca se hincha, enrojece y duele. La mastitis subclínica es más difícil de diagnosticar, ya que ni la leche ni la ubre de la vaca se ven afectadas de manera visible. Sin embargo, tiene un profundo impacto en el rendimiento del

animal, representando un porcentaje significativamente alto de los costes de la enfermedad (~70-80%). En los peores casos, puede dañar irreversiblemente la ubre de la vaca y afectar severamente a la calidad de la leche y el volumen de producción a lo largo de la vida del animal. La detección de mastitis subclínica es de gran preocupación para la industria láctea.

Una vez detectada la infección, ésta debe rastrearse hasta el animal infectado para eliminar la leche afectada y administrar el antibiótico adecuado. En algunos casos, el tratamiento con antibióticos es ineficaz y por eso se administran dosis múltiples para garantizar que el fármaco permanezca en la ubre durante el ordeño, lo que aumenta el coste del tratamiento. Además, en ocasiones se administran antibióticos sin evidencia suficiente que respalde la infección. Como resultado, los residuos de antibióticos pueden pasar a la

leche y liberarse en el agua y el suelo, lo que contribuye a incrementar la resistencia a antibióticos. Cuando el tratamiento con antibióticos no es una opción, especialmente cuando se detectan tasas significativamente altas de infección dentro del rebaño, se recomienda el sacrificio del animal. Todo esto lleva a buscar soluciones rápidas y eficientes para el diagnóstico temprano de la mastitis bovina. La detección rápida y la intervención oportuna son esenciales para reducir el impacto económico, social y ambiental de la enfermedad.

En granja, el recuento de células somáticas se utiliza como indicador de la probabilidad de que la leche contenga bacterias patógenas y, por lo tanto, este método de diagnóstico sólo puede identificar casos potenciales. En el laboratorio, tanto el cultivo celular como la PCR se utilizan para confirmar la infección e identificar el patógeno causante. Sin embargo, es-

tas técnicas requieren tiempo y tienen un coste elevado. Más importante aún, estos métodos no permiten el diagnóstico en las primeras etapas de la enfermedad, cuando los animales son altamente infecciosos y las terapias son más efectivas.

En este contexto, se está llevando a cabo un proyecto de investigación en el marco de una acción ERA-NET, con apoyo de la Unión Europea, dedicada a coordinar la investigación internacional en enfermedades infecciosas que afectan a los animales (programa ICRAD). El objetivo principal del proyecto se centra en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para la detección de la mastitis bovina en las primeras etapas de la enfermedad, aprovechando la presencia en leche de biomarcadores de la respuesta inmunitaria temprana de las vacas: miARNs, citocinas y péptidos antimicrobianos. El proyecto (Bio-sens4PrecisionMastitis) está coordinado por la Universidad Rovira i Virgili de Tarragona, y en él colaboran investigadores

del Centro de Investigación e Innovación Pro-Academia de Polonia, de la Universidad Riga Stradiņš de Letonia, y la empresa SeqOmics Biotechnology Ltd. de Hungría.

El proyecto se basa en avances recientes en el diagnóstico de infecciones en humanos que aprovechan la respuesta inmunitaria temprana del organismo para facilitar la toma de decisiones rápida e informada. Tomando este avance de investigación en salud humana como punto de partida, el nuevo proyecto pretende desarrollar una tecnología de detección capaz de evaluar la respuesta inmunitaria diferencial del huésped en las primeras etapas de la infección animal. Específicamente, el objetivo es aplicar el conocimiento adquirido sobre biomarcadores clave derivados de la respuesta inmune del huésped durante el período de incubación, al desarrollo de una plataforma de diagnóstico de mastitis basada en biosensores electroquímicos nanoestructurados. Aprovechando la presencia de esos biomarcadores en la leche,

el nuevo enfoque de detección en base a una "biopsia líquida" permitirá el diagnóstico rápido, no invasivo y sin estrés de la mastitis bovina.

El proyecto se divide en cinco etapas esenciales. En primer lugar, busca la identificación y validación de un panel de biomarcadores derivados del sistema inmunológico del huésped presentes en las primeras etapas de la enfermedad, que incluirán miARNs, citocinas y péptidos antimicrobianos. En segundo lugar, la identificación de estos biomarcadores se realiza en leche proveniente de un rebaño que se encuentra en un entorno natural, en lugar de utilizar modelos animales. En tercer lugar, los avances en la tecnología de biosensores electroquímicos basados en nuevos nanomateriales facilitan el diseño de dispositivos para una detección directa, rápida y cuantitativa de los biomarcadores identificados, evitando interferencias de otros componentes de la leche. En cuarto lugar, estos nuevos biosensores altamente

XXV

CONGRESO INTERNACIONAL ANEMBE DE MEDICINA BOVINA

LEÓN (Palacio de Congresos)
del 24 al 26 de mayo de 2023

DE LA TRADICIÓN LA BUIATRÍA DEL FUTURO

www.congresoanembe.com



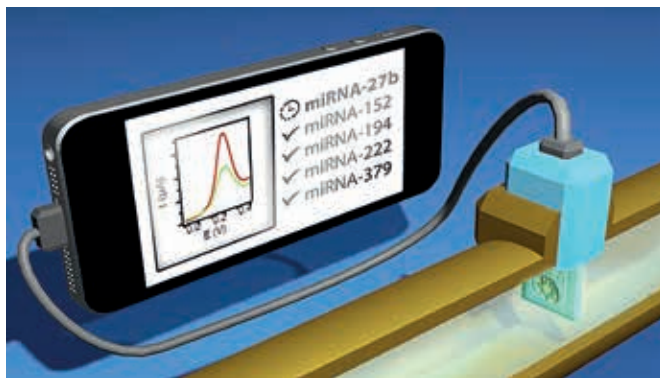


Imagen 1: Concepto preliminar del dispositivo para el monitoreo en línea de miRNAs.

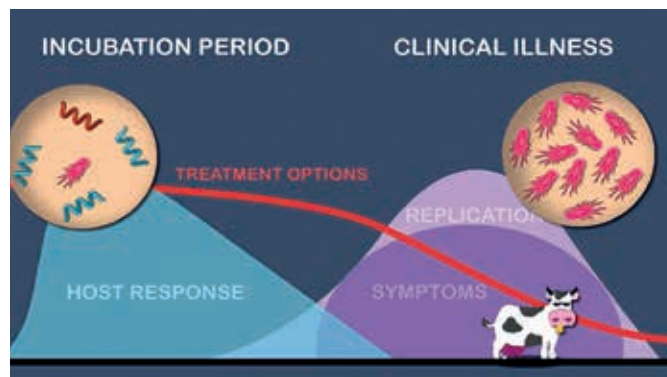


Imagen 2: Etapas de la evolución de la respuesta inmune del huésped y replicación del patógeno durante un proceso infeccioso.

sensibles y específicos son clave para diseñar un dispositivo de punto de atención miniaturizado, fácil de operar en la granja por personal no experto, y que permita lecturas casi en tiempo real gracias a su bajo coste y uso simple. En quinto lugar, el dispositivo final se rediseñará para su implementación en las líneas de ordeño existentes, para realizar "biopsias" de leche de manera no invasiva y sin estrés, a bajo coste y aprovechando equipos fácilmente disponibles.

El proyecto se está llevando a cabo con vacas infectadas naturalmente para identificar inicialmente biomarcadores clave de mastitis bovina en leche. Investigadores del Centro de Investigación e Innovación Pro-Akademia recolectaron muestras representativas de un rebaño de ~35 vacas lecheras Holstein-Friesian. Después de identificar en base a los valores de recuento de células somáticas vacas sanas, y vacas infectadas tanto con mastitis clínica como con mastitis subclínica, la leche de los animales seleccionados se recolectó en días consecutivos. Las muestras de leche también se analizaron mediante cultivo microbiano para determinar el número total de bacterias y detectar los microorganismos más comunes que causan mastitis, incluidos *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. aureus* y *E. coli*. A pesar de que los resultados microbiológicos no reflejan la severidad de la infección, se concluyó que pueden ser útiles para guiar el tipo de antibiótico a administrar a las vacas con mastitis en estado avanzado.

Seguidamente, los investigadores aislaron el ARN total de las muestras de leche para llevar a cabo su secuenciación en las instalaciones de la compañía SeqOmics, con el objetivo de seleccionar secuencias

de miARN clave en las primeras etapas de la mastitis bovina. Como resultado, se seleccionó una lista preliminar de cinco miARNs que mostraron un mayor nivel de expresión en las muestras clínicas y subclínicas, como posibles candidatos a biomarcadores.

También se aislaron sedimentos de leche para que los investigadores de la Universidad Riga Stradiņš analizaran la presencia de citoquinas y péptidos antimicrobianos producidos en el organismo huésped como biomarcadores tempranos de mastitis. Se prepararon frotis de leche de 30 vacas y se tiñeron inmunohistoquímicamente con 16 factores en seis días diferentes. Tras analizar los datos obtenidos, se observó que en vacas sanas, un alto número de células inmunorreactivas indicaba la preparación de la inmunidad del huésped bajo exposición continua a patógenos. En consecuencia, se confirmó que tanto la respuesta inmune local celular como la humoral desempeñan un papel clave en las respuestas de defensa y se identificaron dos factores como biomarcadores potenciales para la detección temprana de mastitis bovina, uno que proporciona defensa antiinflamatoria, y otro con actividad microbicida frente a bacterias Gram-negativas.

En paralelo, en la Universidad Rovira i Virgili se está trabajando en el desarrollo de una nueva plataforma de detección capaz de proporcionar la sensibilidad, selectividad y precisión adecuadas para la detección de los biomarcadores previamente identificados. En primer lugar, se fabricó y caracterizó un nuevo transductor electroquímico nanoestructurado de silicio poroso carbonizado, que mostró un rendimiento electroquímico excelente. Este transductor

se modificó adecuadamente para permitir la detección de miRNAs, citoquinas y péptidos antimicrobianos. Hasta ahora los resultados han demostrado la capacidad del dispositivo desarrollado para detectar concentraciones mínimas de miRNAs.

Al final del proyecto se espera que este nuevo concepto confirme la infección, en lugar de sólo la exposición al patógeno, y también informe del estado y la etiología de la enfermedad. Nuestra solución aprovecha tecnología basada en biosensores para realizar "biopsias" de leche no invasivas, *in situ*, casi en tiempo real, a bajo coste y aprovechando equipo fácilmente disponible. Esta nueva tecnología permitirá la vigilancia constante de los animales, con el fin de detectar rápidamente los casos procesables e identificar el patógeno causante, lo que es clave para guiar la intervención de los ganaderos, proporcionando al final una ventaja significativa a la industria láctea europea. **MG**

El proyecto Biosens4PrecisionMastitis (www.biosensingbovinemastitis.com) se enmarca en la iniciativa ERA-NET ICRAD (Coordinación Internacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas) y está cofinanciado por la Agencia Estatal de Investigación de España (AEI/10.13039/501100011033; PCI2020-120693-2), el Ministerio de Agricultura de la República Húngara (AKGF /99/2021), el Centro Nacional de Investigación y Desarrollo de Polonia y la Agencia Estatal de Desarrollo de la Educación de Letonia (ES RTD/2021/2). Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea en virtud del acuerdo de subvención n. 862605.