

Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus* y exotoxinas de *S. aureus* aislados en leche de pequeños rumiantes

Barrera Jiménez, I.¹, Perea Cantero, R.A.¹, Perea Rodríguez, R.B.².

¹División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Calz. Del Hueso 1100 Col. Villa Quietud, Coyoacán, 04960. ²Facultad de medicina UNAM Circuito Interior, Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán C.P. 04510 México. rperea@correo.xoc.uam.mx

Palabras clave. Mastitis, Antibióticos, gen mec A, Oveja, Cabras

Introducción

Una de las preocupaciones mayores para los ovinocultores y caprinocultores es causada por la mastitis subclínica (SCM), ya que representa pérdidas económicas significativas debido a la reducción de la producción de leche, mala calidad de la leche y disminución del crecimiento de corderos. La administración intramamaria de antibióticos ha aumentado, ya que se ha demostrado su eficacia para el tratamiento de SCM en pequeños rumiantes. El uso inadecuado de antibióticos en el tratamiento de SCM en leche de oveja y cabra puede ser una fuente potencial de patógenos resistentes a los antibióticos de origen animal, humano y ambiental [1]. El uso generalizado de antibióticos en animales podría conducir a la selección de cepas bacterianas resistentes. La detección de patógenos resistentes a antimicrobianos y especialmente *S. aureus* (MRSA) se requiere no solo para la terapia sino también para monitorear la propagación de cepas resistentes. Pocos estudios han informado que las cepas de MRSA pueden ser aisladas de la leche de pequeños rumiantes [2]. *S. aureus* produce una o más exoproteínas, una de ellas es responsable del síndrome de choque tóxico toxina-1 (TSST-1), otras toxinas que producen son las enterotoxinas A a U (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI y SEJ), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y leucocidina Pantone-Valentine (PVL). Estas toxinas son responsables de la intoxicación alimentaria por estafilococos y de otros tipos de infecciones en humanos y animales. PVL es una citotoxina que causa destrucción de leucocitos y necrosis de tejido [3]. *in-vivo* se ha demostrado que puede inhibir el sistema inmunológico del huésped. Las respuestas a *S. aureus* contribuyen a la patogenia de la mastitis, así como, al desarrollo de enterotoxemia estafilocócica, lo que resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables que incluso se puede encontrar en leche pasteurizada. Estas enterotoxinas son producidas tanto en procesos clínicos como subclínicos de mastitis [4]. A diferencia de los aislados bovinos [5] hay algunos datos disponibles en la literatura sobre la propagación de *S. aureus* enterotoxigénico aislado de pequeños rumiantes en los últimos años [6]. Los objetivos de este estudio fueron aislar cepas de *S. aureus* a partir de leche de ovejas y cabras, así como determinar la prevalencia de genes de enterotoxina así como la detección del gen *pvl* y la presencia del gen de la toxina exfoliativa en cepas de *S. aureus* aisladas de leche de ovejas. Además, determinas los perfiles de resistencia a los antimicrobianos de dichas cepas.

Materiales y métodos

Muestras de leche y examen bacteriológico. Las muestras de leche se colectaron de 13 diferentes establos de pequeños rumiantes en el estado de Michoacán Municipio de Pajacuarán el mes febrero hasta agosto de 2019. Un total de 1,604 muestras de leche directas de la ubre de 857 ovejas y 66 muestras de leche directas de la ubre de 33 cabras fueron recogidas. Las puntas de los pezones se limpiaron con alcohol al 70% antes del muestreo. Se descargaron los primeros chorros de primera leche y luego se tomaron asepticamente 10 ml de leche de cada ubre y se colocaron en viales estériles. Las muestras se inocularon en placas agar sangre de carnero al 5%. (Merck,) y se incubaron aeróticamente durante 24h a 37 °C. Se determinó el estado microbiano de las muestras de leche de acuerdo con los procedimientos recomendados Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP. La infección intramamaria se definió cuando se encontraron colonias ≥ 500 ufc / mL. Las colonias se identificaron mediante la prueba de tinción de Gram (positiva), morfología, características de hemólisis, catalasa, oxidasa, coagulasa en tubo con plasma de conejo, Voges-Proskauer y prueba anaeróbica de manitol. Los aislamientos fueron confirmados por el sistema BBL Crystal para la identificación (ID) de bacterias gram-positivas (GP); método de identificación en miniatura (Becton Dickinson, EE. UU.). Todos los aislamientos

que se identificaron se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo de infusión cerebro-corazón (Merck, Alemania) que contiene 15% de glicerol hasta su posterior análisis. La prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, se determinó por el método de difusión de disco en agar Mueller-Hinton (Merck, Alemania) y los resultados se interpretaron según directrices del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Así, 11 agentes antimicrobianos fueron probados: penicilina G (10 U), cefalotina (30 μg), eritromicina (15 μg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25 / 23,75 μg), rifampicina (5 μg), tetraciclina (30 μg), enrofloxacin (5 μg), cefoxitina (30 μg), vancomicina (30 μg), antibióticos gentamicina (10 μg) y linezolid (30 μg). La cepa de *S. aureus* ATCC 25923 se utilizó como control de calidad (CLSI 2002). Para el análisis del perfil de exotoxinas de los aislamientos de *S. aureus* se extrajo ADN de *S. aureus* para su análisis por PCR. Para este propósito, los aislados de *S. aureus* se cultivaron en Mueller-Caldo Hinton durante la noche. Las células bacterianas fueron recolectadas por centrifugación por 10 min a 5,000 rpm y lavado en 1 mL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM) y recentrifugado durante 10 min 14.000 rpm. Se añadió 50 microlitros de lisostafina (100 μg / mL) al sedimento, e incubados durante 10 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente tratados con 50 μL de proteinasa K (100 μg / ml) durante 10 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la inactivación de proteinasa K, la suspensión se calentado durante 10 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras de ADN aisladas fueron mantenidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso. Para la tipificación de secuencia para genes de enterotoxina estafilocócica (sea-sej), el gen de la toxina del síndrome del shock tóxico (*tsst*), el gen de toxinas exfoliativas (*eta*, *etb*), gen *mecA* y Pantone–El gen de la leucocidina de Valentine (*pvl*) el método que se utilizó fue como se describe por Løvseth y col. (2004). Para realizar la PCR, la mezcla se realizó de la siguiente manera: se agregaron 5 μL de ADN a 45 μL de mezcla de tampón de polimerasa Taq 1 \times , MgCl_2 4 mM, 2 U Taq polimerasa, 400 μM cada un desoxinucleósido trifosfato y 300 nM de cada cebador. Los ciclos de amplificación se programaron 1 ciclo a 5 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la desnaturalización inicial; 30 ciclos, 1 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el gen *mecA*, 30 s $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ para genes de exfoliativo de toxinas (*eta*, *etb*) y el gen de la leucocidina Pantone-Valentine (*pvl*), extensión de 1 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$; y 1 ciclo de 5 min para el paso final de extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los genes de enterotoxina estafilocócica fueron detectados por PCR multiplex, algunos de los productos de PCR eran similares en tamaño y, por lo tanto, se encontró que las bandas eran difíciles de diferenciar. Para evitar esta complicación, se utilizaron 11 cebadores dividido en dos grupos. Imprimaciones para *sed*, *see*, *seg*, *sei*, y *tsst* se combinaron en la mezcla de reacción 1, y los cebadores para *sea*, *seb-sec*, *sec*, *seh*, *sej* y 16S r RNA fueron combinados en la mezcla de reacción 2. Usamos el protocolo de Løvseth y col. (2004) para la amplificación de m-PCR: se añadió 5 μL de ADN a 45 μL de mezcla de PCR de 1 \times Taq tampón de polimerasa, MgCl_2 4 mM, Taq polimerasa 2 U, 400 μM cada desoxinucleósido trifosfato y 300 nM cada cebador. El ADN se amplificó en termociclador (TCPRO / Boeco) por desnaturalización inicial durante 10 min $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de 30 ciclos de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, y 1 ciclo de extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Todos los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis de 10 μL de producto de reacción en un gel de agarosa al 1.5% (1 \times Tris–Tampón EDTA a 100 V durante 100 min) y se visualizó en un UV transiluminador (Ingenius, Syngene Bio Imaging). Los tamaños de producto se determinaron por comparación con 100 pb como marcador (Vivantis, NL0401).

Resultados y discusión

Examen bacteriológico. La prevalencia de infección intramamaria subclínica fue 5.2%; solo 10 ovejas tuvieron ambas mitades de la ubre infectadas. Los cultivos bacteriológicos fueron positivo en 87 (5.2%) de 1,670 muestras de leche de media ubre. Las cepas bacterianas aisladas de muestras de leche fueron 46 (2.8%) estafilococos coagulasa negativos, 21 (1.3%) *S. aureus*, mientras que 20 (1.2%) fueron identificados como pertenecientes a otras especies, *Streptococci spp.* 0,6% (n = 10), *Corynebacterium spp.* 0,5% (n = 8), *Bacillus spp.* 0,06% (n = 1), *Pasteurella spp.* 0,06% (n = 1). Todos los aislamientos de *S. aureus* se aislaron de leche de oveja, mientras que no se aisló *S. aureus* de muestras de leche de cabra. Los estafilococos constituían el 77.0% de los microorganismos aislados de muestras de leche (SNC 52,9% y *S. aureus* 24,1%). Cuarenta y seis estafilococos coagulasa negativos; 8 *S. simulans* (dos aislados de origen caprino), 8 *S. capitis* (uno aislado de origen caprino), 6 *S. haemolyticus*, 4 *S. lugdunensis*, 4 *Staphylococcus xylosus* (un

aislado de origen caprino), 4 *S. warneri*, 3 *S. epidermidis*, 2 *S. lentus*, 2 *S. auricularis* (un aislado de origen caprino), 2 *S. schleiferi*, 1 *S. caprae*, 1 *S. vitulus*, 1 *S. saprophyticus* fueron identificados en este estudio. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. En este estudio, se obtuvo un número de 46 cepas de estafilococos coagulasa negativos y 21 *S. aureus* aislados se probaron contra agentes antimicrobianos; penicilina G, cefalotina, eritromicina, trimetoprim- sulfametoxazol, rifampicina, tetraciclina, enrofloxacin, cefoxitina, vancomicina, gentamicina y linezolid por el método de difusión en disco. Diecinueve cepas de un que un total de 67 aislamientos se determinó eran resistentes contra uno o más antibióticos. No se encontró MRSA en los aislados de *S. aureus* de oveja. La prevalencia de resistencia de *Staphylococcus spp.* aislados en ovinos y caprinos. a penicilina G, tetraciclina, eritromicina, gentamicina y enrofloxacin fueron: 26,9% (n = 18), 7,5% (n = 5), 6.0% (n = 4), 3.0% (n = 2) y 1.5% (n = 1), respectivamente. Todos los estafilococos eran sensibles a cefalotina, trimetoprim-sulfometoxazol, rifampicina, cefoxitina, vancomicina y linezolid. De las 21 cepas de *S. aureus* y 46 del SNC, el 19,0% y el 30.4% eran resistentes a la penicilina, el 4,8% y el 8,7% a tetraciclina, 4.8% y 6.5% a eritromicina, 4.8% y 0.5% a gentamicina, 0,0% y 0,5% a enrofloxacin, respectivamente. Se observó resistencia múltiple a los antimicrobianos en seis aislamientos, y se encontró que un *S. xylosus* aislado de la leche de cabra era resistente a cinco antibióticos. En el estudio de perfiles de exotoxinas en los aislados de *S. aureus* Solo 3 de los 21 aislados de *S. aureus* (13.4%) de oveja albergaron genes de exotoxina, siendo cada uno de ellos *seh*, *sej* o *sec* genes. Ninguna de las cepas produjo más de un tipo de enterotoxinas. Dos (*seh* y *sec*) de estos tres aíslan también gen *pvl* albergado. Un total de 14 (66,6%) de 21 *S. aureus* de los aislados tenían el gen *pvl*. Evidenciados en este estudio, ninguno de los aislamientos albergaba el gen de la toxina del síndrome de choque tóxico (*tsst*), el gen de toxinas exfoliativas (*eta*, *etb*) y gen *meco*.

La mastitis subclínica causada por el SNC es una enfermedad importante ya que conduce a reducción de la producción de leche, disminución de la calidad de la leche, mala leche Higiene y menor peso del cordero. Los resultados obtenidos en esta investigación, como la prevalencia de infección intramamaria subclínicas (5,2%) fue acorde con lo reportado en otras investigaciones como 6% para las ovejas [7] sin embargo, más bajos que en algunos otros estudios que informan sobre un 15,6% en ovejas y un 18% en cabras [8] Esto se puede esperar dado que la prevalencia está influenciada por varios factores, entre ellos especies (caprino u ovino), genotipos, estadios y número de manejo de lactancia, así como el ambiente en este estudio, El grupo principal de patógenos aislados en las muestras leche fueron estafilococos (77,0%), de acuerdo con la otros estudios (Kunz y col. 2011). La multiresistencia como MRSA de cepas de *S. aureus* son y sigue siendo un problema considerable en medicina. La ausencia de gen *mecA* y la baja prevalencia de casos únicos y múltiples de resistencia a los antibióticos observada en nuestro estudio que sugiere que SCM en ovejas y cabras puede no desempeñar un papel significativo en la propagación de estafilococos multirresistentes y muestra menor riesgo para la salud pública. También, Maslankova y col. (2009) observaron que MRSA no estaba presente en cualquiera de los 79 aislados de *S. aureus* de origen ovino. El porcentaje de mayor resistencia en el presente estudio fue frente a la penicilina, para muestras de leche de oveja y cabra y Lollai y col. (2008) para la leche de oveja, porcentajes de resistencia a los antibióticos (penicilina G, tetraciclina, eritromicina, gentamicina y enrofloxacin) obtenidos en este estudio fueron inferiores a los referidos Varias toxinas extracelulares y factores de virulencia son producido por *S. aureus*. Las enterotoxinas estafilocócicas (*se*) son causa de intoxicación alimentaria por estafilococos en humanos. Además, estas proteínas extracelulares pueden contribuir a la patogenicidad de mastitis subclínica en vacas y pequeños rumiantes.

Los resultados observados en la literatura sobre el gen *sec* presentan en cepas de *S. aureus* de mastitis subclínica bovina en leche Los tipos de genes *sec*, *sed*, *seg* y *sei* fueron los más comúnmente detectados El gen *Sec* que albergan cepas de *S. aureus* aisladas de la leche de bovinos y productos elaborados se ha reportado en Turquía. De 106 cepas de *S. aureus* presentes en mastitis subclínica bovina, 27 (25,5%) resultaron ser enterotoxigénicas. De estos, 25 (23,6%) fueron SEA, 2 (1,9%) eran SEB. realizaron un estudio sobre aislados de *S. aureus* comparándolos sobre la base de la presencia de genes *se*, donde encontraron diferencias significativas entre los aislamientos de vacas infectadas intramamarias (n = 51, 75%), cabras (n = 22, 77%) y ovejas (n = 43, 70%). (Morandi et al. 2009). En otro estudio, en general, el 75,9% de *S. aureus*

aislados resultaron positivos para uno o más genes de toxinas. Se encontró que el gen *sec* es el más frecuente (24,1%), seguido de *tst* (22,8%), *seb* (13,9%), *sed* (10,1%) y finalmente *mar* (5,1%) [6]. En el presente estudio, se encontró que solo 3 cepas de *S. aureus* originarias de ovejas (n = 21) tenía el gen de la enterotoxina (*sec*, *seh* o *sej*), que no era coherente con los resultados. Este es el primer estudio que proporciona datos sobre la presencia del gen *se* en *S. aureus* procedentes de ovejas con mastitis subclínica. Uno de los varios factores de virulencia que son producidos por *S. aureus* es PVL y puede contribuir a su patogenicidad. Se ha demostrado en muchos estudios que la toxina PVL causa neumonía, dermatitis necrosante. Rankin y col. (2005) mostró que 11 cepas de MRSA aisladas de animales de compañía fueron positivos para la toxina PVL. Los resultados del presente estudio destacan ya que el 66,6% (14) son de origen ovino las cepas *S. aureus* tienen el gen *pvl*, y todas las cepas son susceptibles a meticilina.

Conclusión

El presente estudio mostró que la prevalencia de SCM en los hatos lecheros ovinos y caprinos es menor al reportado en otros estudios y dado que no se ha detectado MRSA, potente riesgo para la salud pública y debido a la pobre diseminación de cepas resistentes a los antimicrobianos el riesgo es bajo. Cabe considerar que la mayoría de los estafilococos fueron susceptibles a los antimicrobianos probados; por lo tanto, el potencial terapéutico de los medicamentos veterinarios de uso común es alto. La baja prevalencia de genes de enterotoxina muestra un riesgo menor de intoxicación alimentaria por estafilococos debido al consumo de leche cruda de oveja o de productos elaborados con leche cruda de oveja. Alta prevalencia del gen *pvl* sugiere un papel en el desarrollo de mastitis subclínica en pequeños rumiantes.

Referencias

1. Viridis, S., Scarano, C., Cossu, F., Spanu, V., Spanu, C., Santis, E. P. L., (2010). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis, *Veterinary Medicine International*, doi:10.4061/2010/517060.
2. Stastkova, Z., Karpiskova, S., Karpiskova, R., (2009). Occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm, *Veterinarni Medicina*, **54**, 419–426.
3. Kunz, F., Corti, S., Giezendanner, N., Stephan, R., Wittenbrink, M., Zweifel, C., 2011. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from mastitis milk samples from sheep and goats, *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 153(2), 63–69
4. Argudin, M. A., Mendoza, M. C., Rodicio, M. R., (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, *Toxins*, **2**, 1751–1773
5. Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R., (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products, *International Journal of Microbiology*, :10.1155/2009/501362.
6. Maslankova, J., Pilipincova, I., Tkacikova, L., (2009). Pheno- and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates of sheep origin, *Acta Veterinaria Brno*, **78**, 345–352
7. -Ergün, Y., Aslantaş, Ö., Doğruer, G., Kireççi, E., Sarıbay, M. K., Ateş, C. T., Ülkü, A., Demir, C., 2009. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33(6), 477–483
8. -Persson, Y., Olofsson, I., 2011. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53, 1–5.

-