

Identificación de serotipos capsulares 5 y 8 en aislamiento de *Staphylococcus aureus* obtenidos de hatos lecheros de producción de tipo familiar en el valle de Toluca, México

Valente Velázquez, Ana García, Alberto Barbabosa, María Uxúa y Benjamín Valladares

V. Velázquez, A. Garcia, A. Barbosa, M. Uxúa y B. Valladares.
Cuerpo Académico en Salud animal (UAEM-CA-3 Salud animal) Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, autopista Toluca-Atlacomulco Km 15.5. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México
rcasaia_fmvyz@uaemex.mx

M.Ramos.,V.Aguilera.,(eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

Staphylococcus aureus expressing 5 and 8 exopolysaccharides are considered the most virulent and frequent in dairy cow's mastitis. To determine their distribution in Toluca Valley, 322 milk samples were taken from 23 family dairy herds in the following municipalities: Almoloya de Juárez, Lerma, Temoaya, Toluca and Zinacantepec. Staphylococcus aureus isolation and identification were undertaken using routine bacteriological procedures. Capsular expression was obtained in Columbia agar and capsule identified using Hiss stain. Capsular type was determined in soft agar supplemented with milk whey. Capsular serotypes 5 and 8 were identified using plate seroagglutination. cap5 and cap8 gene expression was confirmed by PCR.

The identification of capsular *S. aureus* serotypes 5 and 8 in dairy family herds in municipalities from Toluca Valley may have clinical significance in persistent infection of the mammary gland in cows as well as representing a major risk for public health.

18 Introducción

La mastitis por *S. aureus* afecta la producción lechera, al producir cambios en la composición físico-química, nutricional y celular de la leche. Los cuales afectan su calidad e inocuidad para el consumidor. El *S. aureus* es un patógeno contagioso de importancia económica y sanitaria en los hatos lecheros. La transmisión del agente ocurre entre las vacas del hato, debido a un manejo inadecuado del ordeño y malas prácticas de higiene, favoreciendo el ciclo de infección vaca - hombre - vaca constituyendo un riesgo a la salud pública. La persistencia de la infección intraglandular mamaria por *S. aureus* y los cuadros clínicos de mastitis se relacionan con la patogenicidad del agente, sugiriendo una variación en la distribución geográfica de los patotipos de *S. aureus* asociada a los factores de virulencia los cuales contribuyen un riesgo de transmisión de cepas de *S. aureus* entre la población animal y humana. La cápsula del *S. aureus* interfiere con la fagocitosis de los neutrófilos, debido a la deficiente opsonización de la bacteria, por el complemento y bajos niveles de IgG₂ en leche. El exopolisacárido capsular contiene glicoproteínas y polisacáridos, polialcoholes y aminoazúcares. Se han identificado 11 serotipos capsulares de estos los serotipos 5 y 8 se han identificado en los animales y el hombre. Dada la importancia de la cápsula por la resistencia a la fagocitosis in vitro en neutrófilos y la persistencia de la infección en la glándula mamaria; el objetivo del estudio fue identificar los serotipos capsulares 5 y 8 en vacas lecheras con mastitis subclínica en hatos lecheros de producción familiar del valle de Toluca.

18.1 Materiales y métodos

Mediante un muestreo aleatorio estratificado, se obtuvieron 322 muestras de leche de vacas en producción de diferentes edades y etapas de lactación, de 23 hatos en los municipios de Almoloya de Juárez, Lerma, Temoaya, Toluca, y Zinacantepec, en el valle de Toluca. Se determinó la frecuencia y la distribución de *S. aureus* asociada a los serotipo capsulares 5 y 8 en hatos estudiados.

La obtención de muestras de leche y el aislamiento bacteriológico se realizó de acuerdo al procedimiento del National Mastitis Council, 2005. A partir de las placas de agar sangre, sal y manitol incubadas a 37°C durante 18 a 24 h. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se identificaron presuntivamente por la hemólisis en agar sangre y la coloración amarilla en agar sal y manitol; tinción de Gram, las pruebas de catalasa y coagulasa. Se emplearon como controles las cepas ATCC *S. aureus* 25923 y *S. epidermidis* 12228 (Cohen, 1977; Boerlin et al., 2003).

La cápsula de *S. aureus* se determinó en agar Columbia (NaCl 2.0%), las UFC se tiñeron con la tinción de Hiss observada al microscopio a 100 x. El tipo capsular del *S. aureus* se identificó en las UFC en agar blando suero de leche 10% (Watts et al., 2005; Sutra y Poutrel, 1990).

Los serotipos capsulares 5 y 8 se determinaron mediante la prueba de seroaglutinación en placa con antisuero policlonal de conejo, empleando como controles las cepas capsulares y acapsular de *S. aureus* ATCC 25904, 49525 y 10832. (Karakawa et al., 1985).

Los genes cap5 y 8 se identificaron mediante la prueba de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) Verdier, 2007; empleando los iniciadores cap5 k1(5-GTCAAAGATT ATGTGATGCTACTGAG-3) y Cap5 k2 (5-ACTTCGAATATAAACTTG AATCAATGTTATACAG-3) y cap8 k1 (5-GCCTTATGTTAGGTGATAAAC-3) cap8 k2 (5-GGAAAACACTATCATAGCAGG-3).

Los productos del PCR amplificaron a 361 pb para cap 5 y 173 pb para cap8 comparados con un marcador de peso molecular y analizados en gel de agarosa al 1.5% corrido a 77 voltios 90 min y teñido con bromuro de etidio, descritos y observados en las cepas de control.

Al amplificar el ADN en un termociclador con una iniciación de 5 min de desnaturalización 94°C, 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización 94°C, 30 segundos de elongación 55°C y 1 minuto de extensión 72°C y una extensión final de 5 minutos 72°C. Los resultados se analizaron a partir de las frecuencias de la comparación de los tipos capsulares, mediante la prueba de hipótesis de proporciones (Steel, 1990).

18.2 Resultados y discusión

Se obtuvieron 90 aislamientos de *S. aureus* con una tasa de positividad del 27.95%, los cuales expresaron la capsula difusa en su totalidad.

El 63.33% (57/90) de las cepas capsulares fueron positivas al serotipo 5, el 22.22% (20/90) al serotipo 8 y 14.44% (13/90) se consideraron no tipificables (NT) ($P < 0.05$). La distribución de los serotipos capsulares 5 y 8 fue similar entre los municipios ($P > 0.005$).

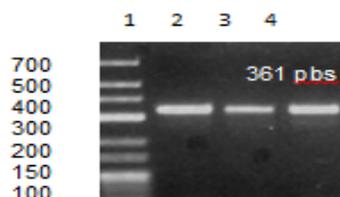
En Almoloya de Juárez se observó la mayor prevalencia de los serotipos capsulares evaluados 31.11% y 4.4% respectivamente. La menor proporción se apreció en el municipio de Toluca 1.75% del serotipo capsular 5 con ausencia del serotipo 8 (Tabla 18).

Tabla 18

Municipios	Aislamientos	Cp5 %	Cp8%	NT%
Almoloya de Juárez	35	0.18 ^{ns}	0.026 ^{ns}	0.01 ^{ns}
Lerma	18	0.16 ^{ns}	0.140 ^{ns}	0.06 ^{ns}
Temoaya	21	0.15 ^{ns}	0.064 ^{ns}	0.05 ^{ns}
Toluca	4	0.06 ^{ns}	0.000	0.20 ^{ns}
Zinacantepec	12	0.28 ^{ns}	0.140 ^{ns}	0.00
Total	90 (0.28)	0.177 ^a	0.062 ^a	0.04 ^a

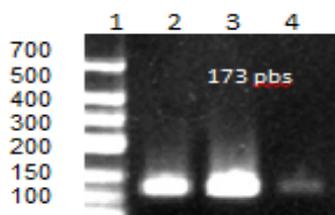
Por medio de PCR se tipificó el 86% (77/90) de aislamientos de *S. aureus*. El tamaño de los amplicones de los productos del PCR para el gen Cap5 correspondió a 361 pbs observado en los aislamientos Sa135, Sa 177, Sa 211, Sa 264, Sa 298 (Figura 1) y para el gen Cap8 173 pbs identificado en los aislamientos Sa 128, Sa 227, Sa 258, Sa 275, Sa 286 (Figura 2).

Figura 18 Amplificación de Cápsula 5. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: muestra135, carril 3: muestra177, carril 4: muestra 211.



Identificación del gen cap5 por medio de PCR

Figura 18.1 Amplificación de Cápsula 8. Carril 1: Marcador de Peso molecular; carril 2: muestra128, carril 3: muestra 227, carril 4: muestra 258.



Identificación del gen Cap8 por medio de PCR

El nivel de infección de *S. aureus* en las unidades de producción lechera familiar estudiada compromete seriamente la salud de la glándula mamaria y la productividad del hato lechero. La mastitis por *S. aureus* constituye un riesgo a la salud pública, por la contaminación de la leche y sus derivados no pasteurizados.

En los hatos lecheros evaluados en los municipios del valle de Toluca se identificaron condiciones de riesgo sanitario que favorecen la prevalencia de la mastitis subclínica en las vacas lecheras afectando consecuentemente la calidad e inocuidad de la leche.

La prevalencia de la infección por *S. aureus* en las unidades de producción lechera familiar en los municipios de Almoloya de Juárez, Lerma, Temoaya, Toluca, y Zinacantepec, fue considerada elevada. Coincidiendo con las frecuencias establecidas en estudios realizados en poblaciones de vacas lecheras en el Norte de África que indican una frecuencia de infección *S. aureus* del 40%, en Sudan del 50% contrastando con la reportada en Suecia que reporta una tasa de infección por *S. aureus* menor al 30%. La mayoría de estudios coinciden en señalar que debido a la infección por *S. aureus* en la glándula mamaria se produce una reducción considerable de la producción láctea y severo deterioro a la salud de glándula mamaria, debido a la cronicidad de la infección glandular. Estudios realizados en Italia, indican que es posible la eliminación de la infección glandular mamaria, al instrumentar programas de prevención y control para el *S. aureus*.

La expresión del tipo capsular 5 y 8 en los aislamientos de *S. aureus* obtenidos en el estudio se relacionaron con el tipo capsular difuso. Los serotipos capsulares 5 y 8 predominaron en las unidades de producción lechera familiar en el estudio, demostrando la importancia en la infección de la glándula mamaria de las vacas lecheras.

La frecuencia de los serotipos 5 y 8 en el estudio difiere con lo reportado en países como Francia, que al estudiar 212 cepas de saures, el 70% fueron clasificadas como serotipos capsulares 5 y 8, en Israel en un estudio hecho por Sompolinsky (1985) de 18 aislamientos provenientes de mastitis bovina, el 17% fue tipificable para los serotipos 5 y 8.

En Noruega en el año 2000 de 86 aislamientos obtenidos de *S. aureus* de vacas con mastitis subclínica el 95% presentaron serotipo capsular 8, mientras que en Estados Unidos de 362 aislamientos obtenidos de diferentes regiones del país el 42% fue positivo a los serotipos capsulares 5 y 8.

En Argentina en el año 2000 se evaluaron 195 cepas de *S. aureus* y se encontró que solo el 14% eran tipificables con antisueros contra el serotipo capsular 5 y 8; mientras que 168 cepas no fueron tipificables. En el estudio el método de PCR permitió la genotipificación de Cap5 y Cap8, que confirmó los hallazgos obtenidos en la serotipificación con el antisuero policlonal anticapsular 5 y 8.

Los serotipos capsulares 5 y 8 se corroboraron por la técnica de PCR, para los serotipos donde los NT mostraron características para el serotipo 5 y 8 correspondiendo a un nuevo serotipo capsular 336, sin embargo su estructura química no ha sido caracterizada y se ha demostrado recientemente que aislamientos que expresan el polisacárido capsular de superficie expresa los genes capsulares Cap5 o Cap8

18.3 Conclusiones

En las unidades de producción lechera de tipo familiar en el valle de Toluca prevalece la mastitis subclínica causada por *S. aureus* serotipos capsulares 5 y 8, con una prevalencia fenotípica y genotípica de cápsula 5 similar al encontrado en otros países y cápsula 8 fue bajo, por lo que se le considera a este patógeno importante desde el punto de vista clínico y sanitario.

18.4 Agradecimientos

El trabajo fue apoyado por el PROMEP, bajo el proyecto Variación genética de aislamientos de *S. aureus* MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar, ID 2582.

18.5 Referencias

Boerlin, P., Kuhnert, P., Hüsey, D, Schaellibaum, M., (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *Journal Clinical Microbiology*, 41,767-771.

Boutonnier, A., Nato, F., Bouvet, A., Lebrun, L., Audurier, D., Fournier, J.M., (1989). Direct Testing of Blood Cultures for Detection of the Serotype 5 and 8 Capsular Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical Microbiology*, 27,989-993.

Buzzola, F.R., Quelle, M.I., Gomez, M., Catalano, L., Steele-Moore, D., Berg, E., Gentilini, G., Sordelli, D.O., (2001). Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiology and Infection*, 126,445-452.

Cohen, G., (1977). *Microbiología y Biología molecular*. Barcelona, España: Colección Métodos.

Guidry, A.J., Bernin, L.M., Hambleton, C.N., (1994a). Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes, *Journal Dairy Science*, 76,1285-1289.

Karakawa, W.W., Fournier, J.M., Vann, W.F., Schneerson, R.S., Robbins, J.B., (1985). Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical Microbiology*, 22,445-447.

Kerro – Dego, O., Van Dijk, J.E., Nederbragt, H., (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: A review. *Veterinary Quarterly*, 24:181-198.

Manjarrez-López, A.M., Díaz-Zarco, S., Salazar-García, F., Valladares-Carranza, B., Gutiérrez-Castillo, A.C., Barbabosa-Pliego, A., Talavera-Rojas, M., Alonso-Fresán, M.U., Velázquez-Ordoñez, V. (2012). *Staphylococcus aureus* biotypes in cows presenting subclinical mastitis from family dairy herds in the Central-Eastern State of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3:265-274.

More, S. J., (2009). Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry. *Irish Veterinary Journal*, 62,5-14.

O'Riordan, K., Lee, J.C., (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Journal Clinical Microbiology Reviews*, 17,218–234

Poutrel, B., Gilbert, F.B., Lebrun, M., (1995). Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 2,166–171.

Risley, A.L., Loughman, A., Cywes-Bentley, C., Foster, T.J., Lee, J.C., (2007). Capsular Polysaccharide Masks Clumping Factor A–Mediated Adherence of *Staphylococcus aureus* to Fibrinogen and Platelets. *Journal Infectious Diseases*, 196,919–927.

Saidi, R., Khelef, D., Kaidi, R., (2013). Subclinical mastitis in cattle in Algeria: Frequency of occurrence and bacteriological isolate. *Journal South African Veterinary Association*. <http://dx.doi.org/10.4102/jsava.v84i1.929>

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. (2003). Production effects related to mastitis economics in dairy cattle herds. *Journal Veterinary Research*, 34:475-491.

Smith, K., Gould, K.A., Ramage, G., Gemmell, C.G., Lang, S. (2010). Influence of Tigecycline on Expression of Virulence Factors in Biofilm-Associated Cells of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 54:380–387.

Sordelli, D.O., Buzzola, F.R., Gomez, M.I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Catalano, M., Reitz, A., Tollersrud, T. (2000). Capsule Expression by Bovine Isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: Genetic and Epidemiologic Analyses. *Journal Clinical Microbiology*, 38:846–850.

Steel, R.G.D., Torrie, J.H., (1990). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. México: McGraw-Hill.

Sutra., L., Rainard, P., Poutrel, B., (1990). Phagocytosis of Mastitis Isolates of *Staphylococcus aureus* and Expression of Type 5 Capsular Polysaccharide Are Influenced by Growth in the Presence of Milk. *Journal Clinical Microbiology*, 28, 2253-2258.

Tollersrud, T., Kenny, K., Caugant, D.A., Lund, A.(2000a). Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 108:565-572.

Velázquez-Ordoñez, V., Valladares-Carranza, B., Gutiérrez-Castillo, A.C., Talavera-Rojas, M., Pescador-Salas, N., Valdés, R.S., (2011). Milk production and Safety Food. In *Nutritional Insights and Food Safety*. Jaroslava Švarc-Gajić (Ed). USA: Nova Science Publishers, 335-359.

Verdier, I., Durand, G., Bes, M., Taylor, K.L., Lina, G., Vandenesch, F., Fattom, A.I., Etienne, J., (2007). Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *Journal Clinical Microbiology*, 45, 725-729.

Watts, A.K., Wang, Q.P., Nicholson-Weller, A., Lee, J.C., (2005). *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infection and immunology*, 73, 3502–3511.