

LOS ESTAFILOCOCOS PRODUCTORES DE MAMITIS COMO AGENTES POTENCIALES DE INTOXICACIONES ALIMENTARIAS

Por M.^a Luisa García López*

El objetivo fundamental de este proyecto de investigación ha sido el estudio de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de los estafilococos productores de mamitis en el ganado vacuno, de su capacidad de producción de enterotoxinas, y consiguientemente de intoxicaciones alimentarias, y de la relación existente entre todas estas propiedades. Este proyecto forma parte de una línea más amplia de investigación, que se sigue en el Departamento de Higiene y Microbiología de los Alimentos, sobre caracterización de estafilococos de origen animal y estudio de su incidencia en la salud pública.

La información existente sobre los aspectos señalados es incompleta, y en muchos casos, conflictiva y no concordante. Un primer punto sujeto a fuerte controversia es la diferenciación de los cocos Gram positivos catalasa positivos en micrococos y estafilococos, ya que el criterio de fermentación anaeróbica de la glucosa resulta excesivamente restrictivo, en el sentido de que muchas cepas incluidas inicialmente en el género *Micrococcus* por no fermentar la glucosa, se comprueba después que poseen propiedades fundamentales que autorizan su clasificación como *Staphylococcus*. Desgraciadamente, estas propiedades fundamentales, como son, entre otras, el contenido en citosina-guanina del DNA y la composición química de las paredes celulares, exigen técnicas muy elaboradas, no asequibles a un laboratorio de microbiología sanitaria de los alimentos. Un carácter fundamental que hemos investigado en nuestras cepas es la sensibilidad a la lisis por lisostafina, que proporciona una información indirecta de la composición de los péptidoglicanos de la pared

* Director de la Tesis: Prof. B. Moreno García.

An. Fac. Vet. León, 1978, 24, 213-219.

celular: la lisostafina escinde los puentes interpeptídicos de glicil-glicina presentes en los péptidoglicanos de los estafilococos y no de los micrococos.

Si conflictiva es la diferenciación de estos dos géneros, no lo es menos el establecimiento de especies dentro del género *Staphylococcus*. Frente a las tres especies que figuran en la última edición del Manual de BERGEY, está prosperando en la actualidad la iniciativa de SCHLEIFER y KLOOS de distinguir hasta 10 especies distintas.

Un objetivo inicial de este trabajo ha sido el encuadramiento taxonómico de los cocos Gram positivos catalasa positivos productores de mamitis en el ganado vacuno.

Un segundo aspecto del conocimiento de los estafilococos que siempre ha presentado serias dificultades es el de la relación existente entre ciertas propiedades fisiológicas y bioquímicas, por un lado, y la capacidad de producción de enterotoxinas y de poder infectivo, por otro, caracteres estos últimos cuya demostración no está exenta de dificultades prácticas. Ciertamente que la clásica prueba de la coagulasa puede utilizarse a este fin. Ha sido, sin embargo, una hipótesis nuestra de trabajo que es preciso cuantificar esta prueba, ya que si las puntuaciones más elevadas guardan buena relación con *Staphylococcus aureus*, la especie patógena y potencialmente enterotoxigénica, las puntuaciones más bajas no son concluyentes. También la producción de DNAsa termostable, que se propone modernamente como de valor semejante a la producción de coagulasa, ha recibido especial atención en este trabajo. La fermentación del manitol en anaerobiosis es otra de las propiedades que se relacionan más comúnmente con el poder patógeno. Sin embargo, es evidente que el hábitat condiciona las propiedades de los estafilococos, y quizá de los microorganismos en general, puesto que esta propiedad es mostrada de modo muy irregular por los estafilococos de origen animal y más uniformemente por los de origen humano.

Otras propiedades, consideradas como de menor valor por algunos investigadores en relación con el poder infectivo y la capacidad de producción de enterotoxinas, que hemos investigado con nuestras cepas de estafilococos, para completar, además, su caracterización, han sido la producción de hemolisinas, de lisozima y de fosfatasa, la actividad proteolítica, la reacción en yema de huevo, etc.

Las mamitis de los animales domésticos son, quizá, las enfermedades en las que se ha utilizado con mayor profusión y de forma más ciega los antibióticos. Nos ha preocupado también la situación actual en el desarrollo de resistencias a estos quimioterápicos por parte de las poblaciones de estafilococos de origen animal, por sus importantes repercusiones, tanto en terapéutica veterinaria como en la salud pública. En relación con este último aspecto, ha surgido en los últimos años la interrogante de si las cepas de *S. aureus* antibiótico-resistentes de origen animal no podrían ser transferidas al hombre y producir en él enfermedades. Los datos con que se cuenta sobre el tipo fágico

80/81 demuestran que, efectivamente, existe un intercambio de cepas de estafilococos entre animales y hombre, y viceversa. Un amplio capítulo de esta tesis presenta los resultados obtenidos en relación con la sensibilidad de las cepas de estafilococos por nosotros estudiadas a diversos antibióticos y sulfamidas.

La tipificación por bacteriófagos, que completa el trabajo que se presenta en esta tesis, tiene también interés epidemiológico y contribuye, además, a la caracterización de las cepas de estafilococos estudiadas.

Uno de los objetivos fundamentales de este proyecto de investigación, como ya indicamos al principio, es el conocimiento de la capacidad de producción de enterotoxinas por los estafilococos productores de mamitis y presentes en muchos casos en la leche y en los derivados lácteos, y de las relaciones existentes entre esta propiedad y las pruebas de enterotoxigenicidad potencial y de poder infectivo, de más fácil realización. Esta parte del proyecto total no se presenta en este trabajo de tesis.

Las cepas de estafilococos estudiadas procedían de 88 casos de mamitis clínicas y de 55 de mamitis subclínicas. Los medios utilizados para el aislamiento fueron el agar sangre y el medio de BAIRD-PARKER. La adscripción de los cocos Gram positivos catalasa positivos aislados al género *Staphylococcus* no presentó dificultades, ya que todos ellos fermentaban la glucosa en anaerobiosis. De los 143 casos de mamitis estudiados, en 57 (39,9 %) la mamitis pudo ser atribuida a estafilococos. Se han establecido relaciones entre mamitis estafilocócica y condiciones de explotación, raza, tratamientos previos a la toma de muestras, etc.

Con las cepas de estafilococos aisladas se ha estudiado la producción de coagulasa, la fermentación del manitol, la producción de DNAsa termostable y la sensibilidad a la lisis por lisostafina. La prueba de la coagulasa se llevó a cabo en tubo con plasma de conejo, y los resultados se interpretaron según el esquema de TURNER y SCHWARTZ. La fermentación del manitol por la técnica recomendada por el Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. Para el ensayo de la producción de termonucleasa, se utilizó el medio de LACHICA, GENIGEORGIS y HOEPRICH (agar azul de toluidina O - ácido desoxirribonucleico). Finalmente, la sensibilidad a la lisis por lisostafina se determinó según la técnica de ZYGMUNT, adaptada a nuestras condiciones de trabajo. La adaptación consistió en modificar la Densidad Óptica (D. O.) inicial en razón de la utilización por nosotros de un espectrofotómetro digital U. V.-Visible con dispositivo de termostatación y cubetas de 10 mm de camino óptico. La suspensión de células en tampón, a la que se añadía la lisostafina (1 unidad/ml, concentración final), se mantenía en el dispositivo termostatzado a 37°C y las lecturas se realizaban a los tiempos 0,5, 10 y 20 minutos.

Todas las cepas estudiadas mostraron actividad coagulasa, si bien en diverso grado: el 70,1 % fueron puntuadas 4 +, el 12,3 % 3 +, otro 12,3 %

2 +, y el 5,3 % restante 1 +. Por el contrario, la fermentación del manitol en anaerobiosis no es un carácter constante de este grupo de gérmenes: el 70,2 % de las cepas fermentaban este azúcar, el 24,6 % no lo fermentaban, y el 5,2 % lo hacía débilmente. Por lo que se refiere a la producción de DNAsa termostable, los porcentajes fueron los siguientes: el 82,5 % de las cepas fueron positivas, el 15,8 % negativas, y el 1,7 % se clasificaron como dudosas. Comparados estos resultados con los obtenidos en la prueba de la coagulasa, ha podido concluirse que las puntuaciones 4 + y 3 + en dicha prueba se corresponden con la producción de termonucleasa, mientras que las 2 + y 1 + coinciden con cepas de estafilococos DNAsa termostable negativas. Los estafilococos estudiados presentaron, en conjunto, una alta sensibilidad a la lisis por lisostafina: el 86 % se clasificaron como muy sensibles, el 3,5 % como de sensibilidad intermedia, y el 10,5 % restante como poco sensibles. Una comparación de estos resultados con los obtenidos en la prueba de la coagulasa ha permitido concluir la estrecha relación existente, por un lado, entre la alta sensibilidad de las cepas a la lisostafina y la producción de coagulasa en grado máximo, y por otro, entre la escasa sensibilidad a la lisostafina y la producción de coagulasa en grado mínimo.

Consideradas en conjunto las pruebas mencionadas anteriormente, ha podido concluirse también que con respecto a la prueba de la coagulasa no parece suficiente referirse a ella en sentido positivo o negativo, sino que se hace necesario especificar el grado de positividad, ya que únicamente las puntuaciones más elevadas se corresponden con las otras propiedades fundamentales de *Staphylococcus aureus*. Con las puntuaciones más bajas, es conveniente someter las correspondientes cepas a la prueba de la DNAsa termostable, a la prueba de sensibilidad a la lisostafina, o a ambas. Ninguna de estas tres pruebas parece tener un valor absoluto por sí sola, aunque todas ellas tienen un elevado significado en la caracterización de *S. aureus*. Para estafilococos productores de mamitis en el ganado vacuno, la prueba de fermentación del manitol en anaerobiosis es menos fiable que las anteriores.

Como ya se ha indicado anteriormente, las cepas de estafilococos estudiadas se han sometido también a las pruebas de la producción de fosfatasa, de gelatinasa y de lisozima. Se ha ensayado igualmente la reacción en yema de huevo. La producción de fosfatasa se ha determinado por la técnica de BARBER y KUPER, la de gelatinasa en el medio de CHAPMAN STONE y la de lisozima por la técnica de ROSKEY y HAMDY. La reacción en yema de huevo se ha ensayado en el medio de BAIRD-PARKER. Un porcentaje alto de las cepas estudiadas producían fosfatasa (el 91,2 %), gelatinasa (el 82,4 %) y lisozima (el 93 %). Comparadas estas propiedades con la producción de coagulasa, de DNAsa termostable y sensibilidad a la lisostafina, se ha encontrado una mayor relación con la prueba de la lisozima y de la fosfatasa que con la de la gelatinasa. Por lo que se refiere a la reacción en medios con yema de huevo, el 54,4 % de las cepas

no producían esta reacción, por lo que no ha sido posible establecer ningún tipo de relación entre esta propiedad y la producción de coagulasa, de DNAsa termostable y sensibilidad a la lisostafina.

La producción de hemolisinas es un carácter que presentan de modo principal los microorganismos patógenos. Sin embargo, por lo que respecta a los estafilococos, no parece posible asociar el carácter hemolítico de las cepas con su patogenidad o enterotoxigenidad. Más relación existe entre estas dos últimas propiedades y la producción de hemolisina alfa (cepas de origen humano) y hemolisina beta (cepas de origen animal). Para la puesta en evidencia del carácter hemolítico, así como para la identificación de las hemolisinas producidas, se utilizó una técnica en placa, empleando eritrocitos lavados de conejo, oveja, caballo y humanos. En cada placa se colocaba una tira de papel de filtro impregnada con antihemolisina alfa. El elevado porcentaje de cepas hemolíticas encontrado (93 %) ha permitido concluir que el carácter hemolítico es una propiedad estrechamente ligada a los estafilococos productores de mamitis en el ganado vacuno. Destaca también en los microorganismos estudiados la producción de hemolisina beta (84,9 % de las cepas) y hemolisina delta (88,6 %), con un porcentaje menor de productores de hemolisina alfa (56,6 %). Las combinaciones de hemolisinas más frecuentes han sido la alfa-beta-delta (47,1 %) y la beta-delta (26,4 %). No ha podido establecerse ninguna relación entre el carácter hemolítico o no hemolítico de las cepas y la producción de coagulasa, de DNAsa termostable y sensibilidad a la lisis por lisostafina. Tampoco parece existir relación entre combinaciones de hemolisinas producidas y las propiedades citadas, salvo que la producción única de delta hemolisina se corresponde con cepas de estafilococos débilmente productores de coagulasa, DNAsa termostable negativas y poco sensibles a la lisostafina.

Los ensayos de sensibilidad a los antibióticos se llevaron a cabo por el método de difusión en medio sólido con discos o método disco-placa y por el método de dilución en medio sólido. En el primer caso, la técnica utilizada fue la recomendada por el NCCLS Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. En el segundo, se siguió la técnica descrita por BARRY. De los resultados obtenidos por ambas técnicas, ha podido concluirse que los estafilococos productores de mamitis en el ganado vacuno mantienen, en líneas generales, su sensibilidad a los antibióticos a excepción de la penicilina y la estreptomycin. En la población estudiada, el porcentaje de resistencia a estos antibióticos, por la técnica de dilución en medio sólido, ha sido del 36,9 % y del 10,5 %, respectivamente. La máxima sensibilidad (100 % de las cepas) se ha registrado frente a la cefalotina, la tetraciclina, la meticilina y la kanamicina. Porcentajes muy pequeños de resistencias se han observado frente a la eritromicina, al cloranfenicol y a la novobiocina. Por lo que respecta a las sulfamidas ensayadas, ha resultado evidente la casi absoluta sensibilidad de

las cepas al sulfatiazol, y la menor sensibilidad a la sulfadiazina y a la sulfamerazina.

El capítulo final de esta tesis presenta la tipificación de nuestras cepas de estafilococos con el set humano internacional de fagos y con el set básico bovino. Las técnicas empleadas con el set humano fueron las descritas por BLAIR y WILLIAMS y por PARKER. Con el set bovino, se siguieron las instrucciones del Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Inglaterra, que suministró estos fagos. Estas instrucciones coinciden básicamente con las técnicas descritas por BLAIR y WILLIAMS. La utilización de los fagos de ambos sets ha permitido tipificar el 80,7 % de las cepas de estafilococos estudiadas. Los grupos fágicos y combinaciones de grupos fágicos más frecuentes correspondieron al III y al III-IV con el set humano, y al IV y al III-IV con el set bovino. Los patrones líticos o fagotipos más frecuentes han sido el 42E/42D y el 42E, con el set humano, y el 102 y el 42E/102, con el set bovino. Los fagos del set humano que lisaron más cepas fueron el 42E y el 42D, y del set bovino el 102, 42E, 107, 117 y 42D, en este orden. El 43,4 % de las cepas tipificadas con este último set presentaban patrones líticos constituidos por fagos específicos bovinos. El significativo porcentaje (22,7 %) de cepas lisadas exclusivamente por fagos del grupo III del set humano puede tener importancia en relación con la capacidad de producción de enterotoxinas de estas cepas. No se ha encontrado el fagotipo 80/81, implicado de modo creciente en los últimos años tanto en infecciones humanas como animales, y particularmente en casos de mamitis en el ganado vacuno y en infecciones cutáneas de las personas encargadas de su cuidado. Tampoco se ha encontrado ninguno de los fagotipos estrechamente relacionados con el 80/81.

STUDIES ON STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS AS POTENTIAL CAUSES OF FOOD POISONING

This work constitutes a doctoral thesis in which the physiological and biochemical properties of staphylococci isolated from mastitis in cattle were studied, with the final aim of knowing their potential capacity of enterotoxin production. 143 cases of mastitis have been studied, 88 of which were clinical mastitis and the remaining 55 subclinical mastitis. 57 (39.9 %) of the total cases were attributed to staphylococci.

All of the 57 strains fermented glucose anaerobically and were coagulase positive, although they showed different grades of rabbit plasma clotting: 70.1 % were scored 4 +, 12.3 % 3 +, another 12.3 % 2 +, and 5.3 % 1 +. In the DNase thermostable test, 82.5 % of the strains were found to be positive, 15.8 % negative, and 1.7 % were uncertain. In general, the isolates studied showed a high sensitivity to lysis by lysostaphin: 86 % were classified as highly sensitive and 3.5 % as moderately sensitive. The remaining 10.5 % had a low

sensitivity to this enzyme. Mannitol fermentation was not a constant property of this group of staphylococci: 70.2 % of the strains were positive, 24.6 % negative and 5.2 % were classified as weakly fermentative. Relationships among the above properties have been established: only reactions scored 4 + and 3 + in the coagulase test correlated well with thermonuclease positive and highly sensitive to lysostaphin strains. From our results, it seems more convenient to report the coagulase test indicating the grade of coagulation.

Production of phosphatase, gelatinase, lysozyme and egg yolk reaction have been also studied, and the results compared with production of coagulase, thermonuclease and lysostaphin sensitivity.

Haemolytic properties have been tested with rabbit, sheep, horse and human erythrocytes: 93 % of the isolates produced one or more haemolysins. Production of beta haemolysin was more frequent (84.9 % of the haemolytic strains) than alpha haemolysin (56.6 %).

Agar diffusion and agar dilution methods were used to study the sensitivity of the strains to antibiotics. Highest percentages of resistance were found to penicillin (36.9 %) and streptomycin (10.5 %).

Finally, this doctoral thesis presents the results of the phage typing of the staphylococcal strains studied. Using both the basic set of phages for typing *S. aureus* strains of human origin and the international basic set for typing bovine staphylococci, 80.7 % of the strains have been typed. Phage groups more frequently found were III and III-IV with the human set, and IV and III-IV with the bovine set. Phage pattern 80/81 has not been found.

Enterotoxin production studies are going on and therefore results are not reported in this doctoral thesis.