

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES HEMOLITICAS DE
ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE MUESTRAS DE LECHE
MAMITICA**

*Por M. L. García y
B. Moreno*

INTRODUCCION

Ya en la segunda mitad del siglo XIX⁸, se observó que existía cierta relación entre la patogenicidad de las bacterias y la producción de hemolisinas o toxinas citolíticas. Desde el año 1894, en que se puso en evidencia que cultivos en caldo de estafilococos mostraban actividad hemolítica sobre eritrocitos de conejo¹⁵, se ha intentado establecer el papel que estas toxinas desempeñan en el poder patógeno de estos gérmenes.

La producción de hemolisinas venía siendo considerada como un importante carácter de patogenicidad útil para la diferenciación de los estafilococos patógenos, hasta que ELEK y LEVY³ pusieron de manifiesto el hecho de que también los estafilococos coagulasa negativos podían ser hemolíticos.

Los mecanismos responsables de la virulencia de los estafilococos no son bien conocidos, pero un examen de la bibliografía reciente permite señalar que se encuentra relacionada más que con un factor único con la producción de un amplio espectro de enzimas y toxinas, existiendo una mayor correlación del poder patógeno con la producción de hemolisinas alfa y/o beta que con el carácter hemolítico en general.

Los estafilococos producen al menos cuatro hemolisinas: alfa, beta, gamma y delta. Siendo el agar sangre el medio comúnmente utilizado para poner de manifiesto el carácter hemolítico de estos microorganismos, se cuenta con menos datos sobre la producción de gamma hemolisina, ya que el referido medio inhibe su actividad. Aunque algunos autores^{1,2} han apuntado la posible existencia de otras toxinas hemolíticas (épsilon, theta, kappa), para su confirmación se precisa disponer de técnicas adecuadas de purificación.

An. Fac. Vet. León, 1979, 25, 249-253.

A pesar de las limitaciones apuntadas, el estudio de las propiedades hemolíticas completa la caracterización de las cepas, contribuyendo a su clasificación. Tal es el caso de las especies *S. hyicus* y *S. intermedius* que carecen de esta propiedad. Además, existe la evidencia de que se puede establecer un cierto grado de correlación entre la producción de un determinado tipo de hemolisina y el origen de las cepas: así la producción de beta toxina es más propia de estafilococos de origen animal, mientras que la de alfa toxina está más relacionada con las cepas de origen humano.

En el presente trabajo, se da cuenta de las propiedades hemolíticas de 57 cepas de estafilococos aisladas de muestras de leche mamítica y se relacionan estas propiedades con las especies en que fueron clasificadas.

MATERIAL Y METODOS

Cepas

Las 57 cepas de estafilococos estudiadas fueron aisladas por nosotros a partir de 143 muestras de leche de ganado bovino afecto de mamitis clínicas y subclínicas⁴. Previamente al estudio de sus propiedades hemolíticas, 46 de estas cepas fueron clasificadas como *S. aureus*, 6 como *S. epidermidis*, 1 como *S. saprophyticus*, 1 como *S. hyicus*, 1 como *S. intermedius* y 2 no pudieron ser clasificadas⁵.

Métodos

Se empleó la técnica en placa descrita por NAKAGAWA¹², utilizándose el sistema de ELEK y LEVY³ para la neutralización de la hemolisina alfa por la antihemolisina correspondiente. Sobre las placas de medio solidificado, tryptose blood agar base (DIFCO) al que se añadía un 5 % de eritrocitos lavados de oveja, conejo, caballo o humanos, se colocaba una tira de papel de filtro estéril impregnada con la antihemolisina alfa (WELLCOME). Cultivos en caldo de las cepas a ensayar se sembraban por estría en ángulo recto con respecto a la tira de papel de filtro. En cada serie de pruebas se incluyeron como controles las cepas *S. aureus* ATCC 25178, productora de hemolisina beta, y *S. aureus* ATCC 8096, de hemolisina alfa. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, manteniéndose posteriormente durante una noche a 4°C. La identificación de las hemolisinas se basó en la diferente sensibilidad de los eritrocitos de las diversas especies a las distintas hemolisinas, en el aspecto de las zonas o áreas de hemólisis y en la neutralización de la hemolisina alfa por el antisuero correspondiente.

RESULTADOS

La frecuencia de las distintas combinaciones hemolíticas encontradas se presenta en la Tabla I. Todas las cepas clasificadas como *S. aureus* mostraron actividad hemolítica, siendo el grupo más común el alfa-beta-delta, con 25

TABLA I
Tipos y combinaciones de hemolisinas producidas por 57 cepas de estafilococos aisladas de muestras de leche mamítica de vaca

Combinaciones hemolíticas	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>	No clasificadas	Total
α							
β							
δ		5	1				6
αβ	3						3
αδ	2						2
αβδ	25						25
βδ	13					1	14
β + ?	3						3
No hemolíticas		1		1	1	1	4
Total	46	6	1	1	1	2	57

cepas, y el beta-delta con 13. De las seis cepas clasificadas como *S. epidermidis*, sólo una no mostró actividad hemolítica, produciendo hemolisina delta las cinco restantes. Este mismo tipo de hemólisis fue observado en el caso de la cepa de *S. saprophyticus*. Por lo que se refiere a las cepas que no pudieron ser clasificadas, una de ellas poseía actividad beta-delta y la otra era no hemolítica.

Considerando las 57 cepas en conjunto, 53 de ellas produjeron una o más de las toxinas investigadas y sólo cuatro no mostraron ningún tipo de actividad hemolítica. La toxina detectada con mayor frecuencia fue la delta (47 cepas), seguida de la beta (45 cepas). El número de cepas productoras de alfa hemolisina fue sensiblemente inferior (30 cepas).

DISCUSION

De los resultados obtenidos, es de destacar el hecho de que el 100 % de las cepas de *S. aureus* estudiadas mostraran actividad hemolítica, así como la mayor frecuencia de las combinaciones alfa-beta-delta (54,3 %) y beta-delta (28,3 %). Resultados similares a los hallados por nosotros, tanto en lo que se refiere a la actividad hemolítica de cepas de *S. aureus* agentes de mamitis bovinas como a la mayor frecuencia de las combinaciones alfa-beta-delta y beta-delta, han sido encontradas por otros autores^{10,7}. También en el caso de cepas de *S. aureus* aisladas de leche normal los resultados son muy semejantes a los obtenidos por nosotros¹¹.

El hecho de que cinco de las seis cepas clasificadas como *S. epidermidis* hayan sido productoras de hemolisina delta no es sorprendente, puesto que existen datos^{9,6} que demuestran la producción única de delta hemolisina por cepas de la mencionada especie. Es de destacar, sin embargo, que aunque existe evidencia de que la hemolisina delta producida por cepas de *S. epider-*

midis es idéntica inmunológicamente a la producida por cepas de *S. aureus*¹⁴, TURNER¹³ señala la producción de una toxina por parte de una cepa de *S. epidermidis* de origen canino cuyas propiedades biológicas eran idénticas a las de la hemolisina delta de *S. aureus*, siendo distintas sus propiedades físicas.

La producción de hemolisinas es una propiedad de la que carecen las cepas de *S. saprophyticus*. Sin embargo, la cepa clasificada por nosotros como tal, basándonos en su incapacidad para fermentar la glucosa en anaerobiosis, así como en su resistencia a la novobiocina y en otras propiedades, mostró una actividad hemolítica similar a la de la hemolisina delta elaborada por las otras especies estudiadas.

La falta del carácter hemolítico de dos de las cepas facilitó, junto con otras propiedades, su clasificación como *S. hyicus* y *S. intermedius*.

Hemos de señalar también que tres cepas produjeron claramente hemolisina beta y otro tipo de toxina que no pudo ser identificada. Finalmente, cabe destacar algunos de nuestros resultados que coinciden con observaciones de otros autores^{7, 9, 10}. Entre ellos, una mayor producción de beta lisina que de alfa lisina por tratarse de estafilococos de origen animal, y la aparición del efecto beta hemolítico sobre eritrocitos de conejo³.

RESUMEN

En este trabajo se estudian las propiedades hemolíticas de 57 cepas de estafilococos clasificadas como *S. aureus* (46 cepas), *S. epidermidis* (6 cepas), *S. saprophyticus* (1 cepa), *S. hyicus* (1 cepa), *S. intermedius* (1 cepa) y no clasificadas (2 cepas). Estas cepas fueron aisladas de muestras de leche de vacas afectas de mastitis clínicas y subclínicas.

La técnica utilizada ha sido la descrita por NAKAGAWA, empleándose tiras de papel de filtro impregnadas con antihemolisina alfa para facilitar la identificación de la hemolisina alfa para facilitar la identificación de la hemolisina correspondiente.

Todas las cepas de *S. aureus* estudiadas mostraron actividad hemolítica, siendo las combinaciones más frecuentes la alfa-beta-delta (25 cepas) y la beta-delta (13 cepas). Cinco de las seis cepas de *S. epidermidis* produjeron hemolisina delta. Este mismo tipo de hemolisina fue mostrado por la cepa de *S. saprophyticus*. Una de las dos cepas no calificadas carecía del carácter hemolítico, al igual que las cepas clasificadas como *S. intermedius* y *S. hyicus*.

HEMOLYTIC PROPERTIES OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM MASTITIC MILK

SUMMARY

The type of hemolysins produced by 46 *S. aureus*, 6 *S. epidermidis*, 1 *S. saprophyticus*, 1 *S. intermedius*, 1 *S. hyicus* and 2 unclassified strains, isolated

from mastitic milk was determined by a plate method. For differentiation of hemolysins, washed rabbit, sheep, horse and human erythrocytes as well as filter paper strips soaked in anti-alpha hemolysin were used.

All of the *S. aureus* strains showed hemolytic properties and the most common pattern found was alpha-beta-delta (25 strains) and beta-delta (13 strains). Five of the 6 *S. epidermidis* strains produced delta lysin alone. The same type of lysin was showed by the culture classed as *S. saprophyticus*. Four non hemolytic strains were found and they were considered as *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. intermedius* and unclassified.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALL, M. I. y HAQUE, R. (1972).—Identification of staphylococcal epsilon hemolysin. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 535-536.
- 2) CABRERA, G. y HAQUE, R. (1973).—Type of hemolysins produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Bacteriol. Proc.*, 118.
- 3) ELEK, S. O. y LEVY, E. (1950).—Distribution of haemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J. Pathol. Bact.*, **62**: 541-554.
- 4) GARCÍA, M. L. y MORENO, B. (1978).—Los estafilococos como agentes de mastitis en el ganado vacuno. *An. Fac. Vet. León*, **24**: 83-93.
- 5) GARCÍA, M. L., MORENO, B. y BERGdoll, M. S. (1980).—Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 548-553.
- 6) GEMMEL, C. G., THELESTAM, M. y WADSTROM, T. (1976).—Toxigenicity of coagulase negative staphylococci. En JELJASZEWICZ, J. (editor). *Staphylococci and staphylococcal diseases*. Proc. of III Int. Symposium of staphylococci and staphylococcal infections, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 133-136.
- 7) HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1969).—A study of staphylococci of bovine origin: *S. aureus* var. *bovis*. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A* **217**, 176-182.
- 8) KLEBS, E. (1874).—Citado por WISEMAN, G. M. (1975).—The hemolysins of *S. aureus*. *Bact. Review*, **39**: 317-344.
- 9) KLECK, J. L. y DONAHUE, J. H. (1968).—Production of thermostable hemolysin by cultures of *S. epidermidis*. *J. Infect. Diseases*, **181**: 317-323.
- 10) MARANDON, J. L. y OEDING, P. (1966).—Investigation on animal *S. aureus* strains. I. Biochemical characteristics and phage-typing. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **67**: 149-156.
- 11) MAYER, S. (1975).—Eigenschaften von aus Kuhmilch isolierten staphylokokken im Hinblick auf die Beurteilung von milch. *Milchwissenschaft*, **12**: 169-172.
- 12) NAKAGAWA, M. (1958).—Studies on staphylococci from the bovine udders. I. Biological characteristics of staphylococci and some observations on the pathogenic strains. *Jap. J. Vet. Res.*, **6**, 19-34.
- 13) TURNER, W. H. (1978).—Purification and characterization of an immunologically distinct delta-hemolysin from a canine strain of *S. aureus*. *Infect. Immun.*, **20**, 485-494.
- 14) TURNER, W. H. y PEICKARD, D. J. (1979).—Immunological relationship between delta-hemolysins of *S. aureus* and coagulase negative strains of staphylococci. *Infect. Immun.*, **23**: 910-911.
- 15) VAN DE VELDE, H. (1894).—Citado por WISEMAN, G. M. (1975).—The hemolysins of *S. aureus*. *Bact. Review*, **39**: 317-344.