

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVOS EN QUESERÍAS ARTESANALES DE LA CUENCA LITORAL NORTE

Marcos Schanzembach¹, Víctor Rodríguez¹, Edgardo Giannechini¹, Carolina Matto¹,

Rosina Villamayor², Carmen Martínez², Álvaro González², Lucía Grille²

1- Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino", Ruta 3 Km 369, Paysandú, 60000. Uruguay.

Autor de correspondencia: mschanzembach@mgap.gub.uy

2- Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

RESUMEN

La mastitis bovina causada por bacterias del género *Staphylococcus* es un problema relacionado con la salud animal y la salud pública. de este trabajo es detectar los genes de virulencia de *Staphylococcus* Coagulasa Positivos y determinar su relación con el nivel del test de mastitis California. Se caracterizaron genes de virulencia y resistencia de 156 aislamientos identificados como SCP provenientes de 15 queserías de la cuenca norte del Uruguay mediante PCR. Se detectaron 10 perfiles, incluyendo 4 perfiles de genes solo presentes en aislamientos con CMT normal (*nuc pvl sec*, *nuc pvl sed*, *nuc tst sec* y *tst*). La detección del gen *sed* indica la presencia del principal genotipo que afecta al ganado (GTB). La relación entre el gen *sec* en aislamientos de SCP provenientes de vacas con infección intramamaria a niveles de CMT normales indica un potencial problema en los sistemas lecheros impactando negativamente inocuidad de los alimentos. Inclusive empleando un sistema de monitoreo y manejo a nivel de tambo.

SUMMARY

Bovine mastitis caused by bacteria of the genus *Staphylococcus* is a problem related to animal health and public health. The main objective of this study is to detect virulence genes of Coagulase Positive Staphylococci and determine their relation with California Mastitis test results. Virulence and resistance genes of 156 isolates identified as SCP from 15 cheese-making dairy farms in the northern basin of Uruguay were characterized by PCR. 10 profiles

were detected, including 4 profiles of genes only present in isolates with normal CMT (*nuc pvl sec*, *nuc pvl sed*, *nuc tst sec* and *tst*). Detection of the *sed* gene indicates the presence of the main genotype affecting cattle (GTB). The relationship between the *sec* gene in SCP isolates from IIM cows at normal CMT levels indicates a potential problem in dairy systems, negatively impacting food safety. Even if using a monitoring and management system at the dairy level.

INTRODUCCIÓN

Entre los agentes zoonóticos causantes de infecciones intramamarias (IIM) encontramos a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), agrupado dentro de los *Staphylococcus* Coagulasa Positivos (SCP) está descrito como el principal patógeno a nivel mundial (Côté-Gravel y Malouin, 2019). A su vez, *Staphylococcus aureus* está descrito como uno de los principales agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) a globalmente. Los efectos tóxicos se deben a la acción de enterotoxinas producidas por este microorganismo las cuales no son eliminadas por tratamientos térmicos. Este conjunto de características demuestra que la mastitis bovina causada por bacterias del género *Staphylococcus* no solo debe considerarse como un problema relacionado a la salud animal, sino que también se la debe tener en cuenta como un riesgo potencial para la salud pública (Becker et al., 2015). El objetivo de este trabajo es detectar los genes de virulencia de *Staphylococcus* Coagulasa Positivos y determinar su relación con el nivel del test de mastitis California.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio fueron empleados 156 aislamientos identificados fenotípicamente como SCP de muestras de leche. Los aislamientos de SCP fueron obtenidos a partir de vacas en ordeño con diferentes grados de mastitis subclínica en base al grado de CMT, en queserías artesanales de la región Litoral Norte.

Se realizó la identificación de los aislamientos mediante PCR a tiempo final en base a la presencia del gen que codifica a la termonucleasa (*nuc*). Los aislamientos de SCP positivos al gen *nuc* son identificados como “*Staphylococcus aureus*”, aquellos negativos serán referidos como “No *aureus* *Staphylococcus* Coagulasa Positivo” (NA-SCP). Se determinó la presencia de los genes de virulencia: enterotoxinas clásicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*), toxina de shock tóxico (*tst*) y leucocidina Pantón-Valentine (*pvl*).

Se realizó el estudio dimensional de los aislamientos de origen bovino por medio del Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM). Se evaluó la relación entre los aislamientos portadores de genes y el nivel de CMT por medio del Coeficiente de Correlación Biserial por rangos y el test t de Student a un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los aislamientos coagulasa positivos obtenidos de bovinos, 144 fueron identificados como *S. aureus* y 12 NA-SCP. Se detectaron aislamientos portadores de genes de producción de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) y del gen *pvl* en muestras de leche en todos los niveles de CMT representando una baja proporción de aislamientos obtenidos de las vacas en ordeño.

En nuestro estudio principalmente fueron detectadas cepas productoras de enterotoxina D. Esto puede deberse a la presencia de cepas con alta tasa de contagio. Esto podría deberse a que estos aislamientos portadores

del gen *sed* pertenezcan al genotipo B (GTB). Evidencia que apoye esto es que este gen pertenece al plásmido pIB485, presente en cepas pertenecientes al GTB (Chieffi et al., 2020). Asociado a esto, el rol de las SEs en la virulencia de las IIM ha sido considerado mínimo o inexistente (Haveri, et al., 2007). La amplia distribución de los genes *pvl* y *tst* en aislamientos de origen bovino obtenida en este trabajo es similar a la hallada en estudios previos (Monistero et al., 2018). En el caso del gen *pvl*, podría estar relacionado a que este gen es transportado por múltiples bacteriófagos (Malachowa y DeLeo, 2010). Creemos que la falta de asociación entre el gen *pvl* y el incremento de células somáticas en leche puede ser causada por la especificidad de esta exotoxina (Zecconi, et al., 2006). En estudios posteriores realizados en Japón se determinó que la acción de la toxina TSST-1 es suprimida por la glándula mamaria (Komine et al., 2000). Relacionado a esto, el sistema inmune de las mismas está adaptado a generar una respuesta rápida al entrar en contacto con la toxina (Hayakawa et al., 2000). Esto puede indicar que la misma no juega un rol significativo en la patogenia de las mastitis por *Staphylococcus* ya que los bovinos están adaptados para responder de forma rápida a la toxina.

El ACM presentó una relación entre los genes *sec* *tst* (Fig. 1A). En este análisis se detectaron 10 perfiles, entre estos, 4 perfiles de genes únicamente presentes en aislamientos con un CMT normal (*nuc pvl sec*, *nuc pvl sed*, *nuc tst sec* y *tst*) (Fig. 1B).

Esta relación entre los genes de producción de enterotoxina C y el gen *tst* posiblemente

Tabla 1. Distribución de aislamientos portadores de genes, ordenados por grado de CMT (NOR: Normal, TRA: Trazas, 1°: Grado 1, 2°: Grado 2, 3°: Grado 3).

CMT	<i>nuc</i>	<i>tst</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>pvl</i>
NOR	45	7	0	1	4	4	0	7
TRA	12	0	0	0	0	1	0	2
1°	45	8	0	0	0	1	0	7
2°	32	0	0	1	0	0	0	5
3°	10	0	0	0	0	1	0	2
TOTAL	144	15	0	2	4	7	0	23

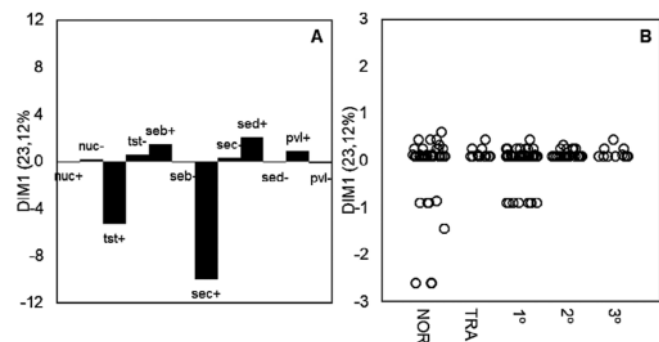
sea causada por medio de la isla de patogenicidad SaPI_{bov1} (Monistero et al., 2018). Ortega et al., (2010), enfatizan el efecto sinérgico entre estas toxinas y en otro estudio se adjudicó el 50% de las mastitis en Japón eran causadas por cepas productoras de ambas toxinas (Nagase et al., 2002)

Se empleó el Coeficiente de correlación biserial detectando correlación negativa significativa ($CC = -0,2$ $p = 0,01$) entre la presencia del gen *sec* y el nivel de CMT, indicando que aislamientos poseedores de este gen tienden a presentarse en niveles bajos de células somáticas. Esto podría ser ocasionado por una baja respuesta inmune ante infecciones por SCP con estas características. El desarrollo bacteriano está directamente asociado a la producción de enterotoxinas y la excreción de células somáticas (Kuroishi et al., 2003). Esto podría deberse a que el patógeno no se encuentre en cantidades suficientes para producir la enterotoxina.

CONCLUSIONES

La relación entre el gen *sec* en aislamientos de SCP provenientes de vacas con IIM a niveles de CMT normales indica un potencial problema en los sistemas lecheros impactando negativamente la producción y calidad de los productos elaborados, así como la inocuidad de los alimentos. Inclusive empleando un sis-

Figura 1. Análisis de correspondencia múltiple. A. Gráfico de barras, correspondencias presencia-ausencia de genes, en eje vertical valores propios (Eigenvalue) de la 1^{er} dimensión (DIM1). B. Jitter plot, distribución de observaciones agrupadas por nivel de CMT (NOR: Normal, TRA: Trazas, 1^o: Grado 1, 2^o: Grado 2, 3^o: Grado 3), en eje vertical valores propios (Eigenvalue) de la 1^{er} dimensión (DIM1).



tema de monitoreo y manejo a nivel de tambo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Becker, K., Skov, R. y Von Eiff, C. (2015). Staphylococcus, Micrococcus, and other Catalase Positive Cocci. En J. Jorgensen, M. Pfaller, K. Carroll, M. Landry, G. Funke, S. Richter, D. Warnock, Manual of Clinical Microbiology (págs. 354-382). Washington: American Society for microbiology.

Chieffi, D., Fanelli, F., Cho, G.S., Schubert, J., Blaiotta, G., Franz, C., . . . Fusco, V. (2020). Novel insights into the enterotoxigenic potential and genomic background of Staphylococcus aureus isolated from raw milk. Food Microbiology, 90, 1-16.

Côté-Gravel, J., Malouin, F. (2019) Symposium review: Features of Staphylococcus aureus mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. J Dairy Sci, 102, 4727-4740.

Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L. y Pyörälä, S. (2007). Virulence genes of bovine Staphylococcus aureus from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. Journal of Applied Microbiology, 103, 993-1000.

Hayakawa, Y., Akagi, M., Hayashi, M., Shimanoto, T., Komae, H., Funaki, O., . . . Takeuchi, S. (2000). Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of Staphylococcus aureus in dairy cows. Veterinary Microbiology, 72, 321-327.

Komine, K., Kuroishi, T., Asai, K., Komine, Y., Kai, K., Itagaki, M., . . . Kumagai, K. (2000). Nyūgyū no kenkō narabini chibusaen chibusa no chishiru-chū budō kyūkin to sono sansei dokuso no kenshutsu [Detección de estafilococos y sus toxinas en la leche de vacas con mastitis y sanas]. Ni-Tsu-jū kaishi, 53, 435-440.

Kuroishi, T., Komine, K., Itagaki, M., Uematsu, M., Kobayashi, J., Kamata, S. y Kumagai,

K. (2003). Nyūjū-chū budō kyūkin-sei enterotokishin - C nōdo no zōka ni tomonai shizen hasshō shita chibusaen shōrei no kaiseki [Análisis de la inflamación mamaria espontánea asociada con un aumento de los niveles de enterotoxina C estafilocócica en la leche]. Ni~Tsu-jū kaishi, 56, 147-151.

Malachowa, N. y DeLeo, F. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci, 67, 3057-3071.

Monistero, V., Graber, H., Pollera, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Bottini, E., . . . Moroni, P. (2018). *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis Countries Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. Toxins, 10(247), 1-22.

Nagase, N., Shimizu, A., Kawano, J., Yamashita, K., Yoshimura, H., Ishimaru, M. y Kojima, A. (2002). Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Japan. J Vet Med Sci, 64(12), 1169-1172.

Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R. y Gálvez, A. (2010). Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Toxins, 2, 2117-2131.

Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V. y Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. Microbial Pathogenesis, 40, 177-183.