



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Determinación de hemólisis en cepas de *Staphylococcus* spp. causantes de mastitis bovina

Determination of hemolysis in *Staphylococcus* spp. strains which cause bovine mastitis

Determinação de hemólise em cepas de *Staphylococcus* spp. que causam mastite bovina

Yaline Sánchez-Neira^{1*}, Maritza Angarita-Merchán¹

Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia

*Correspondencia: Dirección: Carrera 2 Este N° 64-169, Tunja, Colombia

Teléfono: 745-0000, extensión: 4402. Correo electrónico: ysanchez@uniboyaca.edu.co

..... • Fecha de recibido: 05-03-2017

..... • Fecha de aceptación: 11-21-2017

Citar este artículo así:

Sánchez-Neira Y, Angarita-Merchán M. Determinación de hemólisis en cepas de *Staphylococcus* spp. causantes de mastitis bovina. Revista Investig Salud Univ Boyacá. 2018;5:(1):15-30. doi: <https://doi.org/10.24267/23897325.266>



RESUMEN

Introducción. El género *Staphylococcus* presenta una amplia diversidad de determinantes de virulencia que comprende componentes de la pared celular y exoproteínas, las cuales contribuyen a su habilidad para colonizar y causar enfermedad en los mamíferos; las hemolisinas, como las toxinas α , y las hemolisinas β , γ y δ , son proteínas capaces de inducir lisis de eritrocitos y toxicidad en otras líneas celulares.

Objetivo. Determinar la actividad hemolítica en cepas de *Staphylococcus* spp. causantes de infecciones intramamarias en vacas lecheras de fincas del cordón central lechero del departamento de Boyacá.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio cuantitativo, observacional y de corte transversal, en el cual se determinó la hemólisis cualitativa y cuantitativa en 12 cepas de *Staphylococcus* spp. previamente confirmadas con ADN ribosómico 16S.

Resultados. Se encontró actividad hemolítica positiva en 9 de las 12 cepas estudiadas; 6 presentaron hemólisis beta; 3, hemólisis alfa, y 3, hemólisis gamma o ausencia de hemólisis. La determinación cuantitativa se llevó a cabo en 9 cepas estudiadas, encontrándose aumento progresivo de la absorbancia y disminución del número de eritrocitos, a medida que aumentaba el tiempo de incubación.

Conclusiones. La determinación cualitativa y cuantitativa de hemólisis en las cepas de *Staphylococcus* spp., permitió conocer la capacidad hemolítica presente en las cepas bacterianas aisladas de ubres de vacas con mastitis según el test de California en el departamento de Boyacá. Esto indica una implicación de riesgo patológico y epidemiológico en bovinos portadores de estas bacterias, por la posible transmisión a los consumidores de productos lácteos y sus derivados contaminados.

Palabras clave: *Staphylococcus*, hemólisis, factores de virulencia, cualitativa, cuantitativa

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus* gender presents a wide diversity of virulence types, which comprises components of the cell wall and exoproteins which contribute to its ability to colonize and cause disease in mammals. Hemolysins such as α toxins, β , γ or δ are proteins capable to induce lysis de erythrocytes and toxicity in other cell lines.

Objective: To determine the hemolytic activity in *Staphylococcus* spp. strains which cause intramammary infections in dairy cows from farms in the central milk producer area of Boyacá.

Materials and methods: A quantitative study, observational and cross-sectional was carried out in which the determination of qualitative and quantitative hemolysis in 12 *Staphylococcus* spp. strains previously confirmed with 16S ribosomal DNA was done.

Results: Positive hemolytic activity was found in 9 of the 12 strains; 6 beta hemolysis, 3 alpha hemolysis and 3 gamma hemolysis or no hemolysis. Nine strains in this study showed quantitative results, finding a progressive increase in absorbance and decrease in the number of red blood cell were found when the incubation time is increased.

Conclusions: The qualitative and quantitative determination of hemolysis in *Staphylococcus* spp. strains showed the hemolytic capacity presented in isolated bacterial strains isolated from udders of cows with a positive California mastitis test in Boyacá. This indicates an implication of pathological and epidemiological risk in bovines which are carriers of these bacteria for the possible transmission to the consumers of dairy products which are contaminated.

Key words: *Staphylococcus*, hemolysis, virulence factors, qualitative, quantitative

RESUMO

Introdução. O gênero *Staphylococcus* possui uma ampla diversidade de determinantes de virulência que inclui componentes da parede celular e exoproteínas, que contribuem para sua capacidade de colonizar e causar doenças em mamíferos; hemolisinas, tais como toxinas α , e hemolisinas β , γ e δ , são proteínas capazes de induzir lise eritrocitária e toxicidade em outras linhagens celulares.

Objetivo. Determinar a atividade hemolítica em cepas de *Staphylococcus* spp. que causam infecções intramamárias em vacas leiteiras de fazendas leiteiras no departamento de Boyacá na Colômbia.

Materiais e métodos. Foi realizado um estudo quantitativo, observacional e transversal, no qual a hemólise qualitativa e quantitativa foi determinada em 12 cepas de *Staphylococcus* spp. previamente confirmado com DNA ribossômico 16S.

Resultados. Atividade hemolítica positiva foi encontrada em 9 das 12 cepas estudadas; 6 apresentavam hemólise beta; 3, hemólise alfa e 3, hemólise gama ou ausência de hemólise. A determinação quantitativa foi realizada em 9 cepas estudadas, encontrando um aumento progressivo na absorbância e uma diminuição no número de eritrócitos na medida que o tempo de incubação aumentou.

Conclusões. A determinação qualitativa e quantitativa da hemólise em cepas de *Staphylococcus* spp., permitiu conhecer a capacidade hemolítica presente nas cepas bacterianas isoladas de úberes de vacas com mastite segundo o teste da Califórnia no departamento de Boyacá. Isso indica uma implicação do risco patológico e epidemiológico em bovinos portadores dessas bactérias, devido à possível transmissão aos consumidores de produtos lácteos e seus derivados contaminados.

Palavras-chave. *Staphylococcus*, hemólise, fatores de virulência, qualitativos, quantitativos

INTRODUCCIÓN

El crecimiento bacteriano se caracteriza por un aumento del número de células y la bipartición (fisión binaria) es el proceso mediante el cual una célula se divide y genera dos células hijas; estas últimas reciben una copia del cromosoma, de los ribosomas, los complejos macromoleculares, los monómeros e iones inorgánicos, necesarias para existir como célula independiente (1).

El intervalo que transcurre para la formación de células hijas se conoce como “generación” y el tiempo requerido para esto se denomina “tiempo de generación o duplicación”. En las bacterias, esta división celular es exponencial y corresponde al tiempo que tarda en duplicarse un microorganismo, el cual es diferente en cada uno de ellos (2).

Este crecimiento involucra ácidos nucleicos, proteínas y componentes celulares que proporcionan nutrientes a los microorganismos. La ausencia de estos componentes y de las condiciones ambientales apropiadas en el medio de cultivo, impiden el adecuado crecimiento microbiano, generando una reacción de crecimiento en la célula bacteriana. Por ejemplo, en algunos microorganismos como los mesófilos, a mayor temperatura (37 °C) se obtiene un crecimiento óptimo y, asimismo, una mayor producción de reacciones enzimáticas, proteínas y otras macromoléculas, si se compara con temperaturas inferiores (3).

Estas condiciones permiten, durante el tiempo de generación, que los microorganismos adquieran y desarrollen factores de supervivencia que conducen a la modificación, la reacción y la adaptación al entorno en el que se encuentren, lo cual influye directamente en la expresión de factores de virulencia producto de esa adaptación. Esto les permite invadir y generar daño en el huésped. Ejemplo de ello es *Staphylococcus* spp., bacterias de importancia clínica por su capacidad de causar infecciones como la mastitis y, en algunos casos, la muerte (4).

El género *Staphylococcus* produce un gran número de factores de virulencia, que favorecen su supervivencia y, al mismo tiempo, la patogénesis en el huésped, causando enfermedad en los mamíferos (5). Estos factores de virulencia, junto con la pared celular y extracelular, contribuyen a favorecer la capacidad patógena, la colonización y el establecimiento de infecciones por las diferentes cepas de este género bacteriano (6).

La mastitis (inflamación de la glándula mamaria) causada por este microorganismo es de difícil control; es necesario recurrir a medidas preventivas para evitar la mastitis crónica, por su capacidad de fijarse en las células glandulares, con el único objetivo de obtener nutrientes necesarios para su crecimiento y supervivencia, lo cual causa daño celular (7).

Se ha informado que las hemolisinas son proteínas capaces de producir principalmente lisis de eritrocitos y toxicidad en otras líneas celulares; las toxinas α , hemolisinas β , γ y δ están involucradas en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos (8), describiéndose su presencia en cepas bacterianas del género *Staphylococcus*, agente causal de infecciones intramamarias. Esta bacteria ha sido estudiada gracias a su importancia y papel protagónico en pérdidas económicas del sector lechero y su capacidad de causar daño constante en el tejido mamario, provocando infecciones crónicas en bovinos (9).

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad hemolítica en las cepas de *Staphylococcus* causantes de infección intramamaria en bovinos de fincas del cordón central lechero del departamento de Boyacá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se hizo un estudio observacional y descriptivo, de corte transversal. Se estudiaron 12 cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas e identificadas como causantes de mastitis en un estudio previo, y cuyas especies fueron confirmadas mediante ADN ribosómico 16S. Las especies bacterianas fueron: *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. devriesei*, *S. simiae*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. auricularis*, *S. chromogenes*, *S. pasteurii*, y *S. haemolyticus*.

Como controles para la evaluación cualitativa de la producción de hemólisis beta, alfa y gamma, se utilizaron cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *S. pneumoniae* ATCC 6305 y *Enterococcus faecium* ATCC 35667, respectivamente.

En la evaluación cuantitativa, el control fueron 25 μ l de glóbulos rojos lavados y resuspendidos en 1.000 μ l de solución salina (concentración celular de $0,03 \times 10^6$ o 30.000 eritrocitos/ml; absorbancia=2.495). La técnica empleada se adaptó a partir del protocolo de estandarización de Mata y Lomonte (10,11,13).

Como tratamiento previo a la evaluación de la actividad hemolítica, fue necesario recuperar las cepas bacterianas, las cuales se encontraban conservadas en caldo BHI/glicerol (medio de conservación) a -80 °C (12), sembrándolas por agotamiento en agar sangre (siembra por duplicado), con posterior incubación a 37 °C durante 18 a 24 horas.

Determinación cualitativa y cuantitativa de la actividad hemolítica en las cepas de *Staphylococcus* spp.

A partir del crecimiento bacteriano obtenido en agar sangre, se hizo la lectura cualitativa del tipo de hemólisis presente en cada una de las cepas estudiadas, por medio de la visualización de las zonas alrededor de las colonias, comparándolas con los controles empleados para cada tipo de hemólisis.

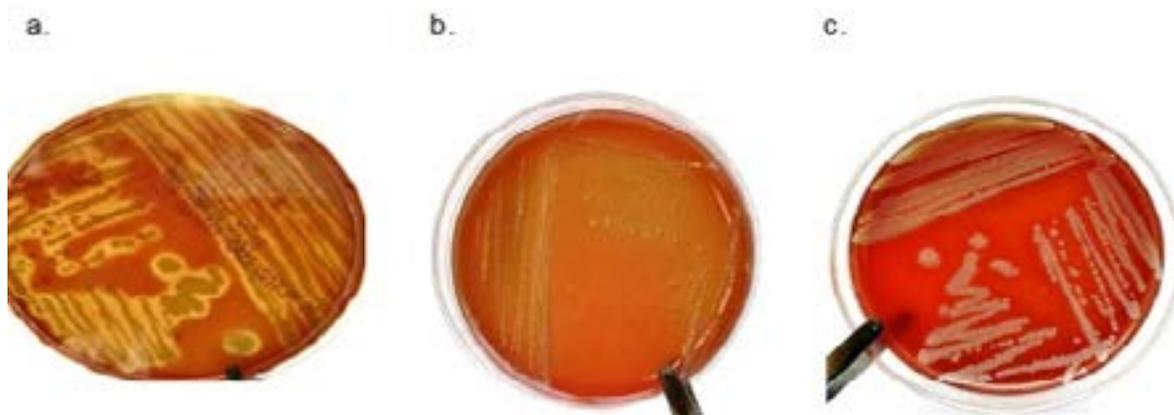
En la determinación cuantitativa de la hemólisis de las cepas estudiadas, se emplearon glóbulos rojos lavados con solución salina estéril al 0,85 %. Para cada cepa se preparó una suspensión de 1 ml de solución salina con 25 ul de glóbulos rojos lavados, a las cuales se les inocularon de dos a tres colonias bacterianas. Posteriormente, se incubaron a 37 °C y se hicieron lecturas por espectrofotometría (filtro de lectura: 540 nm) e impedancia (13,14), a los 0', 30', 1 hora, 2 horas y 3 horas después de la incubación, determinando la cantidad de eritrocitos destruidos (15,16,).

RESULTADOS

Determinación cualitativa de la hemólisis de las cepas de *Staphylococcus* spp.

La determinación cualitativa de la hemólisis de las cepas bacterianas estudiadas, se basó en la presencia de un halo de hemólisis alrededor de las colonias que crecieron en agar sangre. *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus*, *S. auricularis*, *S. chromogenes*, *S. simiae* y *S. saprophyticus* presentaron hemólisis beta, que produce un halo transparente por la destrucción total de los glóbulos rojos. *Staphylococcus sciuri*, *S. warneri* y *S. devriesei* presentaron hemólisis alfa, que produce un halo verde por la destrucción parcial de los glóbulos rojos. *Staphylococcus haemolyticus*, *S. pasteurii* y *S. epidermidis* no produjeron destrucción de los glóbulos rojos, lo que corresponde a hemólisis gamma (figura 1) (17).

Figura 1. Determinación cualitativa de la actividad hemolítica beta o de hemólisis beta producida por *S. aureus*, b. hemólisis alfa producida por *S. sciuri*, y c. hemólisis gamma por *S. epidermidis*.



Determinación cuantitativa de la hemólisis

La determinación cuantitativa permitió contar los eritrocitos destruidos por las cepas estudiadas en los tiempos de incubación establecidos; se encontró positividad en 9 de las 12 cepas estudiadas (*S. aureus*, *S. hyicus*, *S. warneri*, *S. devriesei*, *S. simiae*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. auricularis* y *S. chromogenes*).

En la espectrofotometría, la generación de partículas que aumentan la turbidez en la suspensión es directamente proporcional al valor de la absorbancia. Todas las cepas mostraron tendencia al aumento en las lecturas con el transcurso del

tiempo: iniciaron con un valor bajo en el tiempo 0 de la medición y fueron aumentando progresivamente durante la incubación. *Staphylococcus sciuri*, *S. pasteurii* y *S. haemolyticus* fueron las cepas bacterianas que mostraron valores más altos a las tres horas de incubación (tabla 1).

Tabla 1. Determinación de la hemólisis por espectrofotometría

| Tiempo/cepa | <i>S. aureus</i> | <i>S. hyicus</i> | <i>S. sciuri</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>S. simae</i> | <i>S. auricularis</i> | <i>S. devriesei</i> | <i>S. chromogenes</i> | <i>S. pasteurii</i> | <i>S. warneri</i> | <i>S. haemolyticus</i> |
|-------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| 0' | 0,148 | 0,157 | 0,217 | 0,222 | 0,240 | 0,240 | 0,231 | 0,163 | 0,136 | 0,238 | 0,194 | 0,240 |
| 30' | 0,159 | 0,162 | 0,258 | 0,229 | 0,296 | 0,285 | 0,242 | 0,231 | 0,148 | 0,241 | 0,200 | 0,300 |
| 1 hora | 0,203 | 0,226 | 0,209 | 0,239 | 0,313 | 0,297 | 0,265 | 0,288 | 0,155 | 0,261 | 0,242 | 0,375 |
| 2 horas | 0,266 | 0,299 | 0,482 | 0,276 | 0,494 | 0,432 | 0,415 | 0,297 | 0,210 | 0,639 | 0,569 | 0,519 |
| 3 horas | 0,320 | 0,343 | 1,029 | 0,718 | 0,898 | 0,815 | 0,793 | 0,468 | 0,288 | 1,072 | 0,921 | 1,026 |
| 4 horas | 0,570 | 0,610 | 1,076 | 1,030 | 1,053 | 0,943 | 1,082 | 0,688 | 0,399 | 1,203 | 1,179 | 1,182 |

El resultado obtenido mediante la impedancia, permitió conocer el número exacto de glóbulos rojos lisados en cada tiempo de medición, partiendo de una concentración eritrocitaria inicial de $0,03 \times 10^6$. Se observó que *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. saprophyticus*, *S. simae*, *S. auricularis*, *S. chromogenes* y *S. warneri* produjeron una destrucción total de los glóbulos rojos presentes en la suspensión ($0,00 \times 10^6$) a las dos horas de incubación. Por su parte, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. devriesei*, *S. pasteurii* y *S. haemolyticus* produjeron destrucción globular total a las tres horas de incubación. Finalmente, se pudo observar que el promedio de glóbulos rojos destruidos de un tiempo de medición a otro, fue de $0,01 \times 10^6$ células (tabla 2).

Tabla 2. Determinación de la hemólisis mediante impedancia

| [] GR / CEPA | <i>S. aureus</i> *10 ⁶ | <i>S. hyicus</i> *10 ⁶ | <i>S. sciuri</i> *10 ⁶ | <i>S. epidermidis</i> *10 ⁶ | <i>S. Saprophyticus</i> *10 ⁶ | <i>S. simae</i> *10 ⁶ | <i>S. Auricularis</i> *10 ⁶ | <i>S. Devriesei</i> *10 ⁶ | <i>S. Chromogenes</i> *10 ⁶ | <i>S. Pasteuri</i> *10 ⁶ | <i>S. Warneri</i> *10 ⁶ | <i>S. haemolyticus</i> *10 ⁶ |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|---|-------------------------------------|---|---|---|--|---------------------------------------|--|
| 0' | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| 30' | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |
| 1 h | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |
| 2 h | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 |
| 3 h | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

GR: glóbulos rojos

DISCUSIÓN

Staphylococcus aureus es un microorganismo muy versátil y con gran capacidad de causar infecciones en humanos mediante el consumo de alimentos contaminados. Entre las infecciones más representativas causadas por este género (*Staphylococcus*), se encuentran las intoxicaciones alimentarias, las infecciones de la piel como forunculosis y el síndrome de la piel escaldada, así como algunas de mayor importancia clínica como necrosis, neumonía, mastitis, síndrome de choque tóxico, osteomielitis, endocarditis y meningitis. Se ha reportado que la patogénesis de *S.*

aureus tiene una relación directa con los niveles de expresión de toxinas como la hemolisina- α y que este es un factor de virulencia determinante en la presentación de infecciones causadas por esta bacteria (18).

Del grupo de las hemolisinas, la hemolisina- α , también llamada toxina- α , es la más importante como factor de virulencia, gracias a su capacidad de formar poros en las membranas celulares, efecto citolítico que puede ser ejercido principalmente sobre células del tejido mamario. Sin embargo, también puede tener un fuerte efecto tóxico sobre otro tipo de células, principalmente las epiteliales.

La toxina-a puede causar muerte celular por dos mecanismos: el primero consiste en la pérdida de homeostasis iónica y destrucción, y la segunda, por activación de las vías apoptóticas al unirse a receptores de superficie de la célula (19,20).

La determinación cualitativa y cuantitativa de hemólisis en cepas de *Staphylococcus* spp., permitió conocer la capacidad hemolítica de las cepas aisladas de ubres de vacas lecheras positivas para el test de mastitis de California, en el departamento de Boyacá. Mediante los métodos empleados, se demostró la destrucción celular producida por las hemolisinas de estas bacterias. Esto indica la presencia de *Staphylococcus* spp. con factores de virulencia con gran significado clínico, capaces de causar infección en los bovinos portadores de las cepas que expresan estas toxinas, y de importancia epidemiológica por la posibilidad de transmisión al humano gracias al consumo de lácteos y sus productos con bajos controles de calidad alimentaria (21).

El presente trabajo demostró lo descrito por Camussone y Calvinhoa (22), es decir, que el cultivo in vitro de un microorganismo permite la expresión de factores de virulencia que pueden asociarse con alguna de las etapas de las infecciones intramamarias. Por tal motivo, la secreción de toxinas (hemolisinas α , β , γ y Δ) se presentará durante la multiplicación de los microorganismos, haciéndose evidentes mediante su detección en

agar sangre (23,24). Los resultados del presente estudio demuestran hemólisis beta en *S. aureus*, hemólisis alfa en *S. sciuri* y hemólisis gamma en *S. epidermidis*; la evaluación de su expresión en agar sangre, permitió establecer el tipo de hemólisis en cada una de las cepas estudiadas.

Por otra parte, la determinación cuantitativa permitió confirmar la capacidad hemolítica en *S. aureus* y *S. sciuri*, y su ausencia en *S. hyicus*, *S. warneri*, *S. devriesei*, *S. simiae*, *S. saprophyticus*, *S. auricularis* y *S. chromogenes*; estas últimas cepas no produjeron hemólisis en agar sangre, lo que confirma de manera más confiable y eficiente la presencia de las hemolisinas mediante el método cuantitativo.

Con respecto a la espectrofotometría, se puede inferir que el aumento de la turbidez se debe a dos factores importantes, el primero está relacionado con el crecimiento bacteriano en la suspensión, gracias a la fisión binaria que experimentan las bacterias bajo condiciones óptimas de crecimiento, el segundo se debe a la destrucción de glóbulos rojos que, al romperse su pared celular, liberan el contenido de hemoglobina, la cual aumenta la turbidez en la suspensión y, por ende, el valor de la absorbancia, factores que deben tenerse en cuenta al momento de interpretar los resultados.

La impedancia es un método más específico para determinar el número de glóbulos rojos destruidos. Permitió establecer estrictamente su número en los diferentes tiempos después de la incubación, y determinar el momento exacto de su destrucción total por las cepas bacterianas; además, se detectó la capacidad hemolítica en cepas bacterianas cuya evaluación cualitativa fue negativa.

Al comparar los resultados de la impedancia con los de la espectrofotometría, se evidencia que, con el paso del tiempo, las mediciones muestran la degradación celular reflejada en el aumento de turbidez y la disminución del número de glóbulos rojos en la suspensión; su relación es directamente proporcional: a mayor número de eritrocitos destruidos, mayor es la absorbancia. No obstante, si se pretende conocer el número exacto de glóbulos rojos que estas bacterias pueden destruir en un tiempo determinado de estudio, la impedancia es el método que se recomienda en este trabajo, pues evita el sesgo presente en la espectrofotometría al involucrar un factor adicional, como es el crecimiento bacteriano en las suspensiones.

Recientemente, se ha calculado que la mastitis genera el 30 % del costo total de todas las enfermedades en el ganado lechero, a nivel mundial. *Staphylococcus aureus* es el agente patógeno más importante en su presentación clínica y subclínica. En diferentes estudios, se ha informado

que su capacidad patógena se debe principalmente a la expresión de factores de virulencia como las hemolisinas α y β , responsables de la hemólisis alfa y la beta en medio de cultivo con sangre bovina o de cordero al 5 %, después de 16 a 48 horas de incubación a 37 °C (25). Estas pruebas se llevan a cabo en laboratorios veterinarios con muestras de leche de vacas con test de California positivo para mastitis, y se complementan con pruebas para discriminar las cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas de las coagulasa negativas; una de ellas es la de coagulasa en tubo, la cual se usa cuando no se presenta hemólisis en agar sangre y hay características morfológicas inespecíficas (25,26).

En Egipto, Younis, et al. (2017), informaron sobre la caracterización fenotípica y molecular de la hemólisis en aislamientos de *Staphylococcus* spp. de leche de vacas con mastitis. Encontraron hemolisina alfa en el 90 % de los aislamientos y hemolisina beta en el 85,45 %; el 9,09 % de las cepas no fueron hemolíticas. Si se comparan estos datos con los resultados del presente estudio, se puede observar que, en el departamento de Boyacá, el porcentaje de cepas circulantes con hemolisina- α es muy bajo (30 %) y el de aquellas con hemolisina- β (60 %) es muy similar, y que no hubo hemólisis en un porcentaje más alto (30 %) (27).

Lo anterior permite afirmar que el escaso porcentaje de hemolisina- α en productos lácteos derivados de

vacas infectadas en el departamento, da un parte de tranquilidad, pues esta toxina tiene gran actividad destructiva contra los glóbulos rojos y es muy tóxica para células epiteliales de humanos, mientras que la hemolisina-b interactúa únicamente con eritrocitos de oveja sin destruirlos, aun cuando se encuentre a una temperatura de 37 °C.

La presencia de este tipo de factores de virulencia en Boyacá, podría apoyar la teoría de que estas toxinas desempeñan un importante papel en la patogénesis de la mastitis, lo cual indica que son necesarias para el establecimiento de *Staphylococcus* spp., principalmente *S. aureus*, en la glándula mamaria, con posterior ataque a las células de membrana, y con compromiso importante de la reacción inmunológica del bovino (27,28). Se pueden generar medidas de prevención en el uso y administración de antibióticos para evitar que estos microorganismos causen resistencia a los antimicrobianos y pérdidas económicas que afecten el sector productivo e industrial.

Siendo *S. aureus* el patógeno contagioso más importante como potencial agente zoonótico, se hace necesario su control, no únicamente en el sector industrial sino también en el de la salud pública, por su capacidad de causar algunas enfermedades transmitidas por alimentos como la leche y los quesos contaminados, por lo cual es necesario un estricto cumplimiento de las normas en las rutinas de ordeño y buenas prácticas de ganadería, que garanticen hatos

libres de potenciales patógenos humanos (25,29).

CONCLUSIONES

Este estudio permitió establecer que 9 de las 12 cepas estudiadas presentaron un porcentaje de hemólisis superior al 70 %. Este dato es importante, pues las cepas se aislaron de ubres de vacas positivas para mastitis con la prueba de California, en el departamento de Boyacá. La presencia de estas toxinas puede generar su transmisión tanto a los consumidores de los productos lácteos como a los hatos lecheros. El método por impedancia es el ideal para conocer el número exacto de glóbulos rojos destruidos por la bacteria; es importante para establecer el riesgo patológico y epidemiológico, con el fin de tomar medidas rápidas y eficaces para la profilaxis y el tratamiento en los hatos bovinos.

RECOMENDACIONES

Se deben generar estrategias de educación dirigidas a los productores, enfocadas en el conocimiento de la mastitis en zonas lecheras, con el fin de disminuir la prevalencia y la incidencia de infecciones intramamarias en los hatos lecheros, así como programas dirigidos al control y la prevención, a partir de los resultados de investigaciones relacionadas con este tema.

CONFLICTOS DE INTERESES

Se manifiesta que el artículo de investigación no presenta conflictos de interés entre investigadores para su elaboración y publicación.

FINANCIACIÓN

Para la financiación de este proyecto, se contó con el aporte de la Universidad de Boyacá.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Microbiología, Inmunohematología y Epidemiología Molecular, de la Universidad de Boyacá.

REFERENCIAS

1. Monod J. The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol.* 1949;3: 371-94. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
2. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011; 29:601-8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
3. Mühlhauser PM, Rivas JL. Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2014; 25:569-79. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70072-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70072-0)
4. Peton V, Le Loir Y. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. *Infect Genet Evol.* 2014; 21:602-15. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.011>
5. Budd KE, Mitchell J, Keane OM. Lineage associated expression of virulence traits in bovine-adapted Staphylococcus aureus. *Vet Microbiol.* 2016; 189:24-31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.013>
6. Mazzilli M, Piccinini R, Scali F, Zecconi A. Pattern characterization of genes involved in non-specific immune response in Staphylococcus aureus isolates from intramammary infections. *Vet Science.* 2015; 103:54-9. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.007>
7. Gasque R. Enciclopedia bovina. Primera edición. Enciclopedia bovina. 2008;77-224. Fecha de consulta: 5 de octubre de 2017. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/55407879/Enciclopedia-Bovina-UNAM>
8. Seilie ES, Wardenburg JB. Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Sem Cell Dev Biol.* 2017; 72:101-16. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.04.003>

9. da Costa LB, Rajala-Schultz PJ, Hoet A, Seo KS, Fogt K, Moon BS. Genetic relatedness and virulence factors of bovine *Staphylococcus aureus* isolated from teat skin and milk. *J Dairy Sci.* 2014; 97:6907-16. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7972>
10. Grumann D, Nübel U, Bröker BM. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics, in infection. *Genet Evol.* 2014; 21:583-92. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>
11. Wang D, Zhang L, Yong C, Shen M, Ali T, Shahid M, Han B. Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 2017; 100:4276-86. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12405>
12. Pérez A, Betancourt A, Duque A, Lobo E. Cryopreservation and storage of *Mycoplasma* spp. *Rev Salud Anim.* 2016;38:105-11.
13. Lomonte B, Robles A, Mata E, Cerdas FL. Cálculo de la actividad hemolítica del complemento sérico (CH50) mediante un programa en "BASIC": comparación con el método gráfico manual. *Rev Méd Hosp Nal Niños Costa Rica.* 1986; 21:179-86.
14. Caligiore-Gei PF, Valdez JG. Adjustment of a rapid method for quantification of *Fusarium* spp. spore suspensions in plant pathology. *Rev Argent Microbiol.* 2015; 47:152-4. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>
15. Jung P, Abdelbary MM, Kraushaar B, Fetsch A, Geisel J, Herrmann M, Bischoff M. Impact of bacteriophage Saint carriage on the immune evasion capacity and hemolytic potential of *Staphylococcus aureus* CC398. *Vet Microbiol.* 2017; 200:46-51. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.015>
16. Foletti D, Strop P, Shaughnessy L, Hasa-Moreno A, Casas MG, Russell M, Pons J. Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against *Staphylococcus aureus* β -hemolysin. *J Mol Biol.* 2013; 425:1641-54. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.008>
17. Haubert L, Kroning IS, Iglesias MA, da Silva WP. First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfg* and transposon family Tn916-1545. *Microb Pathog.* 2017; 113:242-7. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.04.007>
18. Reddy PK, Shekar A, Kingston JJ, Sripathy MH, Batra H, Kudumala P. Evaluation of IgY capture ELISA for sensitive detection of alpha hemolysin of *Staphylococcus aureus* without staphylococcal protein A interference. *J Immunol Methods.* 2013; 391:31-38. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.02.004>
19. Jean ATS, Swofford CA, Panteli JT, Brentzel ZJ, Forbes NS. Bacterial delivery of *Staphylococcus*

- aureus β -hemolysin causes regression and necrosis in murine tumors. *Mol Ther.* 2017; 22:1266-74. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.36>
20. Berube BJ, Wardenburg JB. Staphylococcus aureus β -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins.* 2013; 5(6):1140-66. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>
21. Artursson K, Söderlund R, Liu L, Monecke S, Schelin J. Genotyping of Staphylococcus aureus in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet Microbiol.* 2016; 193:156-61. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.012>
22. Camussone CM, Calvinhoa LF. Factores de virulencia de Staphylococcus aureus asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Rev Argent Microbiol.* 2013; 45:119-30.
23. Savic NR, Katic V, Velebit B, Colovic S. Characteristics of enterotoxigenic coagulase positive Staphylococci isolated from bovine milk in cases of subclinical mastitis. *Procedia Food Sci.* 2015; 5:250-253. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.070>
24. Sugawara T, Yamashita D, Kato K, Peng Z, Ueda J, Kaneko J, Yao M. Structural basis for pore-forming mechanism of staphylococcal β -hemolysin. *Toxicon.* 2015; 108:226-31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.033>
25. Lundberg Å, Aspán A, Nyman A, Unnerstad HE, Waller KP. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical Staphylococcus aureus mastitis. *Acta Vet Scand.* 2014;56:2. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-56-2>
26. Persson Y, Nyman AKJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* 2011;53:36. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-36>
27. Younis G, Awad A, Shabana B. Phenotypic and molecular characterization hemolysins of Staphylococcus aureus isolated from mastitic cow's milk in Egypt. *Int J Agric Sc Vet Med.* 2017; 5:83-93.
28. Kummel J, Stessl B, Gonano M, Walcher G, Bereuter O, Fricker M, Ehling-Schulz M. Staphylococcus aureus entrance into the dairy chain: Tracking S. aureus from dairy cow to cheese. *Front Microbio.* 2016; 7:1603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01603>
29. Gil R, Amado K, Peña RJ, Remón DD. Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. *Revista de Producción Animal.* 2016; 28:39-50. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpa/v28n2-3/rpa06216.pdf>



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional