

Comunicación corta

**PRIMER INFORME EN CUBA DE VARIACIÓN GENOTÍPICA
DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE LECHE BOVINA**

J. Peña y Odalys Uffo

Laboratorio de Genética Molecular, Centro de Ensayos para la Calidad de la Leche y derivados Lácteos (CENLAC), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32 700, La Habana, Cuba. Correo electrónico: joan@censa.edu.cu

RESUMEN: *Staphylococcus aureus* es un contaminante importante y frecuente de la leche. Actualmente los estudios de tipificación genética arrojan datos importantes para el control de su diseminación; los que se basan en la variabilidad genética de la especie bacteriana. Con el objetivo de detectar polimorfismo genético se aplicaron técnicas de tipificación basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los genes *coa* y RNAr en aislamientos de *S. aureus*, a partir de leche de tanque de varias empresas de provincia La Habana y un caso de mastitis clínica. Por primera vez se comprobó la variabilidad genética de *Staphylococcus aureus* aislados en Cuba y se demostró la utilidad de las técnicas empleadas a nivel de zonas geográficas relativamente distantes y cercanas, con lo que se evidencia la distribución de ciertas variantes genéticas como aportes a la epidemiología molecular de este patógeno alimentario.

(Palabras clave: *Staphylococcus aureus*; tipificación; variabilidad genética; leche)

**GENETIC VARIATION OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM BOVINE MILK
IN CUBA, FIRST REPORT**

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is an important and frequent contaminant of raw milk. At present the studies of genetic typing gives important data for controlling their dissemination; those are based on genetic variability of the bacterial specie. With the goal of detecting genetic polymorphism typing techniques based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) of the genes *coa* and RNAr were applied *S. aureus* isolated from bulk and mastitic milk in Havana. The genetic variability of *S. aureus* isolates from bovine milk was proven for first time in Cuba and the usefulness of the techniques employed on relatively distant and near geographical areas was demonstration as well as the distribution of certain genetic variants as contribution to the molecular epidemiology of this food pathogen.

(Key words: *Staphylococcus aureus*; typing; genetic variability; milk)

Staphylococcus aureus es un patógeno versátil en animales y humanos. Puede causar enfermedades superficiales e internas, debido a la producción de exotoxinas y una variedad de síndromes toxémicos. La leche y productos lácteos han estado frecuentemente involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) contaminados con estafilococos, tanto como vehículo o lugar de multiplicación del patógeno. Entre las fuentes de conta-

minación bacteriana de la leche de tanque pueden encontrarse las manos de los ordeñadores, los equipos de ordeño, el ambiente, la ubre y la piel del pezón de la vaca. Sin embargo, por las características epidemiológicas de *S. aureus* la fuente de infección que más influye en su conteo final es la ubre del animal, lo que resalta la influencia de la mastitis bovina en la contaminación de la leche y productos lácteos (1).

En muchos países, la especie bacteriana que más se asocia con la mastitis bovina es *S. aureus*. En Cuba, según informes anteriores, este agente tuvo una prevalencia de un 29.3% (2). Múltiples investigaciones han caracterizado la diversidad genotípica de *S. aureus* provenientes de casos de mastitis bovina a nivel de cuarto (1,3,4,5,6), pero muy pocos se han dedicado a caracterizar ese comportamiento a nivel de leche de tanque (7). Hasta el presente estudio, en Cuba no se había determinado la diversidad genotípica de ninguna de las dos fuentes. El conocimiento de la variación genotípica entre aislados de *S. aureus* de leche de tanque puede ayudar en la implementación de estrategias para disminuir los niveles de este patógeno y ser útil en futuras investigaciones de brotes de ETAs a partir de productos con leche cruda, debido entre otras razones a que la presencia de ciertos genotipos en el producto puede apuntar a una posible fuente de contaminación (1).

Con el objetivo de conocer la variabilidad genética de *S. aureus* provenientes de leche de tanque se tomaron muestras en cinco vaquerías de dos Empresas Pecuarias y de un productor independiente (caso de mastitis clínica) de la provincia La Habana, así se formaron tres núcleos o zonas geográficamente dispersas entre sí dentro de la provincia; mientras que entre vaquerías de la misma empresa mantuvieron un vínculo geográfico y epidemiológico estrecho.

En total se colectaron diez muestras de leche cruda, nueve de tanque: 5 de la Empresa 1 y 4 de la Empresa 2 entre julio y octubre de 2008, mientras que la muestra restante se colectó de un caso de mastitis clínica en Marzo de 2009.

Cada muestra de leche se sembró en Agar Sangre, se aislaron las colonias sospechosas y se realizaron las pruebas: catalasa, Gram, glucosa anaerobia y coagulasa hasta llegar a la identificación bacteriana a nivel de especie (8). Luego de la extracción del ADN genómico a cada cepa según Guler *et al.* 2005, se empleó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la tipificación genética de los aislados en estudio, utilizando los oligonucleótidos para el tipaje del gen *coa*: CCAG1 y CCAG2 (9) y el par de oligonucleótidos para la variabilidad intergénica del ARNr: RRNA1 y RRNA2 (10), de los mismos autores se siguieron los programas de amplificación. Se analizaron 7 µL de cada producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio y fotografiado. Cada ensayo de PCR se repitió tres veces. Durante la aplicación de las técnicas microbiológicas y moleculares se empleó la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 5638 como control positivo.

De las diez muestras analizadas se obtuvieron siete aislados de *S. aureus*, el 70% de muestras positivas coincide con los últimos informes sobre el aislamiento de patógenos de la mastitis en Cuba, donde *S. aureus* siempre resulta ser el de mayor prevalencia (2, 11).

Los patrones de amplificación obtenidos por las técnicas basadas en PCR mostraron una repetibilidad del 100%. En el caso del tipaje basado en el gen *coa* se obtuvo una banda por cada aislado en el rango entre 700 y 1500pb (Figura 1). Según el tamaño de la banda, los siete aislados pueden ser clasificados en seis patrones, designados de C1 a C6 (Tabla 1). Siempre se observó diferente comportamiento entre vaquerías de una misma empresa; por lo que se pudo evidenciar que esta técnica es capaz de discriminar entre cepas más relacionadas geográficamente.

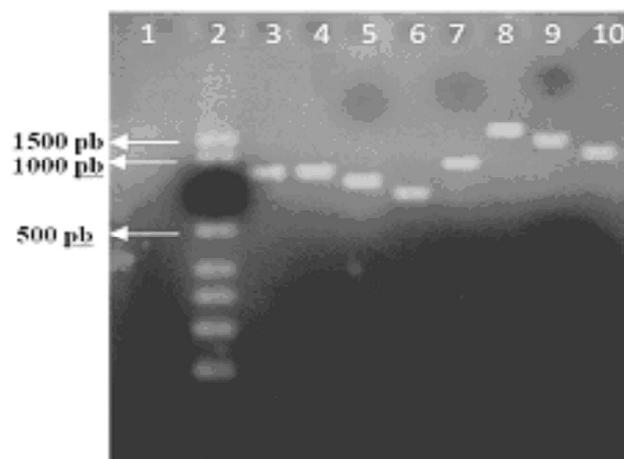


FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos del PCR para variabilidad en el gen *coa*. Línea 1: Control negativo de agua, línea 2: Patrón de peso molecular 50-1500pb (Bio-rad), línea 3: aislado 3, línea 4: aislado 12, línea 5: aislado 14, línea 6: aislado 18, línea 7: aislado 23, línea 8: aislado 24, línea 9: aislado 25 y línea 10: control positivo (*S. aureus*: cepa ATCC 5638)./ *Agarose gel electrophoresis of the PCR products for gen coa variability. Line 1: Water negative control, line 2: 50-1500pb molecular weight pattern (Bio-rad), line 3: isolate 3, line 4: isolate 12, line 5: isolate 14, line 6: isolate 18, line 7: isolate 23, line 8: isolate 24, line 9: isolate 25 and line 10: positive control (S. aureus: strain ATCC 5638).*

Mediante el estudio de la variabilidad intergénica del ARNr o ribotipaje, se generaron de 5 a 6 bandas en el rango de 600 a 1100 pb aproximadamente (Figura 2). Basados en sus respectivos patrones de amplificación, los siete aislados de *S. aureus* pudie-

TABLA 1. Distribución de los aislados de *S. aureus* según origen./ *Distribution of S. aureus isolates according to origin.*

No.	Procedencia y fecha de muestreo	Patrones por coa	Ribotipos
3	Vaquería A Empresa 1 2/7/2008	C1	R1
14	Vaquería B Empresa 1 2/7/2008	C2	R1
18	Vaquería C Empresa 1 23/7/2008	C3	R1
12	Vaquería D Empresa 2 2/7/2008	C1	R1
23	Vaquería D Empresa 2 8/10/2008	C5	R2
24	Vaquería E Empresa 2 8/10/2008	C4	R3
25	Muestra individual 4/3/2009	C6	R4

ron ser clasificadas dentro de cuatro ribotipos, designados de R1 a R4 (Tabla 1), se observa el mismo patrón en las tres vaquerías de la Empresa 1, por lo que se puede verificar que el poder de discriminación es menor que la técnica anterior, a pesar de que no sucede lo mismo en la Empresa 2.

Entre los resultados comunes de las dos técnicas, tenemos que: siempre difieren los patrones de los aislados provenientes de leche de tanque de empresas con la muestra individual de mastitis clínicas, lo cual se corresponde con las diferencias epizootológicas entre ambas fuentes, traducidas en: modo de producción, distancia geográfica, entre otras. Es importante observar también que el rebaño muestreado dos veces (vaquería C), difiere en su patrón. Una posible explicación es que en el término de tres meses que mediaron entre ambos muestreos la primera variante de *S. aureus* fue desplazada por la segunda (12).

Es interesante destacar que un ribotipo y un patrón del tipaje del gen coa incluyen cepas de diferentes orígenes, lo cual sugiere que ciertas variantes genéticas de *S. aureus* se encuentran diseminadas por la región de estudio. No obstante, estos resultados no deben ser analizados más exhaustivamente, puesto que la epidemiología molecular vinculada a los patógenos en leche requiere de mayor cantidad de muestras y de técnicas de tipificación más sofisticadas, como muestra el estado del arte en este sentido (7, 13, 14). Sin embargo con este estudio es suficiente para confirmar la utilidad de ambas técnicas para el tipaje de *S. aureus*.

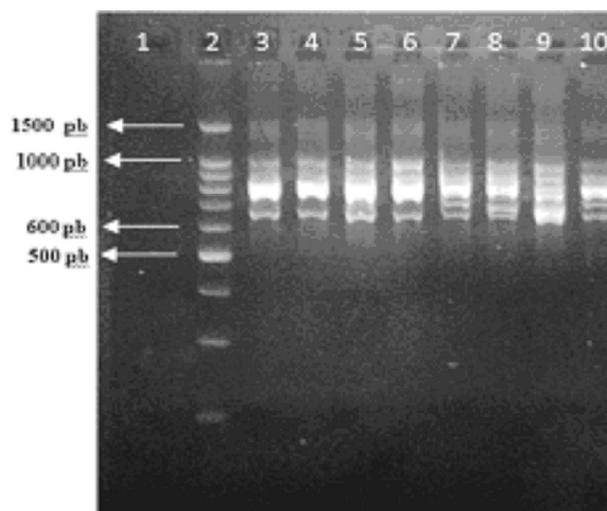


FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados por PCR para ribotipaje en región intergénica del ARNr. Línea 1: Control negativo de agua, línea 2: Patrón de peso molecular de 100pb (PROMEGA), línea 3: aislado 3, línea 4: aislado 12, línea 5: aislado 14, línea 6: aislado 18, línea 7: aislado 23, línea 8: aislado 24, línea 9: aislado 25 y línea 10: control positivo (*S. aureus*: cepa ATCC 5638)./ *Agarose gel electrophoresis of the PCR products for ribotyping on RNAr intergenic region. Line 1: Water negative control, line 2: 100pb molecular weight pattern (PROMEGA), line 3: isolate 3, line 4: isolate 12, line 5: isolate 14, line 6: isolate 18, line 7: isolate 23, line 8: isolate 24, line 9: isolate 25 and line 10: positive control (S. aureus: strain ATCC 5638).*

Resultados similares en cuanto al nivel de variabilidad y tallas en los patrones observados se han obtenido por otros investigadores (9, 10, 13).

Los análisis de leche de tanque actualmente están reconocidos como una herramienta útil, barata y rápida para evaluar la calidad de la leche y el monitoreo del estado sanitario de la ubre en el rebaño (15). Por ello, este estudio preliminar constituye un acercamiento a la caracterización molecular de aislados de *S. aureus* vinculados a la mastitis bovina, la principal enfermedad que afecta la producción lechera a nivel mundial.

Se demuestra por primera vez en Cuba la variabilidad genotípica entre aislados de *S. aureus* provenientes de leche bovina, así como que el ribotipaje y la tipificación del gen coa mediante PCR es una herramienta útil para detectar polimorfismo genético a nivel de zonas geográficas relativamente distantes, no obstante se recomienda que el presente estudio se debe corroborar con mayor cantidad de aislados de *S. aureus* y otras técnicas de tipificación descritas para la especie.

REFERENCIAS

1. Jorgensen HJ, Mork T, Caugant DA, Kearns A, Rorvik LM. Genetic Variation among *Staphylococcus aureus* Strains from Norwegian Bulk Milk. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Dec. 2005;71(12):8361.
2. Novoa R, Armenteros M, Abeledo MA, Casanovas E, Valera R, Pulido J. Impacto epizootiológico y económico de la mastitis bovina en rebaños lecheros de la provincia de Cienfuegos *Rev Salud Anim.* 2004;26(3):178.
3. Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, et al. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci.* 2008;85(3):439-48.
4. Wang SC, Wu CM, Xia SC, Qi YH, Xia LN, Shen JZ. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. *Vet Microbiol.* 2009 Jan 7.
5. Graber H, Naskova J, Studer E, Kaufmann T, Kirchhofer M, Brechbuhl M, et al. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *J Dairy Sci.* 2009; 92(4):1442.
6. Moret-Stalder S, Fournier C, Miserez R, Albini S, Doherr M, Reist M, et al. Prevalence study of *Staphylococcus aureus* in quarter milk samples of dairy cows in the Canton of Bern, Switzerland. *Prev Vet Med.* 2009;88(1):72-6.
7. Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet Microbiol* 2004; 101:107.
8. National-Mastitis-Council. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison: National Mastitis Council; 1999.
9. Guler L, Ok U, Gunduz K, Gulcu Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *J Dairy Sci* 2005 Sep; 88(9):3149-54.
10. Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol.* 1999 Jun 15;67(2):127-41.
11. Armenteros M, Ponce P, Capdevila J, Zaldívar V, Hernández R. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras de primer parto y patrón de sensibilidad de las bacterias aisladas en una lechería especializada. *Rev Salud Anim.* 2006;28(1):8-12.
12. Osteras O, editor. Mastitis epidemiology, practical approaches and applications. XIV WORLD BUIATRICES CONGRESS 2006; Nice, France: IVIS.
13. Annemuller C, Lammler C, Zschock M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1999 Sep 15; 69(3):217-24.
14. Sabour P, Gill JJ, Leep JC, Pacan J, Ahmed R, Dingwell RT, et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3455.
15. Jayarao BM, Wolfgang DR. Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Vet Clin Food Anim.* 2003; 19:92.

(Recibido 25-2-2010; Aceptado 6-6-2010)