

Eficacia del bacteriófago BK-510 contra *Staphylococcus aureus* multirresistentes aislados de leche de vaca.

Guzmán-Rodríguez J.J.^a, León-Galván F.^{b,c}, Barboza-Corona E.^{b,c}, López-Meza J.E.^d, González-Marrero J.^e, Sánchez-Felipe C.^f, Lechuga-Arana A.^b, Avila-Ramos F.^{b,g}, Valencia-Posadas M.^{b,g}, Martínez-Jaime O.A.^h y Gutiérrez-Chávez A.J.^{b,g}

^a Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Programa de Maestría y Doctorado en Biociencias. Estancia Posdoctoral (PRODEP). Ex Hacienda El Copal s/n, 36821, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México. jaquelinajulia@yahoo.com.mx

^b Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Programa de Maestría y Doctorado en Biociencias. Ex Hacienda El Copal s/n, 36821, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

^c Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Dpto. Alimentos. Ex Hacienda El Copal s/n, 36821, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

^d Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, FMVZ. Avenida Francisco J. Múgica S/N Ciudad Universitaria, 58030, Morelia, Michoacán, México.

^e Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Farmacéutica. Av. Mineral de Valenciana 200, Col. Fraccionamiento Industrial Puerto Interior, 36275 Silao de la Victoria, Guanajuato, México.

^f COBBYSA, S. A. de C. V. Río Lerma 227-B Puerto Interior 2, San Miguel, 37390 León, Guanajuato, México.

^g Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Dpto. Veterinaria y Zootecnia. Ex Hacienda El Copal s/n, 36821, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

^h Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Dpto. Agronomía. Ex Hacienda El Copal s/n, 36821, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad a antibióticos y bacteriófagos de *S. aureus* aislados de muestras de leche de vacas con mastitis. Para lo cual se tomaron 60 muestras de diferentes hatos bovinos del estado de Guanajuato. Se colectaron 10 mL de leche de vacas con mastitis. Las muestras fueron inoculadas e incubadas a 37°C por 24 h en medios LB y Baird Parker. Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos y bacteriófagos se realizaron mediante la metodología de Kirby-Bauer y la prueba de gota, respectivamente. Se obtuvieron un total de 36 aislados de *S. aureus*, de los cuales el 100% de éstos resultaron resistentes a penicilina, ampicilina y dicloxacilina. Sin embargo, todos los *S. aureus* aislados multirresistentes fueron sensibles al efecto de los bacteriófagos. Por lo que se concluye que la fagoterapia puede considerarse como una alternativa para el control y disminución del riesgo de uno de los agentes responsables de enfermedades transmitidas por alimentos en los consumidores del estado de Guanajuato..

Palabras clave: Productos lácteos, *Staphylococcus aureus*, mastitis bovina, fagoterapia.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the susceptibility to antibiotics and bacteriophages of *S. aureus* isolated from mastitic cow milk samples. Sixty milk samples were taken from several dairy cattle herds in the Guanajuato state. It was collected 10 mL of milk from cows with subclinical mastitis. The samples were inoculated and incubated at 37° C for 24 hours in LB and Baird Parker medium. Antibiotic and bacteriophage susceptibility tests were performed using the Kirby-Bauer and drop spot test methodology, respectively. A total of 36 isolates of *S. aureus* were obtained, of which 100% of them were resistant to penicillin, ampicillin and dicloxacillin. However, all multi-resistant *S. aureus* isolates were sensitive to the effect of bacteriophages. Therefore, it is concluded that phage therapy can be considered as an alternative for the control and reduction of the risk of one of the agents responsible for foodborne diseases in consumers of the state of Guanajuato..

Keywords: Dairy products, *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, phagotherapy.

Área: Lácteos.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada, donde estos elementos actúan como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas. El informe “Estimación de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria”, publicado en 2015 por la OMS informó que los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 96 mil defunciones en este grupo de edad. Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer.

En este sentido, *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que produce ETA y representa un problema de salud pública al transmitirse al hombre a través de diversos alimentos como la leche y otros productos lácteos contaminados. *S. aureus* es responsable de la mastitis en las vacas lecheras (Hennekinne *et al.*, 2011). El tratamiento convencional es con antibióticos, sin embargo, además de ejercer un bajo índice de curación, provoca la persistencia de residuos en la leche (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2008). En la búsqueda de nuevas herramientas para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos multirresistentes, la fagoterapia representa una alternativa importante. Recientemente se ha desarrollado una nueva línea de investigaciones para el control de la mastitis, basada en el uso de bacteriófagos (terapia fágica) o sus proteínas, capaces de provocar daños sustanciales al *S. aureus*. El uso de bacteriófagos para combatir infecciones se ha aplicado satisfactoriamente en numerosos países de la extinta Unión Soviética (O'Flaherty *et al.*, 2005a, 2005b). En dichos países, actualmente se producen fagos para el tratamiento de diversas enfermedades bacterianas. Se ha probado la eficiencia de las endolisinas en bacterias multirresistentes, como *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *estreptococos del grupo B* (Gill *et al.*, 2006, Keen *et al.*, 2015).

Con base en los antecedentes aquí mostrados, en el presente trabajo se plantea la hipótesis de que los aislados de *S. aureus* obtenidos del estado de Guanajuato, son multirresistentes a los antibióticos convencionales; sin embargo, son sensibles al tratamiento con bacteriófagos. Por lo tanto, nuestro objetivo principal es evaluar la susceptibilidad a antibióticos y bacteriófagos de *S. aureus* aislados de muestras de leche de vacas, con la finalidad de aportar herramientas de control para la mastitis bovina, la cual es una fuente importante de contaminación de la leche y eventualmente de ETA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 60 muestras de diferentes granjas del estado de Guanajuato. Se colectaron 10 mL de leche de vacas que fueron previamente diagnosticadas con mastitis subclínica. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por un lapso no mayor a 24 h para su posterior análisis en el laboratorio. Se inocularon placas de agar LB con 100 µL de leche y se distribuyó uniformemente con una varilla de vidrio, posteriormente se incubaron las cajas Petri a 37°C por 24 h. Una vez obtenidas las colonias, estas se seleccionaron en función de las características típicas de colonia de *S. aureus*: colonias blancas amarillentas, bordes regulares, brillantes y convexos. A estas colonias se les realizó una tinción Gram para seleccionar los cocos Gram (+) con crecimiento en racimos. Por último, paso para la identificación, se utilizó el medio selectivo Baird Parker, en el cual se incubaron los aislados por 48h a 37°C. Se tomaron como positivas para *S. aureus* a las colonias negras y brillantes. Para las pruebas de susceptibilidad a antibióticos se utilizó el método de difusión de disco en agar Müeller-Hinton, las placas de agar fueron inoculadas con 100 µl de un cultivo fresco de los diferentes aislados, posteriormente se colocaron los sensidiscos y se incubaron a 37°C por 24 h. La sensibilidad a bacteriófagos se realizó por la prueba de gota, la cual consiste en extender sobre una placa de Petri con agar LB un cultivo de *S. aureus* en su fase exponencial. Una vez seca la superficie, se adicionó una gota de la solución del fago BK-510. Posteriormente se incubaron las placas a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se registró la formación calvas o halos de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de *S. aureus*. Para realizar el aislamiento e identificación de *S. aureus* se tomaron 60 muestras de leche de diferentes granjas del estado de Guanajuato. Se obtuvieron un total de 36 aislados de *S. aureus* positivos a

las pruebas de tinción de Gram y Medio selectivo Baird Parker (Fig. 1). A pesar de la dificultad que se presenta cuando se quiere calcular la incidencia de mastitis en las granjas lecheras, esto debido a la variabilidad del curso de la infección crónica y subclínica, de los resultados obtenidos en este estudio se puede observar la importancia del problema de mastitis en la región ya que se obtuvieron aislados de *S. aureus* en más del 50% de las muestras analizadas.

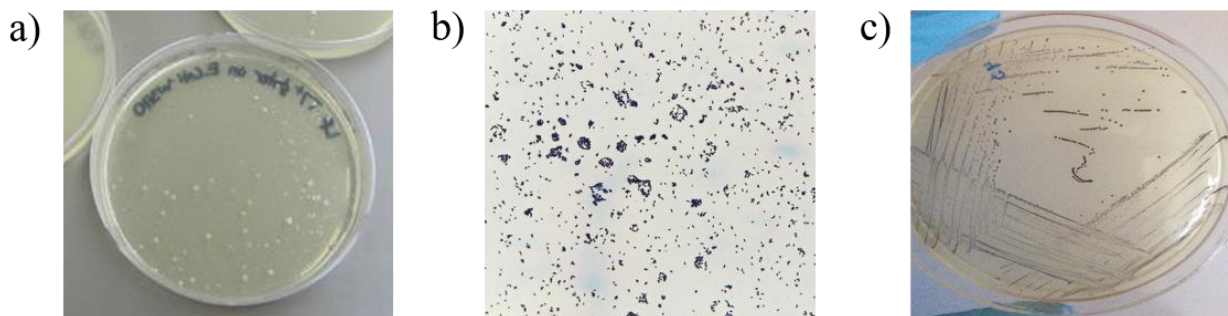


Figura 1. Aislamiento de *S. aureus*. a) placa representativa de las colonias obtenidas después del cultivo de la muestra de leche en agar LB. b) Tinción Gram representativa de las colonias seleccionadas, se observan cocos Gram (+) con crecimiento en racimo. c) se muestra una caja Petri con agar selectivo Baird Parker con crecimiento de colonias brillosas color negro las cuales son positivas para *S. aureus*.

Susceptibilidad a antibióticos de los aislados de *S. aureus*. Se realizó un antibiograma a los aislados de *S. aureus* utilizando 12 de los antibióticos utilizados comúnmente para tratar bacterias Gram (+) (Tabla I). Los resultados muestran un patrón de resistencia del 100% en los aislados de *S. aureus* a penicilina, ampicilina y dicloxacilina. De los 12 antibióticos utilizados, tres de ellos mostraron una efectividad del 83 al 100% (levofloxacina, gentamicina y tetraciclina) como lo muestra la figura 2. Además, cabe resaltar que todos los aislados fueron resistentes a por lo menos 4 de los antibióticos utilizados y 4 de ellos son resistentes a los 12 antibióticos utilizados (Tabla II).

Tabla I. Antibióticos utilizados en la prueba de sensibilidad (Kirby-Bauer)

Símbolo	Antibiótico	Concentración (µg)	Símbolo	Antibiótico	Concentración (µg)
PE	Penicilina	6	SXT	Sulfametoxazona + Trimetoprim	1,25 + 23,75
DC	Dicloxacilina	30	TE	Tetraciclina	30
PEF	Pefloxacina	5	AM	Ampicilina	10
CXM	Cefuroxima	30	E	Eritromicina	15
GE	Gentamicina	120	CAZ	Ceftazidima	30
CTX	Cefotaxima	5	CF	Cefalotina	30

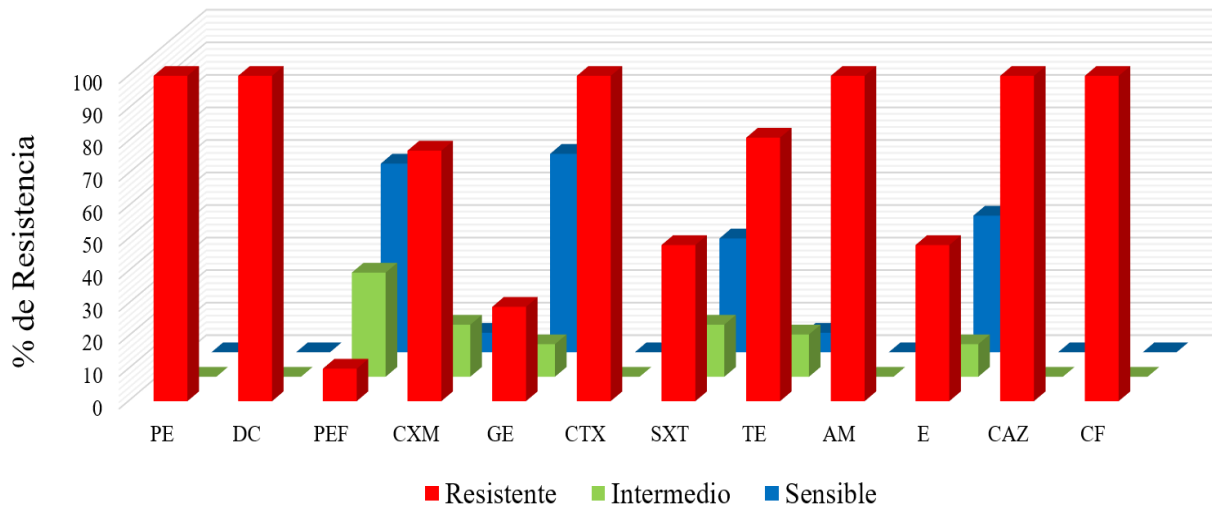


Figura 2. Antibiograma de los aislados de *S. aureus*. El gráfico muestra los resultados del antibiograma clasificados como resistentes intermedios y sensibles en función de los límites aceptables de referencia para *S. aureus* ATCC.

Sensibilidad de los aislados de *S. aureus* al bacteriófago BK-510. Una vez obtenido el patrón de resistencia de los aislados de *S. aureus*, se procedió a realizar una prueba de sensibilidad de los mismos al bacteriófago BK-510. Para ello se utilizó la técnica de spot test o prueba de gota, esta es una prueba cualitativa en la que se considera que hay efecto del fago contra la bacteria cuando se presenta la formación de calvas, es decir, halos de inhibición de crecimiento translúcidos en el agar. Esta prueba mostró que a pesar de tratarse de microorganismos multirresistentes a antibióticos, el 100% de los aislados resultaron sensibles al bacteriófago BK-510 (Tabla I).

Tabla II. Patrón de resistencia y susceptibilidad al fago BK-510 de los aislados de *S. aureus*.

No. aislado	Número (%) de resistencia a antibióticos	Susceptibilidad al fago	No. aislado	Número (%) de resistencia a antibióticos	Susceptibilidad al fago
1	7 (58.3)	Sensible	19	12	Sensible
2	9 (75.0)	Sensible	20	11 (91.7)	Sensible
3	10 (83.3)	Sensible	21	6 (50.0)	Sensible
4	10 (83.3)	Sensible	22	12 (100)	Sensible
5	11 (91.7)	Sensible	23	9 (75.0)	Sensible
6	12 (100)	Sensible	24	11 (91.7)	Sensible
7	10 (83.3)	Sensible	25	10 (83.3)	Sensible
8	8 (66.7)	Sensible	26	6 (50.0)	Sensible
9	8 (66.7)	Sensible	27	7 (58.3)	Sensible
10	10 (83.3)	Sensible	28	8 (66.7)	Sensible
11	9 (75.0)	Sensible	29	12 (100)	Sensible
12	8 (66.7)	Sensible	30	11 (91.7)	Sensible
13	9 (75.0)	Sensible	31	6 (50.0)	Sensible
14	9 (75.0)	Sensible	32	7 (58.3)	Sensible
15	7 (58.3)	Sensible	33	4 (33.3)	Sensible
16	7 (58.3)	Sensible	34	9 (75.0)	Sensible
17	8 (66.7)	Sensible	35	4 (33.3)	Sensible
18	7 (58.3)	Sensible	36	4 (33.3)	Sensible

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró una eficacia *in vitro* del 100% de los bacteriófagos sobre los aislados multi-resistentes de *S. aureus*, lo cual representa una alternativa para el control y disminución del riesgo de uno de los agentes responsables de ETA en los consumidores del estado de Guanajuato.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por su financiamiento a través de la Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2018. Proyecto: CIIC-77/2018.

BIBLIOGRAFÍA

Gill, J., Pacan, J., Carson, M., Leslie, K., Griffiths, M., & Sabour, P. (2006). Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical *Staphylococcus aureus* Mastitis in Lactating Dairy Cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2912-2918.

Keen, E.C. (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*, 37 (1), 6–9.

Ochoa-Zarzosa, A., Loeza-Lara, P.D., Torres-Rodríguez, F., Loeza-Ángeles, H., Mascot-Chiquito, N., Sánchez-Baca, S., & López-Meza, J.E. (2008). Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94, 199–206.

O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W., Fitzgerald, G.F., & Ross, R.P. (2005a). The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 187, 7161–7164.

O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F., & Ross, R.P. (2005b). Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 274–279.

World Health Organization, Who Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. Pages: 255. Publication date: 03.12.2015. ISBN: 978 92 4 156516 5. http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/ (Consulta: febrero 15, 2018).