

Control del crecimiento In Vitro sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis*

Luz Adriana Gutiérrez**, Divier Antonio Agudelo***

Resumen

Introducción. La mastitis es una enfermedad causante de pérdidas, a nivel mundial, especialmente en las regiones con una producción lechera intensiva. Es producida por microorganismos que generan daños en la ubre, generando con el tiempo resistencia bacteriana a la acción de los antibióticos y produciendo infecciones reemergentes. Una solución a este problema es la utilización de cargas hipertónicas diferentes sobre los microorganismos que generan la mastitis. **Objetivo.** Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de monosacáridos y disacáridos en los microorganismos causantes de la mastitis. **Metodología.** Se aisló *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus* de leches provenientes con vacas con mastitis del municipio de Santa Rosa de Osos, a estos se les midió su curva de crecimiento para identificar a qué horas llegaban a la fase estacionaria. La concentración de microorganismos para la evaluación con los respectivos azúcares fue 10^6 /ml inoculados en 9ml de los diferentes azúcares a las diferentes concentraciones, su inhibición se determinó por espectrofotometría, a las 20 horas aproximadamente de incubación. **Resultados.** *Staphylococcus Aureus* es susceptible a la acción de azúcares como sacarosa y glucosa, mientras que *Escherichia Coli* tiene un nivel de tolerancia más alta. Los análisis de varianzas de dos factores mostraron que existen diferencias significativas en cada uno de los tratamientos tanto para *Escherichia Coli* como para *Staphylococcus Aureus*. **Conclusión.** Se comprobó que los azúcares como sacarosa y glucosa tienen un efecto bacteriostático sobre el crecimiento In vitro de *Staphylococcus Aureus* y *Escherichia Coli* en concentraciones superiores al 30% y 35% respectivamente.

Palabras clave: Mastitis bovina, cepas Gram positivas, cepas Gram negativas.

Growth control In Vitro on Gram – negative and Gram - positive Strains that produce mastitis

Abstract

Introduction. Mastitis is a disease that causes losses worldwide, especially in regions with an extensive milk production. It is caused by microorganisms that damage the udders, producing a bacterial resistance to antibiotics with the pass of time and, in consequence, re-emerging infections. A solution to this problem is the use of different monosaccharide and disaccharide loads on the microorganisms that produce mastitis. **Objective.** To evaluate the effect of monosaccharide and disaccharide different concentrations on microorganisms that cause mastitis. **Methodology.** *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* samples were taken from milks coming from cows in Santa Rosa de Osos. The growth curves of the microorganisms were measured to identify the moment of their stationary phase. The concentration of microorganisms for the evaluation with the corresponding sugars was 10^6 /ml inoculated in 9ml of those sugars at the different concentrations. Their inhibition was determined by the use of spectrophotometry, approximately 20 hours after their incubation. **Results.** *Staphylococcus aureus* is susceptible to the action of sugars like sucrose and glucose, while *Escherichia Coli* has a higher tolerance. The variance analysis of two factors showed that there are significant differences in each treatment for both *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. **Conclusion.** A bacteriostatic effect of sucrose and glucose on the growth In vitro of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia Coli* in concentrations above 30% and 35 %, respectively, was demonstrated.

Key words: Bovine mastitis, Gram positive strains, Gram negative strains.

* Artículo producto de la investigación "Control del crecimiento *in Vitro* con diferentes concentraciones hipertónicas de monosacáridos y disacáridos sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis", realizada durante el año 2008 con financiación de la Corporación Universitaria Lasallista

** Bióloga, MSc Biotecnología, Docente Corporación Universitaria Lasallista e-mail lugutierrez@lasallista.edu.co

*** Industrial Pecuario, MSc en Ciencias Agrarias, Docente Corporación Universitaria Lasallista

Controle do crescimento In Vitro sobre cepas Gram positivas e Gram negativas produtoras de mastites.

Resumen

Introdução. A Mastites é uma doença causadora de perdas a nível mundial especialmente nas regiões com uma produção leiteira intensiva, esta é produzida por microorganismos que geram danos na ubre; gerando com o tempo resistência bacteriana à ação dos antibióticos produzindo infecções re-emergentes. Uma solução a este problema é a utilização de ônus hipertônicos diferentes sobre os microorganismos que geram a mastites. **Objetivo.** Avaliar o efeito de diferentes concentrações de monossacarídeos e dissacarídeos em microrganismos que causam mastite. **Metodologia.** Isolou-se *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de leites provenientes de vacas com mastites do município de Santa Rosa de Osos, a estes se lhes mediu sua curva de crescimento para identificar a que horas

chegavam à fase estacionária. A concentração de microorganismos para a avaliação com os respectivos açúcares foi 106/ml inoculados em 9 ml dos diferentes açúcares às diferentes concentrações, sua inibição se determinou por espectrofotometria, às 20 horas aproximadamente de incubação. **Resultados.** *Staphylococcus aureus* é susceptível à ação dos açúcares como sacarose e glicose, enquanto *Escherichia coli* tem um nível de tolerância mais alta. As análises de variâncias de dois fatores mostraram que existem diferenças significativas é cada um dos tratamentos tanto para *Escherichia coli* como para *Staphylococcus aureus*. **Conclusões.** Comprovou-se que os açúcares como sacarose e glicose tem um efeito bacteriostático sobre o crescimento in vitro de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em concentrações superiores aos 30% e 35% respectivamente.

Palavras Chave: Mastites bovina, cepas Gram - positivas, cepas Gram - negativas.

Introducción

La mastitis es la inflamación mamaria caracterizada por alteraciones patológicas del epitelio glandular, las cuales se reflejan en cambios físicos y químicos de la leche. La mastitis puede ser causada por agentes físicos y por la interacción de algunos efectos ambientales ¹. Una de las principales causas de la aparición de la mastitis es la presencia de microorganismos gram negativos y gram positivos que atacan y generan daños en la ubre de la vaca, que sumados a la resistencia bacteriana que oponen estos gérmenes a la acción de los antibióticos, presente en la mayoría de los casos, se torna una infección re emergente y reincidente. Al menos 140 microorganismos que causan mastitis han sido reportados, la mayoría de los cuales son de difícil erradicación ².

No sólo los microorganismos son responsables de la mastitis, la realidad es que la enfermedad es el resultado de la interacción y cooperación de varios factores, entre los que se destacan: la higiene y el manejo de los animales, especialmente durante la ordeña; las características del ambiente productivo, y la susceptibilidad individual de las vacas ².

Las formas más frecuentes de mastitis son: la subclínica y la clínica^{2,3}. La subclínica es difícil

de detectar, dado que la enfermedad transcurre sin provocar inflamación glandular visible, ni cambios organolépticos de la leche, aunque sí afecta la calidad fisicoquímica. Para su diagnóstico se requieren análisis de laboratorio que detecten la presencia de microorganismos causantes o el recuento de células somáticas en el fluido lácteo, y es de 10 a 40 veces más frecuente que la clínica. La forma clínica de la enfermedad presenta manifestaciones externas de naturaleza inflamatoria en la glándula, detectables por análisis clínico, secreciones lácteas alteradas y reacción sistémica ⁴.

Las medidas básicas de control de los organismos contagiosos apuntan a la prevención, a evitar que se produzcan las infecciones intramamarias. Estas medidas consisten en la práctica de un ordeño higiénico, el secado y el tratamiento antibiótico de mastitis clínicas. Estas medidas tradicionales logran reducir la incidencia de mastitis por *S. aureus*; sin embargo, en muchos casos, el nivel de infección puede ser tan elevado, que puede desencadenar mastitis clínica; con el agravante de originar resistencia bacteriana ⁵.

Una solución a este problema es la utilización de métodos alternativos que no generen efectos colaterales después de su tratamiento. Las concentraciones hipertónicas de determinados

azúcares sobre el crecimiento in Vitro de los microorganismos es una estrategia para su control que aunque, es in Vitro, los resultados pueden ser extrapolables a nivel in Vivo estudiando previamente las posibles consecuencias que puedan generar en el tejido. En esta investigación se evaluó el efecto de varios azúcares con diferentes concentraciones, sobre el crecimiento in Vitro de bacterias productoras de mastitis.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista.

Aislamiento de cepas

Las muestras de leche se obtuvieron de vacas con mastitis clínica y subclínica, provenientes de rebaños lecheros de la finca LA BAVIERA, ubicada en la vereda Pontezuela del Municipio de Santa Rosa de Osos -Departamento de Antioquia, Colombia- altura de 2450m.s.n.m, con una temperatura promedio de 14°C.

Las muestras de leche provenientes de vacas fueron recolectadas asépticamente de cuartos mamarios individuales en tubos estériles desechables con tapa rosca de 15ml de capacidad. Para el aislamiento e identificación de los microorganismos se siguieron las normas internacionales estandarizadas, empleando agar sangre para *Staphylococcus spp* además del reconocimiento de sus propiedades morfológicas, hemolíticas y pruebas de la coagulasa⁶.

Para la identificación de las bacterias coliformes, además de las características morfológicas, se utilizó una batería bioquímica de reconocimiento para gram negativas.

Determinación de la curva de crecimiento de los microorganismos

Para determinar el comportamiento de los microorganismos aislados en condiciones favorables, se procedió a evaluar su curva de crecimiento para definir las horas en las que llegaban a la fase exponencial y estacionaria; determinando de esta manera la hora aproximada en la cual se podrían realizar las lecturas de inhibición.

Efecto de diferentes concentraciones de monosacáridos y disacáridos sobre el crecimiento in Vitro de *E.coli* y *Staphilococos sp*

Los microorganismos aislados se sometieron a concentraciones de 25%, 30%, 35% y 40% para los azúcares glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa, el número inicial de microorganismos empleados fue de 10E6 bacterias/ml; concentración necesaria para que se desencadene una infección en la mayoría de los organismos superiores. Estos se inocularon en 9ml de las respectivas concentraciones. Los cultivos se encubaron a 37°C aproximadamente 20 horas. Cada experimento tuvo 5 repeticiones y dos réplicas. El control para los experimentos se realizó con la concentración de azúcar sin el microorganismo para cada una de las presiones.

Medición del crecimiento por Espectrofotometría

Con los datos obtenidos en la curva de crecimiento, para cada uno de los microorganismos, se pudo estimar la hora en la cual ellos se encontraban en el máximo punto de la fase exponencial; de acuerdo con estos datos se tomaron las medidas por espectrofotometría a 630nm, determinando, de esta manera, el efecto de las presiones osmóticas sobre el crecimiento de los microorganismos

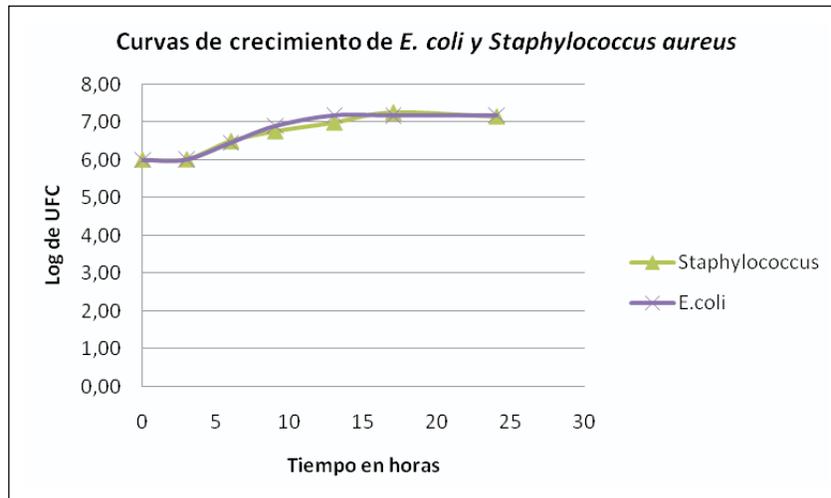
Resultados

Después de varios muestreos se aislaron colonias de bacterias en agar EMB (eosina metil blue) con características muy semejantes a las de *Escherichia coli*. De igual manera, se aislaron colonias en agar sangre con características muy similares a las de *Staphylococcus aureus* y estos resultados se corroboraron con pruebas morfológicas, pruebas bioquímicas convencionales y test de coagulasa para *Staphylococcus aureus*⁷.

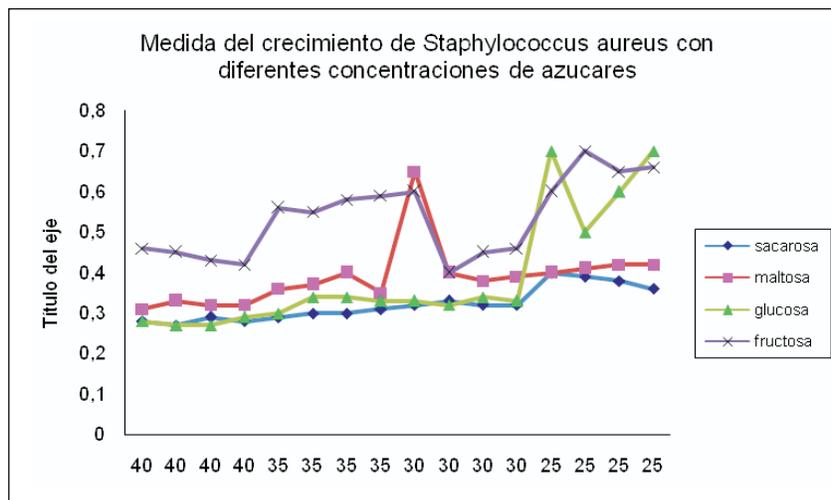
Una vez se aislaron y determinaron las cepas productoras de mastitis, se realizaron las curvas de crecimiento para cada microorganismo, evaluando su crecimiento, por espectrofotometría aproximadamente cada tres horas, en las que se observó un comportamiento similar en

ambos microorganismos (Gráfica 1) y aproximadamente a las 17 de horas de evaluación se llegó a la fase estacionaria; estos resultados

fueron determinantes a la hora de evaluar el efecto de las concentraciones de azúcares sobre el microorganismo.



Gráfica 1 Determinación de la curva de crecimiento para *E.coli* y *Staphylococcus aureus*



Gráfica 2. Medida del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con diferentes concentraciones de azúcares

La presencia o ausencia de turbidez observada en cada concentración de azúcar con cada uno de los microorganismos se realizaron por espectrofotometría, aproximadamente a las 17 horas después de iniciado el ensayo. Los resul-

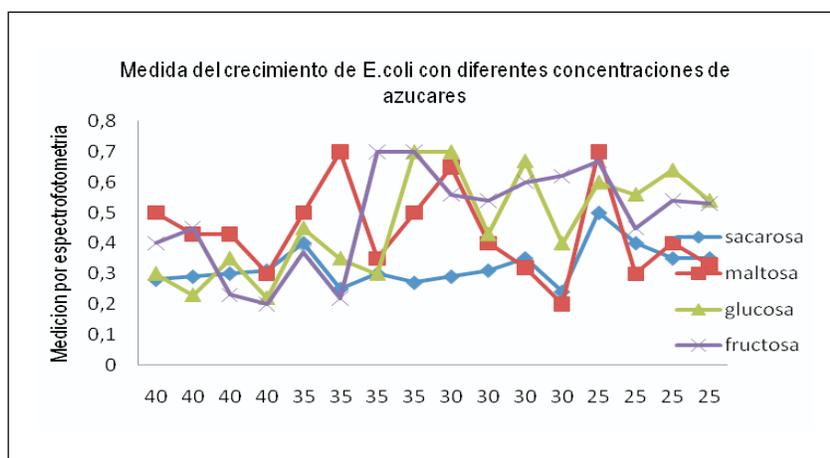
tados muestran que la *E.coli* es más tolerante a la acción de las presiones osmóticas, mientras que el *Staphylococcus aureus* es más susceptible. Estos datos fueron tabulados en las cinco repeticiones realizadas en la investigación,

obteniéndose promedios y llevando estos a un análisis de varianza de dos factores, con varias muestras por grupo, en el programa Excel.

Al comparar los resultados obtenidos (Gráficos 2 y 3) se observa que las concentraciones de azúcares empleadas en *E.coli* muestran un comportamiento similar, excepto con sacarosa, en la cual se observaron disminuidas las medidas espectrofotométricas; en cambio, con *Staphylococcus aureus* las medidas espectrofotométricas más bajas se observaron con sacarosa a concentraciones superiores del 30%, seguido de maltosa, glucosa y fructosa. En la

Gráfica 2 se observan dispersiones obtenidas de maltosa y fructosa en las concentraciones de 30% y 25% respectivamente. Es probable que haya habido conteos imprecisos de los microorganismos inoculados inicialmente y por lo tanto se disparó el crecimiento.

Al comparar los análisis de varianza se muestra que hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones utilizadas sobre los aislados; encontrándose mayor nivel de variabilidad en el *Staphylococcus aureus* comparado con el de la *E.coli*.



Gráfica 3. Medida del crecimiento de *E.coli* con diferentes concentraciones de azúcares

Tabla 1 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para *E.coli*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0,24411875	3	0,08137292	5,11812881	0,00374664	2,79806065
Columnas	0,24963125	3	0,08321042	5,23370242	0,0033106	2,79806065
Interacción	0,21234375	9	0,02359375	1,48398087	0,18107096	2,08173039
Dentro del grupo	0,76315	48	0,01589896			
Total	1,46924375	63				

Tabla 2 Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para *Staphylococcus aureus*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0,29926719	3	0,09975573	42,6287558	1,4044E-13	2,79806065
Columnas	0,38915469	3	0,12971823	55,432673	1,2648E-15	2,79806065
Interacción	0,17547656	9	0,0194974	8,33184954	2,4041E-07	2,08173039
Dentro del grupo	0,112325	48	0,0023401			
Total	0,97622344	63				

Discusión

En los ensayos de aislamientos y caracterización de microorganismos productores de mastitis, en la finca la Baviera del municipio de Santa Rosa de Osos, se encontró que los patógenos causantes de esta enfermedad eran *Staphylococcus aureus* y *E.coli* en 6 muestras evaluadas; estos resultados corroboran los encontrados por Zschöck⁷ y colaboradores donde los índices más altos de infección son producidos por *Streptococos agalactiae*; *Staphylococcus aureus* y *E.coli*, en sus investigaciones un 58% de 433 establos lecheros tenían problemas por el *S. aureus*⁸.

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria inmóvil Gram positiva, esférica y usualmente agrupada en racimos, anaerobia-aerobia facultativa, catalasa positiva. Produce generalmente la enzima coagulasa, fermenta el manitol y otros azúcares, formando ácido pero no gas⁹. Tolerancia altas concentraciones de cloruro de sodio que la hace muy halófila, razón por la cual su crecimiento se ve afectado por la acción de algunos azúcares, especialmente sacarosa y glucosa, en concentraciones superiores al 30%.

La mayoría de reservorios de *S.aureus* están en el hombre, las moscas, alojamientos, equipos y otros animales no bovinos. El *S.aureus* tiene alta capacidad de vivir intracelularmente, por lo tanto, la respuesta del microorganismo frente al antibiótico no es óptima; regularmente, hay que buscar métodos alternativos¹⁰.

La mastitis producida por *Escherichia coli* constituye otro problema importante en la salubridad animal; pues la mayoría es de origen ambiental y difícil de controlar en el hato; se considera pri-

mera causa de contaminación con excretas fecales y su incidencia es menor de 25%^{11,12}.

Castañeda¹³ en 1997, encontró que la dosis infectiva capacitada para desencadenar una mastitis es de 10^6 a 10^7 bacterias/ml, estas mismas dosis fueron utilizadas en los ensayos de la investigación; asegurando que los azúcares tuvieran control sobre el crecimiento de los microorganismos a nivel in Vitro¹³.

Los azúcares que generaron mayor control sobre el crecimiento de los microorganismos fueron Sacarosa y glucosa, ambos, son de uso común y posiblemente, generaron en la membrana de las bacterias una hiperosmolaridad logrando en ellas la deshidratación. Estos resultados son reportados también por Bastado¹⁴ y colaboradores quienes encontraron que cualquier cambio drástico en la concentración de solutos presentes en la fase acuosa de una preparación, puede ocasionar la lisis o la deshidratación de los microorganismos; situación que no se presentó con maltosa y fructosa. La maltosa es un azúcar fácilmente asimilable por *E.coli* y la fructosa entra directamente la degradación glicolítica en los dos microorganismos¹⁴.

La acción inhibitoria más importante de la sacarosa, posee propiedades antibacterianas, bacteriostáticas, antisépticas, antiedematosa, no irritantes, e inmunológicas, su aplicación directa genera una presión osmótica que deshidrata el citoplasma bacteriano de las columnas presentes en el lecho de las bacterias, consiguiendo por un lado, la lisis bacteriana y por otro, la incapacidad reproductora de las bacterias no lisadas de las heridas. Algunos autores^{15y16} han sugerido el uso de una solución salina hipertónica (SSH) (3-5 mL/kg P.V.) para el con-

trol de mastitis en becerros. También la SSH al 7.0-7.5% está indicada para vacas con endotoxemia asociada con mastitis para coliformes^{15, 16}.

Al observar el análisis de varianza utilizada en la pruebas, se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos realizados; en *S.aureus* la F calculada fue mucho mayor que la f crítica al comparar los azúcares y las concentraciones utilizadas; apreciándose mayor índice de variabilidad en estos ensayos. En cambio, con *E.coli* aunque presentó diferencias significativas entre la F calculada y la f crítica, la variabilidad interna es menor, lo cual sugirió que la inhibición del crecimiento realizada por los azúcares fue menor.

Conclusiones

Con los resultados encontrados en esta investigación se pudo comprobar que los azúcares como sacarosa y glucosa, tienen un efecto bacteriostático sobre el crecimiento in Vitro del *S.aureus* y *E.coli* en concentraciones superiores al 30% y 35% respectivamente. El *S.aureus* presentó mayor susceptibilidad a los azúcares evaluados que *E.coli*. Se recomienda que para futuros ensayos se evalúen sobre células somáticas para determinar las consecuencias de estos in vivo

Referencias

1. BLOOD, Douglas Charles y RADOSTIS, Otto M. Medicina Veterinaria: tratado de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino. 7 ed. México: Interamericana, 1992-2002. 2v.
2. PHILPOT, N. y NICKERSON, S. Mastitis: el contraataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Estados Unidos: Babson Bros Co, 1992. p 147-234.
3. KRUIZE, J. Diagnóstico bacteriológico de mastitis. En: Curso Mastitis del bovino y su impacto económico. (4: 24-26, octubre: Chile). Memorias. Santiago de Chile: Universidad de Santiago de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, 1988. p. 169-184.
4. TINSKY, M.; ZAGRIR, S. Detection of clinical and sub clinical mastitis using an on line electrical conductivity. En: Semmer International Proceeding mastitis (3: 13-14, may: Ámsterdam, Holanda). Memory. Ámsterdam, Holanda, 1995.
5. CARRIÓN, G. M. Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional de Michoacán, 2002. p. 6-20, 55.
6. VIERA, A, *et al.* Genes de resistencia en *Staphylococcus aureus* y Bacilos gram negativos aislados en predios lecheros de la provincia de Ñuble, VIII Región de Chile. En: Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. (13: Valdivia. Póster) Memorias. Santiago de Chile:
7. ZSCHÖCK, Michael; SOMMERHÄUSER, Jurgen and CASTAÑEDA, Hugo. Relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd. En: Journal of Dairy Research. 2000. vol. 67, no. 3, p. 429-435.
8. WATTS, Jeffrey L; NICKERSON, S and PANKEY, J. Evaluation of the STAPH-Ident and STAPHase systems for identification of staphylococci from bovine intramammary infections. In: Journal of Clinical Microbiology, 1984, no. 20, p. 448-452. Citado por: WATTS, Jeffrey L. And WASHBURN, Patty J. Evaluation of the Staph-Zym System with *Staphylococci* Isolated from Bovine Intramammary Infectionst. En: Journal of Clinical Microbiology. January, 1991. vol. 29, no. 1, p. 59-61
9. NUÑEZ PEÑA, Daniel. Recuento de células somáticas de leche cruda recepcionada en planta proveniente de estanques prediales positivos a cultivo de *staphylococcus aureus* en la provincia de Ñuble. Memoria de título. Paraguay: Universidad de Concepción Campus Chillán. Facultad de Medicina Veterinaria, 2002. P.48.
10. OWENS, WE; NICKERSON, SC. and RAY, CH. Efficacy of parenterally or intramammarily administered tilmicosin or ceftiofur against *Staphylococcus aureus* mastitis during lactation. En: Journal of Dairy Science. 1999. vol. 82, no. 3, p. 645-647.
11. ARIZNABARRETA, A., *et al.* Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. En: Journal of Dairy Science. June, 2002. vol. 85, no. 6, p. 1370-1375
12. ROSSITTO, PV, *et al.* Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis. En: Journal of Dairy Science. January, 2002. vol. 85, no. 1, p. 132-138.

13. CASTAÑEDA VASQUEZ, H. Distribución y prevalencia de bacterias patógenas aisladas de casos de mastitis bovina en Jalisco México. En: Avances en la investigación científica en el CUCBA. 2006: XVI Semana de la Investigación Científica. México: Universidad de Guadalajara, 2006. p. 603-607.
14. BASTADO, Yajaira. Garantía de la calidad microbiológica de los medicamentos. Trabajo de ascenso para optar a la categoría de profesor agregado. Venezuela: Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. 1993.
15. BOUDA, J; NUÑEZ, OL y QUIROZ, RG. Fisiopatología y tratamiento de diarrea en becerros. En: Curso de actualización en el diagnóstico de enfermedades metabólicas y ruminales en los bovinos y Congreso Mundial de Buiatría. (21: 9-10, diciembre: Punta del Este, Uruguay). Memorias. Uruguay: 2000. 86-90.
16. VALDIVIA VASQUEZ, Oscar. Identificación y genotipificación de cepas de Staphylococcus aureus de vacas con mastitis en la región Centro de Jalisco México. En: Avances en la Investigación Científica. En el CUCBA 2006: XVI semana de la investigación científica. México: Universidad de Guadalajara, 2006. p 702-707