


**Frecuencia de genes que codifican resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus* de piel de ubre de bovinos del suroeste de México**



Luis Fernando Gaspar-Nava <sup>a</sup>

Natividad Castro-Alarcón <sup>b</sup>

Verónica Iranzú Martínez-Santos <sup>c</sup>

Jeiry Toribio-Jiménez <sup>d</sup>

Cinthia Lizzete Dionicio-Rodríguez <sup>e</sup>

Francisco-Javier Leal-Vega <sup>f</sup>

Arturo Ramírez-Peralta <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Laboratorio de Investigación en Patometabolismo Microbiano, Guerrero, México.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Laboratorio de Investigación en Microbiología, Guerrero, México.

<sup>c</sup> Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, SECIHTI-UAGro, Guerrero, México.

<sup>d</sup> Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Laboratorio de Investigación en Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Guerrero, México.

<sup>e</sup> Secretaría de Salud Guerrero. Jurisdicción Sanitaria 02, Guerrero, México.

<sup>f</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología. Laboratorio de Microbiología. Ciudad de México, México.

Autor de correspondencia: [ramirezperaltauagro@gmail.com](mailto:ramirezperaltauagro@gmail.com)

**Resumen:**

La presencia de *Staphylococcus aureus* en la piel de ubre bovina se ha propuesto como una fuente de contaminación ascendente hacia la glándula mamaria, que ocasiona el desarrollo de mastitis y la presencia de esta bacteria en leche. La entrada de *S. aureus* a la cadena alimenticia se convierte en un problema de salud pública, debido a la diseminación de cepas resistentes a antibióticos desde los animales, a alimentos y por ende a humanos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la resistencia a antibióticos y genes asociados en cepas de *S. aureus* aisladas de la piel de ubre bovina. La resistencia a antibióticos fue determinada por concentración mínima inhibitoria y la presencia de genes de resistencia a antibióticos por PCR en punto final. Las cepas de *S. aureus* presentaron elevada frecuencia de resistencia a betalactámicos, macrólidos, lincosamidas y tetraciclinas. Las cepas fueron resistentes a cefoxitina pero no se encontró el gen *mecA*; de los genes *ermA-C*, *ermB* fue el gen encontrado con mayor frecuencia (16.39 %); el gen *msrA* se encontró en la mayoría de las cepas con resistencia constitutiva a macrólidos y lincosamidas (88.46 %); el gen *tetM* se encontró en 64.28 % de las cepas resistentes a tetraciclina. En conclusión, las cepas de *S. aureus* aisladas de piel de ubre bovina presentaron diferentes grados de resistencia a diversos grupos de antibióticos, la cual puede ser explicada por la presencia de genes asociados.

**Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, Ubre de vaca, Genes de resistencia, Antibióticos.

Recibido: 26/08/2024

Aceptado: 12/05/2025

## Introducción

La mastitis bovina es la enfermedad infecciosa más prevalente a nivel mundial, la cual es asociada con severas pérdidas económicas debido a la reducción en la producción y calidad de la leche, así como el costo de los tratamientos y la salud de los animales, incrementando el riesgo de sacrificio y los costos de remplazo<sup>(1-3)</sup>. *Staphylococcus aureus* es reconocido como el principal patógeno a nivel mundial causante de mastitis bovina, y se considera a este microorganismo como contagioso y difícil de tratar debido a su alta tasa de diseminación entre animales infectados y la capacidad de ocasionar infecciones crónicas o recurrentes<sup>(1,4,5)</sup>.

La terapia con antibióticos es una importante medida para controlar la mastitis bovina. Sin embargo, se ha incrementado el número de estudios que reportan que *S. aureus* presenta resistencia a múltiples clases de antibióticos como respuesta a la presión selectiva por el uso

continuo de los mismos, debido al sobreuso de estas sustancias activas en la medicina veterinaria y la agricultura<sup>(6,7)</sup>.

Además del uso de antibióticos para el control de la mastitis, es importante identificar los patrones epidemiológicos e identificar las fuentes de contaminación. Varias fuentes potenciales de contaminación se han identificado: desde el aire de los establos, el equipo de ordeña hasta la piel de la ubre<sup>(8)</sup>. Sin embargo, resultados acerca del papel de la piel de la ubre bovina como una fuente de *S. aureus* en las infecciones intramamarias aún no son concluyentes. Por un lado, se ha demostrado que las cepas de *S. aureus* de la piel y del canal de la ubre de la vaca pueden ser una fuente potencial para el desarrollo de la mastitis bovina, debido a que genéticamente son iguales a las cepas obtenidas en leche y que éstas pueden promover la cronicidad de la infección<sup>(4,9)</sup>. Por otro lado, en otro estudio se observó que la mayoría de los *S. aureus* asociados con casos de mastitis pertenecen a cepas altamente adaptadas a la glándula mamaria pero diferentes a las cepas que provienen de piel<sup>(8)</sup>. Aun cuando no es claro el papel de las cepas aisladas de la piel de la ubre de la vaca, estas cepas pueden fácilmente transferirse a la leche cruda durante la ordeña. La leche bronca contaminada con *S. aureus* puede convertirse en un problema de salud pública, debido al riesgo de una intoxicación alimentaria por este microorganismo; además de la diseminación de cepas resistentes a antibióticos<sup>(4,10)</sup>.

En un estudio previo, se aislaron cepas de *S. aureus* de la piel de la ubre de vacas de tres establos lecheros del suroeste de México, estas cepas presentaron los genes de la enterotoxina A, D y E. Además, dentro de estas cepas se identificaron grupos clonales que se diseminaron entre los establos y permanecían en temporadas de lluvias y estiaje<sup>(11)</sup>. Por el potencial toxigénico de las cepas, es importante continuar con la determinación de otras características de importancia epidemiológica como es la resistencia a antibióticos, considerando que su persistencia en los establos puede estar relacionada a la elevada resistencia a antibióticos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la resistencia a antibióticos y genes asociados en cepas de *S. aureus* aisladas de la piel de ubre de bovinos en granjas del suroeste de México.

## Material y métodos

### Cepas bacterianas

Las cepas de *S. aureus* provenientes del pezón de la ubre de vaca se aislaron durante el año 2019, en dos temporadas del año (lluvias y estiaje) y en tres establos lecheros ubicados en tres zonas con diferente altitud<sup>(11)</sup>. Las cepas están conservadas en crioviales de glicerol al 15 % (v/v) a -20 °C en el cepario del Laboratorio de Investigación de Patometabolismo Microbiano (LIPM) de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad

Autónoma de Guerrero. Estas cepas fueron caracterizadas bajo el siguiente perfil fenotípico: coco Gram positivo, manitol, catalasa y coagulasa positivos e identificados molecularmente por el gen *fem*. La reactivación de las cepas se realizó resuspendiendo 20 µl de cada criovial en 1 ml de caldo Mueller Hinton (MH), el cual se incubó a 37 °C por 24 h. Una vez obtenido el crecimiento, se inocularon en placas de agar BHI para su conservación como cepas de trabajo.

### **Concentración mínima inhibitoria**

La resistencia antimicrobiana se evaluó mediante el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI); los inóculos bacterianos se prepararon a partir de cultivos de 24 h de cada una de las cepas en caldo MH y se ajustaron al 0.5 McFarland. En una microplaca de 96 pocillos se colocó cada antibiótico en diferentes rangos de concentraciones; penicilina (PEN 0.25-2 µg/ml), ceftriaxona (CRO 0.5-32 µg/ml), ciprofloxacino (CIP 4-32 µg/ml), clindamicina (DA 4-256 µg/ml), eritromicina (E 8-256 µg/ml), kanamicina (KAN 16-256 µg/ml), gentamicina (GEN 16-256 µg/ml), tetraciclina (TET 16-256 µg/ml), vancomicina (VAN 16-256 µg/ml), cloranfenicol (CLF 16-256 µg/ml) y trimetoprima (TMP 16-256 µg/ml) indicadas por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)<sup>(12)</sup>. A continuación, se agregaron los inóculos bacterianos y se incubaron a 37°C durante 24 ± 1 h. Como control positivo se inocularon las mismas cepas sin antibiótico y como control negativo se utilizó un pocillo con caldo Mueller Hinton y antibiótico. Posteriormente, se realizó la lectura del crecimiento por absorbancia a una longitud de onda de 492/630 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific®, GENESYS 200, USA). Después se calculó el CMI<sub>50</sub> y se catalogaron las cepas de manera paramétrica y de acuerdo con los valores de CMI reportados por el manual del CLSI como Sensibles (S) o Resistentes (R).

### **Resistencia a betalactámicos**

Cada una de las cepas se incubó 18 h en caldo MH a 37 °C en condiciones estáticas, el cultivo se ajustó al 0.5 McFarland y se inoculó en agar MH mediante el método de difusión en disco con discos de cefoxitina (FOX 30µg) y penicilina (PEN 10µg) y se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 h<sup>(12)</sup>; una vez transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición y se categorizaron como sensibles (S) (PEN ≥ 29 mm o FOX ≥25 mm) o resistentes (R) (PEN ≤28 mm o FOX ≤24 mm)<sup>(12)</sup>. Después se colocaron 10 µl de nitrocefina (Oxoid Thermo Scientific™) para determinar la producción de betalactamasas mediante la observación en el cambio de coloración del halo: un halo color rojizo permitió definir las como productoras y cuando no se observaba un cambio en la coloración del halo como no productoras.

## Determinación de fenotipos de resistencia a MLS<sub>B</sub>

Los fenotipos de resistencia a MLS<sub>B</sub> (Macrólidos-Lincosamidas-Streptogramina B) se determinaron mediante los resultados obtenidos de la resistencia a la clindamicina (C-R) o eritromicina (E-R), clasificando las resistencias obtenidas como constitutiva (C-R, E-R o ambas) o inducible (E-R, pero sensible a clindamicina)<sup>(12)</sup>.

## Genes de resistencia a antibióticos

### Extracción de DNA

El DNA genómico de todas las cepas de *S. aureus* se obtuvo a partir de 1 ml de un cultivo estático en caldo infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés: “brain heart infusion) de 18 h incubado a 37 °C. Las células se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, resuspendiendo las pastillas en 300 µl de buffer de lisis (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0, lisozima 0.02 mg/ml) e incubando a 37 °C por 10 min. Posteriormente, se agregaron 200 µl de solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v), se mezcló por inversión 10 a 15 veces, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min, se recuperaron 200 µl de la fase acuosa y se transfirieron a 1 ml de etanol frío (96%). Se incubó a -20 °C durante 24 h, después se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante, las pastillas celulares se dejaron secar a temperatura ambiente y se resuspendieron en 20 µl de agua estéril<sup>(13)</sup>.

### Genes que confieren resistencia a antibióticos

La identificación de los genes que confieren resistencia a antibióticos se determinó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final. Para los genes *mecA*, *blaZ*, *ermA-C*, *msrA* y *tetM* se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1X Taq 2x Máster Mix RED, 1.5 MgCl<sub>2</sub> (Ampliqon, Denmark), 40 nM de cada oligonucleótido y 100 ng de DNA. En el caso de la *ermB* se utilizó la siguiente mezcla de reacción 1X de Taq 2x Máster Mix RED, 1.5 MgCl<sub>2</sub> (Ampliqon, Denmark), 160 nM de cada oligonucleótido y 100 ng de DNA. Se utilizó la cepa ATCC 43300 *S. aureus* subsp. *aureus* rosenbach para *ermA*, *mecA*, *blaZ*; para el gen *ermB* se utilizó un aislado clínico de *S. aureus* caracterizado en el LIPM; la cepa ATCC 25923 *S. aureus* subsp. *aureus* rosenbach y la cepa 1084 de *S. hominis* caracterizada por el Laboratorio de Investigación en Microbiología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, se utilizaron como controles de los genes *tetM* y *msrA* respectivamente. Los oligonucleótidos y las condiciones se describen en el Cuadro 1.

**Cuadro 1:** Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Gen	Secuencia	Ciclaje	Tamaño esperado (pb)	Referencia
<i>blaZ</i>	F-ATTTTGAAAAAGTTAATATTTTTAATTG R-CATTACACTCTTGGCGGTTTC	1 ciclo 95°C por 5 min; 35 ciclos a 95°C por 30 s, 52°C por 50 s, y 72°C por 50 s; y 1 ciclo a 72°C por 10 min	833	(14)
<i>mecA</i>	F- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	1 ciclo 94°C por 5 min; 32 ciclos 94°C por 30 s, 57°C por 45 s, y 72°C por 1 min; y 1 ciclo 72°C por 5 min	583	(15)
<i>ermA</i>	F-GTTCAAGAACAATCAATACAGAG R-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	1 ciclo 94°C por 2 min; 32 ciclos 94°C por 30 s, 52°C por 1 min, y 72°C por 30s; y 1 ciclo 72°C por 10 min	421	(16)
<i>ermB</i>	F- CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC R- GAATCGAGACTTGAGTGTGC	1 ciclo 95°C por 5 min; 32 ciclos 95°C por 20 s, 52°C por 45 s, y 72°C por 40 s; y 1 ciclo 72°C por 7 min	359	
<i>ermC</i>	F- RGCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC R-GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	1 ciclo 94°C por 2 min; 32 ciclos 94°C por 30 s, 52°C por 1 min, y 72°C por 30s; y 1 ciclo 72°C por 10 min	572	
<i>msrA</i>	F-GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG R-AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT	1 ciclo 95°C por 15 min; 32 ciclo 95°C por 30 s, 52°C por 45 s, y 72°C por 1 min; y 1 ciclo 72°C por 7 min	940	(17)
<i>tetM</i>	F- GTGGACAAAGGTACAACGAG R-CGGTAAAGTTCGTACACAC	1 ciclo 95°C por 5 min; 32 ciclo 95°C por 20 s, 52°C por 45 s, y 72°C por 40 s; y 1 ciclo 72°C por 7 min	406	(16)

## Resultados

### Resistencia a antibióticos

Se determinó que el 95.1 % (58/61) de las cepas son resistentes a penicilina y el 100 % (61/61) son resistentes a ceftriaxona. Solo se encontró el 1.6 % de las cepas (1/61) con resistencia a ciprofloxacino, gentamicina y cloranfenicol, 98.4 % (60/61) a clindamicina, 42.6 % (26/61) a eritromicina, 62.3 % (38/61) a kanamicina, 22.9 % (14/61) a tetraciclina, 13.1 % (8/61) a trimetoprima. Por último, no se encontraron cepas resistentes a vancomicina. En cuanto a los resultados de las concentraciones de antibiótico a las cuales son inhibidas cada una de las cepas analizadas en este trabajo. Las 58 cepas con resistencia a penicilina se distribuyeron en CMI de 0.25 a 2.0  $\mu\text{g/ml}$ ; en el caso de la ceftriaxona, en las 61 cepas resistentes, se determinaron CMI de 0.25  $\mu\text{g/ml}$  hasta mayores a 32  $\mu\text{g/ml}$ , de las cuales 40 cepas presentaron la CMI más alta (32  $\mu\text{g/ml}$ ).

En el grupo de antibióticos  $\text{MLS}_B$ , las cepas resistentes para clindamicina (60/61) presentaron CMI de 8 a 256  $\mu\text{g/ml}$ , siendo 44 cepas las que presentaron CMI de 256  $\mu\text{g/ml}$ , para eritromicina las cepas resistentes tienen una CMI de 16 a 256  $\mu\text{g/ml}$ , de las cuales cuatro cepas tenían CMI de 256  $\mu\text{g/ml}$ ; del grupo de fluoroquinolonas solo una cepa con CMI de 4  $\mu\text{g/ml}$  de ciprofloxacino, en aminoglucósidos se determinaron cepas con CMI de 32 a 256  $\mu\text{g/ml}$  de concentración de kanamicina y una cepa con CMI de 64  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina.

Respecto a tetraciclina, se observaron cepas con CMI de 32 a 256  $\mu\text{g/ml}$ , de las cuales 11 cepas tenían CMI de 256  $\mu\text{g/ml}$ ; en anfenicoles solo se obtuvo una cepa con CMI de 128  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol; por último, en el grupo de las diaminopirimidinas se determinaron valores de 32 a 256  $\mu\text{g/ml}$  en cepas con resistencia a trimetoprima, observando dos cepas con CMI de 256  $\mu\text{g/ml}$  (Cuadro 2).

**Cuadro 2:** Concentración mínima inhibitoria de las cepas de *S. aureus* resistentes a los diferentes grupos de antibióticos

Antibióticos	Concentraciones utilizadas (µg/ml)											Cepas resistentes % (n), N=61
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
<i>Betalactámicos</i>												
Penicilina	9	5	17	27								95.1 (58)
<i>Cefalosporinas</i>												
Ceftriaxona		1	5	1	10	4	0	40				100 (61)
<i>Fluoroquinolonas</i>												
Ciprofloxacino					1							1.6 (1)
<i>Lincosamidas</i>												
Clindamicina						10	0	0	4	2	44	98.4 (60)
<i>Macrólidos</i>												
Eritromicina							11	9	0	2	4	42.6 (26)
<i>Aminoglucosidos</i>												
Kanamicina								10	9	7	12	62.3 (38)
Gentamicina									1			1.6 (1)
<i>Tetraciclinas</i>												
Tetraciclina								1	0	2	11	22.9 (14)
<i>Fenicoles</i>												
Cloranfenicol										1		1.6 (1)
<i>Diaminopirimidinas</i>												
Trimetoprima								4	0	2	2	13.1 (8)

Los parámetros de la CMI (µg/ml) se determinaron de acuerdo con los valores establecidos en la 31ed M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing<sup>(12)</sup>.

### Fenotipos de resistencia a antimicrobianos

El 100 % de las cepas fueron resistentes a cefoxitina y solo una fue productora de betalactamasas (1.6 %). Para eritromicina y clindamicina se obtuvieron frecuencias de resistencia del 42.6 y 98.7 % respectivamente, las cuales se categorizaron dentro del grupo de fenotipos de resistencia constitutiva a MLS<sub>B</sub>, destacando que el mismo 42.6 % de cepas fue resistente a ambos antibióticos (eritromicina y clindamicina). No se determinaron cepas con resistencia a eritromicina, pero sensibilidad a clindamicina, por lo que no existe una resistencia inducible de un antibiótico; en cambio se encontró un resultado atípico de 55.8 % de cepas con resistencia a clindamicina (C-R), sin ser resistentes a eritromicina (S). El 80.2 % de las cepas presentan resistencia al menos a tres grupos de antibióticos (Cuadro 3).

**Cuadro 3:** Fenotipos de resistencia antibióticos en las cepas de *S. aureus*

<b>Fenotipo de resistencia a betalactámicos</b>	<b>Número de cepas n (%) N=61</b>
MRSA	61 (100.0)
MSSA	0 (0.0)
Producción de betalactamasas	1 (1.6)
<b>Fenotipos MLS<sub>B</sub></b>	<b>(%)</b>
cMLS <sub>B</sub>	
E- R	26 (42.6)
C- R	60 (98.7)
E-R, C-R	26 (42.6)
iMLS <sub>B</sub>	
<b>Fenotipos de resistencia a antibióticos</b>	<b>(%)</b>
PEN, CRO	1 (1.6)
PEN, CRO, DAN	11 (18.2)
PEN, CRO, DAN, E	3 (4.9)
PEN, CRO, DAN, E, KAN	13 (21.3)
PEN, CRO, DAN, E, KAN, TET	4 (6.7)
PEN, CRO, DAN, E, KAN, CIP	1 (1.6)
PEN, CRO, DAN, E, KAN, TMP	1 (1.6)
PEN, CRO, DAN, E, TET	1 (1.6)
PEN, CRO, DAN, E, TMP	1 (1.6)
PEN, CRO, DAN, E, TMP, CLF, TET	1 (1.6)
PEN, CRO, DAN, KAN	14 (23.1)
PEN, CRO, DAN, KAN, GEN, TET	1 (1.6)
PEN, CRO, DAN, KAN, TET	3 (4.9)
PEN, CRO, DAN, TMP	3 (4.9)
PEN, CRO, DAN, TMP, TET	1 (1.6)
CRO, DAN, E	1 (1.6)
CRO, DAN, E, KAN, TET	1 (1.6)

PEN (penicilina), CRO (ceftriaxona), DA (clindamicina), E (eritromicina), KAN (kanamicina), GEN (gentamicina), TMP (trimetoprima), TET (tetraciclina), CLF (cloranfenicol), CIP (ciprofloxacino), MRSA (methicilin resistance *Staphylococcus aureus*), MSSA (methicilin sensitive *Staphylococcus aureus*), MLS<sub>B</sub> (Macrólidos- Lincosamidas- Streptogramina B), cMLS<sub>B</sub> (resistencia constitutiva a Macrólidos- Lincosamidas- Streptogramina B), E-R (resistencia a eritromicina), C- R (resistencia a clindamicina), iMLS<sub>B</sub> (resistencia inducible a Macrólidos- Lincosamidas- Streptogramina B).

## Genes de resistencia a antibióticos

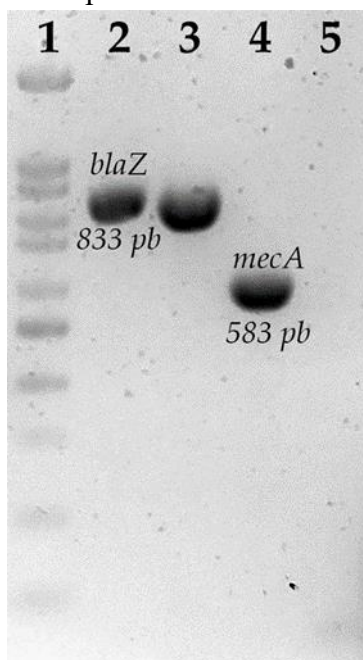
Se determinaron frecuencias absolutas de los genes que confieren resistencia a cada uno de los grupos de antibióticos. De las cepas resistentes a betalactámicos solo se encontraron tres cepas positivas a la presencia del gen *blaZ* (4.91 %), una cepa resultó positiva la prueba de nitrocefina destacando que ésta no fue positiva a la presencia del gen *blaZ*. Para *mecA*, no se encontraron cepas positivas a la presencia de este gen (Cuadro 4) (Figura 1).

**Cuadro 4:** Distribución de genes de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus*

Grupo de antibióticos	Cepas resistentes Antibiótico	Beta lactámicos			MLS			TETRA
		<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>	<i>tetM</i>
Betalactámicos	Penicilina (N=58)	3						
Cefalosporinas	Ceftriaxona (N=61)	3						
	Cefoxitina (N=61)	3						
ML	Clindamicina/ Eritromicina (N=26)				9	1	23	
	Clindamicina (N=60)				1	1	29	
TETRA	Tetraciclina (N=14)							9

TETRA= tetraciclina.

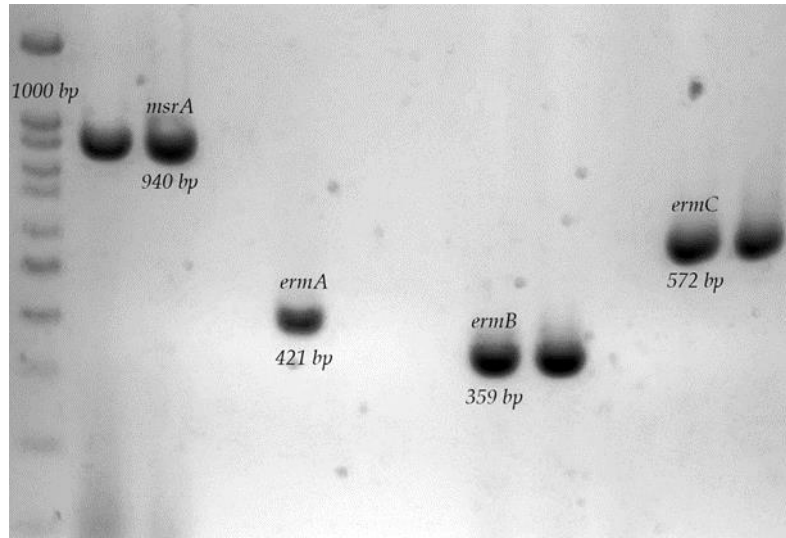
**Figura 1:** Genes asociados a resistencia a beta- lactámicos en cepas de *S. aureus* aisladas de piel de ubre bovina



Electroforesis en geles de agarosa de la amplificación de *blaZ* y *mecA*. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2) *blaZ*, *S. aureus* ATCC43300; 3) *blaZ*, *S. aureus* S680; 4) *mecA*, *S. aureus* ATCC 43300; 5) *mecA*, *S. aureus*.

Del grupo de antibióticos MLS<sub>B</sub>: se determinaron 52 cepas del total de cepas resistentes a MLS<sub>B</sub> con la presencia del gen *msrA* (86.6 %); de estos, 29 cepas pertenecen al perfil C-R (55.7 %) y 23 correspondían al perfil ER-CR (44.23 %). Además, se encontraron 10 cepas positivas al gen *ermB* (16.6 %), de las cuales sólo nueve corresponden al fenotipo ER-CR (90 %) y la cepa restante es del fenotipo C-R (10 %). También, se determinaron dos cepas con la presencia del gen *ermC* (3.3 %), de las cuales una cepa corresponde al fenotipo ER-CR y una cepa al fenotipo C-R y no hubo cepas positivas a *ermA* (Figura 2).

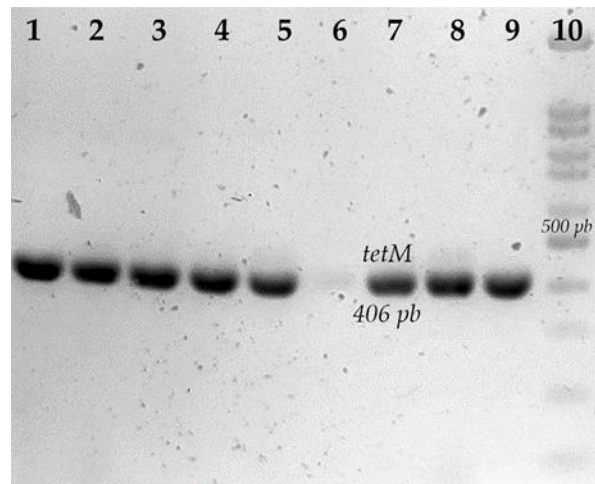
**Figura 2:** Genes asociados a la resistencia a macrólidos en cepas de *S. aureus* aisladas de piel de ubre bovina



Electroforesis en geles de agarosa de la amplificación de los genes *msrA*, *ermA*- *C*. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2) *S. haemolyticus* 1035, *msrA*+; 3) *S. aureus* S697; 4) Control negativo; 5) *S. aureus* ATCC 43300, *ermA*+; 6) *S. aureus* S661; 7) Control negativo; 8) *S. aureus* S697, *ermB*+; 9) *S. aureus* S694, *ermB*+; 10) Control negativo; 11) *S. aureus* S662, *ermC*+; 12) *S. aureus* S661, *ermC*+.

En la determinación del gen *tetM* de 14 cepas resistentes a tetraciclina, se determinaron nueve con la presencia del gen *tetM* (64.28 %) (Figura 3); de éstas, seis cepas presentaron CMI de 256 µg/ml, una cepa tuvo un CMI de 128 µg/ml y dos cepas con CMI de 32 µg/ml.

**Figura 3:** Genes asociados a resistencia a tetraciclina en cepas de *S. aureus* aisladas de piel de ubre bovina



Electroforesis en geles de agarosa de la amplificación de *tetM*. 1) *S. aureus* S68; 2) *S. aureus* S689; 3) *S. aureus* S692; 4) *S. aureus* S693; 5) *S. aureus* S696; 6) *S. aureus* S697; 7) *S. aureus* S654; 8) *S. aureus* S662; 9) *S. aureus* D1; 10) marcador de peso molecular de 100 pb.

## Discusión

*S. aureus* es el principal patógeno a nivel mundial que causa mastitis bovina, caracterizándose por causar infecciones crónicas por la baja respuesta a antibióticos, facilitando la diseminación entre el ganado. La resistencia antibacteriana de este microorganismo surge por el extensivo uso de antibióticos para el control de la mastitis, convirtiéndose en un problema de salud pública debido a la aparición y diseminación de cepas resistentes a antibióticos a los humanos a partir de los alimentos<sup>(18)</sup>.

En este estudio, se encontró una alta resistencia a antibióticos betalactámicos en comparación a otros grupos de antibióticos en las cepas de *S. aureus* aisladas de la piel de la ubre bovina; la resistencia a estos antibióticos está mediada por la síntesis de proteínas alternas de unión a penicilina (PBP2a, PBP2'), síntesis de betalactamasas y mutaciones en los genes de las proteínas de unión a penicilina (PBP). La resistencia a cefoxitina infiere que el mecanismo podría estar mediado por la síntesis de proteínas alternas codificadas en el casete cromosomal SCCmec; sin embargo, en este estudio las cepas fueron negativas para la amplificación del gen *mecA*. Las cepas negativas para *mecA* pero con MIC elevados para oxacilina han sido reportadas como *mecA*-BORSA (*S. aureus* resistentes a oxacilina en el límite, *mecA* negativos) en distintos alimentos como pollo, puerco, leche, e incluso en la sociedad<sup>(19)</sup> por lo que no es de extrañarse su presencia en la piel de ubre bovina. Una característica clave de las cepas BORSA, es la sobreproducción de betalactamasas<sup>(20)</sup>; en ese sentido, para evaluar la presencia de genes relacionados a betalactamasas se amplificó el gen *blaZ*, obteniendo una frecuencia baja para este gen (3/61, 4.91 %), la baja frecuencia de cepas productoras de betalactamasas codificadas por *blaZ* y negativas a *mecA* podría estar relacionada a la presencia de nuevas betalactamasas no codificadas por *blaZ* si no por plásmidos<sup>(21)</sup>. Por otro lado, para evaluar la producción de betalactamasas se valoró por la hidrólisis de nitrocefina, obteniendo una frecuencia baja (1/61, 1.64 %), remarcando que la cepa positiva a prueba de nitrocefina es negativa para el gen *blaZ*. En este punto, se han descrito hasta cuatro diferentes betalactamasas en *S. aureus*, denominadas de la A hasta la D, sin embargo, no todas se pueden determinar por la prueba de suspensión en nitrocefina, cefazolina o cefaloridina<sup>(22)</sup>. Aun cuando el principal mecanismo de resistencia en las cepas BORSA es la sobreproducción de betalactamasas, éste no es el único mecanismo; la presencia de nuevas beta-lactamasas, mutaciones en los genes de PBP o la presencia de bombas de eflujo podría explicar el comportamiento de estas cepas y podría estudiarse a futuro<sup>(20,21,23)</sup>.

Los macrólidos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B denominados como MLS<sub>B</sub> se han convertido en una estrategia para el control de *S. aureus* resistentes a meticilina, así como en pacientes con alergia al grupo de betalactámicos. Del grupo de los MLS<sub>B</sub>, la clindamicina es de importancia debido a su aplicación para el tratamiento de infecciones de la piel, tejidos blandos y huesos, debido a su alta permeabilidad<sup>(24-26)</sup>. Con respecto a lo anterior, los

granjeros que participaron en este estudio refieren el uso de este antibiótico como tratamiento preventivo de infecciones de la ubre bovina, lo cual se ve reflejado en la elevada resistencia a clindamicina (98.3 %, 60/61) en un fenotipo constitutivo con macrólidos (cMLS<sub>B</sub>) en el 42.6 % de las cepas. La resistencia a MLS<sub>B</sub> puede estar conferida por diferentes mecanismos como la modificación del sitio blanco, bombas de eflujo e inactivación enzimática del antibiótico<sup>(27)</sup>. La modificación del sitio blanco es mediada por la presencia de genes de metilasas de resistencia a eritromicina (*erm*). Los principales genes *erm* comúnmente encontrados incluyen *ermA* y *ermC*<sup>(17)</sup>. Los genes *erm* codifican metilasas que causan modificaciones conformacionales de la subunidad 23S RNAr, lo cual ocasiona una disminución en la unión de los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub> a su sitio blanco en la subunidad 50S ribosomal<sup>(24)</sup>. Uno de los datos relevantes de este estudio es la alta prevalencia del gen *ermB* en las cepas de *S. aureus* aisladas de ubre bovina, lo cual también se ha encontrado en cepas de *Staphylococcus* coagulasa positivos y negativos aislados de leche de búfalo<sup>(28)</sup>; a diferencia de cepas de origen clínico en donde es común encontrar los genes *ermA* y *ermC*<sup>(29-31)</sup>. Como se describe, la modificación del sitio blanco no es el único mecanismo que explica la resistencia constitutiva a MLS<sub>B</sub>; otro mecanismo es la presencia de bombas de eflujo como MsrA que explica la resistencia constitutiva a macrólidos<sup>(32)</sup>. La presencia de ambos mecanismos podría explicar en cierta medida el fenotipo constitutivo a MLS<sub>B</sub> (E-R, C-R) encontrado en este estudio, aun dejando a consideración la circulación de otros genes *erm*. En aquellas cepas de *S. aureus* que sólo son resistentes a clindamicina (55.8 %), aun cuando es un resultado poco común, éste podría explicarse por la presencia de genes *linA* y *linB* que inactivan solamente lincosamidas<sup>(33)</sup> en las cepas circulantes y que podría ser una de las perspectivas a futuro de este estudio.

La tetraciclina es un antibiótico que en los últimos 40 años se sigue utilizando en la ganadería, humanos, animales pequeños, agricultura y acuicultura<sup>(34)</sup>. Al mismo tiempo, la tetraciclina no es solo usada para el tratamiento de infecciones en animales sino también como promotor de crecimiento o para mejorar la eficiencia de productos de engorda, práctica que en la actualidad se sigue realizando tanto en Estados Unidos de América como en otros países<sup>(35)</sup>. Por lo anterior, no es de sorprender la circulación de cepas de *S. aureus* con resistencia a tetraciclina provenientes de ganado bovino<sup>(36)</sup> e incluso que *S. aureus* resistente a meticilina asociado a la ganadería (LA- MRSA) del complejo clonal CC9 tenga como característica distintiva la resistencia a tetraciclina<sup>(37)</sup>. En este sentido, se identificaron 14 cepas con resistencia a tetraciclina, remarcando que comparten otras características de resistencia bacteriana incluida la clindamicina, eritromicina y cefoxitina, por lo cual no se descarta que estas cepas también pertenezcan a este grupo clonal. Debido a esto, es necesaria en un futuro la caracterización completa de estas cepas. La resistencia a tetraciclina es mediada por genes que codifican bombas de eflujo así como proteínas de protección ribosomal<sup>(35)</sup>. En este último grupo, uno de los principales genes buscados es *tetM*. En este estudio, la frecuencia del gen *tetM* fue de 14.75 %, encontrándose en 9 de las 14 cepas resistentes. Este gen comúnmente se han reportado en cepas aisladas de mastitis subclínica en Brasil, China y Canadá<sup>(38-40)</sup>,

muestras de leche de vaca en Brasil<sup>(41,42)</sup>, de leche de búfalo en Egipto<sup>(28)</sup>. En las cepas resistentes a tetraciclina pero negativas al gen *tetM*, la búsqueda podría enfocarse a más de 25 genes relacionados a la resistencia a tetraciclina<sup>(34,35)</sup>.

La determinación de los genes de resistencia en *S. aureus* así como en otros microorganismos es importante, debido a que muchos de estos genes se encuentran localizados en elementos genéticos móviles (EGM), los cuales, por mecanismos de transferencia horizontal pueden generar nuevas cepas resistentes a antibióticos. Incluso se han buscado estos EGM a partir de muestras ambientales debido a la importancia de estos<sup>(43,44)</sup>.

## Conclusiones e implicaciones

Se confirmó en las unidades de producción lechera analizadas, la circulación de cepas de *S. aureus* provenientes de la piel de ubre bovina con resistencia a betalactámicos, macrólidos, lincosamidas y tetraciclinas con la presencia de los genes *blaZ*, *ermABC*, *mrsA* y *tetM*. Si bien, los presentes resultados no permiten generalizar, se sugiere que el adecuado seguimiento del desarrollo de casos de mastitis, la implementación de buenas prácticas de ordeño en ranchos de la región y el uso adecuado de los antimicrobianos, serían de ayuda para evitar la circulación de las cepas de *S. aureus* de la piel de la ubre bovina hacia la leche y en su momento hacia los humanos por el consumo de leche y sus derivados, favoreciendo la sanidad animal así como la salud humana y ambiental.

### Literatura citada:

1. 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(11):6907-6916.
2. Hogeveen H, Huijps K, Lam T. Economic aspects of mastitis: New developments. N Z Vet J 2011;59(1):16-23.
3. Rasool Z, Noreen H, Anjum A, Rizvi A, Rabaan AA, Halwani MA, et al. Genotypic and phenotypic characterization of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and humans in close contact. Trop Med Infect Dis 2022;8(1):26.
4. Piccinini R, Cesaris L, Daprà V, Borromeo V, Picozzi C, Secchi C, et al. The role of teat skin contamination in the epidemiology of *Staphylococcus aureus* intramammary infections. J Dairy Res 2009;76(1):36-41.

5. Sakwinska O, Giddey M, Moreillon M, Morisset D, Waldvogel A, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(17):5908-5915.
6. 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;193:156-161.
7. Gomes F, Henriques M. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Curr Microbiol* 2016;72(4):377-382.
8. Zadoks RN, Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, *et al.* Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):3894-3902.
9. Haveri M, Hovinen M, Roslöf A, Pyörälä S. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Clin Microbiol* 2008;46(11):3728-3735.
10. Ren Q, Liao G, Wu Z, Lv J, Chen W. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *J Dairy Sci* 2020;103(4):3368-3380.
11. Adame-Gómez R, Toribio-Jimenez J, Castro-Alarcón N, Talavera-Alarcón K, Flores-Gavilan J, Pineda-Rodríguez SA, *et al.* Diversidad genética y factores de virulencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de la piel de ubre bovina. *Rev Mex Cienc Pecu* 2021;12(3):665-680.
12. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2021.
13. Adame-Gómez R, Muñoz-Barrios S, Castro-Alarcón N, Leyva-Vázquez MA, Toribio-Jiménez J, Ramírez-Peralta A. Prevalence of the strains of *Bacillus cereus* group in artisanal Mexican cheese. *Foodborne Pathog Dis* 2020;17(1):8-14.
14. El-Maghraby AS, Aziz S, Mwafy A. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccine in chicken. *J Worlds Poult Res* 2020;10(2s):203-213.
15. Al-Amery K, Elhariri M, Elsayed A, El-Moghazy G, Elhelw R, El-Mahallawy H, *et al.* Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from camel meat and slaughterhouse workers in Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019;8(1):129.

16. Chai M, Sukiman MZ, Kamarun Baharin AH, Ramlan I, Lai LZ, Liew Y, *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from peninsular Malaysian animal handlers: molecular profile, antimicrobial resistance, immune evasion cluster and genotypic categorization. *Antibiotics* 2022;11(1):103.
17. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(5):1062-1066.
18. Molineri AI, Camussone C, Zbrun MV, Suárez Archilla G, Cristiani M, Neder V, *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. *Prev Vet Med* 2021;188:105261.
19. Zehra A, Gulzar M, Singh R, Kaur S, Gill JPS. Comparative analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and borderline oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) in community and food of animal origin. *FEMS Microbiol Lett* 2020;367(23):fnaa201.
20. Hryniewicz MM, Garbacz K. Borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) – a more common problem than expected? *J Med Microbiol* 2017;66(10):1367-1373.
21. Massidda O. Evidence for a methicillin-hydrolysing  $\beta$ -lactamase in *Staphylococcus aureus* strains with borderline susceptibility to this drug. *FEMS Microbiol Lett* 1992;92(3):223-227.
22. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS. Characterization of four beta-lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(2):440-445.
23. Jo A, Ahn J. Phenotypic and genotypic characterisation of multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of oxacillin and levofloxacin. *BMC Microbiol* 2016;16(1):170.
24. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance phenotypes in clinical staphylococcal isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31(4):364-368.
25. Daurel C, Huet C, Dhalluin A, Bes M, Etienne J, Leclercq R. Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *erm* (a) and *erm* (c) *Staphylococcus aureus* genes. *J Clin Microbiol* 2008;46(2):546-550.
26. Prabhu K, Rao S, Rao V. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *J Lab Physicians* 2011;3(01):025-027.

27. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002;34(4):482-492.
28. Osman KM, Pires ÁDS, Franco OL, Orabi A, Hanafy MH, Marzouk E, *et al.* Enterotoxigenicity and antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from raw buffalo and cow milk. *Microb Drug Resist* 2020;26(5):520-530.
29. Aydeniz Ozansoy F, Cevahir N, Kaleli İ. Investigation of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples by phenotypical and genotypical methods. *Mikrobiyol Bul* 2015;49(1):1-14.
30. Malla Thakuri DR, Pokhrel A, Amatya R, Sharma Bashyal N, Neupane M, Kc S, *et al.* Distribution of *mecA* and *erm* genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible resistance to clindamycin. *J Nepal Health Res Counc* 2023;21(1):29-33.
31. Nagarkoti D, Prajapati K, Sharma AN, Gyawali A, Manandhar S. Distribution of macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics resistance genes in clinical isolates of staphylococci. *J Nepal Health Res Counc* 2021;18(4):734-740.
32. Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Kohrer K, *et al.* Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000;45(6):891-894.
33. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(12):2823-2830.
34. Roberts MC, Schwarz S. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans. *J Environ Qual* 2016;45(2):576-592.
35. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65(2):232-260.
36. Nemati G, Romanó A, Wahl F, Berger T, Rojo LV, Graber HU. Bovine *Staphylococcus aureus*: a European study of contagiousness and antimicrobial resistance. *Front Vet Sci* 2023;10:1154550.
37. Ye X, Wang X, Fan Y, Peng Y, Li L, Li S, *et al.* Genotypic and phenotypic markers of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC9 in humans. *Appl Environ Microbiol* 2016;82(13):3892-3899.

38. De Oliveira RP, Da Silva JG, Aragão BB, De Carvalho RG, Juliano MA, Frazzon J, *et al.* Diversity and emergence of multi-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from subclinical mastitis in cows in of the state of Piauí, Brazil. *Braz J Microbiol* 2022;53(4):2215-2222.
39. Majumder S, Sackey T, Viau C, Park S, Xia J, Ronholm J, *et al.* Genomic and phenotypic profiling of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis for antibiotic resistance and intestinal infectivity. *BMC Microbiol* 2023;23(1):43.
40. Yang F, Shi W, Meng N, Zhao Y, Ding X, Li Q. Antimicrobial resistance and virulence profiles of staphylococci isolated from clinical bovine mastitis. *Front Microbiol* 2023;14:1190790.
41. Martini CL, Lange CC, Brito MA, Ribeiro JB, Mendonça LC, Vaz EK. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. *J Dairy Res* 2017;84(2):202-205.
42. Pérez VKC, Custódio DAC, Silva EMM, De Oliveira J, Guimarães AS, Brito MAVP, *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Braz J Microbiol* 2020;51(4):2111-2122.
43. Wang H, Zhuang H, Ji S, Sun L, Zhao F, Wu D, *et al.* Distribution of erm genes among MRSA isolates with resistance to clindamycin in a Chinese teaching hospital. *Infect Genet Evol* 2021;96:105127.
44. Anand T, Bera BC, Vaid RK, Barua S, Riyesh T, Virmani N, *et al.* Abundance of antibiotic resistance genes in environmental bacteriophages. *J Gen Virol* 2016;97(12):3458-3466.