

Comunicación breve

Determinación del efecto antagónico de bacteriófagos sobre géneros de bacterias potenciales causantes de mastitis bovina (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., y *Escherichia coli*) en Pamplona, Norte de Santander

Determination of the antagonistic effect of bacteriophages on genera of bacteria potentially causing bovine mastitis (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., and *Escherichia coli*) in Pamplona, Norte de Santander

Vega, T. Liliana^{1*}; Márquez, C. Ana^{2*}; de la Cruz A. Boris^{3*}; Torres, C. Angie^{4*}; Ricardo, P. Alba^{5*}

*Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología. Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Email: vegatliliana@gmail.com¹; cele9410@hotmail.com²; borisbeto@hotmail.com³; angie.torres.1040@gmail.com⁴

E-mail autor de correspondencia: albapaez@unipamplona.edu.co⁵

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el efecto antagónico de bacteriófagos sobre bacterias potenciales causantes de mastitis bovina como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *E. coli* y *Pseudomonas* spp. Se analizaron dos muestras, una del hisopado de la ubre y otra de la leche de una vaca con mastitis. Se empleó el protocolo de aislamiento de doble capa de agar y se observó la presencia de fagos infectando a *Staphylococcus* spp., *E. coli* y *Pseudomonas* spp. Los bacteriófagos son una prometedora alternativa a los antibióticos, compuestos a los cuales las bacterias han desarrollado algún tipo de resistencia.

Palabras clave: control alternativo, resistencia bacteriana, infección de la ubre, fagos.

ABSTRACT

In this work, the antagonistic effect of bacteriophages on bacteria potentially causing bovine mastitis such as *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *E. coli* and *Pseudomonas* spp. was determined. Two samples were analyzed, one from udder swab and a second one from the milk of a cow with mastitis. The presence of phages infecting *Staphylococcus* spp., *E. coli* and *Pseudomonas* spp. was observed using a double layer agar isolation protocol. Bacteriophages are a promising alternative to antibiotics, to which bacteria have developed some form of resistance.

Keywords: alternative control, bacterial resistance, udder infection, phages.

Recibido: 25-06-2019

Aceptado: 08-08-2019

Publicado: 08-08-2019

Introducción

La mastitis se define como la respuesta inflamatoria resultante de la infección del tejido de la ubre y se ha reportado concretamente en los animales domésticos lecheros (Gomes y Henriques, 2016). La mastitis involucra la afectación en la cadena de producción de la leche, sacrificio prematuro de los animales e inversión económica en tratamientos, al final esto redundará en costos altos en la industria lechera (Angelopoulou *et al.*, 2019). La mastitis se presenta como infecciones clínicas y subclínicas, ambas se caracterizan por un aumento en el conteo de células somáticas (CCS), un resultado del CCS de 200.000 células

mL⁻¹ en la leche, se considera una vaca con mastitis. En la mastitis clínica, hay una alteración organoléptica de la leche, además el ganado presenta síntomas como fiebre, problemas de deglución y debilidad, mientras en la mastitis subclínica hay solo un aumento en el CCS (Gomes y Henriques, 2016; Angelopoulou *et al.*, 2019).

La mastitis es causada por diferentes patógenos, entre los denominados patógenos contagiosos se encuentran: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp. Otro grupo lo conforman los patógenos ambientales como: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp *dysgalactiae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp (Oliver y Murinda, 2012). Los antibióticos

Autor de correspondencia: Ricardo P. Alba. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología. Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Email: albapaez@unipamplona.edu.co

más usados para el tratamiento y prevención de la mastitis son: la penicilina, cefalosporina, streptomina, tetraciclina (Oliver y Murinda, 2012). Se cree que el uso y el abuso de los antibióticos en la agroindustria, son los responsables de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, es el responsable del 50 % de la mastitis y el antibiótico pirlimicina, presenta solo un 10-30 % de efectividad frente a este patógeno (Gomes y Henriques, 2016).

Un tratamiento alternativo para la mastitis bovina es la terapia con bacteriófagos (fagos). Los fagos son virus que infectan y pueden destruir células bacterianas mediante lisis. Al igual que el resto de virus, son parásitos obligados y utilizan la maquinaria del hospedero para reproducirse. Los fagos necesitan de un receptor específico para unirse al huésped, seguido de la liberación del ácido nucleico en la célula infectada, en donde los genes del fago se expresan eficientemente, en detrimento de la célula bacteriana, el genoma del fago es replicado, posteriormente encapsulado en la partícula viral y finalmente causa una lisis de la bacteria (Hesse y Adhya, 2019). La presencia abundante y diversa de los fagos en la biosfera, los hace tener un papel fundamental en la población y evolución de los patógenos bacterianos (Pratama y van Elsas, 2018).

Los fagos tienen varias ventajas: son específicos en su acción, no afectan la microbiota normal u ocasionan reacción alérgica (Horiuk, 2018). La relevancia de este estudio radica en el uso potencial de fagos como alternativa a los antibióticos, compuestos a los cuales las bacterias han desarrollado algún tipo de resistencia y multiresistencia (Carson *et al.*, 2010).

Materiales y métodos

Las muestras se obtuvieron de un hisopado de la ubre, realizando un frotis con hisopo, que luego se depositaron en tubos con una solución salina isotónica. Otra muestra se obtuvo a partir de 1 mL de leche de una vaca con mastitis. Las muestras se transportaron al laboratorio a una temperatura de 4°C. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro Whatman de 0,45 µm, posteriormente se realizó el método de doble capa de agar (Kropinski *et al.*, 2009), en donde se adicionó 1 mL de bacteria más 1 mL del filtrado a un tubo de ensayo con 4 mL de agar al 0,8 % a una caja de Petri, las cuales se incubaron a 37 °C/24-48 horas hasta observar placa de lisis.

Para la masificación de los bacteriófagos, las placas de lisis respectivas se transfirieron a un Erlenmeyer con 50 mL de caldo nutritivo con la bacteria en estudio, incubándose a 37°C por 48 horas, luego se centrifugó a 8000 rpm por 20 minutos; se recuperó el sobrenadante y se llevó a cabo nuevamente el método de doble capa de agar, hasta la aparición de placas de lisis.

Resultados

En el primer aislamiento se observó la presencia de bacteriófagos que se encontraban infectando a

Staphylococcus spp., *E. coli* y *Pseudomonas* spp., principales géneros de bacterias que ocasionan la mastitis (Figura 1).

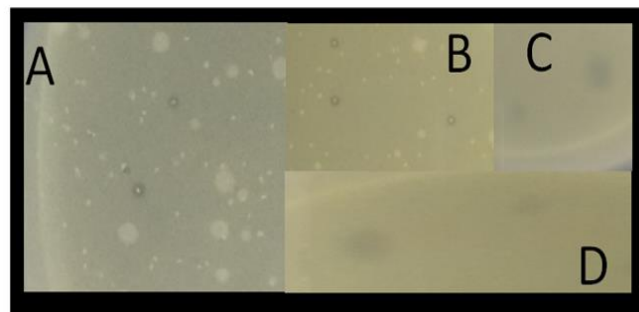


Figura 1. Bacteriófagos con acción sobre *S. aureus* y *E. coli*. Se diferencian dos morfologías de las calvas, pequeñas (1 mm) sobre *S. aureus* y grandes (5 mm) para *E. coli*. (A) Bacteriófago aislado de leche con acción sobre *S. aureus*. (B) Bacteriófago aislado por hisopado de la ubre, acción sobre *S. aureus*. (C) Calvas producto de bacteriófagos sobre *E. coli* aislados de la leche. (D) Bacteriófago con acción sobre *E. coli*, aislado del frotis de la ubre de la vaca.

En el segundo ensayo se demostró la reproducibilidad del experimento evidenciando bacteriófagos que infectan a *E. coli* y *Staphylococcus* spp (Figura 2). Se contrasta el primer aislamiento con el segundo ensayo debido a que no se obtuvieron nuevamente fagos que infectaran a *Pseudomonas* spp. lo que puede darse por razones como la resistencia que posee esta bacteria debido a las biopelículas que forma, la capacidad de adhesión del fago a la bacteria, o que no se hayan producido las partículas de fago suficientes para infectar la bacteria y el tiempo de latencia haya sido muy corto para la liberación del fago.

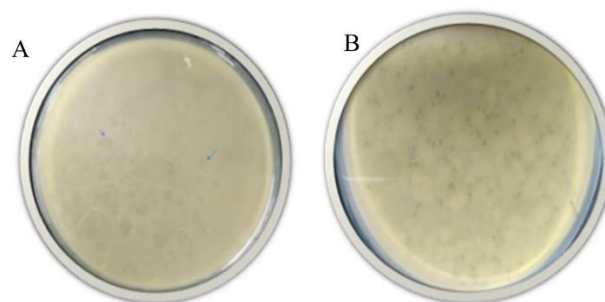


Figura 2. Segundo bioensayo. A. Aislamiento de bacteriófago frente a *E. coli*. B. Aislamiento de bacteriófagos frente a *Staphylococcus* spp.

Discusión

Los fagos fueron descritos de manera independiente por Frederick Twort y Felix D'Herelle, en 1915 y 1917 respectivamente. Aunque hubo un entusiasmo en la era pre-antibióticos, con la aplicación de los fagos contra infecciones

como furunculosis, osteomielitis, meningitis, sepsis puerperal, tifoidea, entre otras, este interés fue decayendo principalmente debido al advenimiento de los antibióticos (Hesse y Adhya, 2019). Sin embargo, algunos países de Europa del Este (Polonia, Georgia y Rusia), continuaron usando los fagos para el control de infecciones bacterianas en clínica, solo la crisis derivada de la resistencia a los antimicrobianos, han hecho resurgir la investigación de los fagos en países como Francia, Bélgica, Suiza y Estados Unidos (Cisek et al., 2017). Esas propuestas se han extendido hacia el campo veterinario, en donde se han descrito el uso de infusiones de fago y un fago denominado SA012, para tratar mastitis ocasionada por *S. aureus* en un modelo murino (O'Sullivan et al., 2019). En un estudio llevado a cabo en Brasil, se aislaron fagos a partir de muestras de aguas residuales de establos, encontrándose sólo dos fagos con potencial para ser evaluados como agentes de biocontrol contra *S. aureus* (Leite et al., 2019). En otro reporte, se analizó la capacidad de inhibir *S. aureus* por el fago K (familia *Myoviridae*) en la leche, encontrándose que en leche cruda había una afectación en la adsorción del fago con respecto a la leche con un tratamiento térmico (O'Flaherty et al., 2005).

En nuestro estudio, se obtuvieron resultados de fagos causando placas de lisis en bacterias tales como *Staphylococcus* spp., *E. coli* y *Pseudomonas* spp. Se evidenció una morfología diferente en las placas de lisis provocadas por los fagos que infectaban a *Staphylococcus* spp. entre el hisopado de la ubre y la leche, observando en la figura 2B la formación de placas de lisis muy pequeñas que pueden ser el resultado de períodos de latencia muy largos, tamaños de explosión pequeños y/o baja tasa de adsorción de los fagos a la bacteria huésped (Abedon y Culler, 2007). Esto también puede indicar que se trata de fagos lisogénicos o temperados, dada la morfología observada en las calvas.

La presencia de fagos en cultivos bacterianos generalmente se presume por las alteraciones características que se observan en las colonias. No obstante, su identificación requiere el uso de pruebas más específicas.

En la actualidad se busca además de fagos con una efectividad comprobada contra la bacteria blanco, una estabilización y optimización de la aplicación del producto, se analizan cocteles de fagos, técnicas de encapsulación y de nanotecnología (Malik et al., 2017) para una eficiencia de la fagoterapia tanto en aplicaciones en humanos, como en animales de interés veterinario.

Conclusiones

Los resultados indican la presencia de bacteriófagos que infectan a *Staphylococcus* spp., *E. coli* y *Pseudomonas* spp. Los bacteriófagos han adquirido gran importancia en la virología como indicadores de contaminación ambiental y se ha ampliado su uso en la fagoterapia como alternativa frente al uso de antibióticos.

Referencias

- Abedon, S. T. y Culler, R. R. (2007) *Optimizing bacteriophage plaque fecundity*. J Theor Biol 249: 582-592.
- Angelopoulou, A., Warda, A., Hill, C. y Ross, P. (2019). *Nonantibiotic microbial solutions for bovine mastitis – live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins*, Critical Reviews in Microbiology, DOI: 10.1080/1040841X.2019.1648381
- Carson, L., Gorman, S. P. y Gilmore, B. F. (2010). *The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of Proteus mirabilis and Escherichia coli*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 59: 447-455.
- Cisek, A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K., Wyżewski G. (2017). *Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages*. Curr Microbiol, 74:277-283 DOI 10.1007/s00284-016-1166-x
- Gomes, F. y Henriques, M. (2016). *Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches*. Curr Microbiol 72:377–382. DOI 10.1007/s00284-015-0958-8.
- Hesse, S. y Adhya, S. (2019). *Phage Therapy in the Twenty-First Century: Facing the Decline of The Antibiotic Era; Is it Finally Time for The Age of the Phage?* Annu. Rev. Microbiol. 73:7.1–7.20 The Annual Review of Microbiology is online at micro.annualreviews.org <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062535>
- Horiuk, Y. V. (2018). *Fagothrapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk*. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 20(88): 42-47. doi: 10.32718/nvlvet8807.
- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Linghor, E., Johnson, R. P. (2009). *Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay*. Methods in Molecular Biology. 501:69-76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7. http://www.springerprotocols.com/Abstract/doi/10.1007/978-1-60327-164-6_7
- Leite, J. A., Pereira, H. P., Borges, C. A. V.; Alves, B. R. C., Ramos, A. I. A. P., Martins, M. F.; Arcuri, E. F. (2019). *Lytic bacteriophages as a potential alternative to control Staphylococcus aureus*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.54, e00917. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00917>.
- Malik, D., Sokolov I., Vinner, G., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G., Clokie, M., Garton, N., Stapley, A., Kirpichnikova, A. (2017). *Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy*. Advances in Colloid and Interface Science 249 100–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2005). *Inhibition of bacteriophage K proliferation on Staphylococcus aureus in raw bovine milk*. Lett Appl Microbiol 41: 274-279.
- Oliver, S. y Murinda, S. (2012). *Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens*. Vet Clin Food Anim. 28: 165-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>

O'Sullivan, L., Bolton, D., McAuliffe, O., Coffey, A. (2019).
The use of bacteriophages to control and detect pathogens in the dairy industry. International Journal of Dairy Technology 73(11). DOI:10.1111/1471-0307.12641
Pratama, A. A., van Elsas, J. D. (2018). *The 'Neglected' Soil Virome - Potential Role and Impact.* Trends in

Microbiology, 26(8): 649-662.
DOI: [10.1016/j.tim.2017.12.004](https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.004)

Ciencia y Tecnología Agropecuaria es una revista publicada por la Universidad de Pamplona bajo la licencia: [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) (CC BY-NC-SA 4.0)

