

**DETECCION E IDENTIFICACION DE LAS HEMOLISINAS
PRODUCIDAS POR ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE
LECHE MAMITICA DE OVEJA Y SU RELACION CON LA
PRODUCCION DE COAGULASA**

*Por L. Gutiérrez,
M. L. García y
B. Moreno*

INTRODUCCION

Al menos cuatro de las numerosas toxinas producidas por los miembros del género *Staphylococcus* poseen actividad hemolítica. El mejor conocimiento de estas toxinas, denominadas hemolisinas alfa, beta, delta y gamma, ha puesto de manifiesto que su acción, en contra de lo que se suponía, no se limita a la lisis de los eritrocitos de las diversas especies animales. Por esta razón, se ha propuesto sustituir el término hemolisinas por otros tales como toxinas citolíticas o citolisinas y toxinas alterantes de las membranas, que reflejan mejor su acción sobre células diversas^{23 18}.

La producción de hemolisina alfa es un carácter que se ha asociado siempre con el poder patógeno de los estafilococos¹. Esta toxina, que actúa sobre los hematíes de distintas especies animales, muestra su efecto más intensamente sobre los de conejo, poseyendo, además, actividad citotóxica y citolítica sobre diferentes células. La hemolisina beta, característica de las cepas de *S. aureus* de origen animal^{4 8}, es una esfingomielinasa que lisa más activamente los eritrocitos de oveja y de vaca, presentando también efecto citotóxico sobre otras células. Al contrario de lo que sucede con las dos toxinas anteriores, que son elaboradas por las cepas de estafilococos coagulasa positivos, la hemolisina delta es producida también por los coagulasa negativos, lo que confirma que la patogenicidad de las cepas se correlaciona mejor con la producción de un tipo de toxina determinado (alfa y/o beta) que con el carácter hemolítico en general. Los eritrocitos de varias especies animales son uniformemente sensibles a la acción lítica de esta toxina²⁵, que es la única que actúa sobre los hematíes de caballo²⁴. La existencia de la hemolisina gamma, aun-

que señalada ya en el año 1938²¹, ha sido muy controvertida, ya que al ser inhibida por el agar no se puede detectar por los métodos habituales de siembra en placa de agar sangre. Diversos investigadores^{7 13} han demostrado definitivamente que se trata de una toxina diferente de las tres antes mencionadas.

Aunque en la actualidad se tiende a considerar que la virulencia de los estafilococos está relacionada más que con un factor único con la producción de una serie amplia de enzimas y toxinas, la investigación del carácter hemolítico completa la caracterización de las cepas, siendo de gran valor para su clasificación en especies^{11 19 2}. Además, el tipo de hemolisinas producido por las cepas de la especie *S. aureus* es muy útil para adscribir las a alguno de los biotipos o ecotipos propuestos por HAJEK y MARSALEK⁸, ya que como se ha señalado anteriormente, la producción de hemolisina beta es propia de los estafilococos coagulasa positivos de origen animal, mientras que la de hemolisina alfa lo es de las de origen humano.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al investigar la capacidad hemolítica y el tipo de hemolisinas producidas por 71 cepas de estafilococos aisladas de leche mamática de oveja, relacionándose estos caracteres con las especies en que fueron clasificadas, así como con la producción de coagulasa.

MATERIAL Y METODOS

Cepas

Las 71 cepas de estafilococos estudiadas fueron aisladas a partir de leche mamática de oveja. De ellas, 59 habían sido clasificadas como *S. aureus*, 1 como *S. simulans*, 5 como *S. epidermidis* y 1 como *S. haemolyticus*. Las 5 cepas restantes no pudieron ser adscritas a ninguna de las especies propuestas.

Detección e identificación de hemolisinas

La detección e identificación de las hemolisinas producidas se llevó a cabo según la técnica descrita por NAKAGAWA¹⁵, empleándose el procedimiento señalado por ELEK y LEVY⁴ para diferenciar las toxinas alfa y delta.

El medio utilizado fue Tryptose Blood Agar Base (Difco), al que se añadía un 5 % v/v de eritrocitos, lavados tres veces y resuspendidos hasta el volumen original en solución salina estéril, de oveja, conejo, caballo y humanos. Para la neutralización de la hemolisina alfa por la antihemolisina correspondiente, se colocaban sobre la superficie de las placas conteniendo el medio solidificado, tiras de papel de filtro impregnadas con el antisuero específico (Wellcome Reagents, Ltd.). Cultivos de 18-24 horas en caldo BHI (Difco) de las cepas a ensayar se sembraban perpendicularmente a la tira de papel de filtro. Las

placas se incubaban a 37°C durante 24 horas, manteniéndose posteriormente una noche a 4°C. En cada serie de pruebas se incluían como controles las cepas *S. aureus* ATCC 25178, productora de hemolisina beta, y *S. aureus* ATCC 8096, de hemolisina alfa. Para la identificación de las hemolisinas, se tuvo en cuenta la diferente sensibilidad de los eritrocitos de las diversas especies a las distintas hemolisinas, el aspecto de las zonas de hemólisis en torno a la línea de crecimiento y la neutralización de la toxina alfa por el antisuero presente en la tira de papel de filtro.

RESULTADOS

En la Tabla I se presentan, en conjunto, los resultados obtenidos. De las 71 cepas estudiadas, 69 (97,18 %) producían algún tipo de hemolisina y sólo 2 (2,82 %) carecían de esta propiedad. Las combinaciones hemolíticas halladas fueron alfa-beta-delta (48 cepas), alfa-beta (11 cepas), delta (6 cepas), alfa-delta (2 cepas), beta-delta (1 cepa) y alfa (1 cepa). La hemolisina más frecuentemente producida fue la alfa (62 cepas), seguida de la beta (60 cepas) y de la delta (57 cepas). Los tipos y combinaciones de hemolisinas producidas por las cepas agrupadas según la especie a la que fueron adscritas se recogen en la Tabla II. Todas las cepas de *S. aureus* mostraron carácter hemolítico. De ellas, 48 elaboraban las tres toxinas investigadas, 10 la alfa y la beta, y 1 la beta y la delta. La cepa de *S. simulans* producía hemolisinas alfa y delta. Sólo 3 de las 5 cepas de *S. epidermidis* fueron hemolíticas, produciendo únicamente toxina delta. Este mismo tipo de toxina fue elaborado también por la cepa de *S. haemolyticus* y por 2 de las 5 no clasificadas. Las 3 cepas restantes no clasificadas producían toxina alfa (1 cepa), alfa y beta (1 cepa) y alfa y delta (1 cepa).

TABLA I
Tipos y combinaciones de hemolisinas
(71 cepas de estafilococos aisladas de mamitis ovinas)

	Número	Porcentaje
Cepas hemolíticas	69	97,18
Cepas no hemolíticas	2	2,82
Hemolisinas*	α	1,45
	δ	8,70
	αβ	15,94
	αδ	2,90
	αβδ	69,56
	βδ	1,45

* Cepas α-hemolíticas: 62 (89,86 %).
Cepas β-hemolíticas: 60 (86,96 %).
Cepas δ-hemolíticas: 57 (82,61 %).

TABLA II
Combinaciones de hemolisinas producidas por 59 cepas de *S. aureus*, 1 de *S. simulans*, 5 de *S. epidermidis*, 1 de *S. haemolyticus* y 5 no clasificadas aisladas de leche mamítica de oveja

Especie	Combinaciones de hemolisinas						N.H. ^a
	α	δ	$\alpha\beta$	$\alpha\delta$	$\alpha\beta\delta$	$\beta\delta$	
<i>S. aureus</i>			10		48	1	
<i>S. simulans</i>				1			
<i>S. epidermidis</i>		3					2
<i>S. haemolyticus</i>		1					
No clasificadas	1	2	1	1			
Total	1	6	11	2	48	1	2

^a N.H. = Cepas no hemolíticas.

DISCUSION

De los resultados obtenidos destaca, por lo que se refiere a *S. aureus*, el que todas las cepas mostraran carácter hemolítico y el que las combinaciones más frecuentes de hemolisinas fueran la alfa-beta-delta y la alfa-beta. Además, es preciso señalar que el 100 % de las cepas incluidas en esta especie producían hemolisina beta, el 98,3 % alfa y el 83 % delta. Al comparar estos resultados con los de los pocos investigadores que estudian cepas de *S. aureus* de origen ovino, se observa que existen dos grupos de trabajos, unos en los que el número de cepas productoras de hemolisina alfa es muy similar al de productoras de hemolisina beta, y otros en los que la producción de hemolisina alfa es reducida e incluso muy poco frecuente, comparada con la beta.

Entre los primeros, se encuentra el de LERNAU *et al.*¹⁴, quienes señalan que el 100 % de 66 cepas de *S. aureus* aisladas de mamitis ovinas eran productoras de ambas toxinas, y el de TAMARIN²², que investiga la capacidad hemolítica de 72 cepas de estafilococos de la misma especie y de origen idéntico al de las anteriores, encontrando que el porcentaje de cepas productoras de toxina beta era del 90,3 % y el de alfa del 84,8 %, siendo las combinaciones más frecuentes la alfa-beta-delta y la alfa-beta. También PAPAVALASSIOU y DENDRINOS¹⁷ observan que 5 cepas de *S. aureus* aisladas de heces de oveja producían toxinas alfa y beta. Recientemente, SCOTT *et al.*²⁰ identifican en Escocia una dermatitis estafilocócica en ovejas debida a cepas de *S. aureus* productoras de hemolisinas alfa, beta y delta.

Existe una discrepancia considerable entre los resultados de los autores anteriores, similares en líneas generales a los hallados por nosotros, y los obtenidos por otros investigadores. Así, OEDING *et al.*¹⁶ indican que de las 84 cepas estudiadas, aisladas de fosas nasales de ovejas sanas y de leche mamítica también de oveja, 81 producían hemolisina beta y sólo 3 alfa. HAJEK⁹, al estudiar 44 cepas de *S. aureus* procedentes de quesos elaborados con leche de

oveja, encuentra que 37 producían hemolisina beta y 6 alfa. Hay también algún trabajo en el que el porcentaje de cepas productoras de hemolisina alfa es superior al de productoras de hemolisina beta: de las 384 cepas de *S. aureus*, aisladas de heces de ovejas y cabras por DIMITRACOPOULOS *et al.*³, 297 producían hemolisina alfa y sólo 54 beta.

Por no haber sido posible encontrar bibliografía relativa a los tipos de hemolisinas producidos por *S. simulans*, es difícil interpretar el hecho de que la cepa de esta especie incluida en este estudio produjera toxinas alfa y delta. KLOOS *et al.*¹² señalan que las cepas de *S. simulans* producen, a menudo, hemólisis moderada o fuerte en sangre humana. No resulta sorprendente el que 3 de las 5 cepas de *S. epidermidis* produjeran hemolisina delta, ya que existen datos sobre la producción de esta toxina por cepas de estafilococos coagulasa negativos y de modo particular por miembros de esta especie^{10 6 5}. El que las cepas de *S. haemolyticus* poseen capacidad para lisar eritrocitos bovinos y humanos es un hecho que caracteriza a esta especie¹². Sin embargo, como en el caso de *S. simulans*, no existe información sobre el tipo o tipos de hemolisinas que la originan. Las combinaciones hemolíticas presentadas por las cinco cepas no clasificadas eran muy variadas. Dos de ellas producían toxina delta y las restantes alfa, alfa-delta y alfa-beta. Las dos cepas productoras de toxina delta, excepto por su capacidad de coagular completamente el plasma bovino, no poseían caracteres propios de las especies coagulasa positivas. No obstante, es preciso señalar que una de ellas era enterotoxigénica. La cepa de este grupo que produjo sólo hemolisina alfa mostraba también otras dos propiedades de las especies coagulasa positivas, como son la coagulación del plasma de cerdo y la producción de termonucleasa. Sin embargo, la productora de hemolisinas alfa y delta, que era también enterotoxigénica, carecía de ellas. La última cepa que pudo ser adscrita a una especie determinada presentaba la combinación alfa-beta y gran número de propiedades características de *S. aureus* y *S. intermedius*.

En la Tabla III se presenta la relación existente entre la capacidad de coagular el plasma de conejo y el tipo de hemolisinas producido. Como puede observarse, existe una correlación absoluta entre la producción de coagulasa y la de hemolisinas alfa y/o beta. Por lo que se refiere a las 11 cepas coagulasa negativas, es preciso señalar que las 6 cepas productivas únicas de toxina delta y las dos no hemolíticas pertenecían a este grupo, pero que las 3 restantes producían hemolisina alfa.

De lo expuesto anteriormente es posible concluir que los estafilococos aislados de leche mamítica de oveja muestran, en su mayoría, actividad hemolítica y que la producción de hemolisinas alfa y/o beta es una propiedad que presentan de modo uniforme las cepas de *S. aureus* de este origen, existiendo también relación entre la producción única de toxina delta y la ausencia de actividad coagulasa.

TABLA III
Relación entre la capacidad de coagular el plasma de conejo y los tipos de hemolisinas producidas

Combinaciones hemolíticas	Cepas coagulasa positivas	Cepas coagulasa negativas
α		1
δ		6
$\alpha\beta$	11	
$\alpha\delta$		2
$\alpha\beta\delta$	48	
$\beta\delta$	1	
N.H. ^a		2

^a N. H. = Cepas no hemolíticas.

RESUMEN

En el presente trabajo se da cuenta de los resultados obtenidos al investigar la actividad hemolítica de 71 cepas de estafilococos clasificadas: 59 como *S. aureus*, 1 como *S. simulans*, 5 como *S. epidermidis*, 1 como *S. haemolyticus* y 5 no clasificadas. Estas cepas habían sido aisladas de leche mamática de oveja.

Para la detección e identificación de las hemolisinas producidas se empleó una técnica en placa, utilizando eritrocitos de diversas especies animales y tiras de papel de filtro impregnadas en suero anti-hemolisina alfa. Únicamente 2 de las cepas estudiadas no mostraban actividad hemolítica. Los tipos y combinaciones de hemolisinas hallados fueron: alfa-beta-delta (48 cepas), alfa-beta (11 cepas), delta (6 cepas), alfa-delta (2 cepas), beta-delta (1 cepa) y alfa (1 cepa). La hemolisina más frecuentemente producida fue la alfa (62 cepas), seguida de la beta (60 cepas) y de la delta (57 cepas). De las 59 cepas de *S. aureus*, 48 elaboraban las tres toxinas investigadas, 10 alfa y beta y 1 beta y delta. La cepa de *S. simulans* producía hemolisinas alfa y delta. Tres de las 5 cepas clasificadas como *S. epidermidis*, la adscrita a *S. haemolyticus* y 2 de las no clasificadas producían sólo hemolisina delta. Las 3 cepas restantes no clasificadas producían hemolisina alfa únicamente o en combinación con beta o delta.

En este trabajo se ha encontrado una correlación completa entre la capacidad de coagular el plasma de conejo y la producción de hemolisinas alfa y/o beta, observándose también relación entre la producción única de toxina delta y la ausencia de actividad coagulasa.

DETECTION AND IDENTIFICATION OF HAEMOLYSINS PRODUCED BY STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM OVINE MASTITIC MILK AND THEIR RELATION WITH COAGULASE PRODUCTION

SUMMARY

The haemolytic properties of 71 strains of staphylococci isolated from ovine mastitic milk were studied by a plate method using washed rabbit, sheep, horse and human erythrocytes and filter paper strips soaked in anti-alpha-haemolysin serum. Sixty six of these strains had been previously classified: 59 as *S. aureus*, 1 as *S. simulans*, 5 as *S. epidermidis* and 1 as *S. haemolyticus*. The remaining 5 strains were not classified.

Only 2 of the 71 cultures failed to produce any of the haemolysins investigated. Alpha lysin was produced by 62 strains, beta lysin was produced by 60 strains and delta lysin was demonstrated in 57 strains. The haemolysin combinations found most frequently were alpha-beta-delta (48 strains), alpha-beta (11 strains), delta (6 strains), alpha-delta (2 strains), beta-delta (1 strain) and alpha (1 strain). Of the 59 *S. aureus* cultures, 48 produced a pattern of alpha, beta and delta lysins, 10 produced alpha and beta lysins, and 1 produced beta and delta lysins. Production of alpha and beta haemolysins was found in the *S. simulans* strain. The 6 strains that produced only delta lysin were classified as *S. epidermidis* 3, *S. haemolyticus* 1 and unclassified 2. The other 3 unidentified cultures were found to produce alpha lysin either singly or in combination with beta or delta.

A complete correlation was observed between the production of alpha and/or beta lysins and coagulase activity. On the other hand, strains that gave coagulase negative reactions were producers of delta haemolysin (only).

BIBLIOGRAFIA

- 1) BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. (editors) (1974).-*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., 8th edition, 483-489.
- 2) DEVRIESE, L. A., HAJEK, V., OEDING, P., MEYER, S. A. y SCHLEIFER, K. H. (1978).-*Staphylococcus hyicus* (SOMPOLINSKY, 1953) comb. nov. and *S. hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 482-490.
- 3) DIMITRACOPOULOS, G., SAKELLARIOU, C. y PAPAVALSILOU, J. (1976). Staphylococci from the feces of different animal species: biotypes of sheep and goat origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**: 53-55.
- 4) ELEK, S. D. y LEVY, E. (1950).-Distribution of hemolysins in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. *J. Pathol. Bacteriol.*, **62**: 541-554.
- 5) GARCÍA, M. L., MORENO, B. y BERGDOLL, M. S. (1980).-Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 548-553.
- 6) GEMMELL, C. G., THELESTAM, M. y WADSTROM, T. (1976).-Toxinogenicity of coagulase negative staphylococci. En *Staphylococci and staphylococcal diseases*, Proceedings of the IIIrd International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, J. JELIASZEWICZ (editor), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 133-136.
- 7) GUYONNET, F. y PLOMMET, M. (1970).-Hémolysine gamma de *S. aureus*: purification et propriétés. *Ann. Inst. Pasteur*, **118**: 19-33.
- 8) HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1971).-The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 217*, 176-182.

- 9) HAJEK, V. (1978).-Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 264-268.
- 10) KLECK, J. L. y DONAHUE, J. A. (1968).-Production of thermostable hemolysin by cultures of *S. epidermidis*. *J. Infect. Dis.*, **181**: 317-323.
- 11) KLOOS, W. E. y SCHLEIFER, K. H. (1975).-Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis* y *S. simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**: 62-79.
- 12) KLOOS, W. E., SCHLEIFER, K. H. y NOBLE, W. C. (1976).-Estimation of character parameters in coagulase negative *Staphylococcus* species. En *Staphylococci and staphylococcal diseases*, Proceedings of the IIIrd International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, J. JELJASZEWICK (editor), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 23-41.
- 13) MOLBY, R. y WADSTROM, T. (1971).-Separation of gamma hemolysin from *S. aureus* Smith 5R. *Infect. Immun.*, **3**: 633-635.
- 14) LERNAU, H., BLAZER, R. y SOMPOLINSKY, D. (1961).-The aetiological investigation of an outbreak of staphylococcal mastitis in a flock of sheep. *Refuah vet.*, **18**: 50-51.
- 15) NAKAGAWA, M. (1958).-Studies on staphylococci from the bovine udder. I. Biological characteristics of staphylococci and some observations on the pathogenic strains. *Jap. J. Vet. Res.*, **6**: 19-34.
- 16) OEDING, P., HAJEK, V. y MARSALEK, E. (1976).-A comparison of antigenic structure and phage pattern with biochemical properties of *S. aureus* strains isolated from sheep. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, **84**: 61-65.
- 17) PAPAVALASSIOU, J. y DENDRINOS, Th. (1970).-Recherche de *S. aureus* dans les selles des animaux. *Arch. Inst. Pasteur Hell.*, **16**: 61-70.
- 18) ROGOLSKY, M. (1980).-Nonenteric toxins of *S. aureus*. *Microbiol. Rev.*, **43**: 320-336.
- 19) SCHLEIFER, K. H. y KLOOS, W. E. (1975).-Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended description of *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* and descriptions of three new species: *S. cohnii*, *S. haemolyticus* and *S. xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**: 50-61.
- 20) SCOTT, F. M., FRASER, J. y MARTIN, W. B. (1980).-Staphylococcal dermatitis in sheep. *Vet. Rec.*, **107**: 572-574.
- 21) SMITH, M. L. y PRICE, S. A. (1938).-Staphylococcus gamma haemolysin. *J. Pathol. Bacteriol.*, **47**: 379-393.
- 22) TAMARIN, R. (1972).-A study of *S. aureus* isolated from cases of ovine mastitis. *Refuah vet.*, **29**: 132-146.
- 23) THELESTAM, M. (1976).-Effect of *S. aureus* haemolysins on the plasma membrane of cultured mammalian cells. En *Staphylococci and staphylococcal diseases*, Proceedings of the IIIrd International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, J. JELJASZEWICK (editor), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 679-690.
- 24) TURNER, W. H. y PICKARD, O. J. (1980).-A new haemolysin from *S. aureus* which lyses horse erythrocytes. *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 237-241.
- 25) WISEMAN, G. M. (1975).-The hemolysins of *S. aureus*. *Bacteriol. Rev.*, **39**: 317-344.

PRODUCCION DE GELATINASA Y DE LISOZIMA, FERMENTACION DEL MANITOL Y REACCION EN YEMA DE HUEVO EN ESTAFILOCOCOS AISLADOS DE ABSCESOS EN INSPECCION DE CARNES Y SU RELACION CON LA PRODUCCION DE COAGULASA Y DE TERMONUCLEASA

Por I. Menes,
M. L. García y
B. Moreno

INTRODUCCION

Las dificultades en el ensayo de la capacidad infectiva y enterotoxigénica de los estafilococos han sido la causa de que se hayan estudiado una serie de propiedades bioquímicas y fisiológicas de fácil determinación, en busca de posibles correlaciones positivas. En este sentido, tienen máxima importancia la producción de coagulasa y de termonucleasa, siendo mucho más problemáticas, por ejemplo, la fermentación del manitol en anaerobiosis, la producción de gelatinasa y de lisozima, y la reacción en yema de huevo. Las opiniones más actuales, sin embargo, coinciden en que la patogenicidad de los estafilococos no está relacionada con ningún enzima ni toxina concretos, sino más bien con un amplio conjunto de estas sustancias^{1 11 43}.

Algunas de las propiedades antes mencionadas han sido utilizadas también con fines taxonómicos e incluso como criterios diferenciales y diagnósticos en los propios medios de aislamiento^{2 3 6 27}. Las clasificaciones más actuales, que amplían considerablemente el número de especies en el género *Staphylococcus*^{4 23 24 25 35}, no incluyen, sin embargo, como criterios de clasificación las propiedades citadas, objeto de nuestro estudio. Tampoco se utilizan estas propiedades en la clasificación de los estafilococos en biotipos según las especies animales de procedencia¹⁸.

El objeto de este trabajo es presentar los resultados obtenidos en cuanto a la producción de gelatinasa y de lisozima, la fermentación del manitol en anaerobiosis y la reacción en yema de huevo por parte de 71 cepas de