

**Uso de nisina y quitosano para la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos y asociado a mastitis bovina**

**Use of nisin and chitosan for the inhibition of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* bovine mastitis-associated**



Mónica Sánchez-Ceja<sup>a</sup>

Ma. Teresa Arceo-Martínez<sup>a</sup>

Ma. Guadalupe Sandoval-Flores<sup>b</sup>

Patricia Nayeli Alva-Murillo<sup>c</sup>

Rafael Jiménez-Mejía<sup>b</sup>

Pedro Damián Loeza-Lara<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México.

<sup>b</sup> Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. Licenciatura en Genómica Alimentaria, Avenida Universidad No. 3000, Colonia Lomas de la Universidad. 59103. Sahuayo, Michoacán, México.

<sup>c</sup> Universidad de Guanajuato, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Guanajuato, Gto, México.

\*Autor de correspondencia: [pdloeza@ucienegam.edu.mx](mailto:pdloeza@ucienegam.edu.mx)

● **Resumen:**

En este trabajo se describen los patrones de resistencia a antibióticos de aislados de *Staphylococcus aureus* obtenidos de vacas con mastitis, así como su susceptibilidad *in vitro* a nisina, quitosano y al compuesto nisina/quitosano. A partir de muestras de leche obtenidas de vacas enfermas se aislaron e identificaron 53 *S. aureus*, a los cuales se les analizó el perfil de resistencia a antibióticos. Los resultados evidenciaron una alta frecuencia de resistencia hacia el grupo de los beta-lactámicos, principalmente a penicilina, dicloxacilina y ampicilina. Asimismo, se detectó multiresistencia en algunos aislados, ya que mostraron tolerancia a 3 o 4 grupos de antibióticos, destacando los aislados AMC-9 (resistente a tres grupos) y AMC-23 (resistente a cuatro grupos). También se resalta que todos los aislados fueron susceptibles a levofloxacina. Por otra parte, se analizó la susceptibilidad *in vitro* de los aislados a nisina, quitosano y al compuesto nisina/quitosano, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Los resultados indican que el 100 % de los aislados fue susceptible a quitosano y al compuesto nisina/quitosano y el 47.1 % a la nisina. El efecto del quitosano y del compuesto nisina/quitosano sobre los aislados multiresistentes AMC-9 y AMC-23 fue bactericida. Estos resultados revelan el potencial de los compuestos antimicrobianos quitosano y nisina/quitosano para ser utilizados como agentes terapéuticos contra la mastitis bovina.

● **Palabras clave:** *Staphylococcus aureus*, Mastitis bovina, Resistencia, Nisina, Quitosano.

● **Abstract:**

This study describes the antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis, as well as their *in vitro* susceptibility to nisin, chitosan and the nisin/chitosan composite. From milk samples obtained from sick cows, 53 *S. aureus* isolated were identified, the profile of antibiotic resistance was analyzed. The results showed a high frequency of resistance to beta-lactams group, mainly penicillin, dicloxacillin and ampicillin. In addition, multiresistance was detected in some isolates, since they showed tolerance to 3 or 4 different groups of antibiotics, highlighting the isolates AMC-9 (resistant to three groups) and AMC-23 (resistant to four groups). It is also noted that all isolates were susceptible to levofloxacin. On the other hand, the *in vitro* susceptibility of the isolates to nisin, chitosan and the nisin/chitosan composite was analyzed determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The results indicated 100 % of the isolates were susceptible to chitosan and to the nisin/chitosan composite and 47.1 % to nisin. The effect of chitosan and nisin/chitosan composite on the multi-resistant isolates AMC-9 and AMC-23 was bactericidal. These results show the potential of the antimicrobial compounds chitosan, nisin/chitosan to be used as therapeutic agents against bovine mastitis.

● **Key words:** *Staphylococcus aureus*, Bovine mastitis, Resistance, Nisin, Chitosan.

Recibido 24/04/2017

Aceptado 24/01/2018

## ❖ Introducción ❖

La mastitis, una respuesta inflamatoria de la glándula mamaria ocasionada usualmente por bacterias, es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas que afecta a las vacas lecheras. Ésta impacta de manera negativa el bienestar del ganado y la calidad de la leche producida, la cual generalmente presenta anomalías, lo que genera pérdidas económicas para los ganaderos y para la industria láctea<sup>(1)</sup>. El principal patógeno contagioso responsable de las infecciones clínicas y subclínicas de las vacas lactantes es la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*<sup>(2,3)</sup>, la cual es capaz de invadir el tejido mamario y sobrevivir dentro de las células hospederas, ocasionando infecciones persistentes y recaídas frecuentes<sup>(4,5)</sup>.

La administración intramamaria de antibióticos ha sido el método más común para tratar la mastitis bovina<sup>(6)</sup>. Sin embargo, los tratamientos se han visto comprometidos en numerosas ocasiones, principalmente en aquéllas en las que está involucrado *S. aureus*, ya que éste tiene la capacidad de evadir el efecto de los antibióticos<sup>(7)</sup>. Asimismo, diferentes estudios han demostrado un incremento importante en la frecuencia de aislados de *S. aureus* resistentes a antibióticos<sup>(8,9)</sup>, lo que finalmente resulta en infecciones recurrentes y crónicas en el ganado.

El incremento en la emergencia de *S. aureus* resistente a antibióticos se debe al uso inadecuado de estos compuestos en el tratamiento de infecciones, así como su utilización como promotores del crecimiento en animales de granja. Lo anterior cobra mayor importancia debido a que la selección de resistencia a una clase de antibiótico puede conducir a resistencia-cruzada a otro tipo<sup>(10)</sup>. Para el caso de la mastitis bovina, estos compuestos son utilizados en los hatos lecheros como inyecciones intramamarias para tratar a la mastitis clínica y subclínica, por lo que el monitoreo de la emergencia de *S. aureus* resistentes es particularmente importante, ya que ello resulta sustancial para la salud pública<sup>(11)</sup>.

Las dificultades para controlar a *S. aureus* han hecho necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. El uso de péptidos antimicrobianos (PAMs) como la nisina y polisacáridos biodegradables como el quitosano, representan opciones atractivas<sup>(12,13)</sup>. La nisina es un péptido de 34 aminoácidos producido por *Lactococcus lactis*, el cual posee actividad antimicrobiana sobre un amplio rango de bacterias Gram positivas<sup>(12)</sup>, además de

que es considerada como segura por la FAO<sup>(14)</sup>. Por su parte, el quitosano (poly  $\beta$ -[1-4]-*N*-acetyl-D-glucosamina) es un biopolímero lineal producido por la desacetilación química de la quitina, la cual se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos e insectos. Adicionalmente, el quitosano es considerado un polímero con propiedades antibacterianas importantes, no es tóxico, es biodegradable y compatible con el ambiente, por lo que es reconocido como seguro por la FAO<sup>(15,16)</sup>.

La Ciénega de Chapala, Michoacán, México, es una de las regiones más importantes del estado en cuanto a producción de leche se refiere (en 2015 produjo 73,641 L, lo que representó el 21 % de la producción estatal), la cual está formada principalmente por hatos de lechería familiar<sup>(17)</sup>. En la actualidad, aunque existe información sobre las principales bacterias asociadas a la mastitis bovina en la región, la información sobre sus perfiles de resistencia a antibióticos es escasa, además de que no existen datos sobre la susceptibilidad de patógenos contagiosos, como *S. aureus*, a nisina, quitosano y al compuesto nisina/quitosano. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar los perfiles de resistencia a antibióticos de aislados de *S. aureus* obtenidos de vacas con mastitis y determinar su susceptibilidad *in vitro* a nisina, quitosano y al compuesto nisina/quitosano.

## ❖ Material y métodos ❖

### ● Detección de mastitis y obtención de muestras de leche ●

La detección de la enfermedad y la obtención de leche se realizaron de julio de 2012 a agosto de 2014, como parte de un programa regional para el estudio de la mastitis bovina en La Ciénega de Chapala, Michoacán, México. Se analizaron 363 animales en ordeña pertenecientes a 30 hatos lecheros de los municipios de Venustiano Carranza y Marcos Castellanos. La mastitis se detectó mediante la Prueba de California (PC), siguiendo las instrucciones del fabricante (Sanfer®, México). La PC se realizó en los cuatro cuartos de cada animal y a partir de los cuartos infectados, se colectó una muestra de leche (30 ml) en tubos (Falcon®) estériles. Dichas muestras fueron mantenidas a 4 °C y transportadas al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, en donde fueron procesadas. Previo a la colecta de las muestras, los cuartos se desinfectaron con algodón que contenía alcohol al 70 %, desechando los dos primeros chorros de leche.

### ● Aislamiento e identificación de *S. aureus* ●

De las muestras de leche colectadas se tomaron alícuotas de 100 µl, las cuales se inocularon en cajas Petri que contenían agar de sal y manitol (BD Bioxon®, México) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Los aislados de *S. aureus* obtenidos fueron adicionalmente identificados mediante pruebas bioquímicas como tinción de Gram, ensayo de catalasa y coagulasa (BD Bioxon®, México) y reducción de telurito y actividad lipolítica en cajas Petri con agar baird parker (Dibico®, México). Posteriormente, los aislados se caracterizaron molecularmente mediante la amplificación de un fragmento del gen *nuc*, el cual codifica para la nucleasa termoestable de *S. aureus*, con los siguientes oligonucleótidos 5'-GACTATTATTGGTTGATCCACCTG-3' y 5'-GCCTTGACGAACTAAAGCTTCG-3'<sup>(18)</sup>. Para las amplificaciones por PCR se utilizó ADN genómico de *S. aureus* obtenido mediante la técnica de Pospiech y Neumann<sup>(19)</sup>. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador C1000 (Bio-Rad, México), bajo una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 25 ciclos a las siguientes temperaturas: desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 54 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 5 min. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 %, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador Gel Doc Universal Hood II (Bio-Rad, México). Como control positivo se utilizó la cepa certificada de *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC (27543), la cual fue aislada de un caso clínico de mastitis bovina y amablemente proporcionada por el Dr. Joel Edmundo López-Meza del CMEB-FMVZ-UMSNH. Los aislados se identificaron con las letras AMC y AVC, correspondientes a Marcos Castellanos y Venustiano Carranza, Michoacán, respectivamente, seguidas de un número arábigo.

### ● Ensayos de resistencia-susceptibilidad a antibióticos ●

Los ensayos de resistencia-susceptibilidad a antibióticos se realizaron mediante el método de difusión en disco sobre cajas Petri con agar Mueller-Hinton (BD Bioxon®, México)<sup>(20)</sup>. Se utilizaron multidiscos para Gram positivos (II) (Bio Rad®, México) con los siguientes antibióticos: ampicilina 10 µg, cefalotina 30 µg, cefotaxima 30 µg, cefepime 30 µg, cefuroxima 30 µg, dicloxacilina 1 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, levofloxacina

5 µg, penicilina 10 U, tetraciclina 30 µg y trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después de ese tiempo, los halos de inhibición se midieron y se interpretaron de acuerdo a los criterios establecidos por el CLSI<sup>(21)</sup>, los aislados se clasificaron como susceptibles, intermedios y resistentes. Se tomó el criterio de multirresistencia de Srinivasan *et al*<sup>(22)</sup>, quienes consideran una cepa multirresistente como aquella que resiste a tres o más grupos distintos de antibióticos.

### ● Preparación de nisina, quitosano y del compuesto nisina/quitosano ●

La nisina proveniente de *L. lactis* subsp. *lactis*, se obtuvo de Sigma-Aldrich®, México y se solubilizó en HCl 0.02 M. Se preparó una solución stock a una concentración de 10 mg/ml, la cual se esterilizó por filtración, con membranas de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore®, USA)<sup>(12,23)</sup>. El quitosano de bajo peso molecular se adquirió de Sigma-Aldrich®, México. Se preparó una solución stock a una concentración de 20 mg/ml, la cual se disolvió en ácido acético (J.T. Baker®, México) al 1 %, durante 12 h. Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a 5.5 con NaOH (Meyer®, México) 1 N. Finalmente, la solución se esterilizó a 120 °C, 20 psi, 15 min<sup>(24)</sup>. El compuesto nisina/quitosano se preparó de la siguiente manera: una vez preparadas y esterilizadas ambas soluciones, la concentración correspondiente de nisina se disolvió en la solución de quitosano a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Dicho compuesto se agitó vigorosamente por 5 min y se utilizó en los ensayos antibacterianos correspondientes.

### ● Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de nisina y quitosano ●

La CMI de la nisina y del quitosano se determinó para todos los aislados bacterianos. Lo anterior se realizó mediante el método de dilución en caldo Mueller-Hinton (BD Bioxon®, México)<sup>(25,26)</sup>, con algunas modificaciones. Tubos con caldo Mueller-Hinton conteniendo un

inóculo de cada uno de los aislados de *S. aureus* ajustado a la turbidez del tubo 0.5 de la escala de McFarland, fueron asépticamente mezclados con nisina hasta alcanzar concentraciones de 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75 y 3.0 mg/ml. El mismo procedimiento se realizó para el quitosano. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37 °C, con agitación constante (160 rpm). La concentración más baja sin crecimiento visible se consideró como la CMI para cada aislado, luego de 24 h de incubación<sup>(20,27)</sup>. Como testigos se utilizaron tubos con caldo Mueller-Hinton que contenían HCl 0.02 M y ácido acético al 1 % (pH 5.5). Los experimentos se realizaron por triplicado.

### ● **Determinación de la CMI del compuesto nisina/quitosano** ●

La CMI del compuesto nisina/quitosano también se determinó para todos los aislados<sup>(20,27)</sup>. Lo anterior se realizó bajo la metodología descrita previamente en Rodríguez-Núñez *et al*<sup>(26)</sup> con las modificaciones descritas en el ensayo anterior. Asimismo, se evaluaron concentraciones inferiores a la CMI de los compuestos por separado (2.0, 2.25, 2.5 y 2.75 mg/ml para la nisina y 1.0, 1.25, 1.5 y 1.75 mg/ml para el quitosano) para observar un posible efecto aditivo del compuesto. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37 °C, con agitación constante (160 rpm). Como control se utilizaron tubos con caldo Mueller-Hinton que contenían HCl 0.02 M y ácido acético al 1 % (pH 5.5). Los experimentos se realizaron por triplicado.

### ● **Determinación del efecto de la nisina, quitosano y del compuesto nisina/quitosano** ●

El efecto bactericida o bacteriostático de la nisina y el quitosano solos y en combinación, se determinó sobre dos bacterias multirresistentes seleccionadas. Lo anterior se realizó de acuerdo a Felicio *et al*<sup>(14)</sup> y Mirdamani *et al*<sup>(28)</sup> con algunas modificaciones. Tubos con caldo Mueller-Hinton conteniendo un inóculo de cada uno de los dos aislados de *S. aureus* ajustado a la turbidez del tubo 0.5 de la escala de McFarland, se mezclaron asépticamente con la CMI de la nisina, quitosano y del compuesto nisina/quitosano. Posteriormente, los tubos se incubaron a 37 °C, con agitación constante (160 rpm). A continuación, el efecto de los

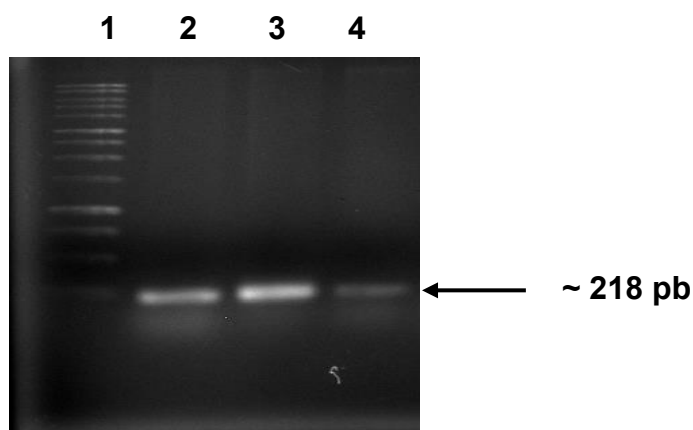
compuestos sobre la viabilidad de *S. aureus* se examinó a las 4, 8, 24, 32, 47, 52 y 72 h, mediante la siembra y conteo de células viables (UFC/ml) incubadas a 37 °C en agar Mueller-Hinton. Las UFC/ml de *S. aureus* se transformaron a logaritmos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

## Resultados

### ● Identificación de aislados de *S. aureus* y evaluación de resistencia-susceptibilidad a antibióticos ●

En un programa regional para el estudio de la mastitis en La Ciénega de Chapala, Michoacán, 363 vacas en ordeña pertenecientes a 30 hatos lecheros fueron analizadas. De acuerdo a la PC, 50.4 % (183) de las vacas mostraron mastitis subclínica. Muestras de leche de estas vacas fueron colectadas y utilizadas para el aislamiento de *S. aureus*, obteniéndose un total de 53 aislados, los cuales se identificaron mediante pruebas microscópicas y bioquímicas (fermentación de manitol, tinción de Gram, catalasa, coagulasa y reducción de telurito y actividad lipolítica). Asimismo, la identidad se confirmó por PCR, mediante la amplificación de un fragmento del gen *nuc*, que codifica para la nucleasa termoestable de *S. aureus* (Figura 1).

**Figura 1:** Amplificaciones representativas del fragmento del gen *nuc* (~ 218 pb)



Carril 1) Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA ladder. Carril 2) Control positivo, *S. aureus* ATCC 27543. Carril 3) Aislado AMC-9. Carril 4) Aislado AMC-23.



Los resultados de resistencia-susceptibilidad mostraron comportamientos variables de los 53 aislados frente a los antibióticos evaluados (Cuadro 1). Los compuestos hacia los cuales mostraron mayores índices de resistencia fueron a penicilina (92.4 %), dicloxacilina (67.9 %) y ampicilina (60.3 %) (beta-lactámicos). Índices de resistencia menores que van de 5.6 a 33.9 % se observaron en los 9 antibióticos restantes. Asimismo, se observó resistencia intermedia hacia cefuroxima (24.5 %), eritromicina (24.5 %) y ampicilina (20.7 %). Además, se obtuvieron altos índices de susceptibilidad hacia levofloxacina (100 %), trimetroprima-sulfametoxazol (94.3 %) y gentamicina (88.6 %). Por otra parte, se observaron 34 patrones de resistencia distintos entre los 53 aislados de *S. aureus*, siendo los de resistencia a ampicilina-dicloxacilina-penicilina los de mayor frecuencia con 7 aislados. Finalmente, 7 (13.2 %) aislados se clasificaron como multirresistentes, ya que toleraron a tres o más antibióticos de grupos diferentes, de los cuales 5 (71.4 %) presentaron resistencia de 7 a 9 antibióticos (Cuadro 2).

**Cuadro 1:** Perfiles de susceptibilidad a antibióticos de los aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina

Antibiótico	Número de aislados (%)		
	Resistentes	Intermedios	Susceptibles
Ampicilina	32 (60.3)	11 (20.7)	10 (18.8)
Cefalotina	18 (33.9)	4 (7.5)	31 (58.4)
Cepéfima	11 (20.7)	6 (11.3)	36 (67.9)
Cofotaxima	11 (20.7)	10 (18.8)	32 (60.3)
Cefuroxima	12 (22.6)	13 (24.5)	28 (52.8)
Dicloxacilina	36 (67.9)	3 (5.6)	14 (26.4)
Eritromicina	16 (30.1)	13 (24.5)	24 (45.2)
Gentamicina	3 (5.6)	3 (5.6)	47 (88.6)
Levofloxacina	0 (0)	0 (0)	53 (100.0)
Penicilina	49 (92.4)	1 (1.8)	3 (5.6)
Tetraciclina	10 (18.8)	6 (26)	37 (69.8)
Trimetroprima-sulfametoxazol	3 (5.6)	0 (0)	50 (94.3)

**Cuadro 2:** Patrones de resistencia a antibióticos de los aislados de *S. aureus*

<b>Antibióticos</b>	<b>No. de aislados</b>
DC	1
AM, PE	5
DC, FEP	1
DC, GM	1
DC, PE	2
FEP, PE	1
PE, TE	4
AM, DC, PE	7
AM, FEP, PE	1
CF, CXM, PE	1
CF, DC, PE	1
DC, CTX, PE	1
AM, CF, DC, PE	2
AM, DC, E, PE	1
AM, DC, PE, TE	2
AM, E, FEP, PE	1
CTX, CXM, FEP, PE	1
CF, DC, E, PE	2
DC, E, PE, SXT	1
CF, DC, E, PE	1
DC, E, GM, PE	1
AM, CF, DC, E, PE	2
AM, CF, CXM, DC, PE	1
AM, CF, CTX, DC, PE	1
AM, CTX, DC, FEP, PE	1
CTX, DC, FEP, PE, TE	1
AM, CTX, CXM, DC, PE	1
AM, CF, CXM, DC, E, PE	1
AM, CF, CXM, DC, E, PE, TE	2
AM, CF, CTX, CXM, DC, FEP, PE	1
AM, CF, CTX, CXM, DC, E, FEP, PE	1
AM, CF, CTX, CXM, E, FEP, PE, SXT	1
AM, CTX, CXM, E, FEP, PE, SXT, TE	1
AM, CF, CTX, CXM, DC, E, FEP, GM, PE	1

AM ampicilina, CF cefalotina, FEP cefepima, CTX cefotaxima, CXM cefuroxima, DC dicloxacilina, E eritromicina, GM gentamicina, LEV levofloxacin, PE penicilina, TE tetraciclina, SXT trimetoprima-sulfametoxazol.

● **Concentración mínima inhibitoria** ●

La nisina mostró efecto antibacteriano en las concentraciones estudiadas, solo en 28 de los 53 aislados de *S. aureus*, así como en la cepa ATCC, en los cuales las CMI variaron entre 1.75 y 3.0 mg/ml. En el resto de los aislados se observó crecimiento aún a la concentración más alta de nisina utilizada en este estudio (3.0 mg/ml) (Cuadro 3). Por otra parte, el quitosano mostró efecto antibacteriano en los 53 aislados y la cepa de referencia de *S. aureus* ATCC. En estos casos las CMI oscilaron entre 1.5 y 2.5 mg/ml. De igual forma, el compuesto nisina/quitosano mostró efecto antibacteriano importante sobre los 53 aislados y la cepa control, cuyas CMI fluctuaron entre 1.5/1.25 y 3.0/2.0 mg/ml, respectivamente. Para este último tratamiento, destacó que las CMI se redujeron en todos los casos en un rango de 0.25 a 0.5 mg/ml, en comparación con las de los compuestos cuando se utilizaron solos.

**Cuadro 3:** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la nisina, quitosano y del compuesto nisina/quitosano sobre los aislados de *S. aureus* (mg/ml)

Aislados de <i>S. aureus</i>	CMI nisina	CMI quitosano	CMI nisina-quitosano
AMC-7	ND	2.0	2.75-1.75
AMC-9	ND	2.0	2.75-1.75
AMC-10	ND	2.0	2.75-1.75
AMC-12	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-13	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-14	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-18	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-21	ND	1.75	2.5-1.25
AMC-22	ND	2.0	2.75-1.5
AMC-23	ND	2.0	2.5-1.25
AMC-25	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-26	ND	2.0	2.75-1.75
AMC-28	ND	2.5	3.0-2.0
AMC-30	ND	2.0	2.5-1.75
AMC-31	ND	1.75	2.5-1.25
AMC-34	ND	2.0	2.5-1.5
AMC-35	ND	2.5	2.5-1.5

AMC-36	3.0	2.0	2.5-1.5
AMC-37	3.0	2.0	2.5-1.5
AMC-38	ND	2.5	2.75-1.75
AMC-43	ND	2.0	2.75-1.75
AMC-44	3.0	1.75	2.5-1.25
AMC-48	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-50	ND	1.75	2.75-1.5
AMC-51	ND	2.0	2.75-1.75
AMC-61	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-73	3.0	2.0	2.5-1.5
AMC-76	ND	2.0	2.5-1.5
AMC-78	3.0	1.75	2.5-1.25
AMC-84	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-85	2.0	2.0	1.5-1.5
AMC-96	3.0	2.0	2.75-1.75
AMC-97	ND	2.5	2.75-1.75
AMC-101	3.0	2.5	2.75-1.75
AMC-107	3.0	2.0	2.5-1.5
AMC-108	ND	2.5	3.0-2.0
AMC-109	ND	2.0	2.5-1.5
AVC-1	3.0	2.5	2.5-1.5
AVC-2	3.0	2.5	2.5-1.5
AVC-3	ND	2.0	2.75-1.75
AVC-5	ND	2.0	2.75-1.75
AVC-6	ND	2.5	2.75-1.75
AVC-7	3.0	2.0	2.5-1.5
AVC-9	3.0	2.0	2.75-1.75
AVC-10	3.0	2.5	2.75-1.75
AVC-11	3.0	2.0	2.5-1.5
AVC-12	3.0	2.0	2.75-1.75
AVC-13	3.0	2.5	2.75-1.75
AVC-14	3.0	2.0	2.75-1.75
AVC-16	3.0	2.5	2.75-1.75
AVC-17	ND	2.0	2.75-1.75
AVC-18	3.0	2.5	2.75-1.75
AVC-24	3.0	2.5	2.75-1.75
ATCC-27543	1.75	1.5	1.5-1.25

ND= No determinada a la mayor concentración evaluada en este trabajo  
(3.0 mg/ml).

Los valores representan la media de tres réplicas.

● **Efecto bactericida** ●

Se seleccionaron dos aislados multirresistentes (AMC-9 y AMC-23) para determinar el efecto antibacteriano de la nisina y el quitosano solos y en mezcla. En lo que se refiere al aislado AMC-9, la adición de la nisina (3.0 mg/ml) no mostró efecto inhibitorio, ya que, como lo muestra el Cuadro 4, el conteo de UFC/ml fue similar al testigo durante las 72 h que duró el experimento. Por su parte, tanto la adición del quitosano (2.0 mg/ml) como del compuesto nisina/quitosano (2.75/1.75 mg/ml), mostró un efecto bactericida, ya que desde las 4 h el conteo de UFC disminuyó a cero en ambos tratamientos, manteniéndose así hasta las 72 h. Con relación al aislado AMC-23, la adición de la nisina (3.0 mg/ml) no mostró efecto inhibitorio, ya que el conteo de UFC/ml también fue similar al testigo, durante el experimento. De la misma manera que en el experimento anterior, tanto la adición del quitosano (2.0 mg/ml), como del compuesto nisina/quitosano (2.5/1.25), mostraron un efecto bactericida, ya que desde las 4 h el conteo de UFC/ml disminuyó a cero en ambos tratamientos, manteniéndose así hasta las 72 h.

**Cuadro 4:** Reducción logarítmica de *S. aureus* por nisina, quitosano y el compuesto nisina/quitosano (Log UFC/ml)

Tiempo h/ tratamiento	<i>S. aureus</i> AMC-9				<i>S. aureus</i> AMC-23		
	N <sup>†</sup>	Q <sup>‡</sup>	N/Q <sup>¶</sup>	Testigo*	N <sup>†</sup>	Q <sup>‡</sup>	N/Q <sup>§</sup>
0	7.45±0.13	7.45±0.13	7.45±0.13	7.90±0.57	8.50±0.46	8.50±0.46	8.50±0.46
4	8.21±0.18	0	0	8.61±0.16	8.80±0.18	0	0
8	8.71±0.06	0	0	8.88±0.12	8.95±0.03	0	0
24	9.18±0.20	0	0	9.24±0.28	9.08±0.02	0	0
32	9.40±0.06	0	0	9.31±0.16	9.43±0.07	0	0
47	9.28±0.07	0	0	9.34±0.08	9.50±0.03	0	0
52	9.46±0.09	0	0	9.30±0.20	9.30±0.03	0	0
72	8.20±0.10	0	0	8.71±0.48	9.28±0.01	0	0

<sup>†</sup>Nisina: 3 mg/ml.

<sup>‡</sup>Quitosano: 2 mg/ml.

<sup>¶</sup>Nisina/quitosano: 2.75/1.75 mg/ml.

<sup>§</sup>Nisina/quitosano: 2.5/1.25 mg/ml.

\*Log UFC/ml promedio de AMC-9 y AMC-23.

Los datos representan el promedio de 3 réplicas ± la desviación estándar.

## Discussion

En este estudio se detectó una alta frecuencia de aislamientos resistentes a los antibióticos del grupo de los beta-lactámicos, principalmente a penicilina, dicloxacilina y ampicilina, los cuales son los antibióticos más utilizados en la región para el control de la mastitis, lo que sugiere que existe el riesgo de selección positiva de cepas resistentes<sup>(29)</sup>. Estos resultados podrían deberse a que no existen programas de monitoreo de la resistencia a antibióticos en la región, lo que permitiría la adopción de medidas para evitar que la resistencia vaya en aumento. De la misma manera, la falta de protocolos de buenas prácticas de higiene durante la ordeña podría contribuir en los resultados observados. Todo lo anterior impacta de manera negativa en la economía del productor y en la salud pública, ya que, además de que la producción de leche disminuye, ésta es de menor calidad, debido a los residuos de antibióticos que contiene<sup>(30)</sup>.

Resultados similares han sido reportados en otras regiones del estado y del país. Se ha observado resistencia a penicilina, ceftazidima, dicloxacilina y ampicilina en aislados de *S. aureus* obtenidos de vacas lecheras mantenidas en traspatio en la región de Morelia, Michoacán<sup>(20)</sup>. Asimismo, existen reportes de resistencia a penicilina y ampicilina de *S. aureus* asociado a mastitis bovina, aislado de granjas lecheras del estado de Guanajuato<sup>(31)</sup>.

Los resultados de la determinación de la CMI de la nisina muestran solo una susceptibilidad del 47.1 % de los aislados de *S. aureus* hacia este péptido antimicrobiano, lo que llama la atención, ya que éste no es utilizado en los hatos de la región como una alternativa terapéutica contra la mastitis bovina. Sin embargo, se ha reportado que *S. aureus* posee un alto potencial para el desarrollo de resistencia natural a la nisina en condiciones *in vitro*. Dicho reporte muestra que las bacterias con baja susceptibilidad presentan un fenotipo llamado colonias variantes pequeñas<sup>(32)</sup>. Estas variantes se caracterizan por tener una tasa de crecimiento lenta, disminuyen su potencial transmembranal y alteran su metabolismo para resistir la acción del péptido<sup>(33)</sup>. Sin embargo, se requiere trabajo adicional para analizar el mecanismo de baja susceptibilidad de aislados de *S. aureus* a la nisina.

En relación al quitosano adicionado solo, éste mostró un efecto antibacteriano importante, ya que inhibió el crecimiento de todos los aislados de *S. aureus* (susceptibilidad del 100 %). Este resultado coincide con estudios que muestran que este compuesto tiene la capacidad de unirse a la superficie celular de bacterias Gram positivas, alterar la interacción entre la pared y la membrana celular y provocar un desbalance osmótico, lo que la lleva a muerte celular. Asimismo, este resultado es importante, ya que muestra el potencial de esta biomolécula, la

cual ha sido ampliamente estudiada como agente antimicrobiano en diferentes formas (biopelículas, soluciones y compósitos)<sup>(34)</sup>.

En este sentido, el compósito nisina/quitosano mostró un efecto antibacteriano importante, ya que inhibió a todos los aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina (100 % de susceptibilidad). Adicionalmente, en este resultado se destaca que el efecto del compósito nisina/quitosano fue superior al de ambos compuestos adicionados solos, ya que las CMI del compósito disminuyeron entre 0.25 y 0.5 mg/ml para ambos compuestos. Este efecto podría deberse a que ambos poseen mecanismos de acción distintos, lo que podría haber mejorado la actividad antibacteriana al ser mezclados<sup>(35,36)</sup>. Asimismo, la encapsulación del péptido podría haber mejorado su estabilidad y su protección de degradación proteolítica, lo que se reflejó en el efecto antimicrobiano<sup>(37)</sup>. Los resultados anteriores son importantes porque muestran el potencial antibacteriano del compósito sobre aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina, mismos que podrían ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad.

Asimismo, en este trabajo se muestra que el efecto del quitosano y del compósito nisina/quitosano sobre los aislados multirresistentes AMC-9 y AMC-23 es bactericida. Lo anterior, confirma la efectividad del quitosano y del compósito observada durante la determinación de las CMI. Se han reportado datos similares sobre el efecto del quitosano, los cuales muestran un efecto bactericida de la molécula sobre bacterias Gram positivas, lo cual depende de su peso molecular, nivel de desacetilación y concentración<sup>(37)</sup>.

## ❖ Conclusiones e implicaciones ❖

Se identificaron aislados de *S. aureus* asociados a mastitis bovina de la región de La Ciénega de Chapala, Michoacán, observándose una alta frecuencia de aislamientos resistentes a los antibióticos del grupo de los beta-lactámicos. Los resultados de este estudio sugieren que el quitosano y la formación del compósito nisina/quitosano podrían tener el potencial tecnológico para ser utilizados en terapias de tratamiento contra la mastitis bovina, ya que inhibieron en un 100 % a los aislados de *S. aureus*; además de que, tanto la nisina como el quitosano son considerados compuestos GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros), por lo que podrían ser utilizados tanto en la formulación de selladores de pezones como de infusiones intramamarias. Sin embargo, es necesario ampliar las investigaciones hacia el posible efecto de los compuestos sobre bacterias Gram negativas asociadas a la enfermedad

y realizar investigaciones *in vivo*, así como estudios de citotoxicidad para considerar a estos compuestos como agentes terapéuticos de la mastitis bovina.

## ❖ Agradecimientos ❖

Este trabajo fue financiado por el Programa de Desarrollo Profesional Docente (PRODEP), Fortalecimiento de Cuerpos Académicos (Proyecto IDCA-11106) y por la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo (UCEMICH).

### ● Literatura citada:

1. Hillerton JE, Berry EA. Treating mastitis in the cow-a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol* 2005;98:1250-1255.
2. Kerro-Dego O, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q* 2002;24:181-198.
3. Díaz-Murillo V, Medina-Estrada I, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. Defensin  $\gamma$ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides* 2016;78:109-118.
4. Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 1996;79:1021-1026.
5. Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LP, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvino L, Sordeli DO. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun* 2007;75:886-891.



6. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011;16:383-407.
7. Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Loir YL, Even S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *J Appl Microbiol* 2013;79:877-885.
8. Holmes MA, Zadoks RN. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011;16:373-382.
9. Sakwinska O, Morisset D, Madec JY, Waldvogel A, Moreillon P, Haenni M. Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhone Valley. *J Appl Microbiol* 2011;77:3428-3432.
10. Piddock LJV. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J Antimicrob Chemother* 1996;38:1-3.
11. Haran KP, Godden SM, Boxrud D, Jawahir S, Bender JB, Sreevatsana S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. *J Clin Microbiol* 2012;50:688-695.
12. Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An *in vitro* study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *Plos One* 2014;9:1-9.
13. Goy RC, Morais STB, Assis OBG. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth. *Rev Bras Farmacog* 2016;26:122-127.
14. Felicio BA, Pinto MS, Oliveira FS, Lempk MW, Pires ACS, Lelis CA. Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. *J Dairy Sci* 2015;98:1-6.
15. Zhang H, Li R, Liu W. Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: A review. *Int J Mol Sci* 2011;12:917-934.
16. López-Mata MA, Ruiz-Cruz S, Silva-Beltrán NP, Ornelas-Paz JJ, Zamudio-Flores PB, BurrueI-Ibarra SE. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules* 2013;18:13735-13753.

17. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: [http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario\\_siapx\\_gobmx/indexmpio.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/indexmpio.jsp). Consultado 26 Ene, 2017.
18. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J Clin Microbiol 1992;30:1654-1660.
19. Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trends Genet 1995;11:217-218.
20. Ochoa-Zarzosa A, Loeza-Lara PD, Torres-Rodríguez F, Loeza-Ángeles H, Mascot-Chiquito N, Sánchez-Baca S, *et al.* Antimicrobial susceptibility and invasive ability of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis from dairy backyard systems. Anton Leeuw J 2008;94:199-206.
21. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. M02-A12, M07-A10, and M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017.
22. Srinivasan BV, Rajamohan G, Pancholi P, Stevenson K, Tadesse D, Patchanee P, *et al.* Genetic relatedness and molecular characterization of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in central Ohio, USA. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009;8:1-21
23. Hammou FB, Skali SN, Idaomar M, Abrini J. The antimicrobial effect of *Origanum compactum* essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* in tryptic soy broth (TSB) and in sheep natural sausage casings during storage at 25 and 7° C. Afr J Biotechnol 2011;10:15998-16005.
24. Liu J, Tiang S, Meng X, Xu Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biol Technol 2007;44:300-306.
25. Zohri M, Alavidjeh MS, Haririan I, Ardestani MS, Ebrahimi SES, Sani HT, *et al.* A comparative study between the antibacterial effect of nisin and nisin-loaded chitosan/alginate nanoparticles on the growth of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk samples. Probiotics Antimicro Prot 2010;2:258-266.
26. Rodríguez-Núñez JR, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Ramírez-Wong B, Torres-Chávez P, Cortez-Rocha MO. Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Int J Food Sci Tech 2012;47:2127-2133.
27. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother 2001;48:5-16.

28. Mirdamani S, Aghaghazvini S, Ehsani MR, Falahpour M, Tafreshi SH. Inhibitory efficacy of *Lactococcus lactis* on food borne pathogens and food spoilage bacteria. J Biotechnol 2008;136:48.
29. Szweda P, Schielmann M, Frankowska A, Kot B, Zalewska M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in Eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polimyxin B. J Med Vet Sci 2014;76:355-362.
30. Bedolla CC, Ponce de León MER. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Redvet 2008;19:1-26.
31. León-Galván MF, Barboza-Corona JE, Lechuga-Arana AA, Valencia-Posadas M, Aguayo DD, Cedillo-Pelaez C, *et al.* Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. Biomed Res Int 2015;ID 615153.
32. Blake KL, Randall ChP, O'Neill AJ. *In vitro* studies indicate a high resistance potential for the lantibiotic nisin in *Staphylococcus aureus* and define a genetic basis for nisin resistance. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:2362-2368.
33. Andersson DI, Hughes, D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. Drug Resist Update 2016;26:43-57.
34. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. Int J Food Microbiol 2010;144:51-63.
35. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol 2005;3:777-788.
36. Piras AM, Maisetta G, Sandreschi S, Gazzarri M, Bartoli C, Grassi L, Esin S, Chiellini F, Batoni G. Chitosan nanoparticles loaded with the antimicrobial peptide temporin B exert a long-term antibacterial activity *in vitro* against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Frontiers Microbiol 2015;6:1-10.
37. Tareq A, Alam M, Raza S, Sarwar T, Fardous Z, Alamgir Z, *et al.* Comparative study of antibacterial activity of chitin and chemically treated chitosan prepared from shrimp (*Macrobrachium Rosenbergii*) shell waste. J Virol Microbiol 2013; ID 369217.