



***PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA Y DETECCIÓN DE LOS
GENES eno Y bap EN AISLAMIENTOS DE Staphylococcus COAGULASA
NEGATIVOS (SCN) PROCEDENTES DE MASTITIS BOVINA***

MAYERLI CATHERINE DIAZ CASTRO
CRISTIAN CAMILO ORTIZ VASCO

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C.
2015**



**PRESENCIA FACTORES DE VIRULENCIA Y DETECCIÓN DE LOS GENES
eno Y bap EN AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus COAGULASA*
NEGATIVOS (SCN) PROCEDENTES DE MASTITIS BOVINA**

MAYERLI CATHERINE DIAZ CASTRO
CRISTIAN CAMILO ORTIZ VASCO

ASESORES:

Asesor Externo

MARTHA CECILIA SUAREZ ALFONSO
Docente Universidad Nacional de Colombia

Asesor Interno

EDITH HERNANDEZ
Docente Investigadora Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
PROYECTO DE GRADO
BOGOTÁ D.C.
2015 – I

*El ideal está en ti;
El obstáculo para su cumplimiento también.*

DEDICATORIA

A nuestras familias, quienes siempre han sido los cimientos sobre los cuales se edificaron y edificarán nuestros sueños y quienes siempre nos brindaron su apoyo, colaboración y comprensión aun cuando ni siquiera nosotros mismos éramos capaces de continuar.

A todos nuestros maestros, no solo los que nos enseñaron en las aulas, sino a todos aquellos que desde su conocimiento y su experiencia construyeron en nosotros profesionales capaces de asumir los retos venideros.

A nuestros amigos, quienes entre risas, alegrías, tristezas y momentos compartidos, sirvieron como apoyo, como escape y como bastón para recorrer el camino que estamos a punto de culminar.

Finalmente, dedicamos este trabajo a todos los que desde el inicio de nuestra carrera nos apoyaron de diversas maneras y que hoy comparten con nosotros la alegría de las metas culminadas.

Dedicado a la vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos, en primer lugar a la doctora Martha Cecilia Suarez, por haber confiado en nuestras capacidades para llevar a cabo este proyecto que hoy hemos culminado; así mismo, a todo el equipo del laboratorio de Microbiología de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional, quienes siempre se mostraron pacientes, amables y colaboradores, que nos enriquecieron y formaron como profesionales y nos brindaron parte de su conocimiento durante todo el tiempo compartido.

Debemos también agradecer a la doctora Edith Hernández, nuestra asesora, quien nos acogió y guió a través del desarrollo de este trabajo brindándonos siempre su conocimiento y apoyo sin el cual no hubiese sido posible alcanzar esta meta.

Por último, debemos agradecer a todas las personas que nos brindaron su apoyo durante el tiempo que desarrollamos este trabajo ya que sin ellos el camino hubiese sido aún más complicado de transitar.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	13
1. INTRODUCCION	15
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos especificos	19
3. ANTECEDENTES	20
4. MARCO REFERENCIAL	27
4.1. Mastitis	27
4.2. Tipos de mastitis	27
4.2.1. Mastitis subclínica	28
4.2.2. Mastitis clínica	28
4.2.2.1. Mastitis aguda	29
4.2.2.2. Mastitis aguda gangrenosa	29
4.2.2.3. Mastitis crónica	29
4.3. Impacto mundial y prevalencia	30
4.4. Impacto de la mastitis sobre la calidad de la leche.	33
4.4.1. Agentes etiológicos y mecanismos de transmisión.	35
4.4.1.1. Patógenos contagiosos	36
4.4.1.2. Patógenos ambientales	37
4.5. <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVA COMO AGENTES CAUSALES DE MASTITIS	38
4.6. FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVA	41
4.6.1. Hemolisinas	41
4.6.2. Proteasas	43
4.6.3. Lipasas	44
4.6.4. Lecitinasas	46
4.6.5. DNAsas	47
4.7. BIOPELICULAS	47
4.7.1. Composición y formación	48
4.7.2. Quorum sensing: mecanismo de regulación	52
4.7.3. Biopelícula de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativa (SCN)	53
4.7.4. Genes <i>eno</i> Y <i>bap</i> asociadas a la formación de biopelícula	55
4.7.4.1. Gen <i>bap</i>	56
4.7.4.2. Familia MSCRAMMs y gen <i>eno</i>	57

5. METODOLOGÍA	60
5.1. Tipo de estudio	60
5.2. Universo	60
5.3. Población	60
5.4. Muestra	60
5.5. Técnicas y procedimientos	60
5.6. Cepas bacterianas	61
5.6.1. Cepas de referencia	62
5.7. CONFIRMACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE DE LAS CEPAS ESTUDIADAS	62
5.7.1. Caracterización microscópica	62
5.7.2. Caracterización bioquímica.	62
5.7.2.1. Prueba de la catalasa	63
5.7.2.2. Prueba de la coagulasa	63
5.7.2.3. Identificación de especie por método automatizado	63
5.7.3. Identificación de enzimas implicadas en la virulencia de los SCN.	64
5.7.3.1. Identificación de hemolisinas	64
5.7.3.2. Identificación de lecitinasas	64
5.7.3.3. Identificación de lipasas	65
5.7.3.4. Identificación de proteasas	65
5.7.3.5. Identificación de DNAsas	65
5.8. DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULA	66
5.8.1. Análisis fenotípico	66
5.8.1.1. Detección de la producción de exopolisacáridos mediante el Agar Rojo Congo (ARC)	66
5.8.1.2. Detección de adherencia por el método de microplaca	66
5.8.2. Análisis genotípico	68
5.8.2.1. Extracción de ADN	68
5.8.2.2. Amplificación de los genes <i>eno</i> y <i>bap</i>	68
6. RESULTADOS	70
6.1. CONFIRMACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE DE LAS CEPAS ESTUDIADAS	70
6.1.1. Caracterización microscópica	70
6.1.2. Caracterización bioquímica	71
6.1.2.1. Prueba de la catalasa	71
6.1.2.2. Prueba de la coagulasa	71
6.1.2.3. Identificación de especie por Sistema automatizado	72
6.2. IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA VIRULENCIA DE LOS SCN.	73
6.2.1. Identificación de hemolisinas	76
6.2.2. Identificación de Lecitinasas	77
6.2.3. Identificación de lipasas	78
6.2.4. Identificación de proteasas	79
6.2.5. Identificación de DNAsas	81
6.2.6. Presencia de factores de virulencia en los aislamientos de SCN por especie	83

6.3. DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULA	85
6.3.1. Análisis fenotípico	85
6.3.1.1. Producción de exopolisacáridos mediante el Agar Rojo Congo (ARC)	85
6.3.1.2. Detección de la adherencia por el método de microplaca	88
6.3.2. Resultados Agar Rojo Congo vs Microplaca	89
6.3.3. Análisis genotípico	92
6.3.3.1. Amplificación gen <i>eno</i>	92
6.3.3.2. Amplificación gen <i>bap</i>	94
6.3.4. Correlación entre los resultados obtenidos en microplaca y la expresión de los genes <i>eno</i> y <i>bap</i>.	95
7. DISCUSIÓN	99
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 Presencia y abundancia relativa de microorganismos en cultivo de leche de vacas positivas a la prueba de california mastitis test (CMT)	33
Figura No. 2 Molécula blanco de acción de las lipasas.....	45
Figura No. 3 Hidrolisis de la lecitina	47
Figura No. 4 Etapas en la formación de biopelículas: 1) Adhesión 2) Adhesión célula-célula 3) Proliferación 4) Maduración 5) Dispersión.....	52
Figura No. 5 Esquema general de los procedimientos empleados en el presente estudio.	61
Figura No. 6 Kit de detección enzima coagulasa Staphaurex Plus. Thermo Scientific™	63
Figura No. 7 Tinción de Gram. Cocos Gram Positivos.....	70
Figura No. 8 Reacción de catalasa positiva y negativa. Peróxido de hidrógeno 3%.....	71
Figura No. 9 Prueba coagulasa. A. Resultado negativo. B. Control positivo.....	72
Figura No. 10 Resultados actividad hemolítica. A. Hemólisis Beta. B. Gamma hemólisis	76
Figura No. 11 Número de aislamientos positivos y negativos a hemolisinas y tipo de hemólisis en los aislamientos positivos.	77
Figura No. 12 Resultados obtenidos en agar yema de huevo A. Cepa productora de lecitinasas. B. Cepa no productora de lecitinasas.....	78
Figura No. 13 Resultados en agar Tween 80. A. y B. Resultado positivo. C. Resultado negativo.....	79
Figura No. 14 Número de aislamientos positivos y negativos a la producción de lipasas.....	79
Figura No. 15 Resultados obtenidos en agar leche al 3%. a) Cepa no productora de proteasas.	80
Figura No. 16 Aislamientos positivos y negativos a la actividad proteolítica por especie.....	81
Figura No. 17 Resultados observados en agar DNAsa con azul de toluidina.	82
Figura No. 18 Número de aislamientos positivos y negativos para la producción de DNAsas. .82	
Figura No. 19 Morfología de las colonias observadas en ARC	86
Figura No. 20 Aislamientos productores y no productores de slime y grados de producción por especie.....	88
Figura No. 21 Resultados obtenidos en microplaca bajo la coloración con cristal violeta al 2%.	90
Figura No. 22 Correlación entre los resultados obtenidos en Agar Rojo Congo y Microplaca...91	
Figura No. 23 Electroforesis en gel de Agarosa 1.5%, resultados positivos 89, 90,91, 93, 94,95, 96 y 97; para gen eno banda de 302bp.	92
Figura No. 24 Aislamientos positivos y negativos al gen eno clasificados por especie.	94
Figura No. 25 Electroforesis en gel de Agarosa 1%, resultado positivo 17, gen bap banda de 971bp.....	95

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efectos de la mastitis subclínica sobre la composición química sobre la leche.....	34
Tabla 2 Especies y subespecies del género <i>Macrococcus</i> y <i>Staphylococcus</i>	38
Tabla 3 Principales adhesinas, mecanismo de unión a la pared y ligando de la matriz extracelular.	58
Tabla 4 Primers empleados para la detección de genes <i>eno</i> y <i>bap</i>	68
Tabla 5 Condiciones para la amplificación del gen <i>eno</i>	69
Tabla 6 Condiciones para la amplificación del gen <i>bap</i>	69
Tabla 7 Frecuencia de especies de SCN estudiadas.....	72
Tabla 8 Resultados de las enzimas implicadas en la virulencia de los SCN por especie.	74
Tabla 9 Expresión de los factores de virulencia estudiados por cada uno de los aislamientos SCN distribuidos por especie.	84
Tabla 10 Grado de producción de slime en ARC por especie.	87
Tabla 11 Resultados obtenidos en microplaca por especie	89
Tabla 12 Comparación de los resultados obtenidos en ARC y microplaca.	90
Tabla 13 Presencia del gen <i>eno</i> dentro de las especies de SCN estudiadas.....	93
Tabla 14 Comparación de los resultados obtenidos en el método de microplaca respecto a la presencia del gen <i>eno</i> y <i>bap</i>	96

RESUMEN

La mastitis bovina es considerada como la principal enfermedad que afecta la producción lechera, esta se define como la inflamación de la glándula mamaria consecuencia de diversos factores, siendo asociada principalmente a microorganismos.

Los *Staphylococcus* coagulasa negativa, SCN, han sido considerados en las últimas décadas, como agentes emergentes de la mastitis bovina dada la poca significancia que se les ha atribuido en los programas implementados para el control; es así, que se ha evidenciado el detrimento de la calidad láctea y/o derivados lácteos, la producción, la salud y el bienestar del animal afectado.

Es por ello, que el presente estudio identificó fenotípicamente la presencia de algunos factores de virulencia que les confieren a estos microorganismos la capacidad de colonizar y persistir en la glándula mamaria bovina; para ello, se emplearon 119 aislamientos caracterizados como SCN en el marco del proyecto: “Caracterización microbiológica y desarrollo de un protocolo de tratamiento y control de mastitis bovina en la sabana de Bogotá”; encontrándose que, un 42% de los aislamientos presentaban actividad hemolítica, 6% fueron positivos a Lecitinasas en agar yema de huevo, un 19.3% de ellas presentaron lipólisis en agar Tween 80, el 53% actividad proteolítica en agar leche y 16.8% del total de aislamientos fue positivo a la prueba de DNAsas en agar DNAsa con azul de toluidina.

Además de ello, se evaluó la expresión de factores asociados a la formación de biopelícula; como la producción de *slime* la cual fue evaluada mediante el Agar Rojo Congo (ARC), cuyos resultados mostraron que el 6% fueron fuertes mientras que el 67% fueron intermedios productores de *slime*; así mismo, se evaluó la adherencia a microplacas, encontrándose que el 88.2% de los aislamientos fueron adherentes en diferentes grados: débil (60.5%), moderado (6.7%) y fuerte (21%).

La presencia de los genes *eno* y *bap*, cuyos productos proteicos se han visto asociados a la formación de biopelícula, fueron evaluados mediante PCR convencional, encontrándose la presencia de *eno* en el 82.4% de las muestras analizadas y *bap* en el 1.7% de las mismas.

PALABRAS CLAVE: Mastitis, factores de virulencia, *Staphylococcus* coagulasa negativa, *slime*, biopelícula.

1. INTRODUCCION

La secreción de leche es el resultado de una serie de factores que inciden directamente en el comportamiento secretor tanto en cantidad como en calidad láctea de un bovino. Existen factores que limitan dicha producción, extrínsecos como: el manejo previo del animal y la dieta que este lleva; y los intrínsecos: genéticos, tamaño corporal, ingestión de alimentos y su metabolismo, fisiología del hígado, tracto digestivo y principalmente la glándula mamaria la cual se ve afectada por infecciones intramamarias (IMI) denominadas como mastitis¹.

La mastitis bovina, fue descrita por primera vez con el nombre de “mamitis” por Mollerau y Nocard² en Francia esta se produce cuando los microorganismos colonizan el canal del pezón y se multiplican en la glándula mamaria produciendo cambios importantes en las características químicas y microbiológicas de la leche³.

Esta es la principal causa de pérdidas en la industria láctea a nivel mundial, tiene un alto impacto económico afectando directamente el precio por litro de leche producida y disminuyendo su calidad en el mercado, los programas de control implementados en los principales países productores, ha reducido la incidencia por patógenos mayores de la mastitis como son el *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, entre otros; pero, se ha visto un incremento en la infección por los denominados patógenos emergentes de la mastitis como son los *Staphylococcus* coagulasa negativa (SCN)⁴.

En 1974 Klastrup y Madsen⁵, describieron por primera vez casos de mastitis cuyo agente causal era *Staphylococcus epidermidis*, desde este momento se cambió la perspectiva que se tenía sobre estos microorganismos, que a la fecha eran considerados como agentes oportunistas incapaces de desarrollar procesos mastíticos en bovinos; a raíz de este estudio, los SCN fueron catalogados como agentes causales de mastitis, en la mayoría de casos procesos subclínicos con signos no visibles, pero con un impacto en la cantidad

y calidad de leche producida por los cuartos infectados. A sí mismo la importancia de las IMI subclínicas radica en que las vacas afectadas por esta patología pueden diseminar los microorganismos afectando a otras vacas dentro del hato.

Las infecciones provocadas por los SCN, son por lo general menos agresivas que las provocadas por otros patógenos como *Staphylococcus aureus*, pero con una característica representativa: su persistencia; los mecanismos por los cuales estas bacterias logran colonizar y mantenerse en el ambiente intramamario no se han descrito totalmente, pero la formación de biopelícula *in vivo* parece ser la respuesta más aceptada⁵.

Las biopelícula, son una forma de resistencia adoptada por las bacterias para tolerar y adaptarse a condiciones que les son adversas en el medio ambiente en el cual se desarrollan; la estructuración y mantenimiento de la comunidad en el interior de la biopelícula conlleva una gran cantidad de procesos bioquímicos, que no han sido descritos totalmente, pero que evidencian la importancia de su presencia para el mantenimiento a través del tiempo de las comunidades bacterianas⁶.

Los distintos géneros bacterianos capaces de formar biopelícula expresan ciertas características distintas dentro del proceso de formación y mantenimiento de la comunidad bacteriana, así como características en común, las cuales fueron descritas por Lemon y col.⁷, estas son: la unión a una matriz extracelular, la producción de moléculas señal tanto extra como intracelulares y la protección de la comunidad frente a presiones ambientales donde se desarrollan⁶.

La habilidad para formar biopelícula de distintas especies bacterianas, aisladas desde gran variedad de superficies y en procesos infecciosos, como factor de virulencia pueden ser evaluadas mediante procedimientos que permiten fenotípicamente observar su desarrollo; como por ejemplo, la producción de *slime* o glucocálix, visualizado en placa mediante la utilización del colorante rojo congo en medio enriquecido con sucrosa u otra fuente de carbono, siendo

este asociado a la adhesión de la bacteria a distintos tipos de superficie; y el método en placas de microtitulación, que permite cuantificar la adhesión de la bacteria en una superficie inerte generalmente vidrio o poliestireno y evidenciarlo por la adición de un colorante y su posterior lectura espectrofotométrica^{7,8}.

El estudio molecular en SCN productores de biopelícula, ha revelado la presencia de una gran variedad de genes codificantes de proteínas y sustancias inductoras; que tienen parte en la estructuración de la biopelícula y en el desarrollo de su comunidad. El descubrimiento de dichos genes y sus productos proteicos, ha permitido el estudio de su prevalencia dentro de las distintas especies de *Staphylococcus* spp., incluyendo coagulasa positiva, como el gen *bap*, inicialmente asociado únicamente a *S. aureus* pero que posteriores estudios identificaron en especies de SCN⁸. Dentro de las especies de SCN, una familia de proteínas denominadas adhesinas han sido descritas e identificadas como las principales moléculas de adhesión a las distintas superficies, y se han agrupado bajo la denominación de MSCRAMMs (componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión a la matriz extracelular), estas moléculas permiten la interacción bacteria-superficie, facilitando la colonización y desarrollo de las comunidades microbianas.

Además de la biopelícula, los SCN expresan proteínas que actúan como factores de virulencia propias del género *Staphylococcus* spp, y que permiten el desarrollo de IMI que comprometen la integridad de la glándula y deterioran la salud animal; es así, que el estudio de dichas proteínas son necesarios para conocer el mecanismo llevado a cabo por la bacteria para colonizar el ambiente mamario y plantear diversas estrategias que permitan contrarrestar los efectos provocados por la acción de estos factores de virulencia.

Por otro lado las infecciones persistentes y crónicas causadas en la glándula por los SCN suelen provocar la eliminación constante de células somáticas en leche, característica que es tomada en cuenta como parámetro de calidad láctea. Países como Estados Unidos y en los integrantes de la Unión

Europea⁹, han establecido que los estándares de buena calidad en la leche cruda corresponde a recuentos de células somáticas inferiores a 200.000 cel/mL, y de muy buena calidad a recuentos inferiores a 100.000 cel/mL, ya que recuentos de células somáticas superiores evidencian procesos de mastitis que afectan la composición de la leche y el pago al proveedor.

Colombia, considerado como un país productor de leche y que ha adoptado el modelo de apertura económica, debe desarrollar programas que eleven la calidad láctea producida en el país, con el fin de competir en el mercado mundial, es por ello, que uno de los pilares debe ser la garantía de la calidad sanitaria tanto de la leche producida como del animal productor, adoptando estrategias integrales que abarquen aquellos microorganismos capaces de repercutir negativamente en la producción y la calidad láctea del país.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar fenotípicamente algunos factores de virulencia de los *Staphylococcus* Coagulasa negativa aislados de muestras de mastitis y detectar los genes *eno* y *bap* implicados en la formación de biopelícula.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evidenciar la presencia de lecitinasas, lipasas, DNAsas, hemolisinas y proteasas como factores de virulencia en *Staphylococcus* coagulasa negativa aislados de muestras de mastitis bovina.
- Identificar a nivel fenotípico la capacidad de formar biopelícula en aislamientos de SCN procedentes de mastitis bovina.
- Determinar la presencia de los genes *bap* y *eno* asociados a la producción de biopelícula como indicador de virulencia en aislamientos de SCN procedentes de muestras de mastitis bovina.

3. ANTECEDENTES

Hacia el año de 1884, en la región de Champagne (Francia), Nocard y Mollereau² estudiaron un brote infeccioso caracterizado por la inflamación de la ubre en los bovinos al que denominaron “mamitis”, identificando una bacteria con forma cocacea como agente causal de la enfermedad; siendo esta la primera descripción e identificación de IMI, posteriores estudios demostraron que la bacteria aislada por Nocard y Mollereau correspondía a *Streptococcus agalactiae* uno de los principales agentes causales de mastitis bovina.

Desde que se llevó a cabo la descripción de *Streptococcus agalactiae* como patógeno causante de mastitis se han descrito diversos microorganismos implicados en la misma; esto ha llevado a la realización de estudios encaminados a determinar las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad en la producción de leche y sus derivados.

Entidades como el Consejo Nacional de Mastitis (del inglés National Mastitis Council (NMC) evalúan el impacto económico que tiene la mastitis como la principal enfermedad en bovinos, y cuyas estadísticas demuestran que solo en los Estados Unidos se alcanzan perdidas de aproximadamente \$1.8 billones de dólares anuales⁹, Huijps y col¹⁰., realizaron bajo petición de la Unión Europea un estudio del costo que implicaba para los productores de leche el tratamiento de cada animal que presentaba mastitis, como resultado de su investigación, encontraron que el rango de costos del tratamiento contra la mastitis dependía de la severidad, tiempo y agente causal de la misma pero que tenía un promedio de \$43/ por animal, oscilando ente \$0 y \$304.

Colombia, según FEDEGAN (2012)¹¹, ocupa el puesto 21 como productor de leche a nivel mundial y el cuarto país en América latina; con un total de 6452 litros de leche anuales, 10% se procesa en finca, 8% se destina a autoconsumo, 45% entra en acopio formal y 37% en sector informal; aun así, el país no cuenta con estudios concluyentes que evalúen las pérdidas económicas causadas por la mastitis en sistemas especializados y/o doble propósito, por ende no hay un establecimiento de políticas claras en cuanto al

manejo y tratamiento de la enfermedad que aun así, presenta una alta prevalencia en el ganado bovino nacional.

Debido a la entrada en vigencia de los tratados de libre comercio (TLC), los productos lácteos, como son la leche líquida, los lactosueros o los derivados lácteos, deben cumplir con normas internacionales de calidad sanitaria e higiénica, la calidad de la leche cruda es establecida mediante el recuento de U.F.C./ml y la cuantificación de gramos para grasas, proteínas y sólidos totales, conjuntamente algunos países evalúan los recuentos de células somáticas (RCS), ya que se ha demostrado que unos recuentos elevados alteran la composición normal debido a que aumentan los componentes sanguíneos en leche y disminuyen sus componentes naturales⁹

La resolución 017 de 2012¹², establece el sistema de pago de leche cruda al proveedor, en el artículo 6, que hace referencia a la calidad sanitaria de la leche, empleando como determinantes sanitarios el registro de vacunación contra fiebre aftosa y brucelosis, Además de establecer en un párrafo que los laboratorios encargados de determinar la calidad de la leche deben implementar técnicas que permitan realizar el RCS como un determinante sanitario y que repercuta en el precio final del producto.

En países como Estados Unidos y en la Unión Europea⁹, los RCS inferiores a 200.000 cel/mL indican buena calidad en la leche, y recuentos inferiores a 100.000 cel/mL de muy buena calidad, este parámetro es tenido en cuenta ya que una elevación en el RCS en leche está directamente relacionado con una inflamación de la ubre producida generalmente por microorganismos; es por esto que si Colombia desea entrar a competir en la industria láctea mundial, no debe aumentar solo su producción sino también su calidad en base a los estándares establecidos, para ello debe iniciar la implementación de programas que reduzcan los índices de mastitis tanto clínica como subclínica teniendo en cuenta los patógenos emergentes como lo son los *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) y las pérdidas ocasionadas por la enfermedad.

Hacia los 70's, se implementaron programas para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche enfocados a disminuir los casos asociados a patógenos contagiosos (Myllys y col., 1998¹³) estos programas han tenido un impacto positivo en la reducción de casos de mastitis contagiosa; sin embargo, se subestimaron las infecciones ocasionadas por patógenos menores como los SCN. Durante mucho tiempo estos microorganismos fueron reportados como bacterias secundarias (Verhoeff y col. en 1981⁴) o flora saprofita del animal ya que inusualmente llegaban a desarrollar procesos de mastitis clínica.

Según el National Mastitis Council, los países que implementan estrictos procedimientos para el control de los patógenos mayores de la mastitis reportan que los SCN son los principales agentes causales de IMI y recuentos elevados de células somáticas en leche. (Pitkala y col., 2004¹⁴; Piepers y col., 2007¹⁵, Simojoki y col. 2012¹⁶).

Estudios de prevalencia como el realizado por Tenhagen y col., 2006¹⁷ en Alemania, evidencia que los SCN se han convertido en los principales patógenos aislados en casos de mastitis, representando el 9.1% dentro de 2614 muestras positivas para IMI, superando así a especies como *S. aureus* y *Corynebacterium bovis*. M. Rall y col. en 2014¹⁸, identificaron 11 especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa causantes de mastitis en Brasil, dentro de los cuales las especies de mayor prevalencia fueron *Staphylococcus chromogenes* (72.2%), *Staphylococcus xylosus* (9.1%) y *Staphylococcus haemolyticus* (6.1%); evidenciando así la gran importancia epidemiológica que han cobrado estos microorganismos como patógenos emergentes de la mastitis bovina.

Así mismo, Alfonso Calderón y Virginia Rodríguez en el año 2008¹⁹, publicaron su estudio sobre la prevalencia de la mastitis bovina en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense, en el cual de 11.416 cuartos estudiados, 3.931 (34.40%) presentaban prueba de california mastitis test (CMT) positiva, a las cuales se les realizaron cultivos

para identificar los microorganismos causales de la IMI, donde *S. aureus* fue el mayormente aislado (29.09%) y los SCN se encontraron en segundo lugar con un 11.75% de prevalencia.

Carlos Trujillo y col en 2010²⁰ analizaron la prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente antioqueño, en el cual examinaron 1160 cuartos, de los cuales 239 cuartos fueron positivos para mastitis subclínica o clínica, y a los cuales se les realizó cultivo para la identificación de los microorganismos causales; se encontró que *Streptococcus dysagalactiae* fue el más prevalente con un 29.5% y en segundo lugar se encontraban los SCN con un 23% de prevalencia.

Nicolás Ramírez y col., en el 2011²¹ estudiaron la prevalencia de los agentes causales de mastitis en el altiplano norte de Antioquia, sus resultados arrojaron que, *Streptococcus agalactiae* fue el microorganismo mayormente aislado en un 34% de las muestras positivas para mastitis y que los *Staphylococcus coagulasa negativa* ocuparon el segundo lugar en prevalencia con un 10.2%.

Como se ve reflejado en los estudios de prevalencia de mastitis en Colombia, la falta de un programa claro y de lineamientos más estrictos para el control de la enfermedad en la población bovina arroja que aun el país presenta altos índices de mastitis por microorganismos contagiosos; pero los programas que se implementen no deben restringirse únicamente a este tipo de agentes causales, ya que, como se ha evidenciado a nivel mundial los agentes menores de la mastitis tienden a aumentar su incidencia cuando se implementan programas estrictamente dirigidos a controlar los patógenos mayores.

Pocos estudios se han encaminado a describir los factores que les confieren a los SCN la capacidad de invadir el tejido mamario bovino y desarrollar procesos inflamatorios; B. Kot y col., en el 2013²² estudiaron los principales factores de virulencia de los *Staphylococcus spp.*, aislados de muestras de leche bovina en la región de Siedlce, Polonia, demostrando fenotípicamente su capacidad de formar biopelícula y producir enzimas como hemolisinas, esterasas, DNAsas

y proteasas, concluyendo que estos factores se correlacionan con la habilidad de desarrollar la patología en la ubre.

Norma Fariña y col., en el año 2013²³, identificaron en cepas de SCN enzimas como lecitinasas, hemolisinas, lipasas y DNAsas, además analizaron la capacidad de estos microorganismos para formar biopelícula, encontrando que todas estas cepas presentaban al menos uno de los factores de virulencia estudiados y que aquellos que poseían más de uno tenían un mayor poder patogénico que las otras cepas.

M. Bochniarz y col., en el año 2012²⁴, publicaron los resultados de su estudio realizado en la región de Lublin, Polonia, en el cual investigaron la producción de hemolisinas y proteasas en cepas de SCN aislados de casos de mastitis clínica y subclínica; sus resultados concluyeron que no todas las cepas aisladas expresaban estas dos características pero aun así desarrollaban procesos de IMI en los bovinos.

Un factor determinante en la persistencia de las IMIs causadas por los SCN es la capacidad de desarrollar biopelícula, tanto en tejido mamario como en los implementos utilizados en la industria lechera; es por ello, que diversos autores como Samah y Hanaa en Egipto 2013²⁵ evaluaron la capacidad de formar biopelícula in vitro en las cepas aisladas desde casos de mastitis subclínica y así correlacionarlo con la persistencia de la infección mamaria; sus resultados demostraron una alta prevalencia de formación de biopelícula correspondiente al 94.1% de las cepas coagulasa negativa aisladas.

Un estudio llevado a cabo en la región Quebec, Canadá, por Tremblay y col. 2013²⁶, a partir de cepas obtenidas de la MPCC (Mastitis Laboratory Network, and Mastitis Pathogen Culture Collection), fueron estudiadas para detectar la formación de biopelícula mediante el método descrito por Christensen y col en 1982²⁷, los resultados obtenidos fueron que un 85.1% de las cepas estudiadas eran biopelícula positivo y se relacionaban con la IMI.

Dada la importancia de la biopelícula como factor de virulencia asociado a infecciones persistentes de la ubre, se han llevado a cabo estudios para

identificar los genes que codifican para MSCRAMMs y proteínas de la familia *bap*, que intervienen en la formación de la biopelícula.

La investigación llevada a cabo por Ángeles Tormo y col., en el año 2005²⁸, evidenció la importancia de la proteína *bap* (Proteína Asociada al Biofilm) y su rol durante la formación de esta agregación bacteriana, mediante la delección de la isla genómica SaPI_{bov2} en cepas de *Staphylococcus epidermidis* formadoras de biopelícula las cuales perdieron esta capacidad.

En el año 2004, Carme Cucarellay col.²⁹, realizó un completo estudio sobre la importancia del gen *bap* como un factor determinante en el desarrollo de infecciones persistentes en la glándula mamaria; evaluó la dependencia del gen *bap* frente al operón *ica* ADBC, concluyendo que la delección de este operón no afectaba la capacidad de los microorganismos para formar biopelícula in vitro.

Otros genes que codifican para las MSCRAMMs se han convertido en una familia muy estudiada por encontrarse implicada en la formación de la biopelícula en todas las especies de *Staphylococcus spp*, así, diversos autores han dirigido sus investigaciones a encontrar los genes más prevalentes en las cepas de SCN aisladas desde la ubre bovina, en humanos, del ambiente y equipos de ordeño.

Un estudio realizado por Yeon-Soo Seo y col. 2008³⁰, a partir de cepas de *Staphylococcus spp*, aisladas desde animales atendidos en el centro de enfermedades infecciosas de Korea y de muestras de aire de distintos sitios públicos, utilizó las cepas productoras de biopelícula para identificar los genes prevalentes; estudió un total de nueve genes pertenecientes a la familia de las MSCRAMMs y el gen *bap*, encontrando que el gen *eno* (laminin binding protein) era el más prevalente tanto en las muestras de aire (83%) como en las muestras procedentes de animales (56%) y concluyendo así, que el gen *eno* está altamente asociado con la formación de biopelícula en *Staphylococcus spp*. aislados de animales y de muestras de aire.

Mostafa Nemati y col. 2009³¹ realizaron un estudio en cepas de *S. aureus* aisladas entre los años 1970-1972 y cepas del año 2006, para estudiar los genes asociados a la formación de biopelícula, encontraron que la totalidad de las cepas aisladas tanto antiguas como recientes eran positivas para el gen *eno*; en la investigación de la habilidad para desarrollar biopelícula de los *Staphylococcus spp.* productores de mastitis bovina realizada por Samah y Hanaa 2013²⁵, se estudió el gen *eno* junto con otros tres genes asociados a la formación de biopelícula, y se encontró que este gen fue el más prevalente tanto en la población de SCN donde se encontró en un 92.6% como en las cepas de *S. aureus* donde se encontró en un 75%.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. Mastitis

Mastitis (del griego mastos: mama y del sufijo itis: inflamación) de acuerdo al NMC se define como la inflamación de uno o más cuartos de la glándula mamaria, considerándose como un síntoma y no una enfermedad, esta se origina como respuesta ante un daño producido por agentes infecciosos y sus toxinas, traumas físicos y/o irritantes químicos, sin embargo, la inflamación causada es especialmente correlacionada con infección intramamaria (IMI) producida por bacterias, virus y hongos, siendo las bacterias el principal agente asociado^{32,33}.

Debido a la alta prevalencia de las IMI el termino mastitis es adoptado por algunos autores para referirse a estas^{9, 28, 32, 34}, es por esto que durante el desarrollo de este trabajo usaremos el termino mastitis haciendo referencia a la infección presentada en bovinos que se caracteriza por la inflamación de la ubre como respuesta a la invasión producida por microorganismos.

4.2. Tipos de mastitis

La mastitis debe ser considerada como una enfermedad del rebaño y no de un solo individuo³⁵, por ende, el personal que se encuentre en contacto permanente con el hato debe tener la capacidad de distinguir los primeros signos que alerten sobre la posible presentación de casos de mastitis en la población animal. Los signos de esta patología se pueden distinguir tanto en la leche como en la ubre; puede cursar sin la aparición de ninguno de ellos (mastitis subclínica) hasta alteraciones como: disminución en la producción de leche, aumento de los leucocitos, presencia de grumos, disminución de la densidad (leche aguada), cambio en el color, en ocasiones presencia de sangre, fiebre en el animal, cuartos mamarios enrojecidos, hinchados e hipertérmicos³⁶.

Existen diversas clasificaciones de mastitis:

4.2.1. Mastitis subclínica

Este tipo de mastitis se caracteriza por la no evidencia visible de síntomas de inflamación en la glándula mamaria ni por la presencia de cambios notorios en las características físicas de la leche⁹; se define como un conteo de células somáticas elevado (mayor a 2000 cel/mL) acompañado de un cultivo bacteriológico positivo para algún microorganismo³⁷.

Los casos de mastitis subclínica, son de difícil y temprano evidenciamiento, por lo que se han convertido en la principal enfermedad que afecta la higiene de la industria láctea a nivel mundial, y dado que esta patología puede pasar desapercibida, conlleva grandes pérdidas económicas no solo por la disminución de la producción sino que también los elevados conteos de células somáticas (CCS) conllevan a la imposición de multas a los productores, Ariznabarreta y col. 2002³⁶. Se dice que por cada caso de mastitis clínica que se diagnostica, se presentan entre 15 a 40 casos de mastitis subclínica³⁷.

4.2.2. Mastitis clínica

El NMC, define mastitis clínica como una inflamación de la ubre, que conlleva signos visibles de afectación de la glándula y alteración visible de la leche.

La Universidad de Dakota (E.E.U.U.), en su guía de programa para el control de la mastitis, define la mastitis clínica como signos visibles de inflamación que pueden incluir:

- Signos leves: Formación de copos o coágulos en la leche y una ligera infección del cuarto afectado.
- Signos graves: Secreciones anormales, cuarto o ubre caliente e inflamada, la vaca puede presentar fiebre, pulso acelerado, pérdida de apetito, deshidratación, depresión, pudiendo ocurrir hasta la muerte.

Según la enciclopedia bovina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (México) ³⁸, la mastitis clínica puede también presentar 3 variantes, mastitis aguda, mastitis aguda gangrenosa y mastitis crónica:

4.2.2.1. Mastitis aguda

Se presenta de manera esporádica y repentina, como resultado de una infección rápida o exacerbación de una mastitis crónica. Generalmente se da posterior al parto y se ha relacionado con heridas en la ubre, inoculación de bacterias vía cánulas o por infecciones sistémicas. Se reconoce por su aparición repentina y los cambios físicos que evidencia la leche como son la aparición de hojuelas o grumos. El volumen de leche disminuye y su apariencia se asemeja al suero sanguíneo. La edematización de la ubre puede variar desde un edema leve hasta una inflamación dura, caliente y dolorosa que puede involucrar a más de un cuarto. El animal puede presentar signos de anorexia, depresión y fiebre, y en toxemias graves puede presentar paraplejia.

4.2.2.2. Mastitis aguda gangrenosa

El cuarto que desarrolla este tipo de mastitis inicialmente se caracteriza por estar inflamado, enrojecido y caliente, posteriormente el fluido de leche cesa y solo se evidencia la presencia de un líquido decolorado en la glándula. A las pocas horas el contenido se vuelve acuoso y sanguinolento, la teta y parte de la glándula presentan una zona azulosa bien definida. Se presenta un exudado sanguinolento, constante que fluye del tejido necrosado y el animal presenta también signos de fiebre, anorexia, deshidratación y depresión. En casos más severos, el animal puede evidenciar signos de toxemia y llegar hasta la muerte. Se presenta por lo general posparto y debe diferenciarse de la fiebre de leche.

4.2.2.3. Mastitis crónica

Para definir un caso de mastitis crónica, se debe conocer la historia clínica del animal, ya que se pueden presentar episodios agudos durante una fase crónica de la mastitis o por el contrario los episodios agudos conllevar al

desarrollo crónico de la patología. A menudo, la mastitis crónica se acompaña del endurecimiento de la glándula y la cisterna, en ocasiones puede haber edema tisular; pero, un síntoma claro de la cronicidad de la mastitis es la presencia continua o intermitente de leche acuosa (residual), con la presencia de hojuelas, grumos, coágulos y fibrinas en los primeros chorros de la leche. El *Streptococcus agalactiae* produce un tejido cicatrizal característico en la cisterna.

4.3. Impacto mundial y prevalencia

La mastitis bovina es la principal enfermedad del ganado lechero y la mayor causal de pérdidas económicas y de sacrificios animales en la industria láctea a nivel mundial³⁷.

Las pérdidas económicas que pueden enfrentar los ganaderos a causa de problemas de mastitis dependen directamente de la presentación que tenga la enfermedad, de la siguiente manera³⁹

- Mastitis Clínica: las pérdidas se originan por las siguientes causas:
 - a) Pérdidas por baja producción del animal enfermo
 - b) Pérdida por la eliminación de la producción durante el tratamiento del animal.
 - c) Secuelas de la enfermedad que perduran en el animal.
 - d) Costos del tratamiento de la enfermedad.

- Mastitis subclínica: Las pérdidas se originan por:
 - a) Reducciones considerables en la producción diaria de leche
 - b) Cambios importantes en las características de la leche.
 - c) Detrimento del valor higiénico de la leche.
 - d) Mucho más importante para la industria lechera dado que las infecciones subclínicas son entre 20 a 50 veces más comunes que las clínicas.

La mastitis es una enfermedad que afecta la industria láctea de todos los países del mundo en mayor o menor proporción. Según el programa de control de la mastitis formulado por la Universidad de Dakota (E.E.U.U.), la industria láctea tiene unas pérdidas anuales de aproximadamente \$1.8 billones de dólares lo que representa un 10% del total de la producción de las granjas lecheras en todo el país, teniendo en cuenta que cuentan con aproximadamente 9 millones de cabezas de ganado dedicadas a la producción de leche⁹.

Numerosos estudios acerca de los principales agentes causales de mastitis aislados en los diferentes países alrededor del mundo se han realizado con el fin de establecer las políticas y medidas a tomar para el control de dicha enfermedad dentro de los hatos.

Durante mucho tiempo los SCN fueron considerados como agentes no patógenos por la dificultad para establecer su relación con procesos clínicos, debido a su amplia distribución en la naturaleza; lo que conllevaba a identificarlos como microorganismos contaminantes y/o oportunistas, sin embargo, en la actualidad se ha evidenciado un incremento en el aislamiento de estos patógenos en casos de mastitis bovina por lo cual hoy en día se consideran patógenos emergentes causantes de esta enfermedad⁴, sin embargo, en la actualidad pocos estudios se enfocan en el análisis de los factores de virulencia que les confiere la capacidad de invadir y persistir en el tejido mamario, además de incrementar moderadamente el recuento de células somáticas.

La mayoría de estudios realizados en diferentes países ha mostrado porcentajes del 40% en morbilidad y una tasa de infección de los cuartos de la ubre de alrededor del 25% en vacas lecheras; en cuanto a la prevalencia de microorganismos los resultados han mostrado un incremento en el aislamiento de *Staphylococcus spp.* Debido al empleo de mecanismos de resistencia como la producción de β -lactamasas y la formación de biopelícula lo cual les confiere resistencia a los antimicrobianos de elección para el tratamiento de mastitis³⁴

El aislamiento de *Staphylococcus* coagulasa negativa asociados a procesos de mastitis ha ido aumentando gradualmente, llegando a ser predominantes en casos de mastitis subclínica; desde 1974 cuando Klastrup y Madsen⁴⁰ describieron por primera vez casos de mastitis asociados a *Staphylococcus epidermidis* se le dio importancia al estudio de estos patógenos; los cuales no eran tenidos en cuenta como microorganismos causantes de mastitis; estudios como el llevado a cabo en Canadá en 1992 demostraron que durante el inicio de la lactancia se presentaba un rango de 5% a 6% de cuartos infectados con SCN y al final de la lactancia este porcentaje incrementaba siendo aislados de un 14% a 17% de cuartos infectados(Davidson y col., 1992⁴¹); en Estonia del 16% del total de cuartos positivos se aisló SCN(Haltia y col., 2006⁴²), este resultado también fue obtenido en Noruega (Østerås y col., 2006⁴³); en Wisconsin el análisis de muestras de leche de mastitis clínica y subclínica obtenidas entre 1994 y 2001 mostraron un incremento del 12.7% a 17.5% de aislamientos de SCN (Makovec y Ruegg, 2003⁴⁴).

Resultados obtenidos en Colombia a partir de investigaciones presentan similitud con los resultados obtenidos en otros países en cuanto a la prevalencia de patógenos asociados a mastitis; un estudio realizado en el 2011 en la microcuenca del altiplano norte de Antioquia²¹ sobre la prevalencia de mastitis mostro como resultado que el microorganismo con un porcentaje mayor de aislamiento fue *Streptococcus agalactiae* (34%) seguido de SCN con un 10.2%; en el 2008 los resultados publicados de datos obtenidos para aislamientos de SCN en sistemas especializados de producción de leche del altiplano cundiboyacense fue 11,75% de los 3931 cuartos positivos a la prueba de California mastitis test¹⁹.

Estudios realizados por Corpoica en el año 2012 (**Figura 1**) en el departamento de Nariño demostraron que los *Staphylococcus* coagulasa negativa presentaron una alta incidencia en los casos de mastitis subclínica encontrándose por encima de los *Staphylococcus* coagulasa positiva y de algunas especies del genero *Streptococcus spp*⁴⁵.

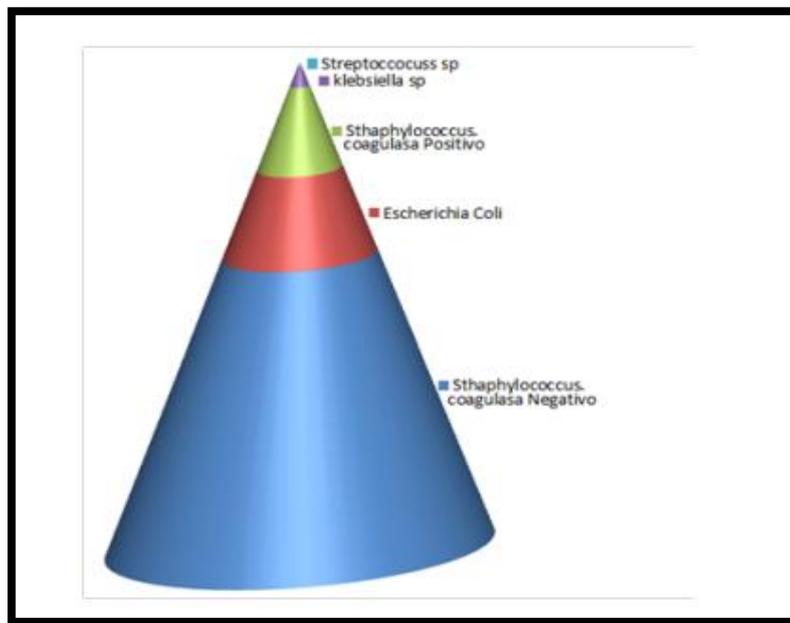


Figura No. 1 Presencia y abundancia relativa de microorganismos en cultivo de leche de vacas positivas a la prueba de california mastitis test (CMT).⁴⁵

4.4. Impacto de la mastitis sobre la calidad de la leche.

En Colombia bajo la resolución 017 de 2012 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural se establecen los pagos al proveedor por litro de leche cruda de acuerdo a la calidad láctea, lo cual hace referencia al grado en el que un conjunto de características inherentes al producto cumple con requisitos sanitarios, higiénicos y composicionales, la calidad es medida por indicadores que permiten evaluar los procesos de obtención, manipulación y conservación de la leche además de indicar el estado de salud del animal¹².

La calidad láctea se puede ver afectada por diversos procesos, sin embargo, la mastitis es una de las principales enfermedades que afecta la calidad sanitaria y composicional de la leche cruda, debido a la inflamación producida como respuesta inmunológica ante la invasión de la ubre bovina por microorganismos, lo que conlleva a un incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos permitiendo el paso de componentes propios de la sangre a la leche, principalmente leucocitos que aumenta el RCS⁴⁶.

RCS altos no solo representan una disminución en la calidad sanitaria sino que estos también han sido asociados con una disminución de la producción láctea. Hagnestam Nielsen y col. 2009⁴⁷, evidenciaron una disminución en la producción de leche del 0,4 a 5% en vacas primíparas y de un 3 a 11% en las vacas multíparas que presentaban mastitis subclínica con recuentos de 200.000 cel/m. Además, aumentos en el RCS debido a infecciones persistentes provoca alteraciones en los constituyentes normales de la leche lo cual disminuye la calidad composicional al producirse disminución en los porcentajes de grasa, lactosa, caseína y sólidos totales; las proteínas totales no se ven afectadas, pero la relación caseína:proteína total si debido a que la caseína es reemplazada por proteínas provenientes del torrente sanguíneo como: albúmina sérica, inmunoglobulinas y transferrina lo que disminuye su rendimiento en la producción de derivados lácteos especialmente la manufactura del queso⁴⁸. **(Tabla 1)**

Otros cambios importantes son las alteraciones en el contenido mineral como el aumento de sodio y cloro, y la reducción del potasio y el calcio lo que ocasiona cambios importantes en la conductividad y el pH. Igualmente La presencia de compuestos liberados por el daño celular y la presencia de enzimas como la lipasa que afecta negativamente el sabor de la leche debido al alto contenido de ácidos grasos libres⁴⁹.

Tabla 1 Efectos de la mastitis subclínica sobre la composición química sobre la leche⁴⁹

Parámetro químico lácteo	Contenido normal	Efecto de la mastitis subclínica
Lactosa	4,6 %	Incrementa en 8 a 22%
Proteína Total	3,3 %	Disminuye en 5 a 10%
Caseína	2,8 %	Disminuye en 6 a 18%
Sólidos totales	12,5 %	Disminuye en 7 a 10%
Grasa láctea	3,5 %	Disminuye en 5 a 12%

4.4.1. Agentes etiológicos y mecanismos de transmisión.

La mastitis es considerada una enfermedad multifactorial, Cano 2006⁵⁰, ya que pueden estar involucrados diversos componentes bien sean ambientales, químicos, físicos y/o microorganismos.

La invasión del tejido mamario por parte de microorganismos representa aproximadamente entre el 80% y el 90% de los casos de mastitis presentándose en un porcentaje menor los casos relacionados a otros factores⁵¹

Se han identificado alrededor de 140 especies microbianas implicadas en la mastitis bovina tanto clínica como subclínica³⁶. Poutrel y Rainard en 1982⁵² clasificaron los microorganismos causantes de mastitis en dos grandes grupos: patógenos mayores y patógenos menores. Dentro de los patógenos mayores se encuentran agrupados los microorganismos que presentan una mayor prevalencia y están asociados a grandes pérdidas económicas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium pyogenes* y coliformes; estos se caracterizan porque producen una respuesta inflamatoria fuerte que aumenta el recuento de células somáticas en la leche. Por otro lado, dentro de los patógenos menores se encuentra el *Corynebacterium bovis* y los *Staphylococcus* coagulasa negativa los cuales aumentan de forma moderada el recuento de células somáticas y generalmente no producen signos clínicos; sin embargo en la actualidad los *Staphylococcus* coagulasa negativa se presentan como microorganismos emergentes ya que se ha evidenciado un incremento significativo en el aislamiento en los laboratorios de microbiología de estos patógenos en muestras de leche generalmente de casos de mastitis subclínica.

Los patógenos también puede ser clasificados tomando como base la asociación epidemiológica, el National Mastitis Council clasifica en dos grandes grupos a estos microorganismos: patógenos contagiosos y patógenos ambientales.⁵³

4.4.1.1. Patógenos contagiosos

La mayor fuente de infección dentro de un hato se debe al no cumplimiento de las buenas prácticas de ganadería que se deberían llevar a cabo durante el proceso de ordeño. La desinfección insuficiente en los equipos destinados para tal fin produce la propagación de microorganismos debido a la contaminación de equipos cuando estos son empleados en animales infectados, de acuerdo a lo anterior, se define como mastitis contagiosa a la infección producida por la transmisión de microorganismos de vaca a vaca.⁵³

Staphylococcus aureus y *Streptococcus agalactiae* son los patógenos contagiosos que se encuentran con mayor prevalencia en los casos de mastitis especialmente clínica, su control se logra mediante la implementación de buenas prácticas ganaderas en las que se incluyan la limpieza de la ubre y los adecuados procesos de desinfección de los pezones durante y después del ordeño^{14,54}.

Staphylococcus aureus también puede ser transmitido por vías como la piel o mucosas aunque esta se presente en menor medida; las infecciones por este microorganismo cursan como subclínicas produciéndose una eliminación periódica del agente, episodios clínicos recurrentes y presentando un aumento en el recuento de células somáticas; en casos crónicos no hay una buena respuesta al tratamiento y en este caso es necesario sacrificar los animales infectados mientras que *Streptococcus agalactiae* causa mastitis aguda induciendo un alto grado de inflamación, pero en ausencia de tratamiento puede cursar como una mastitis clínica o subclínica⁵⁴.

Los *Mycoplasma* de igual manera son patógenos relevantes en la mastitis ya que las infecciones producidas por estos microorganismos cursa con agalactia; debido a que no existe un tratamiento adecuado los animales que se identifiquen como infectados deben ser segregados y/o sacrificados ya que son una fuente potencial de contaminación en el hato por la diseminación rápida del microorganismo⁵⁵.

4.4.1.2. Patógenos ambientales

Se denominan patógenos ambientales a aquellos microorganismos que hacen parte del hábitat de la vaca, y que comúnmente se encuentran en el suelo, material vegetal, estiércol, cama y/o agua contaminada, estos microorganismos no dependen del momento del ordeño para su ingreso al pezón provocando así infecciones en cualquier momento; especialmente durante el periodo seco.

Dentro de los patógenos aislados con mayor frecuencia se encuentran coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus spp.*, diferentes de *Streptococcus agalactiae* y SCN (denominados también como patógenos oportunistas), los cuales causan mastitis aguda generalmente limitada a un cuarto de la vaca con una corta duración, aproximadamente 10 días de acuerdo al manejo de la infección⁵³.

Las mastitis producidas por estreptococos y enterococos que habitan en las vacas y su ambiente como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, entre otros, varían en cuanto sus manifestaciones produciendo cuadros clínicos hasta subclínicos y su duración es de aproximadamente 30 días, un poco más que los coliformes.

Un lugar limpio y seco es indispensable para disminuir los casos de mastitis asociados a patógenos ambientales, la eliminación de estos microorganismos no es posible pero mantener el hábitat de la vaca en excelentes condiciones higiénicas reduce el número de patógenos a los que el animal se encuentra expuesto⁵⁴.

La mastitis producida por microorganismos ambientales ha sido considerada el mayor problema en los hatos que implementan programas enfocados al control de los patógenos contagiosos, siendo evidente el incremento de las infecciones producidas por patógenos ambientales debido al poco manejo higiénico que se da en el hábitat del animal.(Calvinho y col., 1998⁵⁶, Phuektes y col., 2001⁵⁷).

4.5. *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVA COMO AGENTES CAUSALES DE MASTITIS

Los *Staphylococcus* fueron descritos inicialmente por Ogston en 1883⁵⁸, quien reportó la presencia de “Micrococcus” asociados con inflamación y supuración en heridas quirúrgicas, además de clasificar los géneros de acuerdo a la agrupación de los microorganismos como *Staphylococcus spp.* a aquellos que se agrupan en racimos y como *Streptococcus spp.* a los que se agrupan en cadenas. Posteriormente se determinó que el género *Micrococcus* y *Staphylococcus* eran divergentes de acuerdo a estudios genéticos reconociéndose desde entonces como géneros distintos. Rosembach 1884² divide el género en dos especies *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus* y es hasta 1970 que se reconoce tres especies del género dentro de los que se encontraban *Staphylococcus* coagulasa positiva: *Staphylococcus aureus* y coagulasa negativa: *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

En la actualidad de acuerdo a las características genótípicas y al análisis bioquímico se reconocen 36 especies y 18 subespecies dentro del género *Staphylococcus spp*(**Tabla 2**)

Tabla 2 Especies y subespecies del género *Macrococcus* y *Staphylococcus*⁵⁹

Los	Species name	References*		
	<i>Macrococcus bovicus</i>	Kloos et al., 1998a	<i>S. hyicus</i>	Devriese et al., 1978
	<i>M. carousselicus</i>	Kloos et al., 1998a	<i>S. intermedius</i>	Hájek, 1976a
	<i>M. caseolyticus</i>	Schleifer et al., 1982	<i>S. kloosii</i>	Schleifer et al., 1984
	<i>M. equiperficus</i> [†]	Kloos et al., 1998a	<i>S. lugdunensis</i>	Freney et al., 1988
	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Kloos et al., 1998a	<i>S. lutrae</i>	Foster et al., 1997
	<i>S. auricularis</i>	Schleifer et al., 1984	<i>S. muscae</i>	Hájek et al., 1992
	<i>S. aureus</i> [†]	Kloos and Schleifer, 1983a	<i>S. pasteurii</i>	Chesneau et al., 1993
	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	Rosenbach, 1884	<i>S. piscifermentans</i>	Tanasupawat et al., 1992
	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	De la Fuente et al., 1985	<i>S. pulverei</i> (= <i>S. vitulinus</i>)	Petras, 1998
	<i>S. capitis</i>	De la Fuente et al., 1985		Zakrzewska-Czerwinska et al., 1995
	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Kloos and Schleifer, 1975b	<i>S. saccharolyticus</i>	Kilpper-Bälz and Schleifer, 1981
	<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Bannerman and Kloos, 1991	<i>S. saprophyticus</i>	Schleifer and Kloos, 1975c
	<i>S. caprae</i>	Bannerman and Kloos, 1991	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>	Hájek et al., 1996
	<i>S. carnosus</i>	Devriese et al., 1983	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	Hájek et al., 1996
	<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	Schleifer and Fischer, 1982	<i>S. schleiferi</i>	Freney et al., 1988
	<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	Probst et al., 1998	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Igimi et al., 1990
	<i>S. chromogenes</i>	Probst et al., 1998	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Igimi et al., 1990
	<i>S. cohnii</i>	Devriese et al., 1978	<i>S. sciuri</i>	Kloos et al., 1976a
	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Schleifer and Kloos, 1975c	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	Kloos et al., 1997
	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Kloos and Wolfshohl, 1983b	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>	Kloos et al., 1997
	<i>S. condimentii</i>	Kloos and Wolfshohl, 1983b	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>	Kloos et al., 1997
	<i>S. delphini</i>	Probst et al., 1998	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	Kloos et al., 1997
	<i>S. epidermidis</i>	Varaldo et al., 1988	<i>S. simulans</i>	Kloos and Schleifer, 1975b
	<i>S. equorum</i>	Winslow and Winslow, 1908	<i>S. succinus</i>	Lambert et al., 1998
	<i>S. felis</i>	Schleifer et al., 1984	<i>S. vitulinus</i>	Webster et al., 1994
	<i>S. fleuretii</i>	Igimi et al., 1989	<i>S. warneri</i>	Kloos and Schleifer, 1975b
	<i>S. gallinarum</i>	Vernozy-Rozand et al., 2000	<i>S. xylosus</i>	Schleifer and Kloos, 1975c
	<i>S. haemolyticus</i>	Devriese et al., 1983		
	<i>S. hominis</i>	Schleifer and Kloos, 1975c		
	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Kloos and Schleifer, 1975b		
	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Kloos et al., 1998b		
	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	Kloos et al., 1998b		

Abbreviation: †, type species.

*First description.

miembros del genero *Staphylococcus* son cocos Gram positivos de 0.5-1.5 μm de diámetro; se encuentran agrupados en pares, tétradas o cadenas cortas pero de forma predominante agrupados en racimos; son catalasa positivos, anaerobios facultativos, aunque crecen mejor en condiciones aerobias, sensibles a lisofatina (algunos más que otros), no móviles, no forman esporas y algunos pueden tener capsula, además, algunos *Staphylococcus* son oxidasa negativa a excepción de algunas especies como: *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus lentus* y *Staphylococcus vitulinus*. Su genoma puede tener un tamaño de 2000-3000 kb con un contenido de G+C de 30-39 mol%⁶⁰.

Desde el punto de vista nutricional no requieren medios suplementados para su crecimiento, además de ser muy resistentes a las condiciones ambientales, su muerte se da a temperaturas mayores a 60°C y macroscópicamente en agares no selectivos se caracterizan por presentar colonias de 1-3 mm de diámetro, lisas, convexas, generalmente pigmentadas desde un color crema a un color amarillo, algunos como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus haemolyticus* pueden presentar hemólisis en agar sangre de cordero 5%.

La coagulasa es una enzima que permite convertir el fibrinógeno en fibrina, la detección de esta enzima permite la caracterización de dos grupos dentro del género *Staphylococcus*, de acuerdo a si poseen está o no, diferenciando *Staphylococcus* coagulasa positiva como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa, compuesto por un gran número de especies, encontrándose principalmente *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

Los SCN en casos de mastitis son tratados como un grupo homogéneo debido a que no hay un tratamiento específico para las diferentes especies, sin embargo, la caracterización precisa de estos es indispensable para conocer el potencial patológico, evaluar la importancia clínica y proveer información epidemiológica que permita desarrollar programas de control eficientes.

Tiempo atrás, los SCN eran considerados como causantes de IMI en menor grado que los patógenos mayores de la mastitis, por ende, no se prestaba

mucha atención a su epidemiología ni a la infección que podrían causar en la glándula, con el incremento de los programas de control de mastitis en los países productores de leche, se disminuyó la incidencia de patógenos como *S. aureus*, coliformes y *Streptococcus*, pero en la actualidad se ha evidenciado que los SCN causan enfermedades persistentes y crónicas que conllevan recuentos elevados de células somáticas provocando un incumplimiento a los estándares de calidad lácteos establecidos en países como USA y la Unión Europea⁶¹.

Satu Pyorala y Suvi Taponen en el 2008⁵, definieron a los SCN como los principales agentes de mastitis subclínica e IMI persistentes que provocan recuentos altos de células somáticas y baja calidad de la leche; su estudio epidemiológico concluyó que, los SCN son los agentes mayormente aislados de casos de mastitis en la mayoría de países con programas de control de patógenos mayores, provocan infecciones persistentes, bajos niveles de producción de leche y determinaron que *S. simulans* y *S. chromogenes* son probablemente las especies más aisladas de los casos de mastitis; por estas características, ellos definieron a los SCN como los agentes emergentes causales de mastitis que provocan el no cumplimiento de los estándares de calidad láctea de cada país.

Generalmente, las infecciones provocadas por SCN son de tipo subclínico, aunque se han reportado casos de signos graves locales (en la glándula) así como diseminación sistémica; aunque, un estudio realizado por Taponen⁵ en 2006, reveló que la mitad de las infecciones por SCN intramamarias causan signos clínicos más leves que las provocadas por patógenos mayores. En general, los casos de mastitis por SCN conllevan a recuentos de células somáticas <500.000, pero se han encontrado casos en los que dichos recuentos alcanzan hasta las 600.000 células, conllevando a que por ejemplo no se pueda considerar una leche de buena calidad en la unión europea ya que el límite máximo en estos países es un recuento menor a 400.000 células; además, se ha reportado que conteos superiores a 100.000 células conllevan

ya a una menor producción de leche en comparación con los cuartos no infectados.

4.6. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVA

En las infecciones producidas por *Staphylococcus spp.* Se reconocen generalmente 3 grupos de factores virulencia.⁶²

- a) secreción de proteínas tales como superantígenos, citotoxinas y enzimas que degradan tejido entre otras.
- b) Proteínas de unión a la superficie celular siendo ampliamente reconocidas las MSCRAMM.
- c) Componentes de la pared celular como el polisacárido capsular y los ácidos lipoteicóicos.

4.6.1. Hemolisinas

Las hemolisinas son una serie de toxinas proteicas y lipídicas que provocan lisis de eritrocitos dañando directamente la membrana celular. Esta propiedad lítica de las hemolisinas son utilizadas por los microorganismo que las producen como una fuente para adquirir nutrientes de los eritrocitos, pero se ha demostrado que la lisis de eritrocitos *in vivo* no es la principal función de estas proteínas, dado que las hemolisinas pueden afectar otro tipo de células, son utilizadas más como mecanismo de resistencia a la respuesta inmune del huésped⁶³.

4.6.1.1. **Hemolisina α :** Tienen un amplio rango de acción, es decir, afectan una gran variedad de células incluyendo los PMN humanos y los eritrocitos de una gran variedad de especies animales; la toxina es de origen proteico con un peso de 33 KDa y es segregada por los microorganismos en medio de cultivo en la fase logarítmica tardía⁶³. La proteína es segregada en monómeros que se unen en la membrana de la célula diana, donde forman heptámeros cilíndricos con un poro central, la presencia de estos poros afecta el equilibrio hidrostático de la célula ya que permite la salida de iones potasio y

la entrada de iones sodio y calcio, produciendo una tumefacción osmótica y una posterior lisis de los eritrocitos. Se ha demostrado que tiene efecto necrótico cuando es inyectada subdermicamente y efecto letal cuando es intravenosa en modelos animales; además, se ha visto relacionada con efectos neurológicos al provocar la desmielinización de las vainas de mielina en las neuronas⁶⁴.

4.6.1.2. **Hemolisina β** : En la membrana celular de algunos tipos celulares se encuentra un complejo formado por esfingomielina-lipocarbohidrato, es allí, donde actúa la hemolisina β por tanto se trata de esfingomielinasa activa. Esta toxina es de carácter proteico y tiene un peso aproximado de 35 KDa, es segregada al medio de cultivo al finalizar la etapa de crecimiento logarítmico. Para su actividad, la β -hemolisina necesita de iones Magnesio además, se ha demostrado que la severidad de la hemólisis depende de la cantidad de esfingomielina presente en la membrana de la célula, por ende, existe diferencia en la hemólisis de los eritrocitos de distintas especies animales. Se ha demostrado que una exposición previa de los eritrocitos a bajas temperaturas potencian la acción de la toxina, lo que puede deberse a que a temperaturas más bajas que la corporal, hay una ruptura de las fuerzas cohesivas dentro de la membrana por la acción tóxica⁶⁴.

4.6.1.3. **Hemolisina δ** : Es de carácter proteico con un peso de 3 KDa y es segregada hacia el final de la fase de crecimiento exponencial. Es encontrada en el 50-70% de los SCN, su mecanismo de acción se basa en la tensoactividad provocando canales en la membrana y posterior lisis de la célula⁶⁴.

4.6.1.4. **Hemolisina γ** : Se utiliza esta denominación para describir el conjunto de tres proteínas cuyos pesos varían entre 32-35KDa, estas tres proteínas interactúan con una de las dos proteínas de la leucocidina de Pantón-Valentain, para formar seis posibles combinaciones todas activas biológicamente. Ninguna de estas cinco proteínas tiene actividad hemolítica,

pero cuando se combinan, la proteína resultante puede tener una actividad hemolítica variable, en cambio todas estas combinaciones muestran una actividad leucocítica eficiente y actúan directamente en la membrana celular de los PMN humanos causando degranulación y lisis por la apertura de poros transmembranales⁶⁴.

4.6.2. Proteasas

Las proteasas o más recientemente determinadas como peptidasas, son un grupo de enzimas que rompen los enlaces peptídicos presentes en las proteínas, utilizando moléculas de agua, por lo tanto se denominan también hidrolasas. Se encuentran en todos los organismos vivos y son utilizadas para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas. Barret en 1998⁶⁵ clasifica las peptidasas en familias y clanes en base a su estructura primaria y terciaria, la familia está formada por peptidasas que demuestran una relación significativa entre las secuencias de aminoácidos de la parte de la molécula que es responsable de la actividad proteolítica, mientras que un *clan* es un grupo de familias que tienen una proteína ancestral en común pero que han evolucionado y transformado su estructura primaria.

Barret⁶⁵ también las agrupa en tipos catalíticos de acuerdo a los grupos responsables de la catálisis, en total son cinco: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas; la base de datos *MEROPS the peptidase database*, tomó como referencia a Barret⁶⁵ y las clasificó en: serin peptidasas, treonin peptidasas, cistein peptidasas, aspartin peptidasas, metalo peptidasas, glutamil peptidasas, y mixtas con un tipo catalítico (serin, cistidin, treonin)⁶³.

La actividad proteolítica en los SCN ha sido ampliamente estudiada como factor de virulencia en las cepas causantes de mastitis clínica y subclínica, por ejemplo Kot²² realizó un estudio en Polonia en el año 2013, donde encontró que un 48% de las cepas utilizadas en su estudio demostraron actividad proteolítica, y este autor asocia la actividad de estas enzimas con la necesidad

de los microorganismos de capturar y degradar proteínas en el ambiente (*in vitro*) o dentro de las células del huésped (*in vivo*).

4.6.3. Lipasas

Son un grupo de enzimas proteicas, que catalizan la hidrólisis de los enlaces de ésteres formados entre un ácido y un alcohol como se muestra en la figura 2; las enzimas lipolíticas bacterianas han adquirido gran importancia y aplicación dentro de la industria, ya que poseen un rango de acción amplio, tanto en sustratos, participan en reacciones de síntesis, hidrólisis o de intercambio de grupo, muchas con alta quimio, regio o estereoespecificidad, y no producen subproductos⁶⁶.

Estas enzimas son estables en un amplio rango de temperatura, pH y solventes orgánicos, obteniendo mejor resultados en pH básico o neutro; las lipasas, son específicas de los acilgliceroles unidos a ácidos grasos de cadena larga (>10 átomos de carbono), usando la trioleína como sustrato de referencia y las estererasas actúan sobre acilgliceroles de cadena corta y otros esterres simples usando como sustrato de referencia la tributirina⁶⁶.

La acción de estas lipasas es romper los enlaces éster de los acilgliceridos mediante la adición de una molécula de agua y formando así ácidos grasos libres y glicerol, aunque no se conoce bien su función biológica se ha descrito que pueden funcionar como una forma para adquirir fuentes de carbono, para el reciclaje de membranas celulares y como factores de virulencia ante determinadas patologías⁶⁷.

Las lipasas presentan la estructura típica de las α/β hidrolasas, consistente en una estructura central formada por 8 láminas β interconectadas por hélices α . El mecanismo de acción de estas enzimas está basado en sistema de intercambio de cargas en 4 etapas: 1. Unión del sustrato específico, 2. Ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo de la serina catalítica sobre el enlace éster del lípido, produciendo ruptura del enlace y formación de un intermediario entre el ácido graso y la serina nucleofílica, 3. Liberación de alcohol y 4.

Segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua que rompe en enlace éster del intermediario transitorio liberando el ácido graso y la regeneración del centro catalítico⁶⁷.

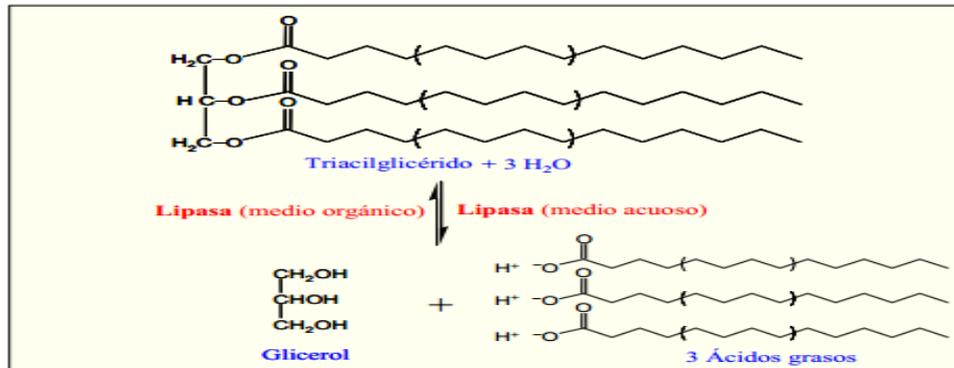


Figura No. 2 Molécula blanco de acción de las lipasas⁶⁸

Las lipasas bacterianas como factor de virulencia son importantes en ciertas patologías, como por ejemplo, *Propionibacterium acnes* produce una lipasa extracelular que provoca la hidrólisis de los triacilglicéridos del sebo liberando el glicerol que utiliza como fuente de carbono, además los ácidos grasos libres, provocan inflamación, favorece la colonización y la formación de biopelícula. Otras lipasas como las producidas por *Helicobacter pylori*⁶⁹, aunque poco estudiada ha demostrado tener un efecto sobre la degradación de los lípidos que forman parte de la mucosa protectora gástrica, así como también están implicadas en la degradación de la membrana apical de las células epiteliales, hemólisis, generación de lisofosfolípidos y otros fosfolípidos proinflamatorios y citotóxicos.

La clasificación de las lipasas más aceptadas fue la propuesta por Arpigny y Jaeger en 1999⁶⁹, donde se clasifican por su secuencia de aminoácidos y sus propiedades biológicas⁶⁷. Las lipasas producidas por las especies del género *Staphylococcus* están agrupadas dentro de la familia I (lipasas verdaderas) subfamilia 6, las cuales presentan un peso molecular de unos 75KDa, y que se convierte en factor de virulencia en algunas patologías debido a su capacidad de colonización de zonas ricas en lípidos como la piel, que favorece su desarrollo y multiplicación dentro del huésped⁶⁷

3.6.4. Lecitinasas

Las lecitinas son fosfoglicéridos o fosfatidos, es decir, compuestos que contienen ácido graso, ácido fosfórico, glicerol y colina; tienen dos moléculas de ácidos grasos de cadena larga unidas en su tercer carbono al éster de colina del ácido fosfórico, el cual se encuentra unido por una unión éster a una base nitrogenada, la colina (alcohol aminado)⁷⁰.

Se han descrito cuatro tipos de lecitinasas, siendo la lecitinasa C, la producida por las bacterias, pertenece a la familia de las enzimas fosfodiéster hidrolasas, y cuyo resultado de acción sobre la lecitina es la producción de fosforilcolina y diglicérido, además de hidrolizar la lecitina, también tiene la habilidad de hidrolizar la esfingomiélin, fosfatidiletanolamina, cefalina y tromboplastina.

La lecitina es un grupo de lípidos componente normal de las células vegetales y animales y presente en la mayoría de los tejidos del organismo, los *Staphylococcus spp.* al igual que muchas bacterias, utilizan este tipo de enzimas para la degradación de tejidos y macromoléculas facilitando la liberación o captación de nutrientes para su crecimiento y provocando así en parte los síntomas de algunas patologías¹⁰¹ (**Figura 3**).

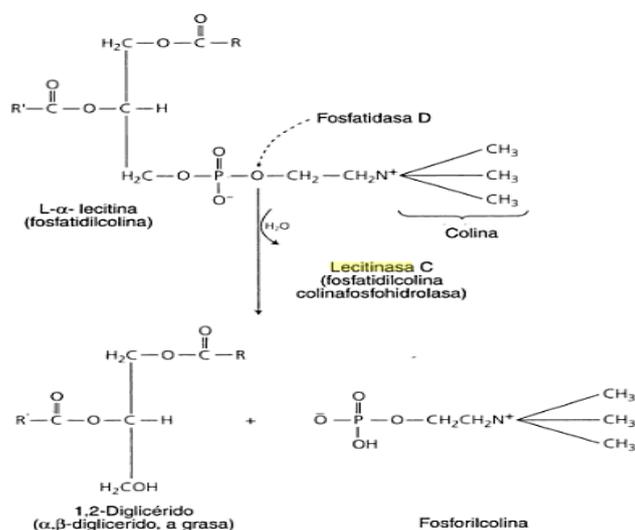


Figura No. 3 Hidrolisis de la lecitina⁷⁰

3.6.5. DNAsas

Las DNAsas son endonucleasas que hidrolizan y rompen los enlaces fosfodiéster del ADN, generando unidades pequeñas; estas endonucleasas, actúan como mecanismo de defensa dentro de los microorganismos, ya que permiten reconocer y degradar el material genético extraño (no metilado); necesita oxígeno para su síntesis y se inhibe en condiciones anaeróbicas, su pH óptimo es de 8.6, es altamente termoestable capaz de actuar a temperaturas de hasta 130°C⁷¹.

Algunos microorganismos especialmente *Staphylococcus aureus* pueden producir DNAsas extracelulares utilizándolo como factor de virulencia; aunque no se ha descrito del todo el mecanismo de acción de esta exotoxina se cree que inhibe junto con otras toxinas la fagocitosis impidiendo la acción del fagolisosoma y la posterior destrucción de la célula fagocitaria⁶⁴.

4.7. BIOPELICULAS

Las bacterias que se desarrollan en los diversos ecosistemas naturales adoptan dos formas de vida: una en estado de vida libre y aislado en el medio ambiente (estado planctónico) y una vida en comunidad donde la población se encuentra fija a un soporte (estado sésil)⁶. El estado planctónico se considera un estado de proliferación bacteriana que le permite a la comunidad extenderse y colonizar nuevos territorios, pero se considera que solo el 1% de las bacterias se encuentran en este estado (Ramadan HH y col⁷²), en contraste, el estado sésil favorece la persistencia de la comunidad bacteriana en determinados ambientes y se postula que el 99% de las bacterias encontradas en ecosistemas naturales se desarrollan en estas comunidades⁷².

La adherencia bacteriana a superficies se ha descrito desde varias décadas atrás, se ha definido como un mecanismo de supervivencia y persistencia bacteriana en un nicho o ecosistema, vivo o inerte; una bacteria en estado

planctónico desarrolla una comunidad sésil después de adherirse a un sustrato, inicialmente dicha bacteria elaborara una serie de señales químicas que permitirán la diferenciación y formación de la estructura cubierta por una capa polisacárida; dicha comunidad se denomina biopelícula (*biofilm*).^{6, 72,102}

La definición más aceptada de biopelícula fue la propuesta en 2002 por Rodney Donlan⁷³, “unabiopelícula es una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interface, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, que ellas han producido y exhiben un fenotipo alterado con relación a la tasa de crecimiento y transcripción génica”.

La formación de biopelícula proporcionan ventajas a los organismos que se desarrollan en su interior, ya que estos les proporcionan protección frente a las condiciones y fluctuaciones medioambientales, como son la humedad, temperatura y pH⁷², además, estudios han demostrado que las bacterias que crecen dentro de las biopelícula conforman estructuras complejas como los canales de nutrientes que permiten su circulación al interior de la comunidad⁷

4.7.1. Composición y formación

Utilizando microscopia electrónica, Donlan⁷³ describió que la composición de las biopelícula varía dependiendo de la superficie y el medio en el cual se desarrolla, es así que, las biopelícula desarrollados en sistemas de agua no solo contenían materia celular y sus productos, sino que además contenían una gran cantidad de residuos de corrosión, limo u otras sustancias propias del ambiente en el que se desarrollan⁶⁰. El crecimiento de los individuos dentro de estas comunidades tiene un alto impacto en su expresión génica, es así, que individuos situados en distintos lugares de la biopelícula expresan distintas características fenotípicas y genotípicas, y aunque existen una gran cantidad de ambientes en los cuales se desarrollan estas comunidades, las características de las biopelícula son extraordinariamente similares⁶.

Lemon y col., en 2008⁶ dedujo, a partir de sus estudios, que las biopelícula bacterianas comparten ciertas características en común:

- a) Las células se mantienen unidas por una matriz extracelular principalmente compuesta de exopolisacáridos (EPS), proteínas y ácidos nucleicos.
- b) El desarrollo de las biopelícula ocurre en respuesta a señales extracelulares tanto ambientales como auto-producidas.
- c) Las biopelícula protegen a las bacterias de una diversa gama de presiones medioambientales como los antibióticos, los depredadores y el sistema inmunológico.

Las biopelícula están conformadas por aproximadamente del 15-20% de células bacterianas sésiles que no se multiplican dentro de la comunidad, embebidas en la matriz polimérica extracelular denominada glucocálix, que contiene cerca de un 97% de agua, utilizada para el continuo transporte de sustancias entre bacterias, así como productos de degradación como resultados del metabolismo o muerte de los microorganismos agrupados. Dicha matriz, esta a su vez conformada por EPS, los cuales son sus componentes fundamentales y son producidos por los microorganismos⁷².

Los EPS contienen del 50-90% del carbón orgánico de la biopelícula y se convierten en su principal fuente, los principales componentes de los EPS son polisacáridos con diferentes propiedades químicas y físicas, así como también, pueden tratarse de moléculas neutras o polianiónicas, característica que es conferida a las moléculas que pueden adherirse al polisacárido (iones metálicos, cationes divalentes, proteínas, DNA, lípidos); Leriche y col.⁷², descubrieron que diferentes microorganismos producían diferentes cantidades de EPS y que estos aumentaban su concentración a medida que la biopelícula era más vieja.

La producción de exopolisacáridos se ve afectada por los niveles de algunos nutrientes en el medio en el cual se desarrollan las bacterias, encontrándose que, excesiva cantidad de carbono y/o limitación de fósforo, nitrógeno y potasio promueven la síntesis de EPS, también se ha observado que, el lento crecimiento de las bacterias formadoras de biopelícula promueve la síntesis de EPS⁷²

La conformación estructural que adopta una biopelícula no es lineal ni rígida, por el contrario se trata de una conformación tridimensional en donde las bacterias crecen en forma de escalones piramidales, desde la superficie a la cual están adheridas; estos escalones, están compuestos no solo por una especie bacteriana sino que puede incluir a más de una especie que habita y convive en la biopelícula, y cada escalón está conformado por una cantidad variable de microcolonias englobadas en exopolisacáridos y separadas por espacios intersticiales huecos que son los canales de agua por los cuales fluye el líquido cargado de nutrientes y oxígeno para las bacterias ubicadas en el interior de la biopelícula⁷².

Para la conformación de una biopelícula estable, las bacterias transitan por una serie de etapas, de las cuales aún hoy se desconocen muchos componentes o sustancias involucradas. El primer paso es la adhesión a la superficie, una bacteria planctónica, debe encontrar un sustrato que le permita una adsorción reversible para posteriormente alcanzar una adhesión irreversible⁷², para ello se necesitan de una serie de factores de adhesión presentes en la pared bacteriana, una vez en contacto con la superficie, las bacterias desarrollan un modelo de unión activa por medio de pili, fimbrias o flagelos, aunque la motilidad no está realmente relacionada con la adhesión ya que bacterias no motiles como los *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* y *Mycobacterias* también desarrollan biopelícula y en ellos la adhesión se relaciona a la presencia de proteínas de superficie^(6, 72)

La adhesión a la superficie se ve influenciada por una gran variedad de factores, entre los cuales se pueden destacar: mayor hidrofobicidad, una superficie no polarizada y más áspera, es así como se ve favorecido el proceso inicial en la formación de la biopelícula, ya que se reducen las fuerzas de deslizamiento; la presencia de factores de película condicionantes se ha convertido en un determinante fundamental para la adhesión, estos factores son principalmente capas formadas por polímeros que cubren la superficie de cualquier material en contacto con un líquido y que posteriormente facilitan la adhesión y la colonización bacteriana. Después de la adhesión fija al sustrato,

la bacterias comenzaran a autoagregarse, dando lugar a la primera formación de microcolonias y por lo tanto requerirán no solo de los factores de adhesión sino también de otra serie de sustancias. ^(6, 72)

El segundo paso en la formación delabiopelícula inicia con la formación de las microcolonias que permiten que la estructura inicie su crecimiento y maduración; en este punto, las bacterias que están en continua división empiezan a producir los EPS que conformaran la matriz extracelular generando la conformación tridimensional de la comunidad, el tipo de exopolisacárido que se produzca dependerá del microorganismo, aunque estudios recientes han demostrado que un mismo microorganismo puede producir diferentes tipos de EPS.(Lassa y col; 2005⁷⁴).

Cuando la biopelícula ha alcanzado su etapa de madurez, se inicia una tercera fase, que se caracteriza por el desprendimiento de células o conglomerados celulares de la matriz, por lo que se denomina que se cierra el proceso de desarrollo dela biopelícula, estas bacterias planctónicas tienen como función colonizar nuevos ambientes⁷⁴; este es el proceso menos comprendido del desarrollo delabiopelícula, y se han encontrado diversos mecanismos de liberación celular: erosión o deslizamiento, pequeñas partes delabiopelícula se remuevenconstantemente; por separación, remoción rápida y masiva de la superficie; abrasión: colisión del líquido circulante que provoca desprendimiento dela biopelícula⁷²El proceso en general se evidencia en la Figura No 4.

Así mismo se han descrito componentes moleculares que podrían provocar el desprendimiento de algunos individuos dentro delabiopelícula, por ejemplo, estudios con *Staphylococcus aureus* han puesto en evidencia que algunas células sufren una delección en el operón *icaADBC* provocando que el individuo produzca menor cantidad de exopolisacárido, dicha delección le permite desprenderse de la comunidad más fácilmente y generar el desarrollo de la biopelícula en otros lugares⁷⁴.

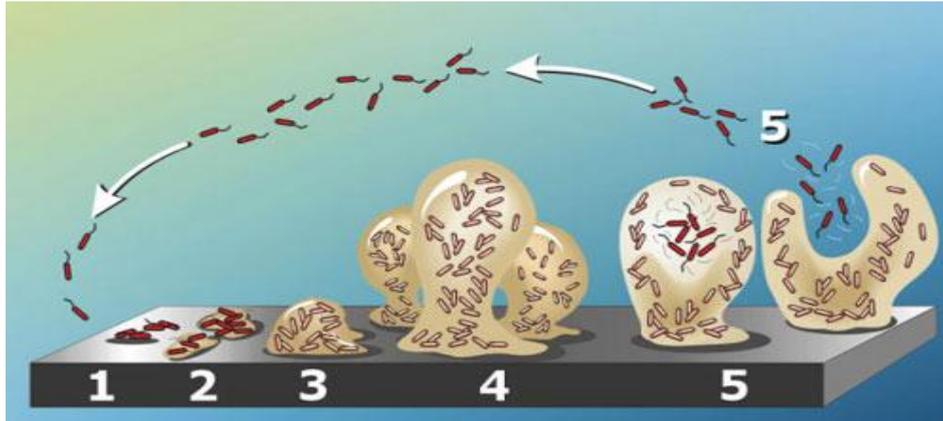


Figura No. 4 Etapas en la formación de biopelícula: 1) Adhesión 2) Adhesión célula-célula 3) Proliferación 4) Maduración 5) Dispersión.

4.7.2. Quorum sensing: mecanismo de regulación

El sistema *quórum sensing*, es un mecanismo regulador que se basa en la acumulación de una molécula señal en el medio (autoinductor) que le permite a la bacteria censar la densidad de población existente; en bacterias Gram negativas se ha identificado a la acil-homoserina lactona como principal molécula autoinductora, mientras que en Gram positivos, se han identificado una serie de péptidos como los responsables del quórum sensing⁷⁴.

La estrecha interacción célula a célula existente en la biopelícula, facilita la comunicación intercelular, los mensajeros químicos permiten a la bacteria conocer las condiciones poblacionales al interior de la biopelícula y le permiten responder a las condiciones cambiantes dentro de la comunidad; además, se ha descrito que los microorganismos solo desarrollan la biopelícula cuando dichas moléculas alcanzan ciertas concentraciones que le indican a la bacteria que hay una amplia densidad poblacional ya que, los costos del inicio de la producción de los exopolisacáridos y demás componentes de la matriz, superan los beneficios que se obtienen⁷².

La unión autoinductor-receptor, inicia una cascada de señalización intracelular que activa genes relacionados con la biopelícula y además activa la producción del mismo autoinductor, aumentando la concentración del mismo en el medio. Davies DG y col., en 1998⁷⁵, concluyeron a partir de sus estudios con *Pseudomonas aeruginosa* que una delección en el gen responsable de la

producción del autoinductor acil-homoserina lactona, provocaba la producción de biopelícula mucho más delgados y sin su arquitectura típica además de ser más vulnerables a la acción de surfactantes, demostrando también, que la adición del autoinductor, provocaba que la biopelícula vuelva a adquirir su composición natural.

4.7.3. Biopelícula de *Staphylococcus coagulasa negativa* (SCN)

Los estafilococos, son considerados como los principales y más frecuentes agentes causales de infecciones relacionadas con biopelícula, esto se debe a que estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas tanto en superficies inertes así como comensales de piel y mucosas de la mayoría de mamíferos. En las últimas décadas gracias al avance tecnológico se ha ahondado en el estudio de las propiedades genéticas de los *Staphylococcus spp.*, como formadores de biopelícula y su asociación a las patologías que desarrollan tanto en humanos como en animales⁷⁶.

La mastitis ocasionada por los estafilococos provocan grandes pérdidas a la industria láctea y diversos autores señalan la formación de biopelícula como un mecanismo de patogénesis y virulencia que le facilita al microorganismo adherirse y colonizar el epitelio de la glándula mamaria, además, le permite evadir la respuesta inmunológica dificultando su eliminación y causando infecciones recurrentes o persistentes²⁵.

El proceso mediante el cual los estafilococos desarrollan la biopelícula se divide en dos pasos: una primera adhesión a la superficie, en el caso de los estafilococos pueden adherirse tanto a superficies inertes como a la matriz extracelular de los epitelios que invaden y a proteínas séricas en circulación; los estafilococos presentan una serie de factores de adherencia que pueden ser de origen proteico (adhesinas) como las fimbrias y adhesinas no fimbriales y estructuras no proteicas como los glucocáliz o slime⁷⁷. La capacidad de adherencia de las bacterias está dada no solo por sus características morfológicas sino también por las características de la superficie como ya se mencionó anteriormente, los estafilococos además, producen polisacáridos

extracelulares que les permiten adherirse más fácilmente a la superficie que colonizan, el más importante dentro de los estafilococos es el *slime*, el cual está definido como una capa de polisacáridos que rodea a la célula que lo produce, esta capa es irregular y no logra recubrir a la totalidad de la bacteria; estos exopolisacáridos que rodean la superficie celular se encuentran débilmente unidas a ella y se desprenden con facilidad a diferencia de los polisacáridos de la capsula de otros géneros bacterianos; los estudios realizados por Whitfield en 1988⁷⁸ revelaron que la presencia del slime en las cepas de estafilococos les confiere una resistencia a la fagocitosis y a la acción de ciertos medicamentos, ya que, esta capa altera las propiedades superficiales de las bacterias inhibiendo u ocultando la presencia de algunos receptores⁷⁷.

La segunda etapa en el desarrollo de las biopelícula es la agregación intercelular y la maduración de la estructura tridimensional de la biopelícula, con sus canales de agua internos y sus células embebidas en la matriz; la agregación, ocurre gracias a la producción de polisacáridos de adhesión intercelular (PIA), los cuales están compuestos por polímeros parcialmente acetilados ligados por enlace β 1-6 con la N-acetilglucosamina⁷⁶, estudios realizados por Gotz en el 2002⁷⁹ demostraron que no solo PIA es responsable de la agregación bacteriana, sino que, muchos otros componentes como los ácidos teicoicos, las proteínas de superficie estafilocócicas (SSP-I), el factor *clumping A* (ClfA), la acumulación de proteínas asociadas (AAP) y las proteínas asociadas a biofilm (bap) contribuían a la estructuración de la biopelícula.

El mecanismo de acción de PIA que permite la agregación de las células bacterianas, se fundamenta en la deacetilación de las moléculas de N-acetilglucosamina, que genera una carga positiva en la molécula por la liberación de los grupos amino y esta permite interactuar con las cargas negativas conferidas por los ácidos teicoicos de las células bacterianas y permitir su unión por fuerzas electrostáticas⁷⁶.

Una vez maduro, el desprendimiento de partes de la biopelícula así como de una sola célula, le permite al microorganismo colonizar nuevos ambientes, en los

Staphylococcus spp., los factores que contribuyen al desprendimiento son: fuerzas mecánicas, la detención de la producción de componentes de la biopelícula como los exopolisacáridos, detrimento por factores que destruyen la matriz como los surfactantes. El desprendimiento controlado actúa como un mecanismo de regulación de la biopelícula y mantiene un espesor continuo además de administrar una tasa específica de difusión, en los estafilococos este mecanismo es controlado por el sistema *agr* de quórum sensing, y aunque no se conoce muy bien su mecanismo de acción, recientes estudios apuntan a que regula la expresión de las modulinas solubles en fenol (PMNs), los cuales son péptidos altamente surfactantes al parecer involucrados en la formación de los canales de agua dentro de la biopelícula⁷⁶.

Las investigaciones en las últimas décadas se han encaminado a distinguir la expresión génica de las bacterias en estado planctónico y aquellas que están desarrollando biopelícula, algunos de estos han descrito diferencias en la expresión genética de hasta un 30% entre la misma especie bacteriana⁵⁹. Además de esto, como ya se ha visto, la biopelícula es un ambiente activo en el cual hay una constante comunicación e intercambio de información, es así, que estudios han demostrado la transmisión de plásmidos, enzimas y otras moléculas a través de la matriz, en donde también se ha descrito que la molécula de ADN liberada de la lisis de bacterias muertas, actúa como molécula iónica capaz de unirse a diferentes moléculas de la matriz, concluyendo así, que la redistribución de genes y el intercambio de ADN aumentado dentro de la biopelícula, constituyen un mecanismo adaptativo que lleva consigo consecuencias en su habilidad adaptativa.^(72, 76)

4.7.4. Genes *eno* Y *bap* asociadas a la formación de biopelícula

Aunque se han descrito una gran diversidad de proteínas asociadas con la producción de biopelícula en los SCN se ha evidenciado la gran importancia de las proteínas codificadas por el gen *eno* y *bap* las cuales actúan en diferentes pasos durante el desarrollo de las comunidades microbianas producidas por estos microorganismos, sus características se describen a continuación.

4.7.4.1. Gen *bap*

A diferencia de las adhesinas de los *Staphylococcus* spp. agrupadas en la familia MSCRAMMs, *bap* es una abreviación para describir las proteínas asociadas al biofilm, y cuya existencia fue descrita por primera vez por Carme Cucarellay col., en el año 2001⁸, cuando trabajaba con cepas de *S. aureus* procedentes de mastitis bovina, inicialmente la describió como una molécula asociada a la adhesión a superficies de poliestireno; sus estudios, se basaron en la inserción de un transposón en un locus al cual posteriormente denominaron *bap*, encontró que al escindir dicho trasposón, las cepas perdían su capacidad de adherencia en el poliestireno de la prueba en placas de microtitulación, además, perdían su morfología típica en el agar rojo congo, y lo correlacionó además con la presencia del operón *ica* y su producto PIA (principal componente de la matriz extracelular). Como resultado de su estudio concluyó que, la delección del locus *bap* desencadenaba en una menor capacidad de agregación y que las cepas *ica* negativo *bap* positivo, también eran capaces de desarrollar la biopelícula, por ende describe que existen mecanismos no dependientes de PIA utilizado por *S. aureus* para la formación de la biopelícula⁸.

La primera proteína descrita codificada por el gen *bap*, es una proteína grande de 2276 aminoácidos, que a diferencia del PIA (que solo promueve la adhesión interbacteriana) promueve tanto la adhesión interbacteriana como la adhesión inicial a la superficie. Esta proteína tiene una región central (aminoácido central 948 al 2139) formado por trece unidades repetidas dispuestas en tándem de 258 nucleótidos⁷⁷.

Ubeda y col. en el año 2003⁸⁰, encontró como conclusión de su estudio que el gen *bap* se encontraba contenido en una isla móvil patogénica y que se halla en *Staphylococcus* spp., aislados de muestras de mastitis bovina. En el año 2004, Cucarellay col.²⁹, publicaron los resultados de su estudio cuyo objetivo era comprobar si los SCN provenientes de mastitis bovina eran capaces de provocar biopelícula in vitro y además si este dependía también de la presencia

de la proteína *bap*, como conclusión de su estudio, Cucarella encontró que el gen estaba bastante conservado entre las distintas especies de *Staphylococcus spp.*, y conservaba su funcionalidad dentro de la conformación de la biopelícula, describió también que el gen *bap* únicamente es aislado de especies causantes de mastitis en rumiantes y que no se ha descrito en aislados de agentes causales de infección en el hombre; describió las siguientes características iguales a todas las proteínas de la familia *bap*: alta masa molecular, una secuencia señal para la secreción extracelular y un dominio core de repeticiones.

El análisis de las secuencias flanco revelaron que el gen *bap* es transportado por un transposón insertado en una isla de patogenicidad llamada isla de patogenicidad estafilocócica bovina 2 (SaPIBov2)⁶⁹, en *S. aureus*; además, la presencia de una secuencia codificadora llamada *Sip* para una recombinasa funcional de la familia de las integrasas hizo suponer que podía existir una transferencia horizontal desde *S. aureus* a otras especies de *Staphylococcus spp.*, el análisis de las secuencias flanco del gen *bap* en SCN aislados por Cucarella en el 2004²⁹ reveló, que difieren mucho a las encontradas en *S. aureus* y entre las diversas especies de *Staphylococcus spp.*, como conclusión de esto, se demostró que el gen no se encontraba en la isla SaPIBov2 en SCN, por tanto, no existía un mecanismo de transferencia horizontal entre las especies de *Staphylococcus* aunque este gen revelara una alta similitud con el encontrado en *S. aureus*.^(81, 30)

4.7.4.2. Familia MSCRAMMs y gen *eno*

Los componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión a la matriz o por sus siglas en inglés MSCRAMMs, son una serie de adhesinas, que se encuentran en las especies de *Staphylococcus spp.*, que les permiten la adhesión inicial a una superficie; estudios realizados por Harraghy y col., en 2003⁸², revelaron que existe una gran cantidad de receptores y sustratos para las adhesinas que expresa *S. aureus* y los SCN, y que además existe un solapamiento entre algunos de ellos, es así que, dos o más

adhesinas pueden fijarse al mismo sustrato, por ejemplo, *FnbpA* y *FnbpB* reconocen y se unen a la fibronectina^{77,82} Clarke y Foster describieron en 2006⁸⁴, que esta habilidad les permitía a los *Staphylococcus spp.*, interactuar más fácilmente con su hospedador y desarrollarse en diferentes nichos modificando su respuesta según las circunstancias⁸².

Estas moléculas, en su gran mayoría, se unen covalentemente al péptidoglicano presente en la pared bacteriana, pero algunas pueden secretarse al exterior de la célula⁷⁷ (**Tabla 3**).

Tabla 3 Principales adhesinas, mecanismo de unión a la pared y ligando de la matriz extracelular.

ADHESINA	MODO DE UNION	LIGANDO
Spa (Proteína A)	Covalente	IgG, IgM, Factor Von Willebrand, TNRF1
FnBPA	Covalente	Fibronectina, fibrinógeno, elastina.
FnBPB	Covalente	Fibronectina, elastina,
ClfA	Covalente	Fibrinógeno
ClfB	Covalente	Fibrinógeno y citoqueratina 10
SdrC	Covalente	Desconocido
SdrD	Covalente	Desconocido
SdrE	Covalente	Desconocido
Pls	Covalente	Lípidos celulares, promueve la adherencia a células epitelio nasal
Cna	Covalente	Colágeno
IsdA	Covalente	Fibrinógeno, fibronectina, fetuina, hemoglobina, transferrina y hemina
IsdB	Covalente	Hemoglobina y hemina
IsdC	Covalente	Hemina
IsdH	Covalente	Haptoglobina
SraP	Covalente	Desconocido, se fija a plaquetas
SasG	Covalente	Desconocido, se fija a epitelio

		nasal
SasB, SasD, SasF, SasK y SasH	Covalente	Desconocido
Ebh	Iónica	Fibronectina
Emp	Iónica	Fibrinógeno, fibronectina y vitronectina
EbpS		Elastina
Bbp		Sialoproteína ósea
Efb		Fibrinógeno
Atl (amidasa)	Iónica	Desconocido
Atl (glucosaminidasa)	Iónica	Fibronectina
Aaa	Iónica	Fibrinógeno, fibronectina y vitronectina
Enolasa	Iónico	Laminina
EbpS	Transmembrana	Elastina
Ac. Teicoico de la pared	Desconocido	Se une a células epiteliales y endoteliales.

5. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo descriptivo en el cual se analizó las cepas de SCN causantes de mastitis bovina y se llevaron a cabo ensayos experimentales que permitieron determinar fenotípicamente algunos de sus factores de virulencia.

5.2. Universo

Cepas bacterianas capaces de producir mastitis bovina de tipo clínico y subclínico.

5.3. Población

Cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de leche procedentes de bovinos con sospecha de mastitis en 24 fincas de la sabana de Bogotá.

5.4. Muestra

119 cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa aislados de muestras de leche en bovinos con mastitis de 24 fincas de la sabana de Bogotá, previamente caracterizadas bajo el estudio “Caracterización microbiológica y desarrollo de un protocolo de tratamiento y control de mastitis bovina en la sabana de Bogotá” realizado en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

5.5. Técnicas y procedimientos

A continuación se muestra en la figura 5 un esquema general de los procedimientos utilizados para realización del presente estudio.

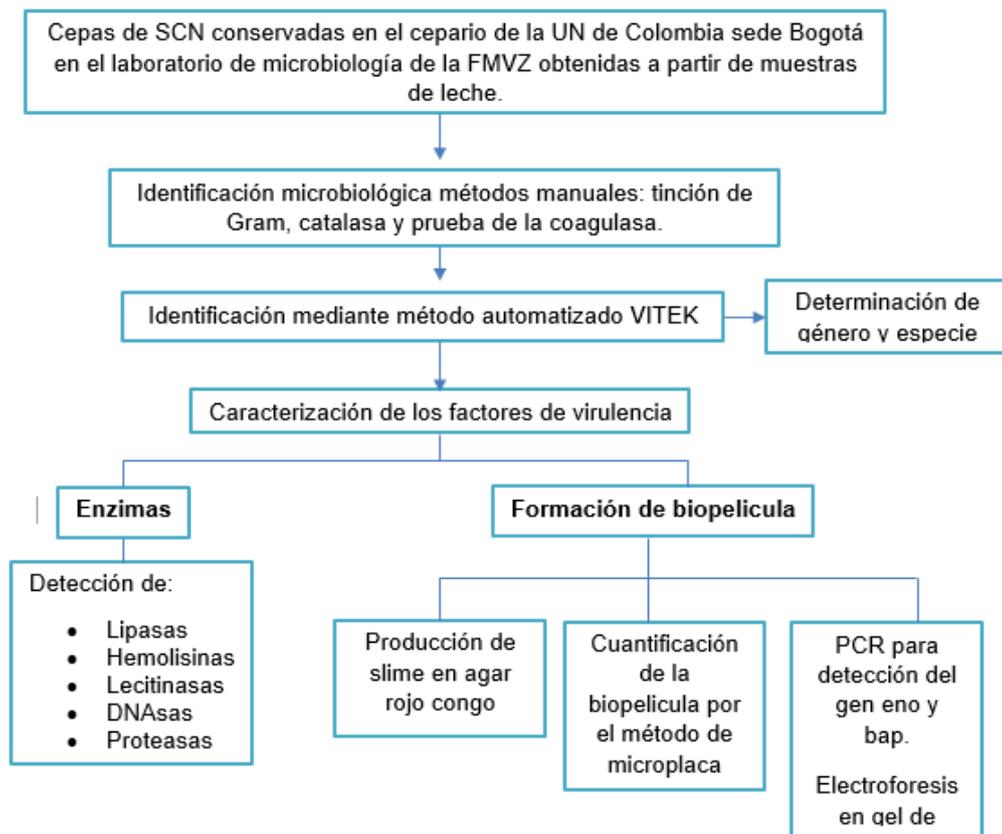


Figura No. 4 Esquema general de los procedimientos empleados en el presente estudio.

5.6. Cepas bacterianas

Se emplearon 119 cepas de SCN que se encontraban criopreservadas las cuales fueron previamente aisladas de muestras de leche de bovinos sospechosos de mastitis en el desarrollo del proyecto “Caracterización microbiológica y desarrollo de un protocolo de tratamiento y control de mastitis bovina en la sabana de Bogotá” realizado en el laboratorio de microbiología veterinaria en la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá; el muestreo fue realizado en 24 Fincas de la Sabana de Bogotá bajo el protocolo establecido por el National Mastitis Council.

5.6.1. Cepas de referencia

Como control se emplearon cepas pertenecientes a la colección americana de cultivos, American Type Culture Collection (ATCC). Las cepas empleadas fueron:

Staphylococcus aureus ATCC 25923 la cual se empleó como control positivo para las pruebas: Detección de proteasas, DNAsas, lipasas, catalasa, coagulasa; como fuerte productor de biopelícula tanto en agar rojo congo como en el método de microplaca y para la detección del gen *eno*.

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 utilizado como control negativo en las pruebas de: DNAsas, Agar rojo congo (slime), proteasas, lipasas y lecitinasas.

5.7. CONFIRMACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

Para la realización de las pruebas se descongelaron las cepas y se sembraron en placas de agar BHI por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$. La determinación de género se realizó mediante la caracterización macroscópica y microscópica de las colonias obtenidas; conjuntamente se evaluó la producción de coagulasa y catalasa.

La especie se determinó mediante el equipo automatizado VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Francia); estas pruebas se realizaron como se describe a continuación:

5.7.1. Caracterización microscópica

Para la caracterización microscópica se empleó la tinción de Gram de acuerdo al método convencional desarrollado por Hans Christian Gram (1884) y descrito por Koneman y col. 2006⁶⁴ con una variación en el tiempo de exposición al colorante fucsina siendo este de 30 segundos.

5.7.2. Caracterización bioquímica.

La caracterización bioquímica de los 119 aislamientos se llevó a cabo como se describe a continuación.

5.7.2.1. Prueba de la catalasa

Esta prueba se realizó con el fin de diferenciar los miembros de la familia *Staphylococcaceae* de los miembros de la familia *Streptococcaceae*. Fue llevada a cabo mediante la inoculación de una colonia de la cepa a estudiar en una gota de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 3% sobre una lámina portaobjetos, evidenciándose en las cepas positivas la formación de burbujas de oxígeno producto de la acción catalítica de la enzima sobre el peróxido.

5.7.2.2. Prueba de la coagulasa

La prueba se llevó a cabo mediante el kit de aglutinación en látex Thermo Scientific™ StaphaurexPlus (**figura 6**) inoculando una colonia de un cultivo puro de 24 horas de incubación en una gota del reactivo sobre las tarjetas provistas en el kit, se caracterizaron como positivas a aquellas cepas que producían aglutinación (grumos).

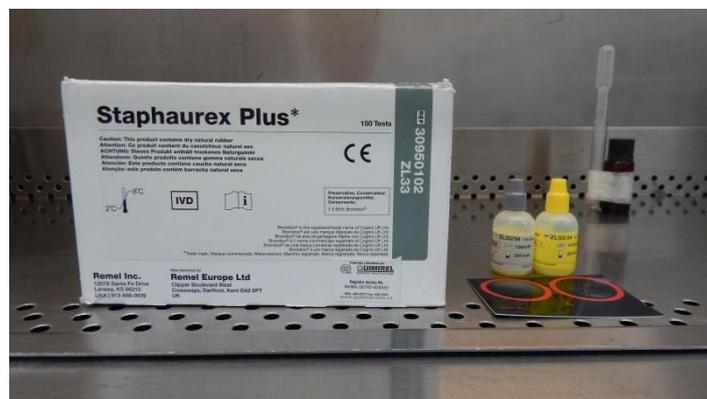


Figura No. 5 Kit de detección enzima coagulasa Staphaurex Plus. Thermo Scientific™

Como control negativo se utilizó el suministrado en el kit y como control positivo se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

5.7.2.3. Identificación de especie por método automatizado

Una vez obtenido un cultivo puro de 24 horas de las cepas se realizó una suspensión bacteriana en solución salina estéril, ajustada al tubo 0.5 de la escala de McFarland para la identificación de especie de los SCN mediante las tarjetas GP (Gram positivos) del equipo automatizado VITEK compact 2 (bioMeuriex).

5.7.3. Identificación de enzimas implicadas en la virulencia de los SCN.

5.7.3.1. Identificación de hemolisinas

Las placas de agar sangre de cordero al 5% fueron sembradas en forma masiva en línea horizontal, por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ en condiciones de aerobiosis, como base del agar se empleó agar BHI (Scharlau).

Los resultados obtenidos después del tiempo de incubación fueron analizados de acuerdo a lo descrito por Koneman y col 2006⁶⁴ quien describe las hemolisis de la siguiente forma:

α – hemolisis: producción de un color verdoso alrededor de las colonias debido a una lisis parcial de los glóbulos rojos.

β – hemolisis: aclaramiento alrededor de las colonias debido a la lisis completa de los eritrocitos.

γ – hemolisis: no se presenta ningún cambio alrededor de las colonias, es decir, microorganismos no hemolíticos.

Cebado α o “zona ancha”: se presenta como una γ - hemolisis alrededor de las colonias seguida por una zona de α -hemolisis.

Como control positivo para la producción de beta-hemolisina se empleó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y como gamma-hemolítico la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

5.7.3.2. Identificación de lecitinasas

La producción de lecitinasas se evidenció mediante el agar yema de huevo el cual fue sembrado por la técnica de spot e incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ en aerobiosis y evaluado a las 48 horas.

Se consideraron positivas aquellas cepas que formaron en el medio un halo opaco, opalescente o blanco lechoso, con producción de un precipitado insoluble alrededor de la siembra producto de la degradación de la lecitina.

5.7.3.3. Identificación de lipasas

La producción de lipasas fue evaluada mediante el agar Tween 80, utilizando como base Agar Trypticosa Soya, suplementado con Tween 80 al 1% y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 0.01%.

Se consideraron como resultados positivos para actividad lipolítica a aquellas cepas que presentaron un precipitado alrededor del inóculo, atribuido a la liberación de ácidos grasos por el proceso lipolítico, que produce en el medio la precipitación de sales insolubles de calcio⁸⁵.

5.7.3.4. Identificación de proteasas

Con el fin de evaluar la actividad proteolítica de las cepas, se empleó el agar leche al 3%; se consideraron como resultados positivos a aquellos que presentaron un halo claro, posterior a 48 horas de incubación en temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en condiciones de aerobiosis, producto de la degradación de la caseína por la acción de proteasas.

5.7.3.5. Identificación de DNAsas

Lachica y col en 1971⁷¹ mediante la propiedad metacromática del colorante azul de toluidina desarrollaron un medio que permite evidenciar la producción de DNAsas (enzimas que hidrolizan el Ácido desoxirribonucleico) por algunos microorganismos añadiendo este colorante al agar DNAsa convencional.

Las placas de agar DNAsa (Oxoid) con azul de toluidina al 0.005% fueron inoculadas por la técnica de spot e incubadas por 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ en

condiciones de aerobiosis. Después del tiempo de incubación se caracterizaron como productores de DNAsas a los microorganismos que produjeron un viraje de azul a un halo rosado debajo y alrededor de las colonias producto de la alcalinización del medio por la hidrólisis del ADN.

5.8. DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULA

5.8.1. Análisis fenotípico

5.8.1.1. Detección de la producción de exopolisacáridos mediante el Agar Rojo Congo (ARC)

Los *Staphylococcus* coagulasa negativa fueron evaluados fenotípicamente para la producción de exopolisacáridos mediante la técnica del Agar rojo Congo descrita por Freeman y colen 1989⁸⁶.

El medio fue preparado con caldo infusión cerebro corazón (BHI) Oxoid 37 g/L, agar N° 1 (Oxoid) 10g/L, rojo congo 75% 0.8 g/L y suplementado con sucrosa 50g/L.

Las placas con agar rojo congo fueron inoculadas por agotamiento e incubadas por 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas y una posterior incubación de 24 horas a temperatura ambiente.

5.8.1.2. Detección de adherencia por el método de microplaca

Para la determinación de adhesión en microplaca se empleó el método descrito por Stepanovic y col 2007⁸⁷.

A partir de cultivos puros de 24 horas de incubación se realizó una suspensión bacteriana ajustada a el tubo 0,5 de la escala de Mc Farland mediante el equipo *Densicheck*, se añadieron 20µl de la suspensión y 180 µl de caldo BHI suplementado con glucosa al 1% a cada pozo de la microplaca, esto se realizó por triplicado para cada cepa en estudio y para el control positivo de adherencia el cual fue la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC

25923, como control negativo se añadieron 200µl de caldo BHI suplementado con glucosa al 1% a los 6 primeros pozos de la microplaca, posteriormente esta se incubo por 24 horas a 37°C .

Después del tiempo de incubación se realizaron 3 lavados añadiendo 300 µl de solución salina estéril al 0.85% a cada pozo para eliminar las células plantónicas; el proceso de fijación se realizó añadiendo 150 µl de metanol a cada pozo por 20 minutos; se retiró el metanol y se dejó secar. Una vez secos los pozos fueron teñidos con cristal violeta al 2%, después de 15 minutos se descartó el colorante y se procedió a lavar la microplaca con agua corriente.

El colorante adherido a las paredes fue resolubilizado con 150 µl de etanol al 95%, finalmente la densidad óptica (DO) fue leída mediante el lector de microplacas Bio-Rad's: Microplate Manger 6 (xMark) a longitud de onda 570 nm.

La interpretación de resultados se realizó de acuerdo a lo descrito por Stepanovic y colen 2007⁸⁷; para cada microplaca se estableció el punto de corte (DOc) definido como 3 desviaciones estándar (DE) por encima del promedio de las 6 densidades ópticas (DO) del control negativo:

$$DOc = \bar{x} \text{ de las DO del control negativo} + (3 \times DE \bar{x} \text{ de la DO control negativo})$$

El valor de DO de las cepas en análisis se determinó hallando el promedio de las 3 DO obtenidas:

$$DO \text{ cepas} = DO1 + DO2 + DO3 / 3$$

Una vez obtenido DOc y la DO de las cepas, estas se clasificaron de la siguiente forma:

DO cepas \leq DOc =	No productora de biopelícula
DOc < DO \leq 2x DOc =	Débil productor de biopelícula
2x DOc < DO \leq 4x DOc =	Moderado productor de biopelícula
4x DOc < DO =	Fuerte productor de biopelícula

5.8.2. Análisis genotípico

5.8.2.1. Extracción de ADN

Para la obtención de ADN se siguió el protocolo establecido por Reischl en 1994⁸⁸, el cual consistió en tomar 15 colonias aproximadamente, procedentes de cultivo puro en Agar BHI, posterior a 24 horas de incubación $35 \pm 2^\circ\text{C}$, estas fueron resuspendidas en 200 μL de buffer de lisis compuesto por: Triton X-100 al 1%, Tween 20 0.5%, TrisHCl 10mM pH 8 y EDTA 1mM; posterior a ello, la suspensión fue llevada a baño María en temperatura de ebullición por un periodo de 10 minutos; después de esto, se centrifugó por 2 minutos a 12000 rpm, a continuación, se separó el sobrenadante y 2 μL de este se emplearon para realizar la amplificación por PCR.

La concentración de ADN se obtuvo mediante el equipo Nanodrop®- Thermo Fisher Scientific, empleando una longitud de onda de 260nm.

5.8.2.2. Amplificación de los genes *eno* y *bap*

Los primers utilizados para la amplificación de los genes fueron recopilados de la literatura, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4 *Primers empleados para la detección de genes *eno* y *bap**

GEN	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO	REFERENCIA
Bap	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG	971	57°C	Cucarella ⁸ y col. (2001)
	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC			

Eno	ACGTGCAGCAGCTGACT	302	57,6°C	Tristan ⁸³ y col. (2003)
	CAACAGCATCTTCAGTACCTC			

La amplificación de los genes se llevó a cabo mediante una PCR convencional, cuyas condiciones se describen en las tablas 5 y 6; como control positivo al gen *eno* se empleó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (Simojoki y col. 2012¹⁶)

Tabla 5 Condiciones para la amplificación del gen *eno*

Reactivos stock	Mix (volumen)	Mix (concentración final)	Programa de amplificación
Primer Forward 20µM	0.5µL	0.4µM	1) Desnaturalización inicial a: 94°C por 4 minutos 2) 40 ciclos de amplificación: 94°C por 1 minuto 57.6°C por 1 minuto 72°C por 1 minuto 3) Extensión final a: 72°C por 1 minutos.
Primer reverse 20µM	0.5µL	0.4µM	
dNTPs 10mM	0.3µL	120µM	
MgCl ₂ 50mM	0.8µL	1.6mM	
Taq. Polimerasa 500U/µL	0.1µL	2U	
H ₂ O ultrapura	18.3µL		
ADN	2µL		
Buffer 10X	2.5µL	1X	
TOTAL	25µL		

Tabla 6 Condiciones para la amplificación del gen *bap*

Reactivos stock	Mix (volumen)	Mix (concentración final)	Programa de amplificación
Primer Forward 50µM	0.5µL	1µM	1) Desnaturalización inicial a: 94°C por 6 minutos 2) 35 ciclos de amplificación: 94°C por 1 minuto 57°C por 1 minuto 72°C por 1 minuto 3) Extensión final a: 72°C por 10 minutos.
Primer reverse 50µM	0.5µL	1µM	
dNTPs 10mM	0.3µL	120µM	
MgCl ₂ 50mM	0.8µL	1.6mM	
Taq. Polimerasa 500U/µL	0.1µL	2U	
H ₂ O ultrapura	18.3µL		
ADN	2µL		
Buffer 10X	2.5µL	1X	

TOTAL	25µL		
-------	------	--	--

Los productos de la PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para el gen eno y al 1% para el gen bap en buffer TAE 1X a 90V por 60 minutos y a 90V por 40 minutos respectivamente. Su visualización se realizó mediante SYBR® Safe y las fotografías fuerontomadas en el fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad).

6. RESULTADOS

6.1. CONFIRMACIÓN DE GÉNERO Y ESPECIE DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

6.1.1. Caracterización microscópica

Las cepas en estudio fueron teñidas a la tinción de Gram con la metodología descrita anteriormente, identificándose como Cocos Gram positivos como se muestra en la Figura 7.

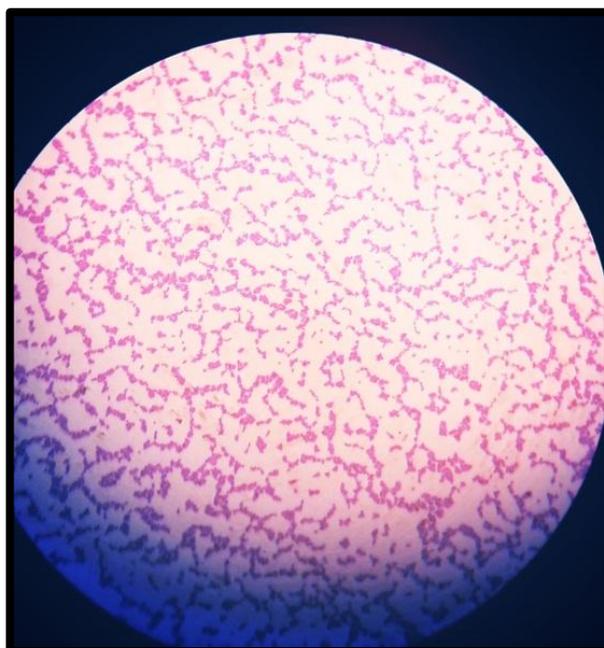


Figura No. 6Tinción de Gram. Cocos Gram positivos

6.1.2. Caracterización bioquímica

6.1.2.1. Prueba de la catalasa

Las cepas que presentaban un resultado positivo a la prueba de la catalasa como se muestra en la figura 8 continuaron con el esquema de identificación, todas las cepas estudiadas fueron positivas a la enzima catalasa.

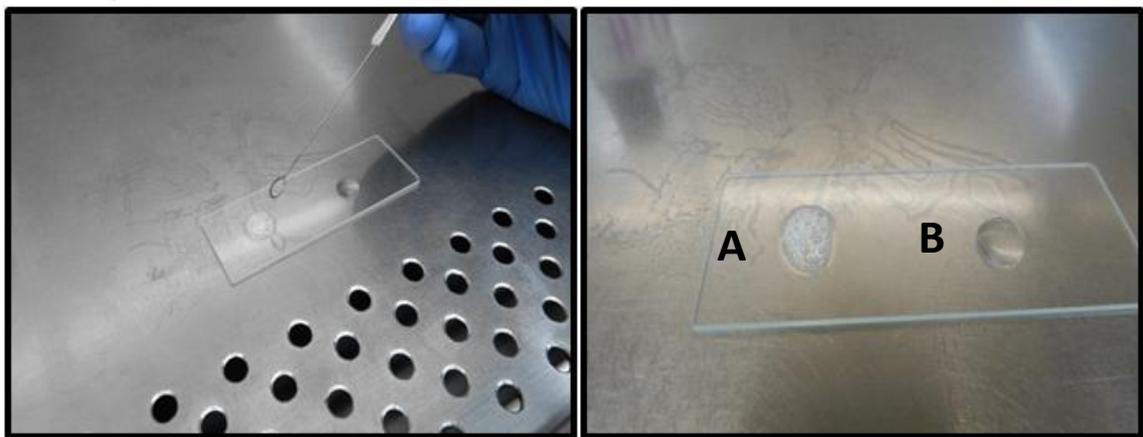


Figura No. 7 Reacción de catalasa: **A)** Reacción positiva que se evidencia por la formación de burbujas producto de la descomposición de peróxido de hidrogeno al 3%.
B) Reacción negativa.

6.1.2.2. Prueba de la coagulasa

La totalidad de las cepas fueron sometidas a la prueba de la enzima coagulasa por medio del kit Staphaurex Plus como se muestra en la figura 9, aquellas que presentaban un resultado negativo a la presencia de la enzima continuaron en el proceso de identificación. Las 119 cepas presentaron resultado negativo en el ensayo.



Figura No. 8 Prueba coagulasa mediante el kit Staphaurex. **A.** Reacción negativa no se evidencia aglutinación. **B.** Reacción positiva producida por la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 observándose aglutinación.

6.1.2.3. Identificación de especie por Sistema automatizado

Las 119 cepas caracterizadas como *Staphylococcus* coagulasa negativa en el desarrollo del proyecto “Caracterización microbiológica y desarrollo de un protocolo de tratamiento y control de mastitis bovina en la sabana de Bogotá” llevado a cabo por el laboratorio de microbiología veterinaria; perteneciente a la facultad de medicina veterinaria y zootecnia, Universidad Nacional de Colombia fueron confirmadas a nivel de género y especie, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 Frecuencia de especies de SCN estudiadas

IDENTIFICACION	NUMERO DE AISLAMIENTOS POR ESPECIE	PORCENTAJE SOBRE EL TOTAL DE AISLAMIENTOS (%)
<i>S. saprophyticus</i>	27	23
<i>S. warneri</i>	25	21
<i>S. hominis</i>	20	17
<i>S. epidermidis</i>	18	15
<i>S. chromogenes</i>	9	8
<i>S. vitulinus</i>	4	3

<i>S. haemolyticus</i>	3	3
<i>S. xylosus</i>	3	3
<i>S. caprae</i>	2	2
<i>S. kloosi</i>	2	2
<i>S. intermedius</i>	2	2
<i>S. sciuri</i>	1	1
<i>S. pasteurii</i>	1	1
<i>S. schleiferi</i>	1	1
<i>S. auricularis</i>	1	1
TOTAL	119	100

6.2. IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA VIRULENCIA DE LOS SCN.

En la tabla se resumen los resultados obtenidos en el estudio de las diversas enzimas que confieren virulencia a los SCN.

Tabla 8 Resultados de las enzimas implicadas en la virulencia de los SCN por especie.

FACTORES DE VIRULENCIA													
ESPECIES	N	HEMOLISINAS				LECITINASAS		LIPASAS		PROTEASAS		DNAsa	
		POSITIVAS				POSITIVO		POSITIVO		POSITIVOS		POSITIVO	
		ALFA	%	BETA	%	N	%	n	%	n	%	n	%
<i>S. saprophyticus</i>	27	0	0	2	7,4	0	0	0	0	10	37	1	3,7
<i>S. warneri</i>	25	5	20	16	64	7	28	6	24	6	24	2	8
<i>S. hominis</i>	20	3	15	12	60	0	0	1	5	13	65	1	5
<i>S. epidermidis</i>	18	3	16,7	2	11,1	0	0	9	50	15	83,3	3	16,7
<i>S. chromogenes</i>	9	0	0	0	0	0	0	3	33,3	9	100	9	100
<i>S. vitulinus</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	3	0	0	1	33,3	0	0	0	0	2	66,7	0	0
<i>S. xylosus</i>	3	0	0	0	0	0	0	1	33,3	1	33,3	0	0
<i>S. caprae</i>	2	1	50	0	0	0	0	1	50	1	50	1	50
<i>S. kloosi</i>	2	0	0	2	100	0	0	0	0	1	50	0	0
<i>S. intermedius</i>	2	1	50	0	0	0	0	1	50	2	100	2	100
<i>S. sciuri</i>	1	0	0	1	100	0	0	1	100	1	100	1	100
<i>S. pasteurii</i>	1	0	0	1	100	0	0	0	0	1	100	0	0
<i>S. schleiferi</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0
<i>S. auricularis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	119	13	11	37	31	7	6	23	19,3	63	53	20	16,8

n= Numero de aislamientos positivos.

%= Porcentaje sobre la totalidad de aislamientos por especie.

6.2.1. Identificación de hemolisinas

En la figura 10, se observan los patrones obtenidos en agar sangre, considerándose como alfa hemolíticos a los aislamientos que presentaban una zona de color verde alrededor de la siembra, aspecto que indicaba la lisis parcial de los glóbulos rojos, por otro lado los aislamientos que producían una zona de aclaramiento alrededor se consideraron como beta-hemolíticos y los aislamientos que no presentaron ninguna de estas características fueron considerados como gamma-hemolíticos.

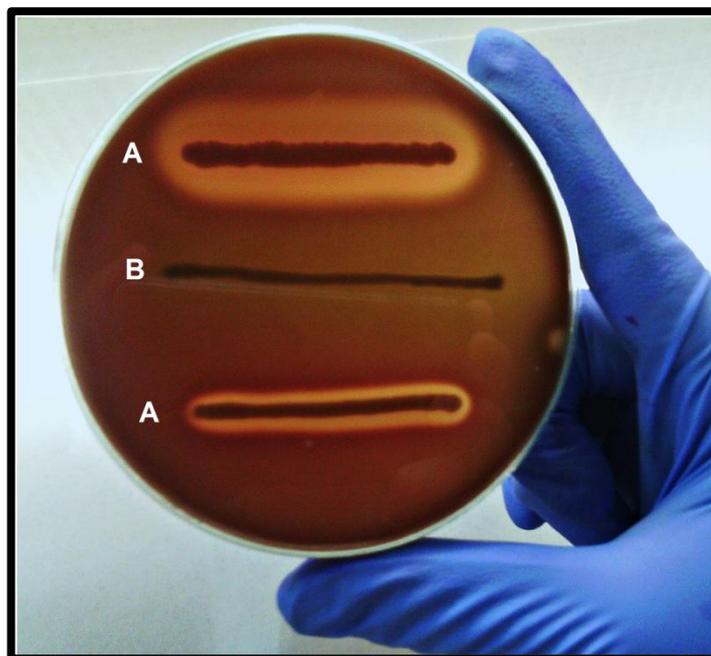


Figura No. 9 Resultados actividad hemolítica. **A.** Reacción B-hemolítica producida por la lisis total de los eritrocitos. **B.** Reacción Gamma-hemolítica, no es visible la lisis eritrocitaria.

La actividad hemolítica evidenciada en agar sangre mostró que del total de cepas (119) 50 (42%) de ellas produjeron algún tipo de hemólisis; se identificaron 13 cepas productoras de alfa hemólisis (11%) y 37 productoras de beta hemólisis (31%).

Se evidenció que *S. warneri* fue el microorganismo que mayor actividad hemolítica presentó, con un total de 21 cepas positivas, de las cuales 16

(76.2%) fueron Beta hemolíticas y 5 (23.8%) presentaron *alfa* hemolisis. Los resultados obtenidos para las demás especies se muestran en la figura 11.

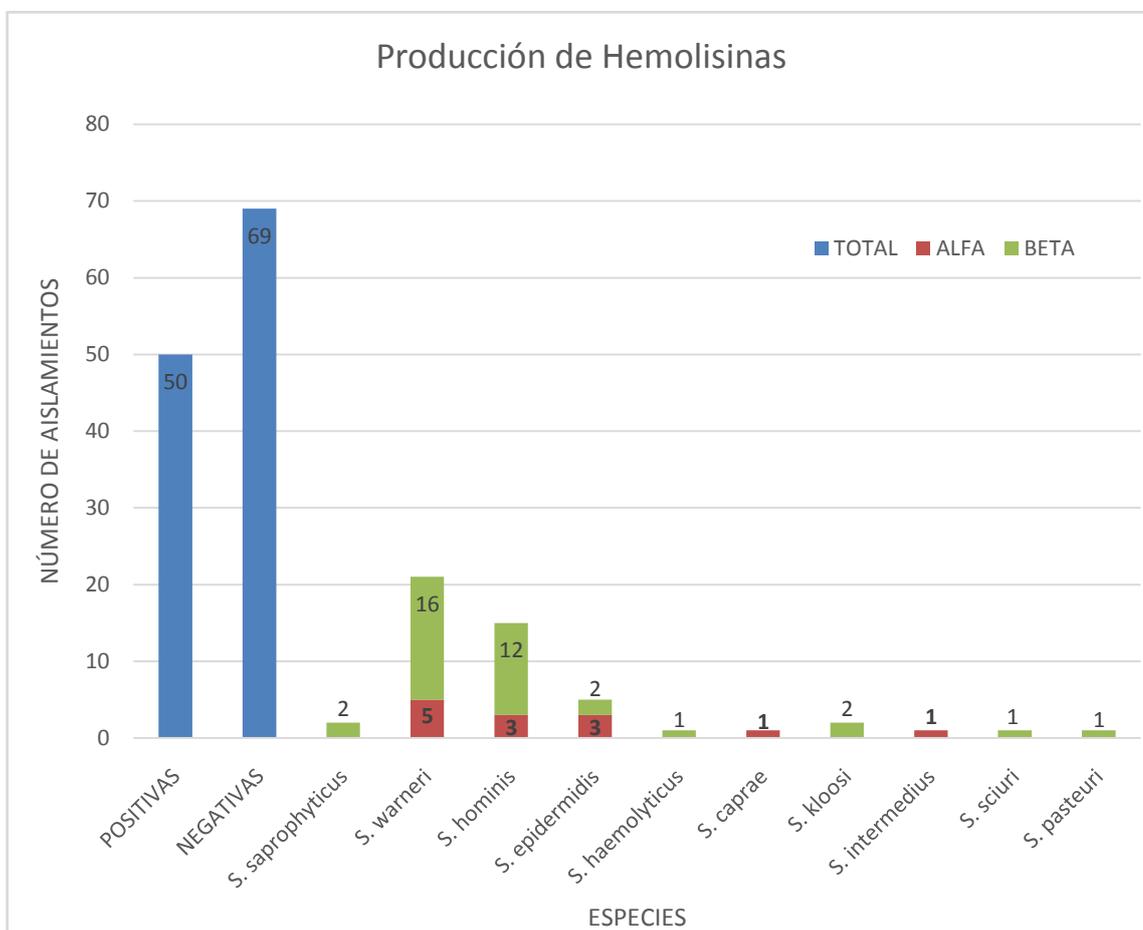


Figura No. 10 Número de aislamientos positivos y negativos a hemolisinas y tipo de hemolisis en los aislamientos positivos. El total aislamientos positivos y negativos se observa en las barras de color azul, en color rojo se observan los resultados Alfa-hemolíticos y en verde los resultados Beta-hemolíticos del total de los aislamientos positivos por especie.

6.2.2. Identificación de Lecitinasas

La producción de lecitinasas fue evidenciada en 7 (6%) cepas del total utilizadas en el estudio, todas ellas correspondientes a *S. warneri*, siendo este el único productor de lecitinasas evidenciado en el estudio. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 8 y la figura 12.

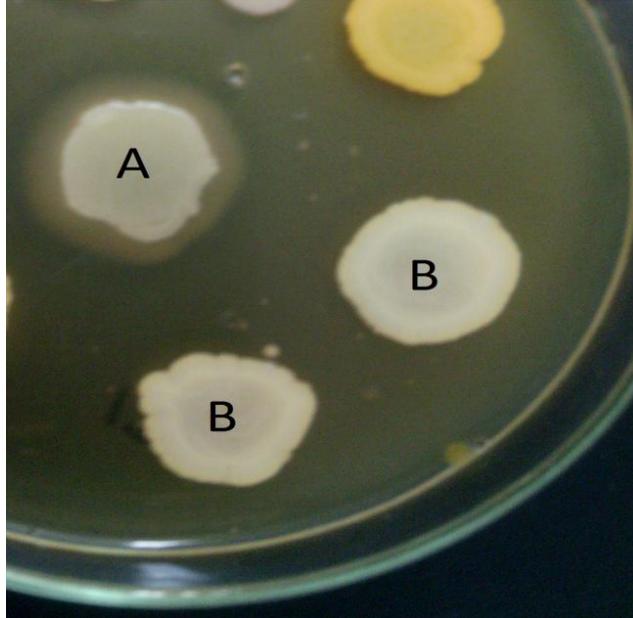


Figura No. 11 Resultados obtenidos en agar yema de huevo **A.** Producción de precipitado insoluble correspondiente a la degradación de la lecitina (resultado positivo). **B.** Aislamientos no productoras de lecitinasas.

6.2.3. Identificación de lipasas

Un total de 23 cepas fueron positivas a la acción lipolítica medida en el agar Tween 80 (**figura 13**), lo que representó un 19.3 % de las cepas estudiadas, siendo *S. epidermidis* la especie que mayor producción de lipasas presentó, 9 cepas (50%) como se evidencia en la figura 14.

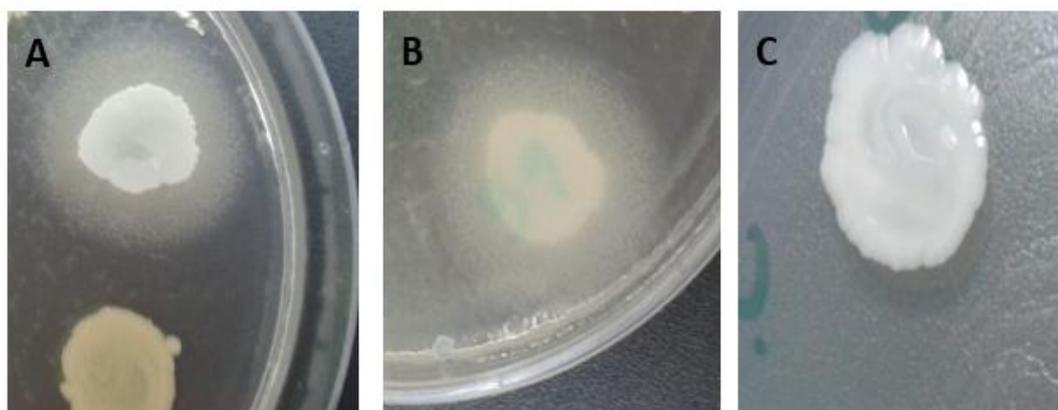


Figura No. 12 Resultados en agar Tween 80. **A. y B.** Aislamientos productores de lipasas observado en la imagen por la formación de un halo opaco. **C.** Aislamiento no productor de lipasas.

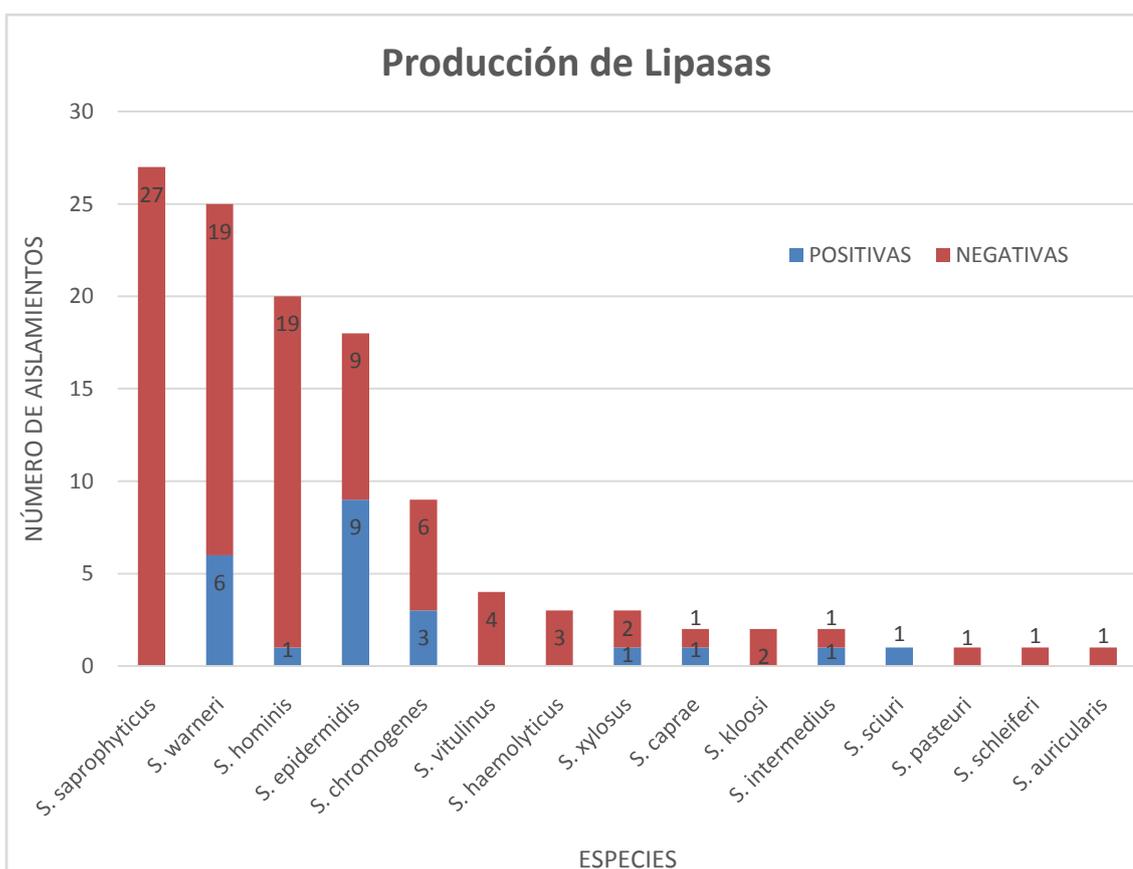


Figura No. 13 Número de aislamientos positivos y negativos a la producción de lipasas. El número de aislamientos positivos por especie se observan de color azul y en rojo el número de aislamientos negativos por especie.

6.2.4. Identificación de proteasas

El 53% (63/119) (Tabla 8) de las cepas de SCN estudiadas desarrollaron actividad proteolítica posterior a una incubación de 48 horas en agar leche al 3%.

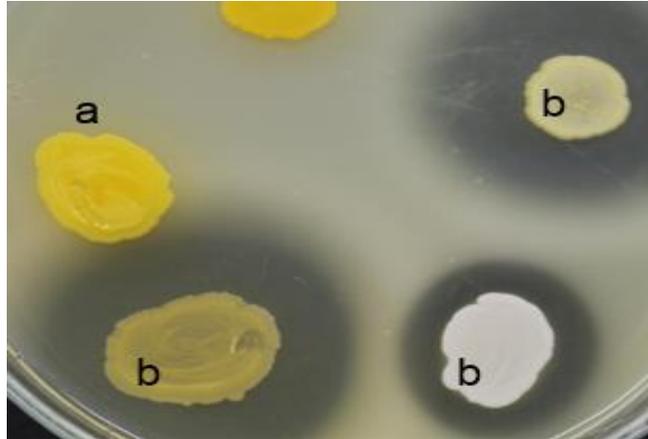


Figura No. 14 Resultados obtenidos en agar leche al 3%. **a)** Aislamiento no productor de proteasas. **b)** Aislamientos productores de proteasas evidenciados por la formación de un halo claro alrededor del inoculo correspondientes a la degradación de la caseína (proteólisis).

El 100% de las cepas de *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. pasteurii* y *S. schleiferi* presentaron esta actividad enzimática; mientras que ninguna cepa de *S. auricularis* y *S. vitulinus* evidencio la producción de dicha enzima. Como se muestra en la figura 16.

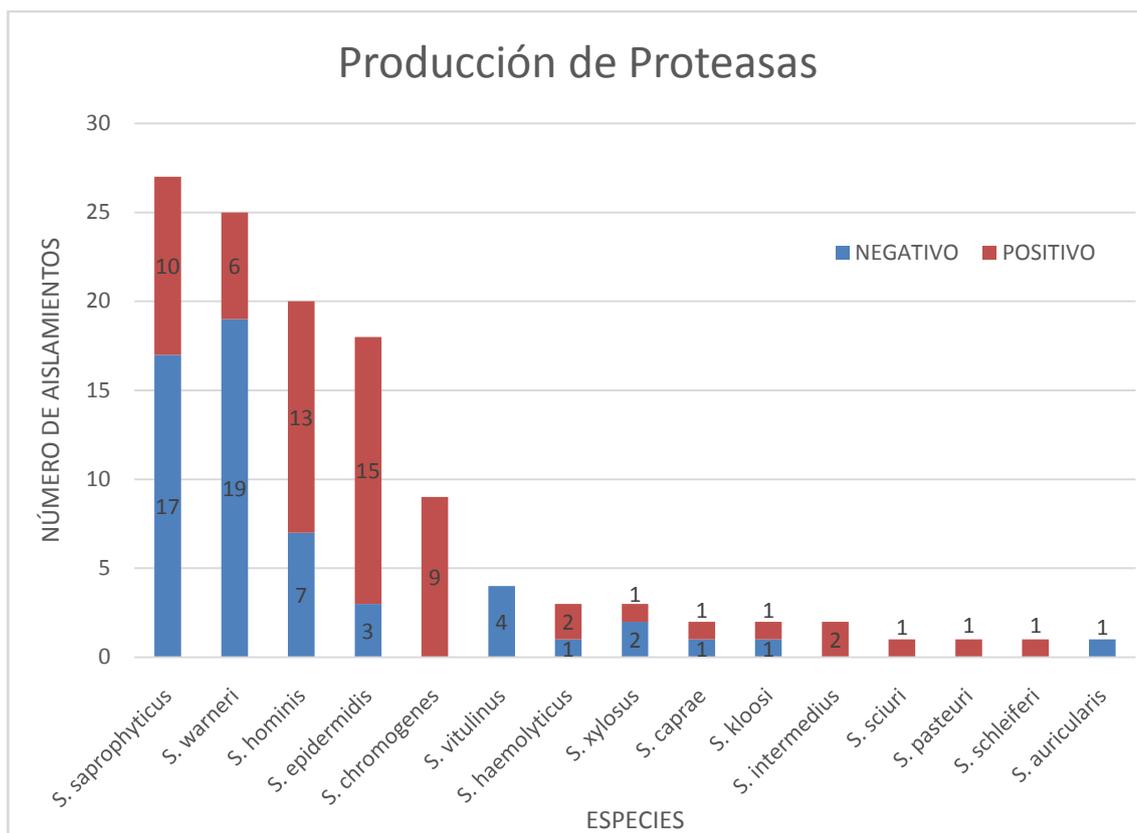


Figura No. 15 Aislamientos positivos y negativos a la actividad proteolítica por especie. El número de aislamientos positivos por especie se observan de color rojo y en azul el número de aislamientos negativos por especie.

6.2.5. Identificación de DNAsas

La producción de nucleasas tipo DNAsas se evidenció en el 16,8% (20/119) del total de cepas de SCN analizadas, en la figura 18 se muestra las frecuencias de los aislamientos positivos a la producción de esta enzima distribuidos por especies. Del total de los aislamientos productores 1 cepa (3.7%) correspondió a *S. saprophyticus*, 2 (8%) a *S. warneri*, 1 (5%) a *S. hominis*, 3 (16,7) a *S. epidermidis*, 9 (100%) a *S. chromogenes*, 1 (50%) a *S. caprae*, 2 (100%) a *S. intermedius* y 1 (100%) a *S. sciuri*.

Los resultados positivos y negativos se interpretaron como se muestra en la figura 17.

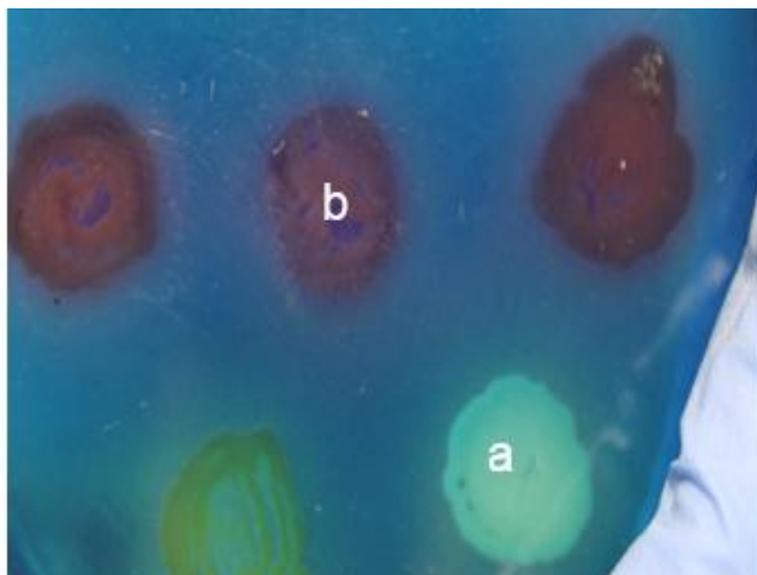


Figura No. 16 Resultados observados en agar DNAsa con azul de toluidina.
a. Aislamiento no productor de DNAsas **b.** Aislamiento productor de DNAsas.

Ninguna cepa de los microorganismos caracterizados como *S. pasteurii*, *S. schleiferi*, *S. auricularis*, *S. vitulinus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum* y *S. kloosii* presentaron producción de DNAsas.

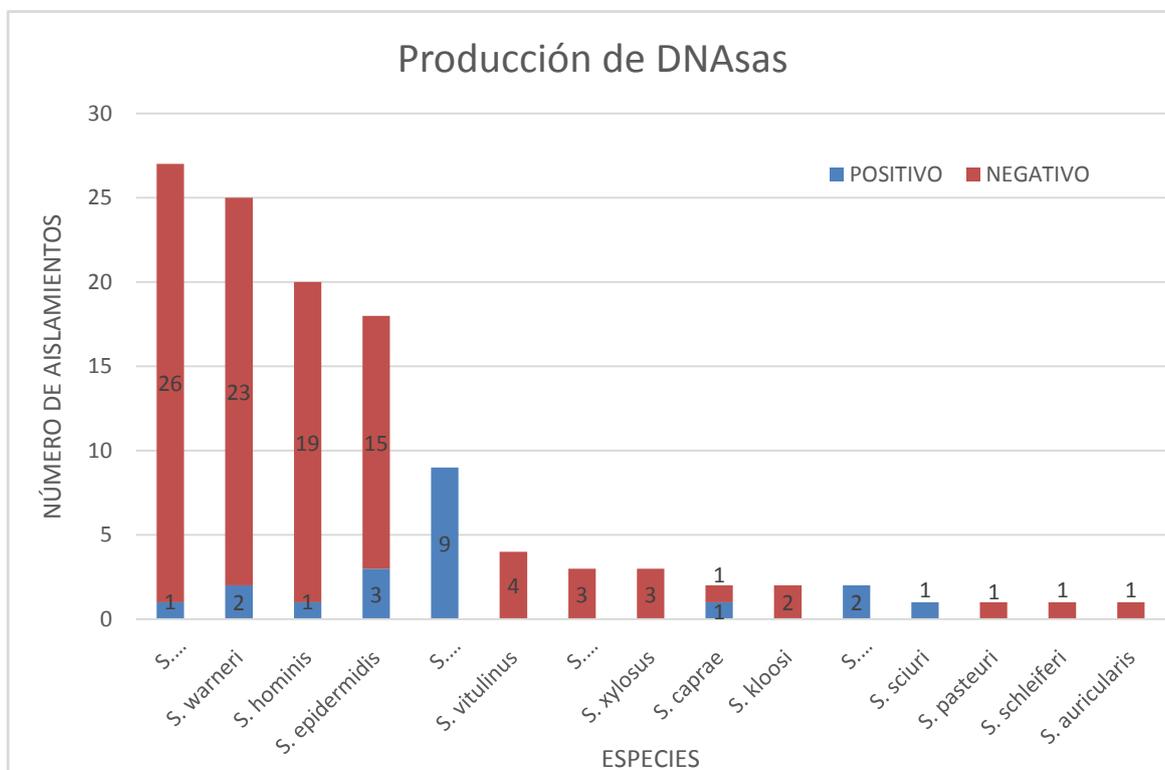


Figura No. 17 Número de aislamientos positivos y negativos para la producción de DNAsas. El número de aislamientos positivos por especie se observan de color rojo y en azul el número de aislamientos negativos por especie.

6.2.6. Presencia de factores de virulencia en los aislamientos de SCN por especie

Con el fin de correlacionar la presencia de más de un factor de virulencia en cada uno de los aislamientos de SCN, se realizó la tabla 9, en la cual se distribuyen la cantidad de aislamientos positivos dentro de una misma especie para uno, dos, tres o cuatro de los factores estudiados.

Se encontró que la mayoría de los aislamientos estudiados presentaban al menos un factor de virulencia (36.1%), siendo el más prevalente las hemolisinas con un 55.9% de las especies que presentaban solo un factor de virulencia, seguido por las proteasas y las lipasas, que presentaron un 41.9% y un 2.2% respectivamente.

La presencia de dos factores de virulencia se evidenció en un total de 35 aislamientos (29.4%), siendo la presencia de proteasas y hemolisinas la combinación más prevalente hallada en este estudio con 17 aislamientos; la actividad proteolítica se halló también combinada con actividad lipolítica y de endonucleasas, en un 22.9% y 14.3% respectivamente.

Un total de 24 aislamientos (20.2%) no presentaron ninguna de las enzimas estudiadas, lo que podría relacionarse con una menor capacidad patológica; la presencia de tres factores enzimáticos se halló en un total de 14 cepas (11.8%), la relación proteasas, lipasas y DNAsas, fue la de mayor prevalencia dentro de estas 14 cepas, con un total de 5 aislamientos que presentaban esta combinación; tan solo 3 cepas expresaron cuatro factores enzimáticos de los estudiados, encontrando 2 aislamientos que presentaban hemolisinas, proteasas, DNAsas y lipasas y 1 aislamiento que presentaba lipasas, hemolisinas, proteasas y lecitinasas.

Ninguno de los aislamientos estudiados expresó la totalidad de las enzimas involucradas en este estudio.

Tabla 9 Expresión de los factores de virulencia estudiados por cada uno de los aislamientos SCN distribuidos por especie

ESPECIES	FACTORES DE VIRULENCIA																	TOTAL
	NF	1 FACTOR			2 FACTORES						3FACTORES					4 FACTORES		
		P	H	L	P/H	P/D	P/L	H/LE	D/L	L/LE	P/H/D	P/H/L	H/LE/L	P/LE/L	P/L/D	P/H/D/L	P/H/L/LE	
<i>S. saprophyticus</i>	17	8	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	27
<i>S. warneri</i>	0	0	13	0	3	1	0	2	1	1	0	0	2	1	0	0	1	25
<i>S. hominis</i>	1	3	6	0	8	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	20
<i>S. epidermidis</i>	2	5	0	1	1	0	4	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	18
<i>S. chromogenes</i>	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	9
<i>S. vitulinus</i>	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<i>S. haemolyticus</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. xylosus</i>	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. caprae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. kloosi</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. intermedius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
<i>S. sciuri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>S. pasteurii</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. schleiferi</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. auricularis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL	24	18	24	1	17	8	5	2	2	1	3	3	2	1	5	2	1	119

NF: Ningún Factor; P: Proteasas; H: Hemolisinas; L: Lipasas; LE: Lecitinasas; D: DNAsas

6.3. DETECCIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELICULA

6.3.1. Análisis fenotípico

6.3.1.1. Producción de exopolisacáridos mediante el Agar Rojo Congo (ARC)

Los resultados evidenciados en la formación de las colonias sobre el agar fueron evaluados de acuerdo a las características macroscópicas que estas presentaban. Los microorganismos fuertemente productores de slime se caracterizaban por la presencia de colonias negras, de consistencia seca, rugosa y cristalina; se consideraron como productores intermedios, a aquellas cepas que presentaban colonias rojas a marrón con consistencia seca, mientras que los no productores se identificaron por la formación de colonias rojas sin consistencia seca, estos resultados se evidencian en la figura 19 la coloración producida en el medio se debe a la interacción de los exopolisacáridos con el colorante rojo congo.

La producción de slime evaluada mediante el agar rojo congo evidenció que el 73% (87/119) de las cepas analizadas eran productoras de slime en diferentes grados, el 5% (6) y el 68% (81) fueron productoras fuertes e intermedias de slime respectivamente, mientras que el 27% (32/119) fueron no productoras. La distribución de especies en los diferentes grados de producción de muestra en la Tabla 10 y la figura 20.

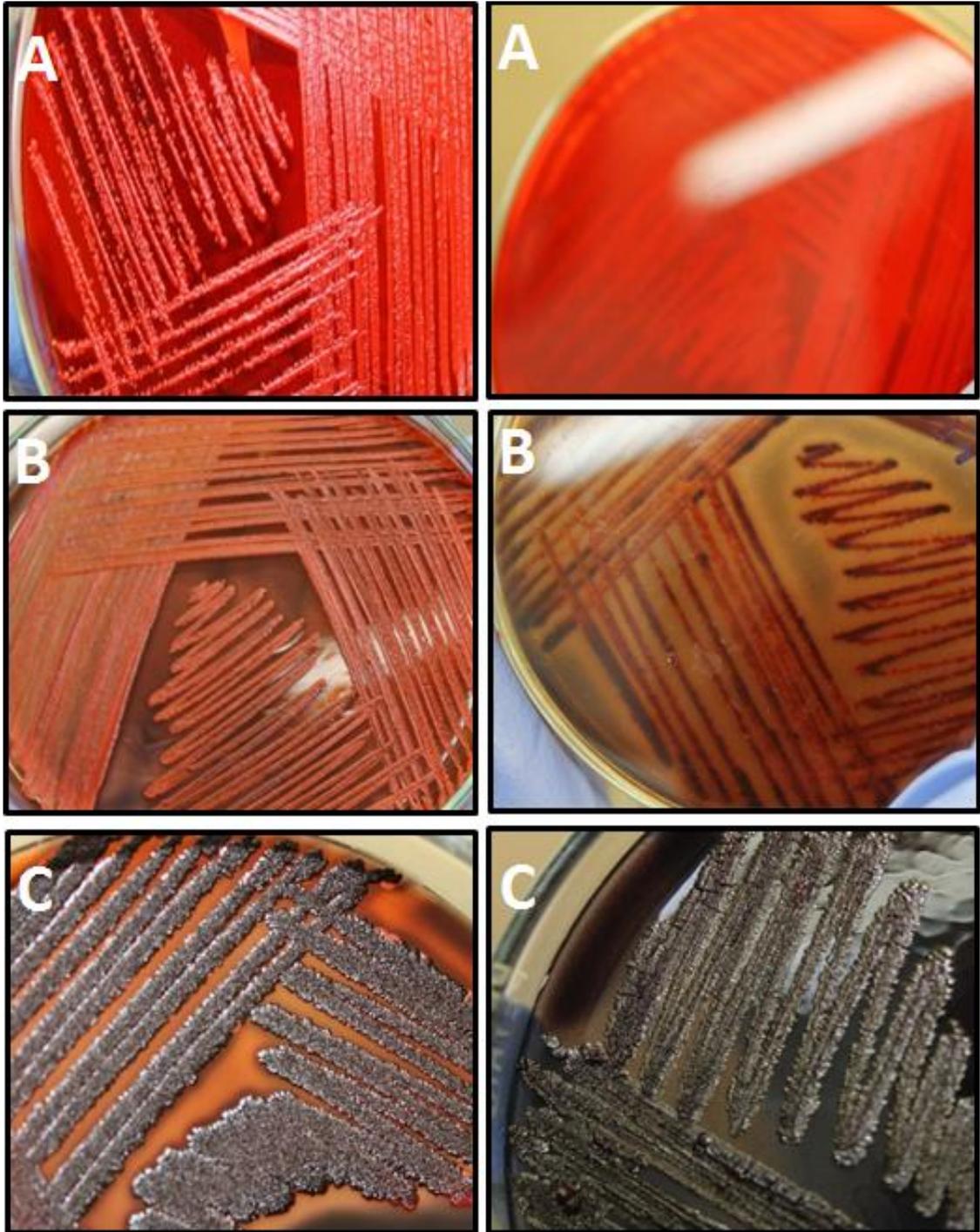


Figura No. 18 *Morfología de las colonias observadas en ARC.* **A) Izquierda** Colonias rojas sin consistencia seca no productoras de slime. **Derecha** anverso de la caja no se observa precipitado del colorante **B) Izquierda** Colonias rojas con consistencia seca producción intermedia de slime. **Derecha** anverso de la caja se observa precipitado del colorante de color negro **C) Derecha e Izquierda.** Colonias negras con consistencia seca rugosa fuertes productoras de slime.

Tabla 10 Grado de producción de slime en ARC por especie.

ESPECIE	N	No. (%) de aislamientos			TOTAL PRODUCTORES
		FUERTE	INTERMEDIO	NO PRODUCTORES	
<i>S. saprophyticus</i>	27	2 (7.4)	25 (92.6)	0 (0)	27
<i>S. warneri</i>	25	0(0)	18 (72)	7 (28)	18
<i>S. hominis</i>	20	0 (0)	7 (35)	13 (65)	7
<i>S. epidermidis</i>	18	2 (11.1)	12 (66.7)	4 (22.2)	14
<i>S. chromogenes</i>	9	0 (0)	9 (100)	0 (0)	9
<i>S. vitulinus</i>	4	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0
<i>S. haemolyticus</i>	3	0 (0)	2 (66.7)	1 (33.3)	2
<i>S. xylosus</i>	3	0 (0)	3 (100)	0 (0)	3
<i>S. caprae</i>	2	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2
<i>S. kloosi</i>	2	0 (0)	1 (50)	1 (50)	1
<i>S. intermedius</i>	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2
<i>S. sciuri</i>	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
<i>S. pasteurii</i>	1	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0
<i>S. schleiferi</i>	1	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0
<i>S. auricularis</i>	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
TOTAL	119	6	81	32	87

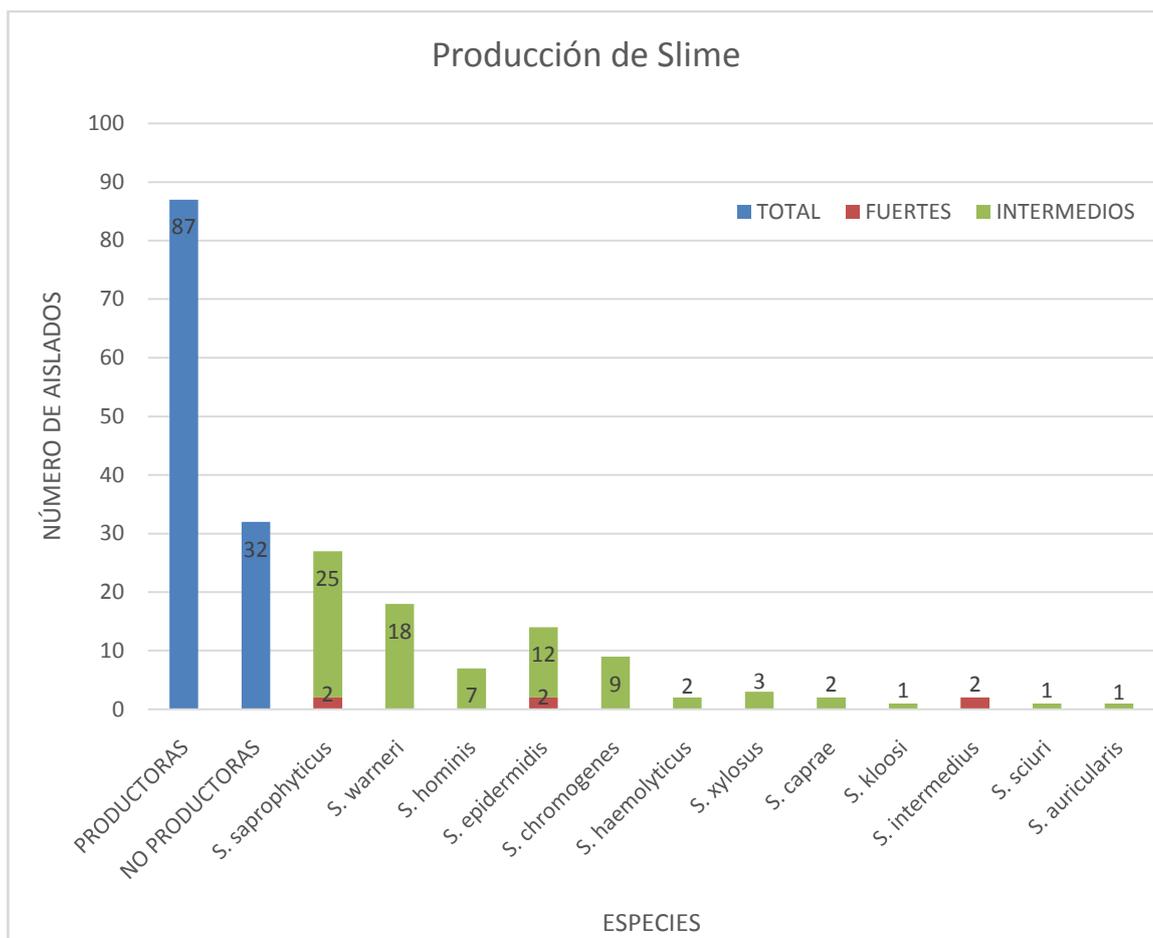


Figura No. 19 Aislamientos productores y no productores de slime y grados de producción por especie. En color azul se muestran los aislamientos productores y no productores de slime, del total de positivos, en verde se muestran los productores intermedios y en rojo los fuertes productores por especie.

6.3.1.2. Detección de la adherencia por el método de microplaca

Los resultados obtenidos en el ensayo en microplaca se muestran en la tabla 11 mientras que en la figura 21 se observan los diversos grados de adherencia a microplaca producida por los SCN.

Se evidenció que 105 cepas (88.2%) fueron productoras de biopelícula, además, la totalidad de las especies de *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. vitulinus*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum*, *S. caprae*, *S. intermedius*, *S. sciuri* y *S. auricularis* presentaron un grado de adherencia dentro de los pozos de microtitulación empleados en el ensayo.

Cabe resaltar que todas las cepas de *S. vitulinus*, *S. intermedius* y *S. auricularis* fueron todas fuertemente formadoras de biopelícula en microplaca

Tabla 11 Resultados obtenidos en microplaca por especie

ESPECIE	N	No. (%) de aislamientos				TOTAL PRODUCTORES
		FUERTE	MODERADO	DEBIL	NEGATIVO	
<i>S. saprophyticus</i>	27	4 (14.8)	2 (7.4)	19 (70.4)	2 (7.4)	25
<i>S. warneri</i>	25	5 (20.0)	2 (8.0)	15 (60.0)	3 (12.0)	22
<i>S. hominis</i>	20	3 (15.0)	0 (0)	11 (55.0)	6 (30.0)	14
<i>S. epidermidis</i>	18	3 (16.7)	4 (22.2)	11 (61.1)	0 (0)	18
<i>S. chromogenes</i>	9	1 (11.1)	0 (0)	8 (88.9)	0 (0)	9
<i>S. vitulinus</i>	4	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4
<i>S. haemolyticus</i>	3	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	3
<i>S. xylosus</i>	3	1 (33.3)	0 (0)	2 (66.7)	0 (0)	3
<i>S. caprae</i>	2	1 (50)	0 (0)	1 (50.0)	0 (0)	2
<i>S. kloosi</i>	2	0 (0)	0 (0)	1 (50.0)	1 (50.0)	1
<i>S. intermedius</i>	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2
<i>S. sciuri</i>	1	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1
<i>S. pasteurii</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0
<i>S. schleiferi</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0
<i>S. auricularis</i>	1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1
TOTAL	119	25 (21.0)	8 (6.7)	72 (60.5)	14 (11.8)	105

6.3.2. Resultados Agar Rojo Congo vs Microplaca

Los resultados obtenidos en microplaca se muestran en la figura 22, después de realizar todo el procedimiento mencionado anteriormente, y cuyas absorbancias fueron medidas en lector de placas de ELISA, bajo la longitud de onda de 570nm, catalogando los aislamientos en negativos, débiles, moderados o fuertes productores de biopelícula en dichas microplacas.

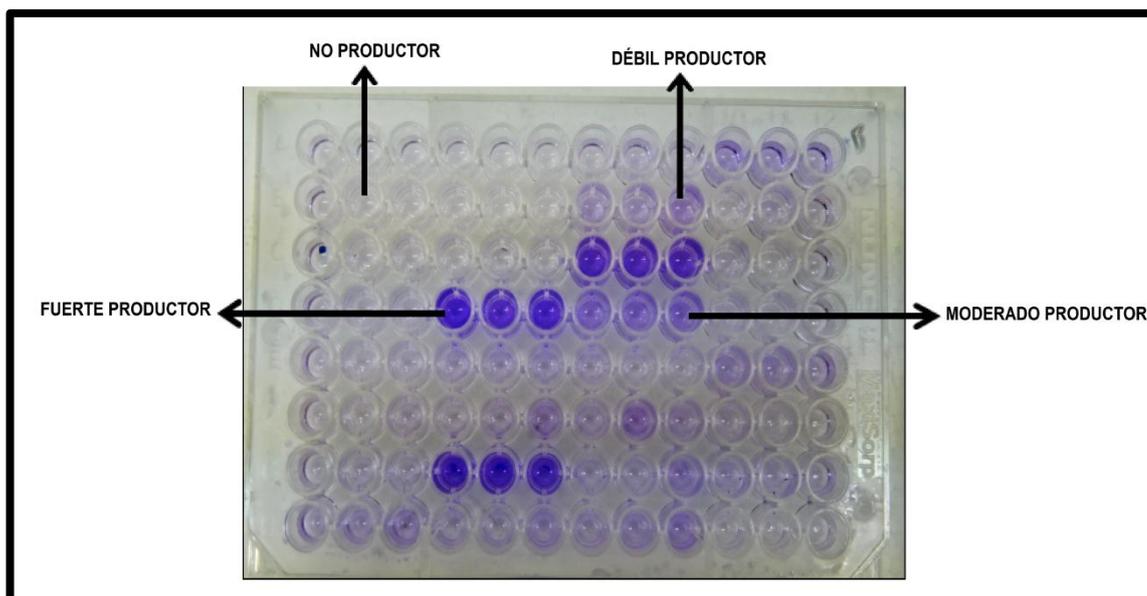


Figura No. 20 Resultados obtenidos en microplaca bajo la coloración con cristal violeta al 2%.

La tabla 12 fue realizada con el fin de comparar los resultados obtenidos en ARC y la adherencia a la placa de poliestireno.

De las 35 cepas negativas en ARC, 21 fueron positivas en el ensayo de microplaca con diferentes grados de producción (14 débiles y 7 fuertes), 14 cepas fueron negativas en ambos métodos y 84 (70,5%) aislamientos fueron positivos.

En la figura 22 se presenta la correlación entre los resultados positivos obtenidos en los diferentes métodos empleados para la determinar la formación de biopelícula.

Tabla 12 Comparación de los resultados obtenidos en ARC y microplaca.

ESPECIES	AGAR ROJO CONGO		MICROPLACA			
		N	NEGATIVO	DÉBIL	MODERADO	FUERTE
<i>S. saprophyticus</i>	FUERTE	2	0	0	0	2
	INTERMEDIO	25	2	19	2	2
<i>S. warneri</i>	INTERMEDIO	18	0	11	2	5
	NEGATIVO	7	3	4	0	0
<i>S. hominis</i>	INTERMEDIO	7	0	6	0	1
	NEGATIVO	13	6	5	0	2

<i>S. epidermidis</i>	FUERTE	2	0	0	0	2
	INTERMEDIO	12	0	8	4	0
	NEGATIVO	4	0	3	0	1
<i>S. chromogenes</i>	INTERMEDIO	9	0	8	0	1
<i>S. vitulinus</i>	NEGATIVO	4	0	0	0	4
<i>S. haemolyticus</i>	INTERMEDIO	1	0	1	0	0
	NEGATIVO	2	0	2	0	0
<i>S. xylosus</i>	INTERMEDIO	3	0	2	0	1
<i>S. caprae</i>	INTERMEDIO	2	0	1	0	1
<i>S. kloosi</i>	INTERMEDIO	1	0	1	0	0
	NEGATIVO	1	1	0	0	0
<i>S. intermedius</i>	FUERTE	2	0	0	0	2
<i>S. sciuri</i>	INTERMEDIO	1	0	1	0	0
<i>S. pasteurii</i>	NEGATIVO	1	1	0	0	0
<i>S. schleiferi</i>	NEGATIVO	1	1	0	0	0
<i>S. auricularis</i>	INTERMEDIO	1	0	0	0	1

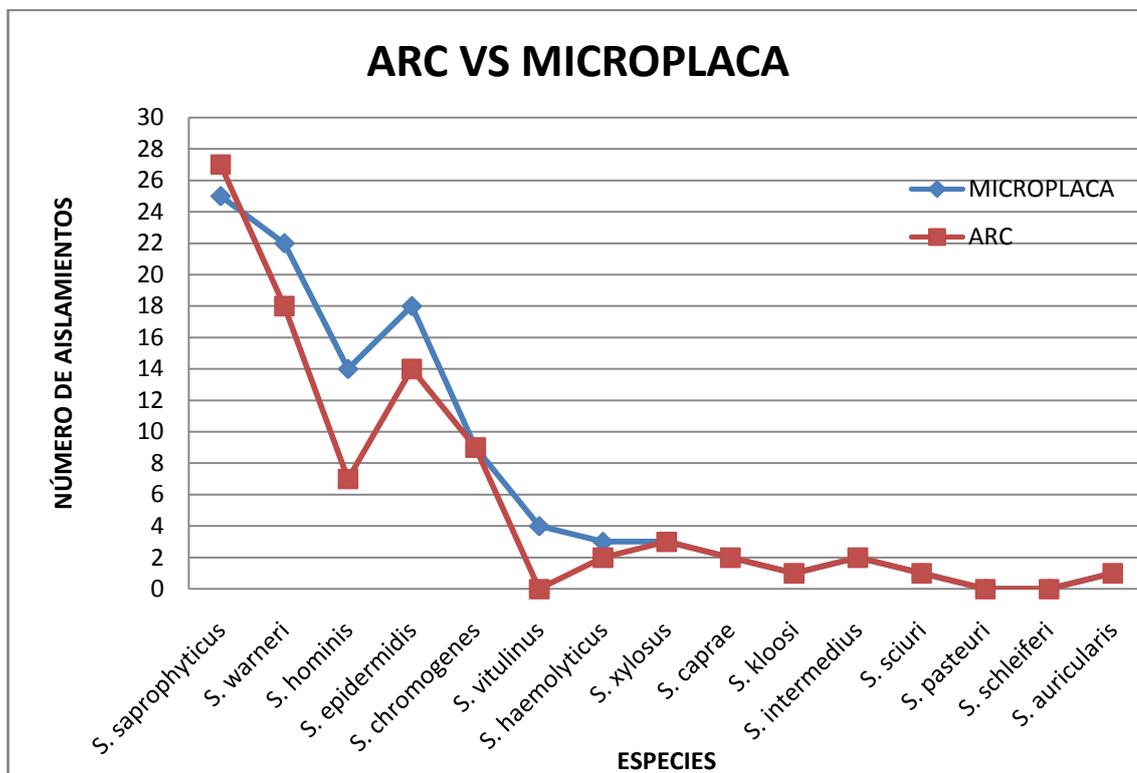


Figura No. 21 Correlación entre los resultados obtenidos en Agar Rojo Congo y Microplaca.

6.3.3. Análisis genotípico

6.3.3.1. Amplificación gen *eno*

A continuación (Figura 23) se observan los resultados obtenidos al realizar electroforesis de los productos de amplificación procedentes de la PCR para el gen *eno*, con una banda de 302bp, utilizando como control positivo *S. aureus* ATCC 25923 y como control negativo agua tipo PCR.

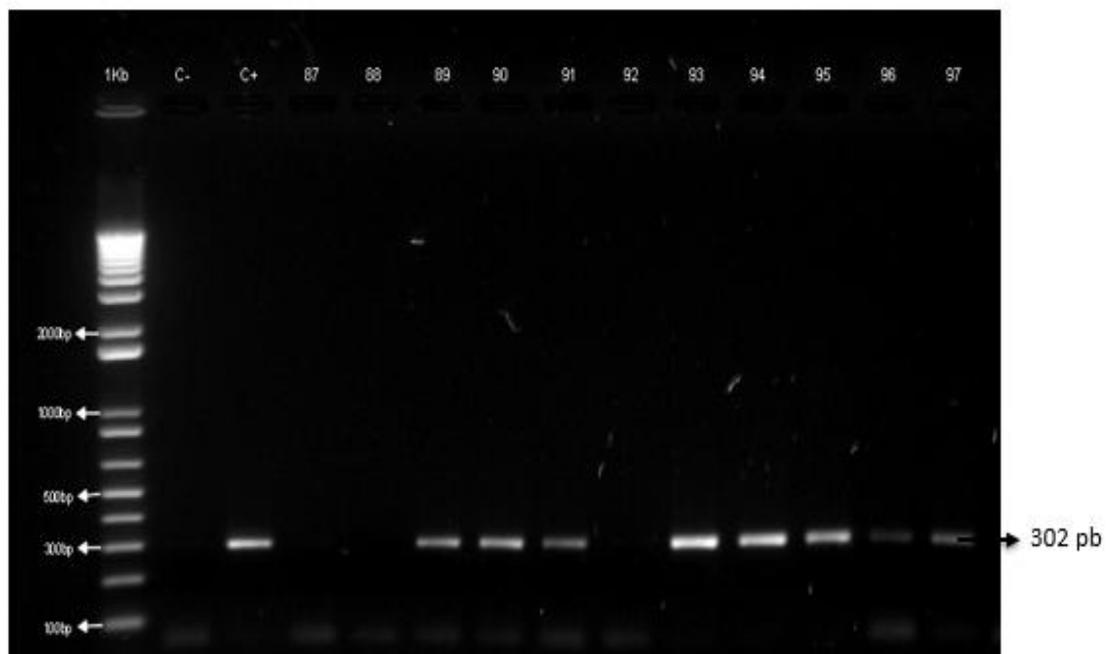


Figura No. 22 Electroforesis en gel de Agarosa 1.5%. Marcador de tamaño molecular 1Kb, Control negativo (C-), Control positivo (C+) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Aislamientos positivos 89, 90,91, 93, 94,95, 96 y 97, Aislamientos negativos 87, 88 y 92; para gen *eno* banda de 302 pb.

El gen *eno* que codifica para la proteína de unión a la laminina fue detectado en 98 (82,4%) aislamientos de los 119 estudiados. Encontrándose que el 100% de los aislamientos correspondientes a *S. vitulinus*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. pasteurii*, *S. schleiferi* y *S. auricularis* presentaban este gen; mientras que otras especies como *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* y *S.*

warneri presentaron un porcentaje similar de presencia del gen (88%). En ningún aislamiento de *S. caprae* se evidenció la presencia de este gen.

Los resultados obtenidos para cada una de las especies se muestran en la tabla 13y Figura 24

Tabla 13 Presencia del gen *eno* dentro de las especies de SCN estudiadas.

ESPECIES	N	<i>Eno</i> ⁺		<i>Eno</i> ⁻	
		n	%	n	%
<i>S. saprophyticus</i>	27	24	88,9	3	11,1
<i>S. warneri</i>	25	22	88,0	3	12,0
<i>S. hominis</i>	20	14	70,0	6	30,0
<i>S. epidermidis</i>	18	16	88,9	2	11,1
<i>S. chromogenes</i>	9	6	66,7	3	33,3
<i>S. vitulinus</i>	4	4	100,0	0	0,0
<i>S. haemolyticus</i>	3	3	100,0	0	0,0
<i>S. xylosus</i>	3	2	66,7	1	33,3
<i>S. caprae</i>	2	0	0,0	2	100,0
<i>S. kloosi</i>	2	1	50,0	1	50,0
<i>S. intermedius</i>	2	2	100,0	0	0,0
<i>S. sciuri</i>	1	1	100,0	0	0,0
<i>S. pasteurii</i>	1	1	100,0	0	0,0
<i>S. schleiferi</i>	1	1	100,0	0	0,0
<i>S. auricularis</i>	1	1	100,0	0	0,0
TOTAL	119	98	82,4	21	17,6

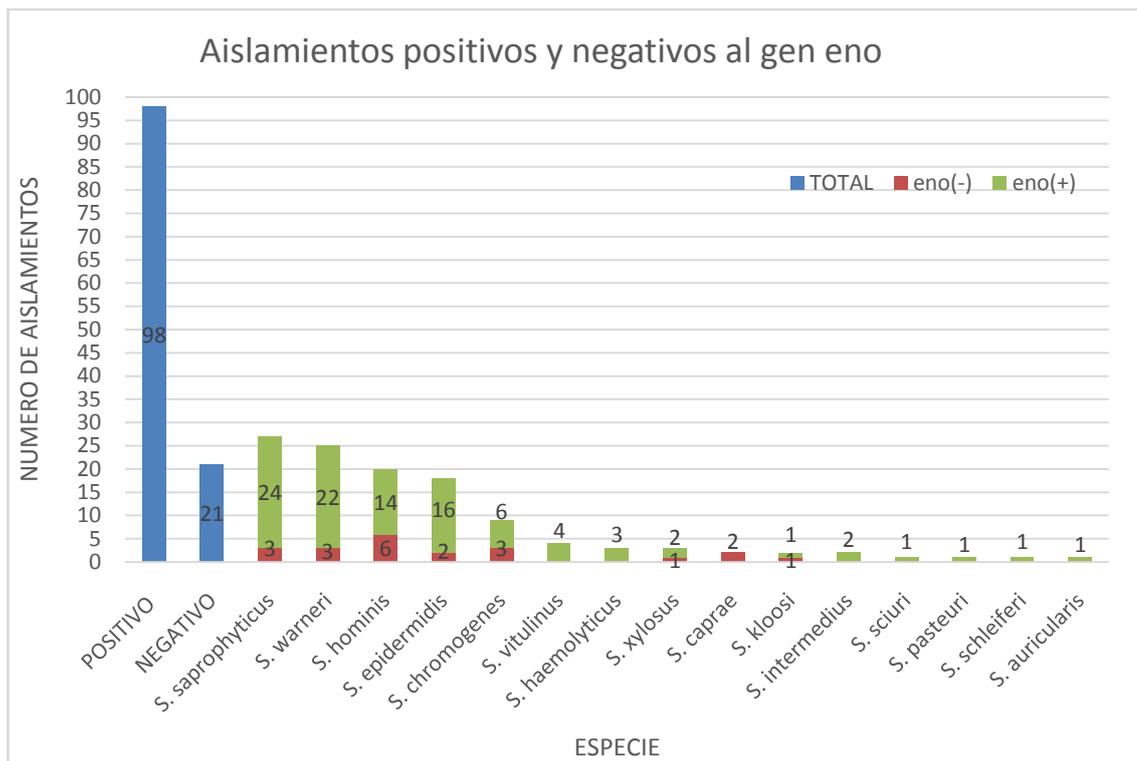


Figura No. 23 Aislamientos positivos y negativos al gen *eno* por especie. La totalidad de aislamientos positivos y negativos se presentan de color azul, los aislamientos positivos al gen *eno* se evidencian en color verde mientras que los aislamientos negativos se muestran en color rojo.

6.3.3.2. Amplificación gen *bap*

En la figura 25 se muestran los resultados obtenidos para la amplificación del gen *bap*, corridos en gel de Agarosa al 1%, utilizando como control un aislamiento positivo encontrado en este estudio y observando el pozo 17 positivo a dicho gen con una banda de 971bp.

La presencia del gen que codifica para la proteína asociada al biofilm (*bap*) solamente se evidenció en 2 cepas (1.7%) del total de aislamientos estudiados.

estas correspondían a *S. xylosum* y *S. epidermidis*.

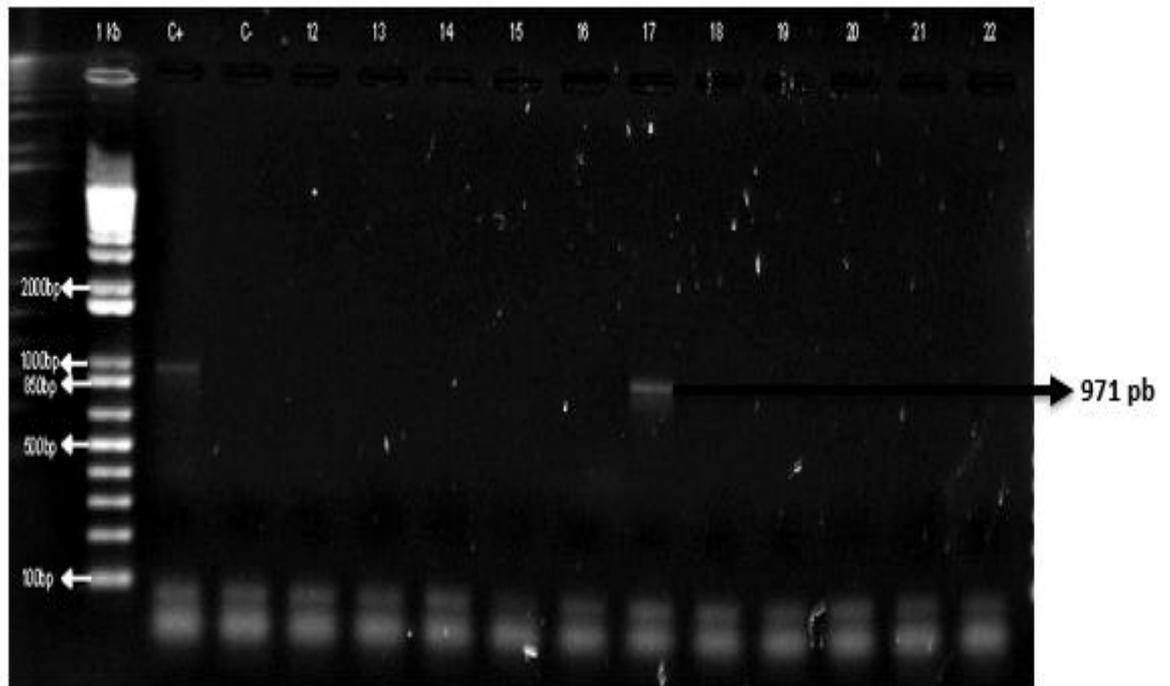


Figura No. 24 Electroforesis en gel de Agarosa 1%, resultado positivo 17, gen *bap* banda de 971bp.

6.3.4. Correlación entre los resultados obtenidos en microplaca y la expresión de los genes *eno* y *bap*.

Del total de cepas positivas al gen *eno*, 11 aislamientos se encontraron como negativos a la formación de biopelícula mediante el método de microplaca, mientras que los 87 aislamientos restantes presentaron formación en diferentes grados. 59 (68%) fueron productores débiles, 7 (8%) productores moderados y 21 (24%) productores fuertes resultados que se muestran en la tabla 14.

Respecto a la presencia del gen *bap* se encontró que los dos aislamientos caracterizados como *S. xylosum* y *S. epidermidis* que presentaban este gen eran fuertes productores de biopelícula mediante el método de microplaca, sin embargo otras especies que fueron fuertes productoras de biopelícula mediante este método no presentaron este gen.

Tabla 14 Comparación de los resultados obtenidos en el método de microplaca respecto a la presencia del gen *eno* y *bap*

ESPECIES	MICROPLACA		eno+		bap+	
	RESULTADO	N	n	%	n	%
<i>S. saprophyticus</i>	NEGATIVO	2	2	100	0	0
	DEBIL	19	17	89.5	0	0
	MODERADO	2	2	100	0	0
	FUERTE	4	3	75	0	0
<i>S. warneri</i>	NEGATIVO	3	3	100	0	0
	DEBIL	15	13	86.7	0	0
	MODERADO	2	1	50	0	0
	FUERTE	5	5	100	0	0
<i>S. hominis</i>	NEGATIVO	6	4	66.7	0	0
	DEBIL	11	8	72.7	0	0
	FUERTE	3	2	66.7	0	0
<i>S. epidermidis</i>	DEBIL	11	9	81.8	0	0
	MODERADO	4	4	100	0	0
	FUERTE	3	3	100	1	5.5
<i>S. chromogenes</i>	DEBIL	8	6	75	0	0
	FUERTE	1	0	0	0	0
<i>S. vitulinus</i>	FUERTE	4	4	100	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	DEBIL	3	3	100	0	0
<i>S. xyloso</i>	DEBIL	2	1	50	0	0
	FUERTE	1	1	100	1	33.3
<i>S. caprae</i>	DEBIL	1	0	0	0	0
	FUERTE	1	0	0	0	0
<i>S. kloosi</i>	NEGATIVO	1	0	0	0	0
	DEBIL	1	1	100	0	0
<i>S. intermedius</i>	FUERTE	2	2	100	0	0
<i>S. sciuri</i>	DEBIL	1	1	100	0	0
<i>S. pasteurii</i>	NEGATIVO	1	1	100	0	0
<i>S. schleiferi</i>	NEGATIVO	1	1	100	0	0
<i>S. auricularis</i>	FUERTE	1	1	100	0	0
TOTAL		119	98		2	

7. Relación entre los diversos ensayos asociados a la biopelícula

La tabla 15 fue realizada con el fin de correlacionar los resultados obtenidos en las diferentes metodologías empleadas durante el estudio, que permitieron determinar la producción de slime, adherencia y genes asociados a la formación de biopelícula por SCN.

La producción de slime, la adherencia a microplaca y la presencia del gen *eno* se observó en un total de 69 aislamientos que representaron el 58% del total de los aislamientos estudiados; dicha relación, fue la mayormente encontrada entre las especies estudiadas.

Un total de 12 aislamientos fueron positivos a uno de los factores asociados a la biopelícula, de ellos, 9 únicamente presentaron el gen *eno* y los 3 aislamientos restantes solo fueron positivos al ensayo de microplaca.

Solo un aislamiento perteneciente a *S. epidermidis*, fue positivo a todos los ensayos realizados para la formación de biopelícula, es decir, produjo slime en agar rojo congo, presentó adherencia en microplaca y fue positivo a los genes *eno* y *bap*.

Tabla 15 Aislamientos productores de biopelícula. Asociaciones observadas entre los resultados obtenidos para los diferentes ensayos realizados.

FORMACION DE BIOPELICULA POR SCN									
ESPECIES	MTP	eno	ARC/MTP	ARC/eno	MTP/eno	ARC/MTP/eno	ARC/MTP/bap	ARC/MTP/eno/bap	TOTAL PRODUCTORES
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	3	2	0	22	0	0	27
<i>S. warneri</i>	1	3	2	0	3	16	0	0	25
<i>S. hominis</i>	1	4	3	0	6	4	0	0	18
<i>S. epidermidis</i>	1	0	1	0	3	12	0	1	18
<i>S. chromogenes</i>	0	0	3	0	0	6	0	0	9
<i>S. vitulinus</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	4
<i>S. haemolyticus</i>	0	0	0	0	1	2	0	0	3
<i>S. xylosus</i>	0	0	0	0	0	2	1	0	3
<i>S. caprae</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>S. kloosi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>S. intermedius</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>S. sciuri</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>S. pasteurii</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. schleiferi</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. auricularis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1
TOTAL	3	9	14	2	17	69	1	1	116

MTP: Adherencia a microplaca, **ARC:** Agar Rojo Congo.

8. DISCUSIÓN

Se han realizado pocos estudios acerca de los factores de virulencia en los SCN procedentes de mastitis bovina, dada la poca relevancia que se les otorgaba como agentes causales de mastitis. La dificultad para unificar criterios de aceptación como agentes infecciosos dentro de procesos mastíticos también incrementa el desconocimiento y por ende, se encuentra poca investigación acerca de los mecanismos y herramientas invasivas que utilizan estos microorganismos para colonizar y persistir en la glándula mamaria.

En lo que refiere a la actividad hemolítica, los resultados obtenidos evidenciaron que de las 119 cepas de SCN estudiadas, un 42% de ellas (50) presentó actividad hemolítica en la siembra en agar sangre, estos resultados son comparables con los obtenidos por B. Kot y col²², quienes evaluaron la actividad hemolítica de 139 cepas aisladas de bovinos con evidencia de mastitis y encontraron que, el 56% de las cepas presentaron α o β hemólisis bajo el cultivo de agar sangre, además, en su estudio, *S. xylosus* fue el que mayor actividad hemolítica presentó, con un total de 36 cepas de las 58 aisladas como agentes mastíticos; estos resultados, no son comparables con los obtenidos en el presente estudio, la explicación a esto puede ser que tan solo se contó con 3 cepas de *S. xylosus* y ninguna de ellas presentó actividad hemolítica a las 48 horas de incubación.

B. Kot²² también encontró que las cepas de *S. sciuri* presentaban mayormente actividad de β hemólisis, lo que es comparable con el presente estudio en el cual la *S. sciuri* también presentó este tipo de hemólisis; aunque, la comparación puede ser complicada debido a que en el presente estudio tan solo cuenta con 1 cepa de *S. sciuri*, mientras que B. Kot²², logró el aislamiento de 24 cepas de esta especie.

La actividad hemolítica de *S. warneri* alcanzó un 84% de las cepas, resultado un poco elevado al compararlo con la literatura, dado que, por ejemplo, Wesley y col⁸⁹, estudiaron la actividad hemolítica de *S. warneri* con el fin de establecer

un patrón de identificación, del cual se desprendió un resultado de cepas positivas a hemolisis de 44%; así mismo, M. Bochniarz y col²⁴ al analizar la actividad hemolítica de *S. warneri* encontraron que ninguna de sus cepas expresaba dicha actividad, sin embargo, se debe tener en consideración que su estudio solo conto con 3 cepas de dicha especie.

Bochniarz²⁴ también describió la actividad hemolítica de *S. xylosus*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. hominis* y *S. saprophyticus* de muestras procedentes de bovinos con mastitis, sus resultados mostraron que *S. haemolyticus*, fue el único que presentó hemolisis en un 84% (21) de las cepas estudiadas; estos resultados son comparables a los obtenidos en este estudio para las cepas de *S. xylosus* y *S. chromogenes* que tampoco presentaron actividad hemolítica, así como *S. haemolyticus* en el que no todas las cepas presentaron una hemolisis evidente en el agar; tan solo dos cepas (7.4%) de *S. saprophyticus* presentaron actividad hemolítica del total de 27 estudiadas, lo que es comparable con los resultados de Wesley⁸⁹ en donde demuestra que tan solo el 3% de las cepas que el incluyo en su estudio (83) mostraron hemolisis.

La importancia de la actividad hemolítica en las especies de SCN aisladas de mastitis subclínica o clínica, radica en la acción citolítica que presenta esta enzima y su capacidad para destruir las membranas de los eritrocitos con el fin de liberar el hierro que se encuentra unido a la hemoglobina al interior del glóbulo; L. Chaneton y col¹⁰⁰, describieron agentes quelantes de hierro, como la lactoferrina y la transferrina presentes en la leche y fluidos corporales de los bovinos que generan un efecto bactericida y/o bacteriostático sobre los patógenos causales de IMI, y atribuyeron este efecto a la capacidad de retener el hierro y también a su efecto adhesivo a la superficie bacteriana, demostrando la importancia que adquiere el hierro en el desarrollo de las infecciones intramamarias.

Los SCN estudiados, demostraron tener poca actividad de lecitinasas, con tan solo 7 cepas productoras (5.9%), y en su totalidad las cepas correspondían a *S. warneri*; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Matsumoto y col⁹⁰ quienes estudiaron un total de 193 cepas de SCN de las cuales tan solo el

9.32%(18 cepas) produjeron degradación de las lecitinas presentes en el agar yema de huevo.

La comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio no fue posible debido a la falta de bibliografía en la cual se evaluara la actividad de cepas procedentes de mastitis bovina, por ende, se compararon los resultados con los obtenidos por María Lourdes de Souza⁹⁶ en cepas de SCN aislados de recién nacidos remitidas al departamento de pediatría, Universidad Estadual Paulista (Brasil), el cual conto con un total de 117 cepas de las cuales solo el 3.4% (4 cepas) presentaron actividad de esta enzima; de estas, dos cepas de *S. warneri* fueron positivas a la prueba.

Un total de 23 cepas presentaron actividad lipolítica en el agar Tween 80, lo que representa un 19.3% de cepas positivas, B. Kot²² y col reportaron 35 cepas positivas para la producción de lipasas representando un 25.7% de la población estudiada, resultado que se asemeja al porcentaje obtenido en el presente estudio; por el contrario, Cesar Bonetto⁹³, reportó que el 41% de las cepas estudiadas presentaron actividad lipolítica en agar Baird-Parker y Perez-Ordoño⁷⁷ demostró que el 64.23% de las cepas mostraron lipólisis en medio suplementado con extracto de yema de huevo.

Así mismo, Perez-Ordoño⁷⁷, también encontró que el 86.3% de las cepas de *S. epidermidis* presentaron actividad lipolítica, mientras Kot²² evidenció que el 70% de sus cepas identificadas como *S. epidermidis* generaron resultado positivo en la prueba de lipasas, siendo este el más equiparable con los resultados obtenidos en este estudio donde 50% de las cepas fueron positivas a lipasas.

La única cepa de *S. sciuri*, presentó actividad lipolítica en agar Tween 80, mientras Kot²² reporta que 3 cepas de las 36 estudiadas para esta especie presentaron lipólisis. El 24% de las cepas de *S. warneri* fueron positivos para la prueba de lipasas realizada en este estudio, resultado equiparable con el obtenido por Cesar Bonetto⁹³ quien reporta que un 22% de las cepas de dicha especie presentaron actividad lipolítica.

Perez-Ordoyo⁷⁷ no reporta ninguna cepa de *S. hominis* productora de lipasas, pero en el presente estudio, 1 cepa (5%) presenta actividad lipolítica de las 20 estudiadas. Bonetto⁹³, reportó como resultado de su estudio, un 70.6% de cepas de *S. chromogenes* como positivas para lipasas, Perez-Ordoyo⁷⁷, registra un 40% de cepas positivas, mientras que en el presente estudio se establece esta actividad enzimática en un 33.3% de las cepas estudiadas.

Las 3 cepas de *S. haemolyticus* fueron negativas para lipasas, resultado que coincide con el reportado por Perez-Ordoyo⁷⁷; mientras que, Cesar Bonetto⁹³ reporta que 20.4% de las cepas de *S. haemolyticus* fueron positivas. El 33.3% de las cepas de *S. xylosus* fueron productores de lipasas, resultado que coincide con lo reportado por Perez-Ordoyo⁷⁷ y Cesar Bonetto⁹³ quienes encontraron un 43.9% y 33.3% respectivamente.

La actividad proteolítica fue evidenciada en 63 cepas de las estudiadas lo que representa un 53% del total de las cepas, estos resultados son comparables con los obtenidos por Matsumoto y col⁹⁰., quienes demostraron que un 51% de los SCN estudiados presentaron actividad proteolítica sobre agar caseína; al igual que Cesar Celestino Bonetto⁹³, quien reportó un 54.3% de cepas productoras de proteasas en este mismo medio; mientras que, M. Bochniarz²⁴, tan solo reportó 31% de actividad proteolítica en 100 cepas estudiadas, esta desviación puede deberse a la evaluación de las proteasas en agar gelatina y no en agares ricos en caseína como el agar leche.

La totalidad de las cepas de *S. chromogenes*, presentaron actividad proteolítica, resultado comparable con el obtenido por Bonetto⁹³, quien encontró que el 94.5% de las cepas de *S. chromogenes* presentaron proteólisis, así mismo, son equiparables los resultados obtenidos para *S. xylosus*, donde el autor reporta un 29.6% de positividad frente al 33.3% reportado en este estudio, así mismo, Luis Perez-Ordoyo⁷⁷ reportó un 46.34% de cepas positivas de *S. xylosus* para proteasas.

Los resultados de esta actividad proteolítica obtenidos para *S. epidermidis* en el presente estudio (83.3%) se encuentran aumentados en valor comparados con los obtenidos por otros autores como por ejemplo B. Kot²², quien solo reporta

un 35% de cepas positivas, así mismo, Perez-Ordoyo⁷⁷ solo reporta un 53.42% de cepas positivas a proteólisis.

De otro lado, Bochniarz²⁴ reportó que ninguna de las cepas de *S. haemolyticus* presentaba actividad proteolítica, resultado que se correlaciona con el hallado en el presente trabajo, en contraparte, Bonetto⁹³ quien describió que un total de 25.2% de las cepas de *S. haemolyticus* de su estudio presentaron proteólisis. De otro lado, un total de 6 cepas de (24%) de *S. warneri*, presentaron proteólisis durante el desarrollo del estudio, mientras que Bonetto⁹³ reportó una positividad 47.4% para las cepas de *S. warneri*.

En cuanto a *S. hominis*, se halló un total de 13 cepas positivas para proteólisis (65%) resultado que se encuentra intermedio en los obtenidos por Bochniarz²⁴ (0%) y Perez-Ordoyo⁷⁷ que reporto un 100% de positividad.

La actividad de la endonucleasa (DNAsa), fue reportada por Kot²² en un 19.55% de las cepas productoras de mastitis bovina, resultado que se correlaciona con el reportado en el presente estudio en el cual encontramos un 16.8% de cepas positivas a la actividad DNAsa; mientras que Perez-Ordoyo⁷⁷ encontró positivas a 46 cepas que representaron un 33.58%. Así mismo el 100% de las cepas de *S. chromogenes* analizadas fueron positivas para la actividad de endonucleasas, resultado similar reportó Perez-Ordoyo⁷⁷, quien demostró que la totalidad de las cepas de *S. chromogenes* fueron positivas a esta enzima.

Igualmente Perez-Ordoyo⁷⁷ describió que el 35.62% de las cepas de *S. epidermidis* eran positivas a DNAsas, mientras que, este estudio evidenció un 16.7% de positividad a esta prueba. En otro estudio Citak Sumruy col⁹¹., determinaron la actividad de DNAsas en 147 cepas de SCN, procedentes de muestras de leche cruda, encontraron que ninguna de las cepas de *S. saprophyticus* fue productora de DNAsas en agar DNA, resultado que se asemeja al obtenido en el presente estudio, donde se evidenció que solo una (1) cepa de *S. saprophyticus* fue productora de endonucleasas; así mismo, determinaron que *S. xylosus* y *S. haemolyticus* presentaban DNAsas en un 17.9% y 42.9% respectivamente, resultados que no son encontrados en el

presente estudio ya que, ninguna cepa de estas dos especies demostró la presencia de esta enzima; en cambio, Perez-Ordoño⁷⁷, reportó que ninguna cepa de *S. haemolyticus* presentaba actividad de endonucleasas, y que *S. xylosus* tan solo presentaba un 12.2% de positividad.

Sumru⁹¹ analizó también la capacidad de *S. hominis* para producir DNAsas, encontrando que 6 cepas (20.7%) fueron positivas, mientras que los resultados derivados del presente estudio evidencian que 1 cepa (5%) fue productora; Perez-Ordoño⁷⁷, reporta para esta misma especie 1 cepa positiva (50%).

Un total de 2 cepas (8%) de *S. warneri* presentaron actividad de DNAsas en este estudio, similar resultado reportó Bruce Langlois⁹², quien encontró que tan solo 1 cepa de 5 aisladas fue positiva para actividad de endonucleasa en cepas procedentes de leche bovina.

En cuanto a los exopolisacáridos o slime, considerados como factores de adherencia bacteriana, asociados a estructuras superficiales que les otorgan mayor o menor grado de fijación a las superficies; la evaluación de su producción mediante agar rojo congo es utilizado por muchos autores con el fin de determinar la capacidad de adherencia de distintas cepas de la familia *Staphylococcus* (B. Kot²², Perez-Ordoño⁷⁷, Li-Li⁷⁶, Tremblay⁷, Samah y Hanaa²⁴, entre otros). Es así como en el presente estudio un total de 87 aislamientos de los 119 empleados (73%) presentaron producción de slime en agar rojo congo, empleando la metodología descrita por Freeman⁸⁶.

De otro lado, Samah y Hanaa²⁴, realizaron el estudio de biopelícula en ARC, utilizando los mismos criterios empleados en este estudio, sus resultados son equiparables a los obtenidos en la presente investigación, ya que describen que un 72.1% de las cepas de SCN presentan producción de slime. Así mismo, Sumru y col⁹¹ contaron con 147 aislamientos de SCN procedentes de leche bovina, los cuales fueron evaluados para la producción de slime en ARC, encontrando que un total de 67 aislamientos (42.2%) fueron positivos.

Simojoki y col¹⁶, describieron la formación de biopelícula en SCN, utilizando diversos ensayos, uno de ellos fue la producción de slime en ARC, en dicho estudio, tan solo el 14.1% de los aislados (27/192) presentaron producción de

slime al suplementar el medio con glucosa; su metodología empleó una incubación de tan solo 24 horas a 37°C, esto podría influir directamente en los resultados obtenidos por Simojoki¹⁶, dado que, como demostró Perez-Ordoño⁷⁷, al cabo de 24 horas algunos aislamientos no se desarrollaban bien, además, con una incubación posterior de 24 horas a temperatura ambiente ($\pm 22^\circ\text{C}$) algunas colonias cambian su morfología, por lo que concluyó que la prolongación del tiempo de incubación favorecía el carácter diferencial del medio.

El carácter cualitativo y subjetivo de la interpretación de los resultados, así como las diferentes variaciones en cuanto a la preparación y lectura del medio ARC, representan un factor importante para la comparación de los resultados obtenidos por otros autores, es así, que *S. saprophyticus* dentro del presente estudio mostró un 100% de aislamientos productores de slime (27/27); mientras que Sumru⁹¹, con dos aislamientos de dicha especie, encontró que tan solo una fue productora de slime (50%); así mismo, Hjelm y Lundell⁹⁴, utilizando cepas aisladas de infecciones urinarias en humanos, demostraron que tan solo el 30% (9/30) de los aislados correspondientes a *S. saprophyticus* fueron positivos a la producción de slime.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio evidenció que los aislamientos correspondientes a *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. caprae*, *S. intermedius*, *S. sciuri* y *S. auricularis*, fueron 100% productores de slime en ARC; Beytullah Kenar y col⁹⁸ encontraron que los 4 aislamientos correspondientes a *S. chromogenes* fueron positivos a la producción de slime; mientras que, Perez-Ordoño⁷⁷ por su parte reporta para *S. chromogenes* 0 aislamientos positivos de 5 estudiados y para *S. xylosus* un 24.39% de positivos (10/41)

Sumru⁹¹, describe un total de 9 aislamientos de *S. xylosus* positivos para la producción de slime de un total de 28 estudiados, lo que representa un 32.1%; así mismo, Simojoki¹⁶ reporta que tan solo una cepa de *S. chromogenes* fue productora de slime de las 55 estudiadas representando un 1.8%. Nora Bedidi y col⁹⁵, contaron con un total de 165 cepas correspondientes a SCN procedentes de muestras de leche de cabra sin signos de mastitis, a las cuales

examinaron para la producción de slime, dentro de sus resultados, se encuentra que un 33% de las cepas de *S. caprae* (30/91) fueron productoras de slime resultado inferior al 100% encontrado en los resultados obtenidos en el presente estudio teniendo en cuenta que tan solo se contaba con dos aislamientos de dicha especie; los resultados para *S. xylosus* muestran que un 70% (25/36) de aislamientos fueron positivos, en su estudio también se describe que 60% de las cepas de *S. warneri* (6/10) fueron productoras de slime, resultado que se asemeja al obtenido en el presente estudio donde *S. warneri* evidenció un 72% de aislamientos positivos para exopolisacáridos.

Dentro de los aislamientos estudiados en el presente estudio correspondientes a *S. epidermidis*, 77.8% de ellos produjeron slime en ARC (14/18); Sumru⁹¹ encuentra que 13 cepas de 19 estudiadas (68.4%) fueron productoras, así mismo, Simojoki¹⁶ reporta que 40% de sus aislamientos identificados como *S. epidermidis* presentaron actividad de exopolisacáridos al ser evaluados en ARC.

La evaluación de la producción de slime para *S. hominis* demostró que, un 35% de los aislamientos presentaron resultado positivo a la prueba, resultado que es similar al reportado por Sumru⁹¹, quien reporta que 11 de 29 aislamientos (37.9%) fueron positivos, así mismo, Perez-Ordoño⁷⁷ reporta que 50% de sus aislamientos (1/2) fueron productores de exopolisacáridos.

S. haemolyticus presentó un total de 66.7% de aislamientos positivos en ARC (2/3), resultado superior al reportado por Perez-Ordoño⁷⁷ y Sumru⁹¹ quienes encontraron un 33.3% y 5.56% de resultados positivos respectivamente.

Respecto al método de adherencia a placas de microtitulación empleado durante este estudio se basó en la técnica estandarizada y descrita por Stepanovic⁸⁷, sin embargo, se debe considerar que los autores realizan diversas modificaciones que pueden variar los resultados obtenidos, por tal motivo, los estudios que manejen dicha metodología deben realizarse bajo las mismas condiciones con el fin de obtener resultados comparables.

Esta técnica se considera un ensayo fenotípico cuantitativo para la formación de biopelícula, por ello, permite establecer un valor numérico a la capacidad de

adherencia que expresen los microorganismos empleados; según Stepanovic⁸⁷, estos valores se establecen de acuerdo a los valores de absorbancias obtenidas en los lectores de microplaca utilizando como punto de partida la valores obtenidos de los controles negativos; este factor, también contribuye a la desviación de los resultados entre estudios, ya que, la utilización de distintas longitudes de onda y/o los valores obtenidos en los controles negativos, desvían los rangos de positividad o negatividad en el ensayo.

Los aislamientos identificados como positivos a formación de biopelícula en microplacas, alcanzaron un total de 109 cepas que corresponde a un 88.2%, este resultado es similar al reportado por Yannick Tremblay col⁷, quienes encontraron que un 85.1% (217/255) de los aislamientos de SCN fueron formadores de biopelícula en microplaca; así mismo, también son comparables con los obtenidos por Samah y Hanaa²⁴, quienes encontraron positivos a 64 aislamientos de un total de 68 SCN representando un 94.1% de adherencia en el ensayo.

Bonetto⁹³, estudió un total de 145 aislamientos de SCN, de ellos 77.2% (112) fueron positivos en la microplaca, también determinó que *S. xylosus* es la especie que presenta una mayor proporción de aislamientos formadores fuertes de biopelícula con un 56.3%, en el presente estudio esta especie tan solo alcanzo el 33.3% de cepas fuertemente formadoras; *S. epidermidis* fue considerado como formador débil de biopelícula por este autor al encontrar que el 75% de las cepas (3) presentaron esta característica en este estudio, los resultados son comparables ya que, el 61% de las cepas fueron débiles productores de biopelícula (11).

Neyra Sierra⁹⁷, realizó una investigación empleando cepas de SCN aisladas de bovinos con mastitis subclínica, esta autora, modificó el protocolo establecido por Stepanovic⁸⁷, disminuyendo la concentración de glucosa hasta un 0.25% y utilizando un longitud de onda de 630nm, sus resultados mostraron un porcentaje de positividad de 74.46%, resultados que no se alejan de los obtenidos en el presente estudio.

La clasificación como fuerte, moderado o débil productor de biopelícula en microplaca, depende de factores como la longitud de onda que es utilizada para la lectura, el valor de la desviación estándar y el punto de corte establecido con los controles negativos, es por ello que, los diferentes estudios manejan rangos distintos entre cada categoría, que provocan la variación de los resultados totales. Teniendo en cuenta esto, la presente investigación mostró que un total de 72 aislamientos (60.5%) fueron productores débiles de biopelícula, Samah y Hanaa²⁴, utilizando la misma longitud de onda (570nm) que fue empleada en este estudio encontraron que un 19.2% de los aislamientos de SCN fueron débiles formadores; Sierra⁹⁷, utilizando una longitud de onda de 630nm obtuvo un 40% de cepas débilmente formadoras de biopelícula en microplaca; Li-Li y col⁷⁶, estudiaron un total de 137 aislamientos de SCN, y evaluando su comportamiento en una longitud de onda de 590nm, encontraron que 54.75% presentaban débil adherencia a la placa; Kot²² describe que bajo una longitud de onda de 492nm las especies aisladas de bovinos con mastitis se comportaron mayormente como débiles productores de biopelícula representando un 48.6%.

Los resultados moderados dentro de evidenciados en este estudio, fueron los que se encontraban dentro del rango (0,303-0,393)encontrándose allí un total de 8 aislamientos, lo que representa un 6.7%; Samah y Hanaa²⁴, encontraron un total de 21 cepas ubicadas en esta categoría, que representa un 30.9% del total de los aislados; Sierra⁹⁷ presenta un resultado más cercano al obtenido en este estudio, con un total de 6 cepas que representa 17.14% de la población estudiada. Tremblay y col²⁶ reportaron que un 25.5% (65) de las cepas estudiadas presentaron resultado moderado medidos en una longitud de onda de 490nm.

La fuerte adherencia a la microplaca, se presentó en un total de 25 aislamientos de los estudiados en la presente investigación, estos representaron el 21% de la población total; 30 aislamientos fueron positivos en el trabajo realizado por Samah²⁵ que correspondieron a 44% de los aislamientos totales estudiados; Tremblay²⁶ y Bonetto⁹³ utilizaron longitudes de onda de 490nm y 550nm respectivamente y encontraron que un total de 65

aislamientos (25.5%) y 35 aislamientos (24.1%) respectivamente fueron formadores fuertes de biopelícula en microplaca.

Las diferencias en los resultados obtenidos para la producción de slime y biopelícula mediante el ARC y el método en microplaca respectivamente, probablemente pueden estar relacionadas con el hecho de que la interpretación del ARC es subjetiva debido a su naturaleza cualitativa. Además, de que el principal polisacárido detectado por este, es el PIA, un componente menor que actúa en las primeras etapas de formación de la biopelícula tal como lo demostró Izano y col., 2008 quien utilizó un tratamiento enzimático con dispersina B (enzima que hidroliza PIA/PNAG) y DNAsa I, observó que la dispersina B no tuvo igual efecto sobre la estructura de la biopelícula cuando esta ya estaba conformada, concluyendo que PIA no es el principal componente presente en la biopelícula madura.

De los 84 aislamientos productores de biopelícula en este estudio mediante el método en microplaca 17 fueron negativos para la producción de slime en ARC lo que podría indicar que la formación de biopelícula se llevó a cabo mediante un proceso independiente al PIA, este mecanismo podría estar asociado a lo descrito por Cucarella y col.⁸, 2001 quien evidencia en su estudio un nuevo gen involucrado en la formación de biopelícula, el gen *bap* que hasta la fecha solo ha sido encontrado en aislamientos obtenidos de mastitis bovina; este gen se encuentra ubicado en una isla de patogenicidad, y se ha encontrado su asociación a diversos pasos en la formación de biopelícula; como la adherencia principal y la adhesión intercelular, procesos indispensables para el desarrollo y maduración de la biopelícula.

En cuanto a la proteína de unión a la laminina, es el producto proteico de la expresión del gen *eno*, el cual ha demostrado tener una alta presencia en aislamientos de SCN productores de biopelícula, en el presente estudio, el 82.4% de las cepas fueron positivas para este gen después de su revelado en un gel de agarosa al 1.5%; Bonetto⁹³, encontró como resultado de su estudio que el 77.9% de los aislamientos utilizados fueron positivos a la presencia del gen *eno*; Yeon-Soo³⁰, analizó fenotípica y genotípicamente la formación de

biopelícula en *Staphylococcus spp.*, dentro del análisis genético, estudió la mayoría de los genes de la familia MSCRAMM, encontrando que, el gen *eno* fue el de mayor prevalencia en las cepas estudiadas alcanzando un 56% de positividad dentro de los aislamientos; así mismo, Simojoki¹⁶ también analizó diferentes genes pertenecientes a la familia MSCRAMM, en aislamientos de SCN procedentes de casos mastitis bovina, encontrando que de ellos el gen *eno* fue el más prevalente alcanzando un 75% de aislamientos positivos (63) de un total de 84 aislamientos; de igual manera, Samah y Hanaa²⁴, analizaron un total de 68 cepas de SCN, procedentes de bovinos con mastitis subclínica, de ellas encontraron que 63 aislamientos (92.6%) evidenciaban la presencia de gen *eno*, siendo este el más prevalente de los estudiados.

La totalidad de los aislamientos correspondientes a las especies de *S. vitulinus*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. sciuri*, *S. pasteurii*, *S. schleiferi* y *S. auricularis*, fueron positivos al gen *eno* en el presente estudio; Yeon-Soo³⁰, describió que de un total de 10 aislamientos correspondientes a *S. auricularis* el 90% presentaron genotípicamente la presencia de *eno*; en el mismo sentido, Simojoki¹⁶ reportó que la totalidad de los aislamientos de *S. haemolyticus* (18) fueron positivos a la presencia de este gen resultado que se correlaciona con el obtenido en el presente estudio, Simojoki¹⁶ también encontró que la totalidad de las cepas de *S. epidermidis* (10), expresaban este gen, resultado no muy distante del obtenido en este estudio donde esta especie alcanzó un 88.9% de positividad; Bonetto⁹³ por su parte, reporta que la totalidad de las cepas de *S. epidermidis* expresaron la presencia del gen *eno*, también describe que aproximadamente un 75% de las cepas de *S. warneri*, *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* fueron positivos a este gen, los resultados obtenidos en el presente estudio para estas especies fueron 88%, 66.7% y 100% respectivamente.

Dentro de este estudio, *S. xylosus* tuvo un 66.7% de aislamientos positivos al gen *eno* (2/3), mientras que, Bonetto⁹³ describió que un total de 25 aislamientos de *S. xylosus* de 27 totales fueron positivos a la presencia del gen *eno*, representando un 93.7% de positividad.

Durante el desarrollo de la biopelícula es posible encontrar una amplia variedad de genes que codifican para proteínas capaces de interactuar en los diferentes pasos de maduración de esta, Cucarella y col. En el 2004²⁹ reportaron que los *Staphylococcus* poseían una proteína asociada a la biopelícula (*bap*) que les confería la capacidad no solo de adherirse a superficies sino también provocar una agregación célula-célula, pasos fundamentales en la conformación de la misma, además, evidencio que los aislamientos que tenían este gen eran fuertes productores de biopelícula característica que les otorgaba a estos microorganismos la capacidad de invadir y persistir en la ubre bovina.

Debido a esto en el presente estudio se evaluó la presencia del gen *bap* encontrándose que tan solo un 1,7% (2/119) de los aislamientos poseían este gen, estos resultados se correlacionan con los obtenidos por autores como Samah y Hanaa²⁴ quienes en el desarrollo de su estudio evidenciaron que tan solo el 4.4% (3/68) de los aislamiento fueron positivos; sin embargo, estos resultados difieren respecto a otros autores quienes demostraron un mayor número de aislamientos positivos a los reportados en el presente estudio. Piessens y col en el 2012⁹⁹ estimaron que el 11.2% (41/366) eran *bap* positivo, así mismo Bonetto⁹³ en su estudio denominado Mastitis bovina causada por SCN encontró una prevalencia de 15,9% (23/145) de aislamientos positivos a la presencia de este gen, siendo detectado en aislamientos caracterizados como *S. xylosus* y *S. epidermidis* resultado que se correlaciona con el presente estudio donde se encontró un aislamiento correspondiente a cada una de las especies mencionadas anteriormente. Sin embargo autores como Simojoki y col en el 2012¹⁶ no lograron amplificar este gen en ninguno de los aislamientos caracterizados como SCN procedentes de mastitis bovina. El bajo porcentaje de aislamientos positivos para el gen *bap* entre las cepas productoras de biopelícula en microplaca podría estar asociado a la presencia de otros genes implicados en la formación de biopelícula, los cuales no fueron analizados en el desarrollo de este estudio.

Cabe resaltar que el gen *bap* se encuentra situado en una isla de patogenicidad descrita principalmente en *S. aureus* aislados de mastitis bovina

sin encontrarse en aislamientos de tipo humano, sin embargo este gen cobra importancia en los SCN debido a que esta isla podría encontrarse relacionada con procesos de transferencia horizontal como lo describió Tormo y col en el 2005²⁸.

La correlación entre la producción de biopelícula mediante el método de microplaca y los genes evaluados en el presente estudio evidencian una posible relación entre la presencia del gen *eno* y la producción de biopelícula. Sin embargo, estudios como el llevado a cabo por Simojoki y col en el 2012¹⁶ y el presente estudio demostraron que un gran porcentaje de cepas no productoras de biopelícula presentaban este gen, esto puede deberse a que la presencia del gen no implica su expresión proteica, además, el gen *eno* no es el único gen implicado en el proceso de formación de biopelícula, por ende, la deficiencia de otros genes podría significar la incapacidad de desarrollar estas estructuras. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio para la presencia del gen *bapy* su relación con la fuerte producción de biopelícula en el método de microplaca también fue evidenciada en el estudio llevado a cabo por Samah y Hanaa en el 2013²⁴ quienes encontraron que 1 de los aislamientos poseía este gen y fue fuerte formador de biopelícula por este método, cabe resaltar que este gen no ha sido descrito en aislamientos no productores de biopelícula.

El análisis de los factores de virulencia dentro de las especies de SCN, permite una aproximación al poder patogénico que les confieran a estos microorganismos la posibilidad de invadir y desarrollarse en el ambiente intramamario; fue por ello, que se estudió cada aislamiento dentro de la misma especie con el fin de establecer la cantidad de cepas que expresaran uno o más de los factores de virulencia aquí estudiados.

La totalidad de los aislamientos de *S. warneri* presentaron al menos una enzima catalogada como factor de virulencia, lo que puede relacionarse con la capacidad de desarrollar procesos infecciosos en la glándula mamaria bovina; la hemolisina fue la enzima que mayor prevalencia presentó dentro de esta especie, la importancia de esta enzima radica en la actividad citolítica que

desarrolla, lo que le permite a estos microorganismos acceder a nutrientes almacenados dentro de las células.

La composición y mantenimiento de la biopelícula por parte de los SCN involucra una serie de complejos y aún no bien estudiados mecanismos, en los cuales se involucran diversos factores tanto ambientales como propios de la especie; es por ello que la evaluación de la biopelícula realizada bajo este estudio, comprendió varios factores relacionados con esta estructura. Encontrándose que, la producción de *slime* (exopolisacáridos), la adherencia en microplacas y la presencia del gen codificante de la proteína de unión a la laminina (*eno*) en conjunto, fueron los factores mayormente reconocidos dentro de la población estudiada; esto puede deberse a que, la producción de una matriz extracelular compuesta principalmente por exopolisacáridos (*slime*) es uno de los primeros pasos en la formación de la biopelícula, permitiendo adherirse a la superficie en la cual se desarrolla el microorganismo, así mismo la proteína de unión a la laminina es una molécula capaz de adherir la bacteria a la matriz producida; por ello, la relación entre estos tres factores contribuye a la formación de biopelícula, pudiendo ser este el motivo por el cual se encuentran en mayor proporción dentro de los aislamientos positivos.

El conjunto de los factores de virulencia examinados en este estudio, son considerados como las principales herramientas empleadas por las distintas especies capaces de invadir el tejido mamario y desarrollar procesos mastíticos en los bovinos, es por ello, que su presencia en los SCN, refleja el poder patogénico que poseen estas especies y permiten asociarlos directamente como agentes causales de IMI.

9. CONCLUSIONES

- Las proteasas fueron el factor de virulencia mayormente expresado por la población estudiada con un 53% de cepas productoras, seguido por las hemolisinas con un 42%, lipasas 19.3%, DNAsas con un 16.8% de aislamientos y por ultimo las lecitinasas con un 6%.
- Solo 24 aislamientos de los 119 empleados no presentaron ninguno de los factores de virulencia tipo enzimático, 43 aislamientos presentaron uno de los factores, 35 expresaron dos, 14 evidenciaron tres y 3 aislamientos mostraron cuatro factores de los estudiados.
- Los fuertes formadores de *slime* en agar rojo congo alcanzaron un 6%, un 67% de los aislamientos fueron intermedios productores y el 27% fueron no productores de *slime*.
- La formación de biopelícula en SCN mediante la metodología de microplaca se encontró en un total de 109 aislamientos (88.2%), de ellos 21% fueron fuertemente adherentes, 6.7% moderados y 60.5% débiles.
- La presencia del gen *bap* se evidenció en solo dos cepas de la población estudiada, correspondientes a un 1.7%.
- El gen *eno* se encontró en un total de 98 aislamientos alcanzando un 84.2%.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Recabarren SE. Fisiología de la lactancia. Revista de Fisiología y Endocrinología Animal. 2008.
2. Figueroa Max. Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica. San José, Costa Rica: EUNED; 1984.
3. Mansilla M., Pedraza G., Fajardo R., y Agüero E. Métodos de estimación del nivel de mastitis en vacas lecheras a partir de la determinación del test de California para mastitis (CMT) de sus cuartos individuales. Agric. Téc. [online]. [citado 2015-01-08]; 61(2) aprox. 8p. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072001000200006&lng=es&nrm=iso.
4. Verhoeff J, Geer Dvd, Hagens FM. Effects of a mastitis control programme on the incidence of clinical mastitis. Veterinary Quarterly. 1981;3:7.
5. Pyörala S, Taponen. Coagulase negative staphylococci emerging mastitis pathogens. Veterinary Microbiology. 2008; 134:26.
6. Jacques M, Aragon V, Tremblay Y. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. Animal Health Research Reviews. 2010. Vol 11: 97-121.
7. Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, Aguilar C y Kolter R. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2008; 322: 116.
8. Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penadé's J. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. Journal of bacteriology. 2001. p. 2888–2896
9. Fargo NDSU. Bovine Mastitis and Milking Management. 2012. p. 16.
10. Huijps K, Vlieghe SD, Lam T, Hogeveen H. Cost estimation of heifer mastitis in early lactation by stochastic modelling. Veterinary Microbiology. 2009;134:23.
11. Federación Colombiana de ganaderos (página web). Colombia. (consultado 12 marzo 2014) Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>

12. Desarrollo MdAy. Resolución Número 000017 de 2012. Bogotá, Colombia 2012. p. 17.
13. Myllys V, Asplund K, Brofeldt E, Hirvelä-Koski V, Honkanen-Buzalski T, et al. Bovine mastitis in Finland in 1998 and 1995 – changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Vet. Scand.* 1998; 39: 119-126.
14. Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 2004; 87(8):2433-41.
15. S. Piepers, L. de Meulemeester, A. de Kruif, G. Opsomer, H. W. Barkema, y S. de Vliegher, "Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium," *J Dairy Res.* 2007; 74 (4): 478–483
16. Simojoki. H, Hyvonen. P, CPF, S. Taponen, S. Pyorala. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Veterinary Microbiology.* 2012; 158:8.
17. B.-A. Tenhagen, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science.* 2006; Vol. 89 No. 7:9.
18. V. L. M. Rall, E. S. Miranda, I. G. Castilho, C. H. Camargo, H. Langoni, F. F. Guimarães, et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science.* 2014; 97:9.
19. Calderón A, Rodríguez VC. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2008; 21:7.
20. Trujillo C, Nicolás Ramírez, Luis Palacio, Gallego A. Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2010; 24:7.

21. Nicolás Ramírez Vásquez, Ofelia Arroyave Henao, Mario Cerón-Muñoz, Manuel Jaramillo, Juan Cerón, Palacio LG. Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2011;N° 22:9.
22. Kot B, Binek T, Piechota M, Wolska KM, Zdunek E, Płatkowska K. Virulence factors and ability of staphylococci from bovine milk and the cowshed environment to biofilm formation. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2013; 16:6.
23. Norma Fariña, Letizia Carpinelli, Margarita Samudio, Rosa Guillén, Florentina Laspina, Ramona Sanabria, et al. Staphylococcus coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Revista Chilena de Infectología*. 2013; 30 (5):8.
24. Bochniarz M, Wawron W. Haemolytic and proteolytic activity of coagulase-negative staphylococci isolated from mastitis cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2012; 15:5.
25. Darwis S, Asfour H. Investigation of Biofilm Forming Ability in Staphylococci Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The ScientificWorld Journal*. 2013; Volume 2013:9.
26. Yannick D. N. Tremblay , Daphnée Lamarche , Pauline Chever , Denis Haine , Messier S, Jacques M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *Journal of Dairy Science*. 2013; 96:12.
27. G D Christensen, W A Simpson, A L Bisno y E H Beachey. Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. *Infect. Immun*. 1982, 37(1):318.
28. Tormo MA, Knecht E, Gootz F, Lasa I, s JRP. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? *SGM JOURNALS*. 2005; 151:11.
29. Carne C., M. Ángeles T., Carles Ú, M. Pilar T., Marta M. et al. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. Apr 2004; 72(4): 2177–2185.
30. Yeon-Soo Seo, Deog Yong Lee, Nabin Rayamahji, Mi Lan Kang, Yoo HS. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics

of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Veterinary Science*. 2008; 85:6.

31. Mostafa Nemati , Katleen Hermans , Luc A. Devriese , Maes D, Haesebrouck F. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. *Taylor & Francis*. 2009;38:4.
32. Agriculture and consumer protection. Milking milk production hygiene and udder health. United States of America: FAO; 2001.
33. Luciano C. [Tesis doctoral en Internet]. Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana. Buenos Aires: biblioteca digital FCEN-UBA. 2010 [fecha de acceso 20 de octubre 2014] Disponible en:
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4760_Chanelton.pdf
34. Hernando Morales Lopez. Mastitis bovina: enfoque biotecnológico (en línea). Cali, Colombia: ReCiTelA; 2011. (fecha de acceso 13 de octubre de 2014). URL disponible en:
<http://books.google.com.co/books?id=CEHjQKafbNIC&pg=PA216&dq=mastitis+un+nuevo&hl=es&sa=X&ei=k9kWVNXXGHqTisATFzIKABg&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q=mastitis%20un%20nuevo&f=false>
35. Arancibia Berrios Richard. Manual para el control de la mastitis (en línea). (consultado el 25 de agosto del 2014). Disponible en:
http://www.green-south.com/agro/archivos/manual_control_mastitis_dleche_chile.pdf.
36. Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., San Primitivo, F. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to *Staphylococci*. *J. Dairy Sci*. 2002. 85:1370-1375.
37. Andres Gallegos Sorias, Jose Noe Moncada Cortez. Uso de extractos de semillas de cítricos para el control de la mastitis bovina (tesis). Universidad de Michoacana, México. 2011.
38. Ramón Gazque Gómez. *Enciclopedia Bovina*. 1ª ed. FMVZ Mexico; 2008.

39. Walter W, Castañeda V, Kloppert B, Zschoeck. La mastitis bovina. Instituto estatal de investigaciones de Hesse. Guadalajara.
40. Klastrup, O., Madsen, P.S., 1974. Scandinavian recommendations concerning examination of udder samples for mastitis. Nord. Vet. Med. 26; 157-204.
41. Davidson, J.F., Dohoo, I.R., Donald, A.W., Hariharan, H., Collins, K. A cohort study of coagulase-negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince Edward Island. Can. J. Vet. Res. 1992. 56:275-280.
42. Haltia, L., Honkanen-Buzalski, T., Spiridonova, I., Olkonen, A, Myllys, V. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. Acta vet. Scand. 2006 48:22-27.
43. Østerås, O., Sølvørød, L., Reksen, O. Milk culture results in a large Norwegian survey – Effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. J. Dairy Sci. 2006 89:1010-1023.
44. Makovec, J.A., Ruegg, P.L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. J. Dairy Sci. 2003. 86:3466-3472.
45. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA [Página principal en Internet], Colombia, 2012 [acceso 18 agosto 2014]. Disponible en :
<http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Publicaciones/CARTILLA-bovinosnario.pdf>
46. Nickerson, S. C. y J. W. Pankey. Neutrophil migration through teat end tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci. 1984 Apr;67(4):826-34.
47. Hagnestam-Nielsen C, Emanuelson U, Berglund BE. Strandberg. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. J. Dairy Sci. 2009; 92: 3124-3133.
48. W. Nelson Philpot, Stephen C. Nickerson. Mastitis: contra ataque, una estrategia para combatir la mastitis. Babson Bros., 1992.
49. Paape M, Duenas M, Wettemann R, Douglass L. Effects of intramammary infection and parity on calf weaning weight and milk quality in beef cows. Journal of animal science. 2000;78(10):2508.

- 50.** Cano, C. 2006. Nuevas alternativas en el diagnóstico clínico de campo y en el tratamiento de mastitis. Boletín Técnico Virtual. (en línea). México. Consultado 18 Agosto 2014. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRgCliC004.htm>
- 51.** Roberto Novoa Quiñones. (tesis). Evaluación epizootiológica y económica de la mastitis bovina en rebaños lecheros especializados de la provincia de Cienfuegos. Universidad Agraria de la Habana, Cuba. 2003.
- 52.** Poutrel B, Rainard P. Predicting the probability of quarter infection (by major pathogens) from somatic cell concentration. Am J Vet Res. 1982.
- 53.** Global Milk Quality. Contagious and Environmental Mastitis Pathogens: What is the Difference and Why Does it Matter?. United States of America: National Mastitis Council.
- 54.** Diego B., Juan F. y Martha S. Recomendaciones para mejorar la calidad higiénica, sanitaria y composicional de la leche. Universidad Nacional de Colombia 2º seminario mastitis bovina y la calidad de la leche. 2014.
- 55.** Hogan JS, Laboratory handbook on bovine mastitis 1999: National Mastitis Council. editor. National Mastitis Council.
- 56.** Calvinho L, Tirante L. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. Revista FAVE. 2005;Vol. 4 N°1:11
- 57.** Phuektes, P., P.D. Mansell and G.F. Browning. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. J. Dairy Sci., 2001 84: 1140-1148.
- 58.** Ogston A. Micrococcus poisoning. J Anat Physiol, 1882; 16:526-- 6; 1883; 17:24-58
- 59.** Götz F., Bannerman T. y Schleifer K. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Martin D., Stanley F. editors. The Prokaryotes. Springer Science & Business Media. 2006. P. 6-75.
- 60.** Rosenbach, AJ. Mikro-Organismen beiden Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, J.F. Bergmann, 1884. p. 18

61. Dufour S., Roy J., Barkema H., Descoteaux L., DeVries T., Reyher K., Scholl D. Epidemiology of coagulase-negative staphylococci intramammary infection in dairy cattle and the effect of bacteriological culture misclassification. *Journal of Dairy Science*. 2012: Vol. 95 No. 6.
62. Vanderhaeghen W., Piepers S., Leroy F., Coillie V., Haesebrouck F. y Vlieghe S. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *J. Dairy Sci.* 2014; 97:5275-5293.
63. Seija V. Genero *Staphylococcus*. En: *Temas de Bacteriología y Virología médica*. Sección III: Etiopatogenia Microbiológica p. 257-271.
64. Koneman E.W. Allen, S.D., Dowell, V.R., Sommer, H.M.: *Diagnostico microbiologico*. 6ª edición. Buenos Aires: Medica Panamericana. 2008.
65. Barret A, Raulings N., Woessner. J.F. Ed. *Handbook of proteolytic enzymes*. San Diego. Academic Press, 1998.
66. Berta Elizabeth Llorente. Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche (tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 2000.
67. Navarro I, Periago M. Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. *Revista Veterinaria de Murcia*. 2012. Vol 28: 45-65.
68. C. Rueda. Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases: isolation, characterization and inhibition by natural substances. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2445/42397>.
69. Cristian Ruiz Rueda. Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases: isolation, characterization and inhibition by natural substances (tesis doctoral). Universidad de Barcelona, España. 2005.
70. L. Arpigny, E. Jaeger. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. 1999. *Biochemistry J.* 343: 177-183.
71. R. V. F. Lachica, Genigeorgis y Hoepflich. Metachromatic Agar-Diffusion Methods for Detecting Staphylococcal Nuclease Activity. *American Society for Microbiology*. Apr. 1971, Vol. 21(4) p. 585-587.
72. Nazar J. Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología*. 2007. Vol 67: 61-72.

73. Donlan R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002. Vol. 8, No. 9.
74. Lassa I, L. del Pozo J, Penadés J, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Revista animal y sanitaria de Navarra*. 2005. Vol 28: 163-175.
75. Davies D, Parsek M, Pearson J, Iglewski B, Costerton J, Greenberg E. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998. 280(5361):295-8.
76. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008. 322: 207–228.
77. Perez-Ordoyo Garcia Luis Ignacio. Exopolisacáridos y otros factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche ovina (tesis doctoral). Universidad de Leon. España. 2010.
78. Whitfield C. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiology*. 1988. 34: 415-420
79. Gotz F. Staphylococcus and biofilms. *Molecular Microbiology*. 2002. 43, 1367–1378.
80. Ubeda C, Tormo M, Cucarella C, Trotonda P, Foster T, Lasa I, Penadés J. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Molecular Microbiology*. 2003. 49, 193–210.
81. Tormo M., Knecht E., Götz F., Lasa I., Penadés J. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. *Microbiology*. 2005. Vol: 151, 2465–2475.
82. Harraghy N, Hussain M, Haggart A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock J. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology*. 2003. 149: 2701-2707.
83. Tristan A., Ying L., Bes M., Etienne J., Vandenesch F., Gerard L. Use of Multiplex PCR To Identify *Staphylococcus aureus* Adhesins Involved in Human Hematogenous Infections. *Journal of clinical microbiology*. 2003. p. 4465–4467

- 84.** S. Clarke, S. Foster. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv. Microb. Physiol.* 2006. 51: 187-225.
- 85.** G. Sierra. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology.* 1957. 23, 15-22.
- 86.** Freeman DJ, Falkiner, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989;42:872-874.
- 87.** Stepanovic S, Dragana V, Veronika H, Giovanni Di B., Slobodanka D, Ivana C, Irkovic y Filip R. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007 115: 891–9.
- 88.** U. Reischl, M. Pulz, W. Ehret, H. Wolf. PCR-based detection of mycobacteria in sputum samples using a simple and reliable DNA extraction protocol. *BioTechniques.* 1994. Vol. 17, no. 5, pp. 844–845.
- 89.** Wesley Kloos, Karl Schleifer. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 1975. Vol 25: 62-79.
- 90.** H. Matsumoto; E. Baba; T. Fukata; M. Naka, Sanenori. The distribution and characters of coagulase-negative staphylococci of the bovine udder. *Osaka Prefecture University Education and Research Archives. (OPERA).* 1984. Vol 26: 27-32.
- 91.** S. Citak, O. Varlik, N. Gundogan. Slime production and DNase activity of staphylococci isolated from raw milk. *Journal of Food Safety.* 2003. Vol. 23: 281-288.
- 92.** B. Langlois, R. Harmon, K. Akers, D. Aaron. Comparison of Methods for Determining DNase and Phosphatase Activities of Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology.* 1989. Vol 27: 1127-1129.

93. Cesar B. Mastitis bovina causada por *Staphylococcus coagulasa* negativos (tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata, Argentina. 2014.
94. E. Hjelm, I. Lundell-Etherden. Slime Production by *Staphylococcus saprophyticus*. American Society for Microbiology: infection and immunity. 1991. Vol 59: 445-448.
95. N. Bedidi-Madani, T. Greenland, Y. Richard. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. Veterinary Microbiology. 1998. Vol 59: 139-145.
96. M. Souza da Cunha, L. Suppo de Souza Rugolo, C. Magalhães Lopes. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006. Vol 101: 661-668.
97. N. Sierra. Detección de biofilm en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa aisladas de bovinos con mastitis subclínica (Tesis). Universidad de Zulia, Venezuela. 2012.
98. B. Kenar, Y. Kuyucuoğlu, E. Şeker. Antibiotic Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Turkey. Pakistan Veterinary Journal. 2011. Vol 32: 390-393.
99. V. Piessens, S. De Vlieghe, B. Verbist, G. Braem, A. Van Nuffel, L. De Vuyst, M. Heyndrickx, E. Van Coillie. Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cow's milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. J. Dairy Sci. 2012. 95:7027–7038.
100. L. Chaneton, L. Tirante, J. Maito, J. Chaves, L. Bussmann. Relationship Between Milk Lactoferrin and Etiological Agent in the Mastitic Bovine Mammary Gland. Journal of Dairy Science. 2008. Vol 91: 1865-1873.
101. Jean F. MacFaddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Montevideo, Uruguay: Medica Panamericana; 2000.
102. Melchior M., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?. The Veterinary Journal. 2006. Vol 171: 398–407

