



# PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA Y DETECCIÓN DE LOS GENES *eno* Y *bap* EN AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVA PROCEDENTES DE MASTITIS BOVINA

Mayerli Catherine Díaz Castro  
Cristian Camilo Ortiz Vasco

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
2015



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

## **Asesor Externo**

MARTHA CECILIA SUAREZ ALFONSO  
Docente Universidad Nacional de Colombia

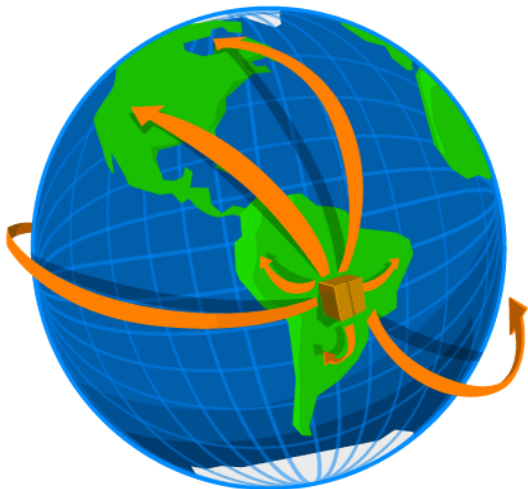
## **Asesor Interno**

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

2015

# JUSTIFICACIÓN





Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados  
y discusión

Conclusiones

# INTRODUCCIÓN



***MASTITIS***



**NMC**  
**NATIONAL MASTITIS COUNCIL**

<http://jairoserano.com/2009/07/mastitis-en-imagenes/>



# MASTITIS



Agentes  
infecciosos



Traumas  
físicos



Irritantes  
químicos



Asociado a  
bacterias en  
80-90% de casos

# CLASIFICACIÓN DE LA MASTITIS

## **Mastitis subclínica:**

No síntomas

No cambios físicos en leche



## **Mastitis clínica:**

Manifestaciones clínicas y/o alteraciones visibles en la leche.

- I. Mastitis aguda.
- II. Mastitis crónica.

# MASTITIS





# MASTITIS

Disminución  
grasa, lactosa,  
caseína y  
sólidos totales

**IMPACTO  
COMPOSICIONAL**

Aumento  
albumina sérica e  
inmunoglobulinas

Alteración  
proporción  
caseína:proteína

# PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS MASTITIS

Patógenos contagiosos

*Staphylococcus aureus*

*Streptococcus agalactiae*

*Mycoplasma spp.*

Patógenos ambientales

*Coliformes*

*Enterococcus spp. y Streptococcus spp.*

*Staphylococcus coagulasa negativa*  
SCN

# *Staphylococcus Coagulasa Negativa*

## CAUSALES DE MASTITIS

*Persisten en la  
glándula mamaria*

Satu P&orala  
y Suvi  
Taponen  
2008

Patógenos  
Emergentes



# FACTORES DE VIRULENCIA SCN

## I. ENZIMÁTICOS

Hemolisinas

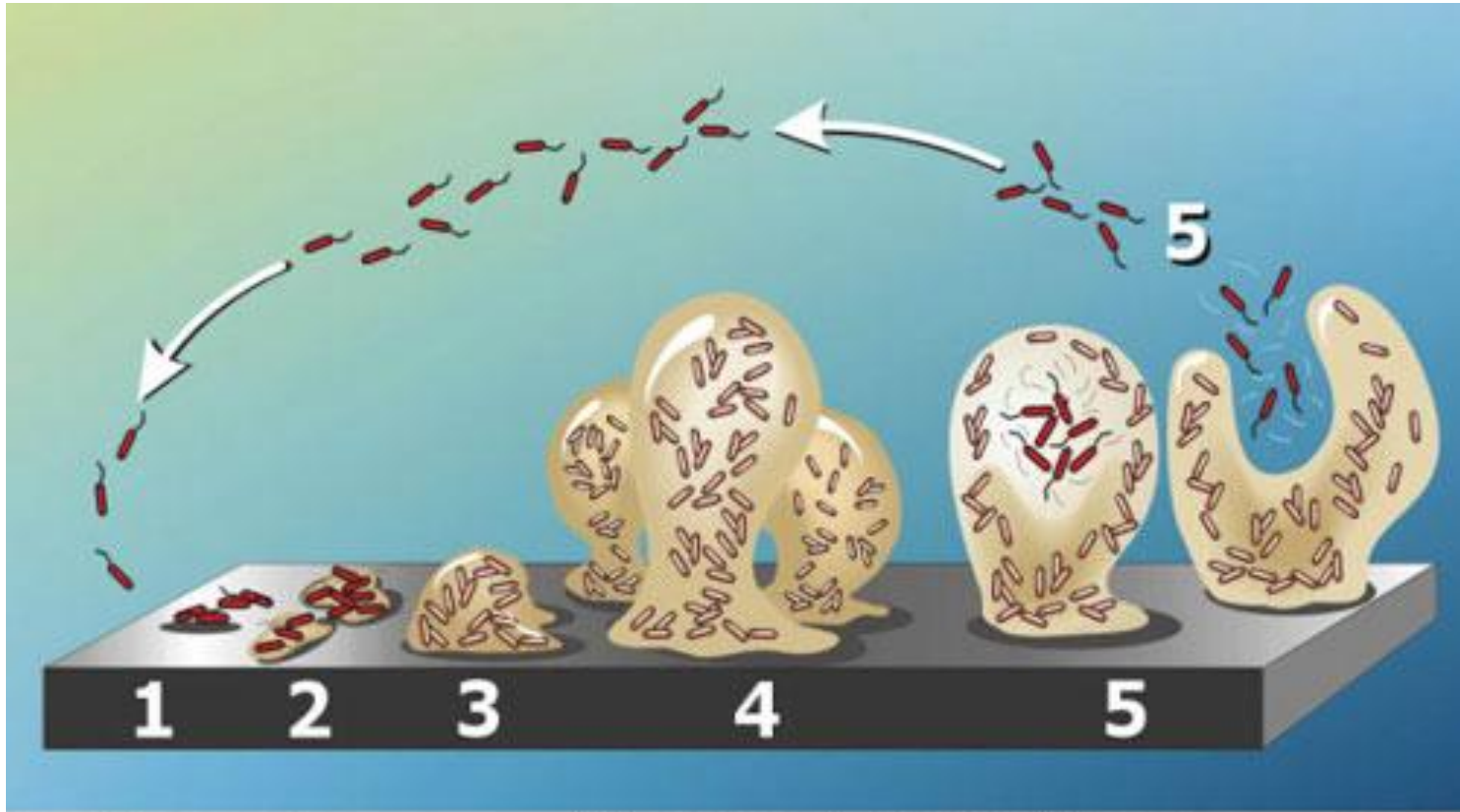
Lecitinasas

Lipasas

Proteasas

DNAsas

# II. FORMACIÓN DE BIOPELICULA



ADHERENCIA

AGREGACIÓN  
CELULAR

PROLIFERACIÓN

MADURACIÓN

DISPERSIÓN



# GENES ASOCIADOS A LA BIOPELÍCULA

GENES	DESCRIPCIÓN
bap	Proteína asociada a la biopelícula
icaADBC	Gen de adhesión intercelular
fnbpA-B	Adhesina de unión a la fibronectina, elastina
eno	Adhesina de unión a la laminina (familia MSCRAMMs)
clfaA-B	Adhesina de unión al fibrinógeno y citoqueratina





# OBJETIVO GENERAL

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

# OBJETIVOS ESPECIFICOS

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

# METODOLOGÍA

119 aislamientos de SCN (mastitis bovina proyecto FMVZ – UN)

Caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica

Confirmación VITEK  
SYSTEMS 2<sup>®</sup> *bioMerieux*

Determinación de factores de virulencia

Enzimas

Hemolisinas  
Lecitinasas  
Lipasas  
Proteasas  
DNAsas

Formación de biopelícula

Producción  
de *Slime*

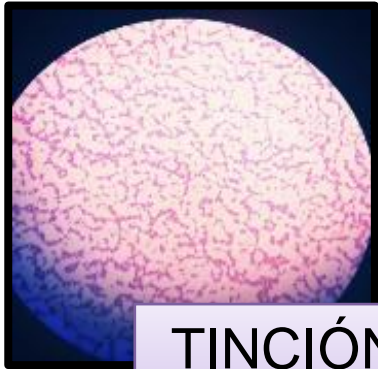
Formación de  
biopelícula en  
microplaca

Detección  
del gen  
*eno* y *bap*

# CONFIRMACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS



Siembra en  
Agar Sangre



TINCIÓN DE  
GRAM

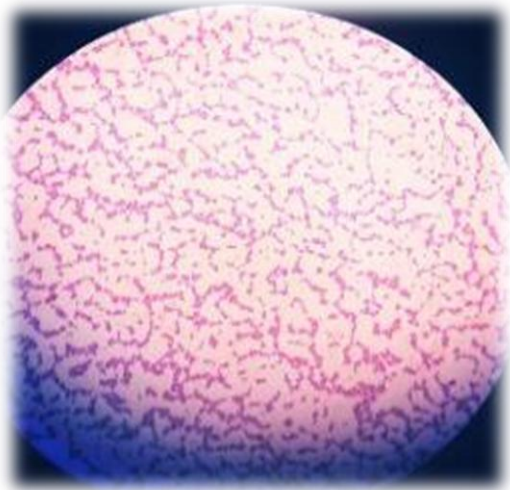


PRODUCCIÓN  
DE CATALASA



PRODUCCIÓN  
DE COAGULASA  
Staphaurex®





***Tinción Gram: Cocos  
Gram Positivos***



***Prueba catalasa:  
Positivo, burbujas.***



***Prueba coagulasa:  
Negativo, no aglutinación***

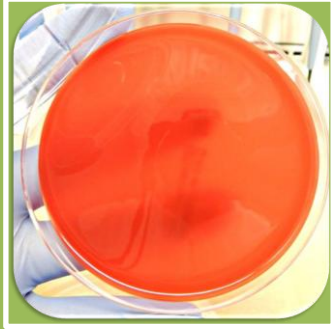
Confirmación positiva para los 119  
aislamientos

# CONFIRMACIÓN DE LOS AISLAMIENTO



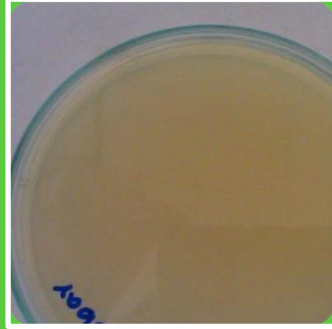
Sistema automatizado  
VITEK SYSTEMS 2<sup>®</sup> bioMerieux  
empleando las tarjetas  
GP 21342 .

# ENZIMAS



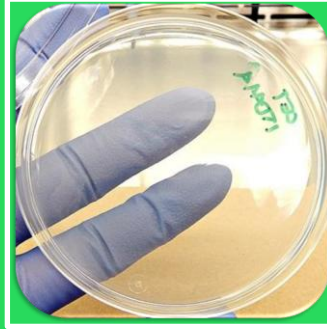
## HEMOLISINAS

Agar Sangre  
de cordero al  
5%



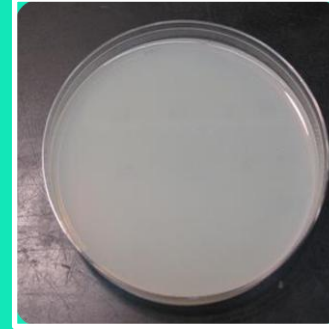
## LECITINASAS

Agar yema de  
huevo



## LIPASAS

Agar Tween  
80



## PROTEASAS

Agar leche



## DNAsas

Agar Dnasa  
con azul de  
toluidina



# PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

## PRODUCCIÓN DE SLIME AGAR ROJO CONGO



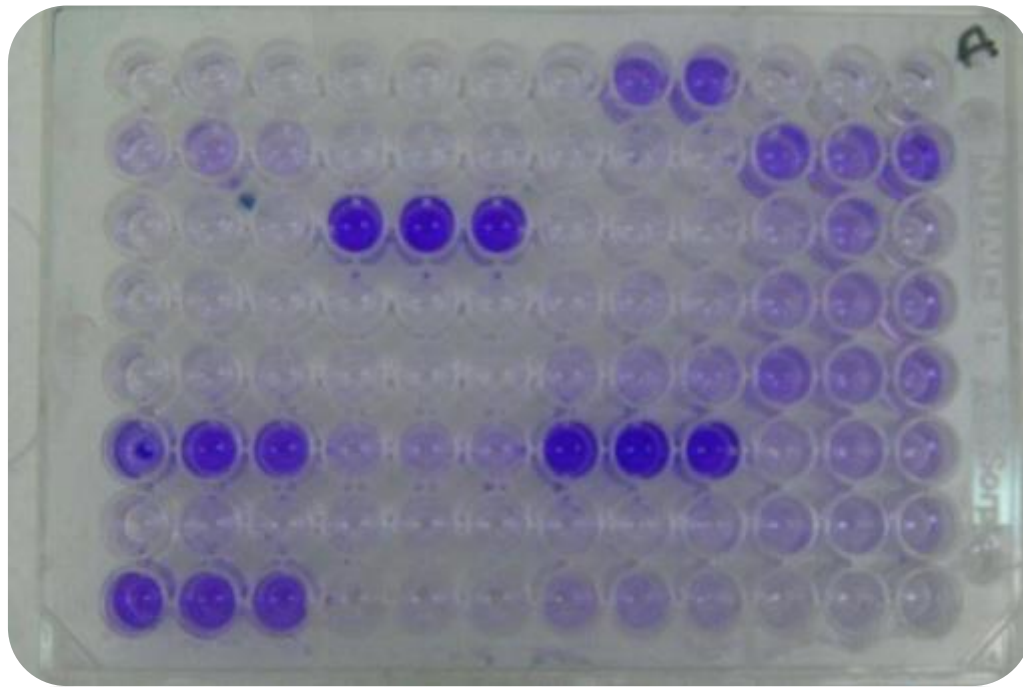
Freeman 1989

**Siembra por agotamiento**

**Agar rojo congo:**

- ✓ No productores
- ✓ Productores intermedios
- ✓ Fuertes productores

# ADHERENCIA EN MICROPLACA



Stephanovic *et. al.* 2007.

Cultivo

Lavado

Fijación

Tinción  
Cristal violeta

Lectura  
570 nm



# DETECCIÓN DE LOS GENES *eno* Y *bap*

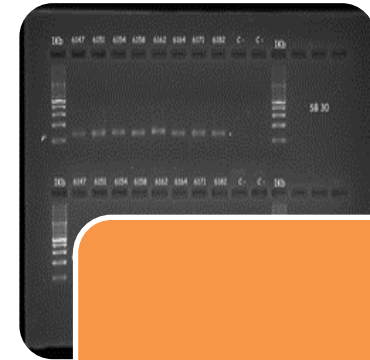


Extracción

Udo Reischl (2000)



Amplificación



Visualización

GEN	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	TEMPERATURA DE ANILLAMIENTO	REFERENCIA
Bap	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG	971	57°C	Cucarella <sup>8</sup> y col. (2001)
	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC			
Eno	ACGTGCAGCAGCTGACT	302	57,6°C	Tristan <sup>83</sup> y col. (2003)
	CAACAGCATCTTCAGTACCTC			

CONTROL POSITIVO GEN *eno*: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

## CICLO DE AMPLIFICACIÓN GEN *eno*

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.

## CICLO DE AMPLIFICACIÓN GEN *bap*

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.

# RESULTADOS

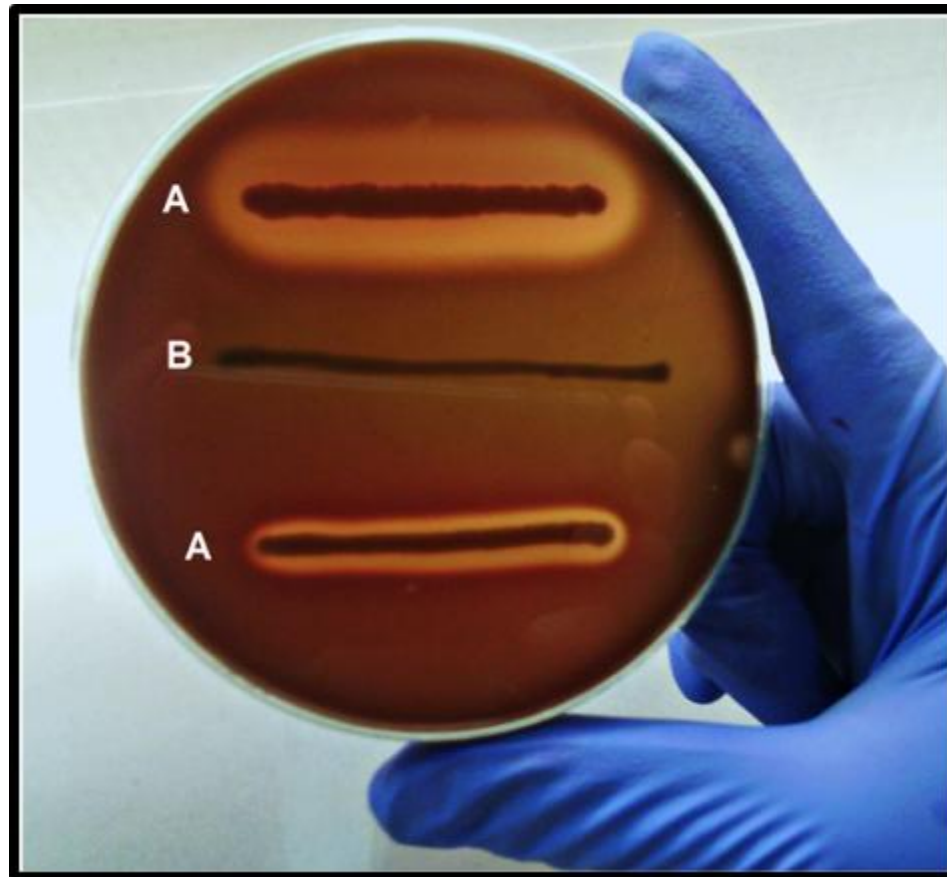
RESULTADOS



# ESPECIES DE SCN

ESPECIE	NUMERO DE AISLADOS (n)	PORCENTAJE SOBRE EL TOTAL DE AISLADOS (%)
→ <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. xylosum</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
<b>TOTAL</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

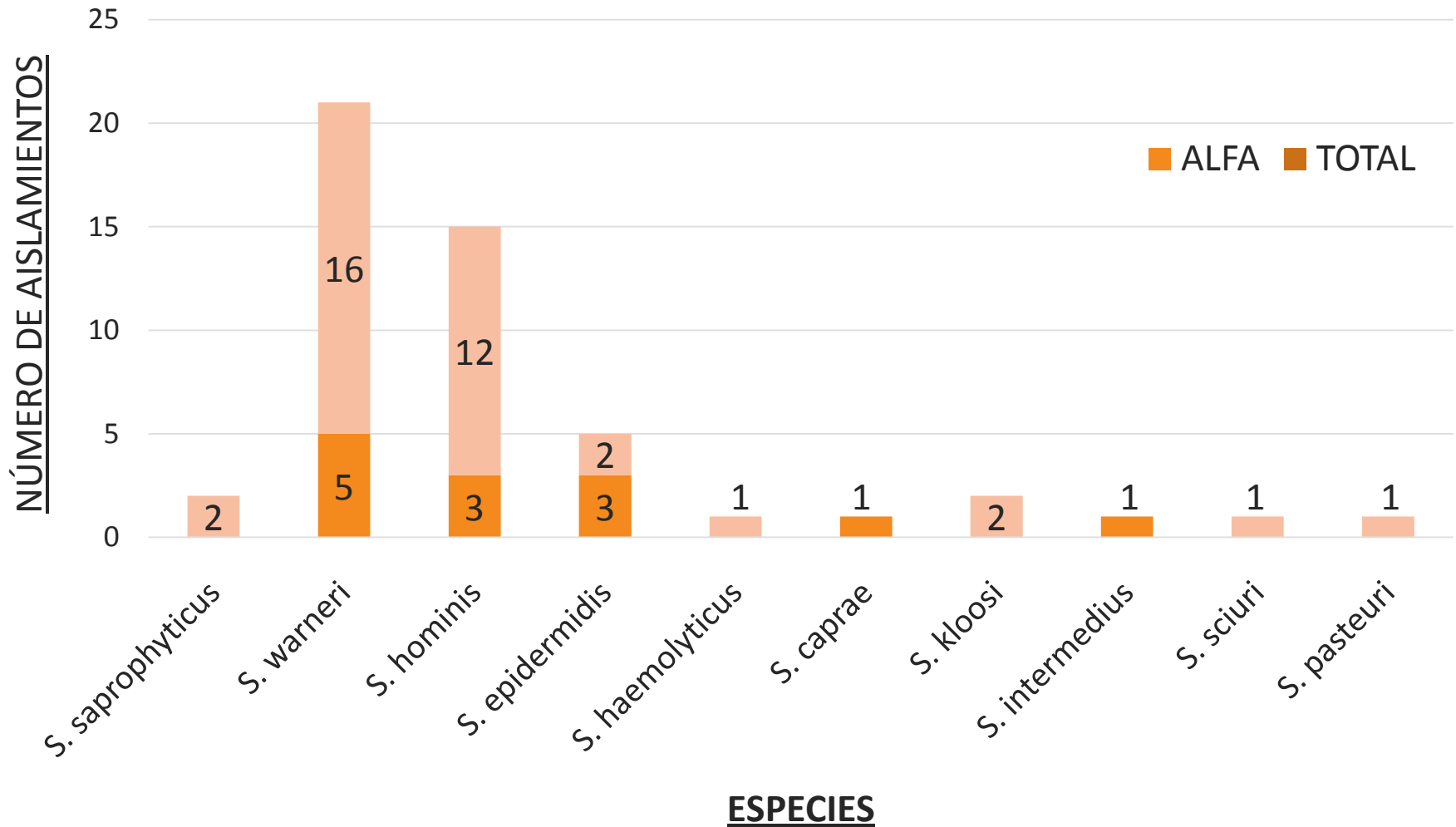
# HEMOLISINAS



Actividad hemolítica. A. *Beta* Hemolisis: Lisis total de eritrocitos.  
B. *Gamma* hemolisis: No lisis eritrocitaria

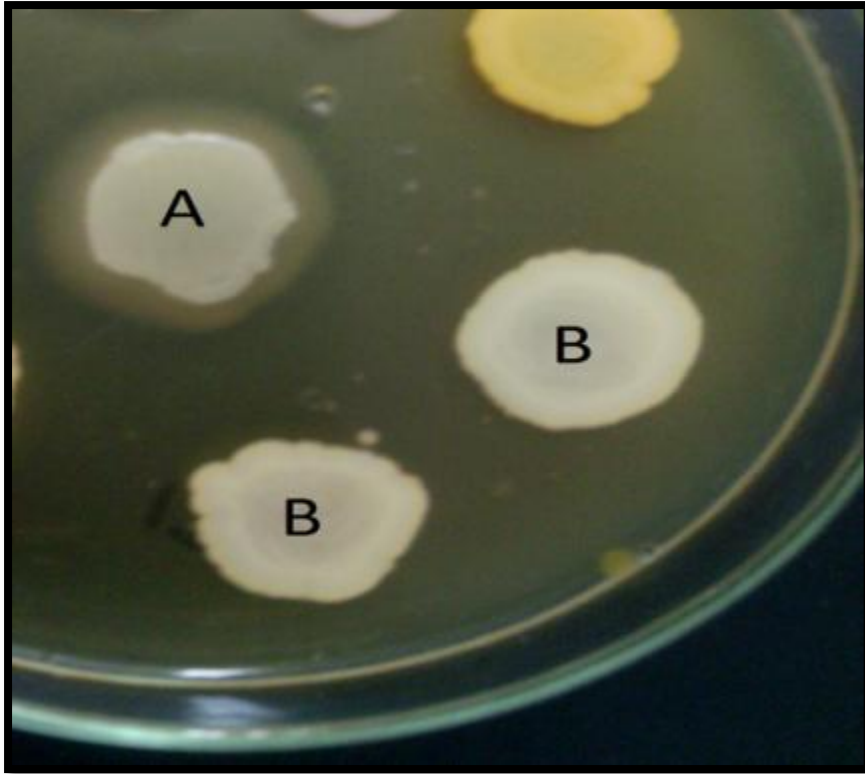


# PRODUCCIÓN DE HEMOLISINAS



Productores 50/119 (42%); Kot et al. 2013 122/217 (56%) hemolíticas

# LECITINASAS



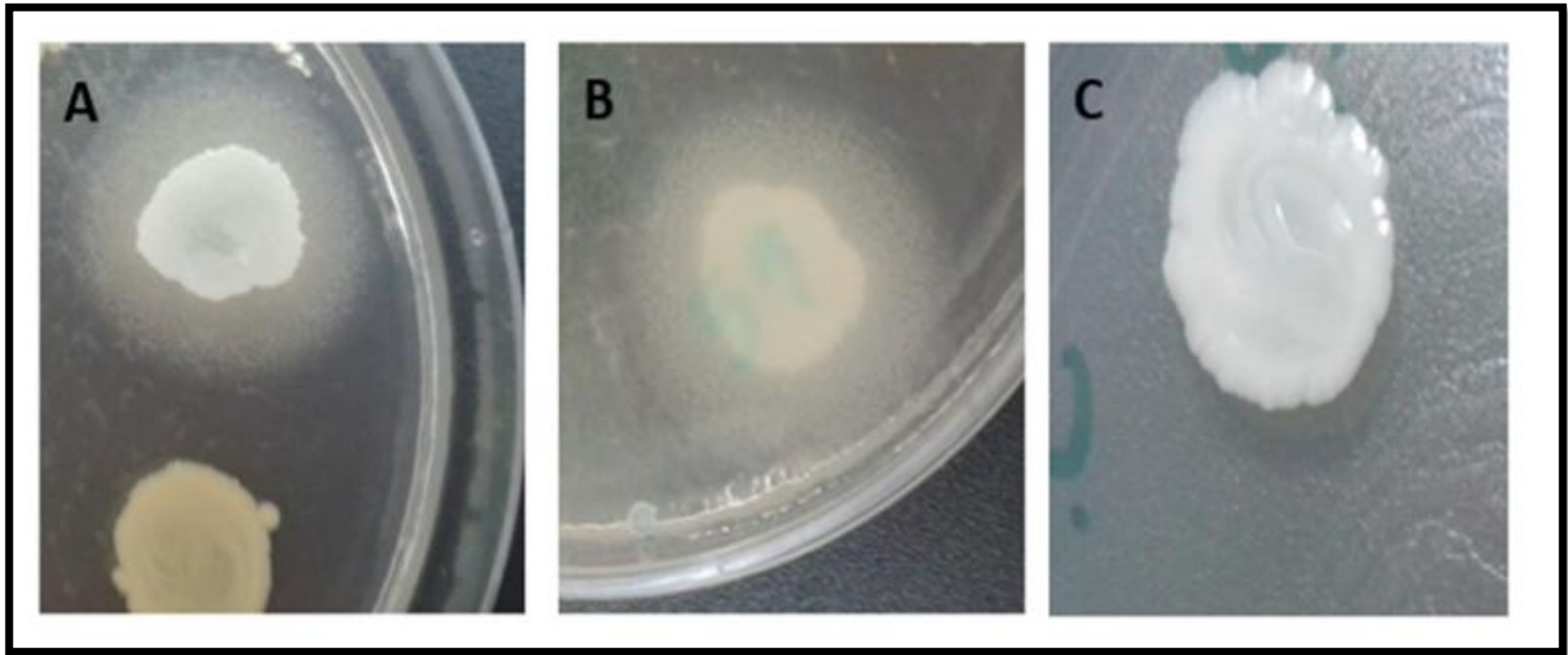
6 % (7/119 aislamientos)  
*Staphylococcus warneri*

## Agar yema de huevo

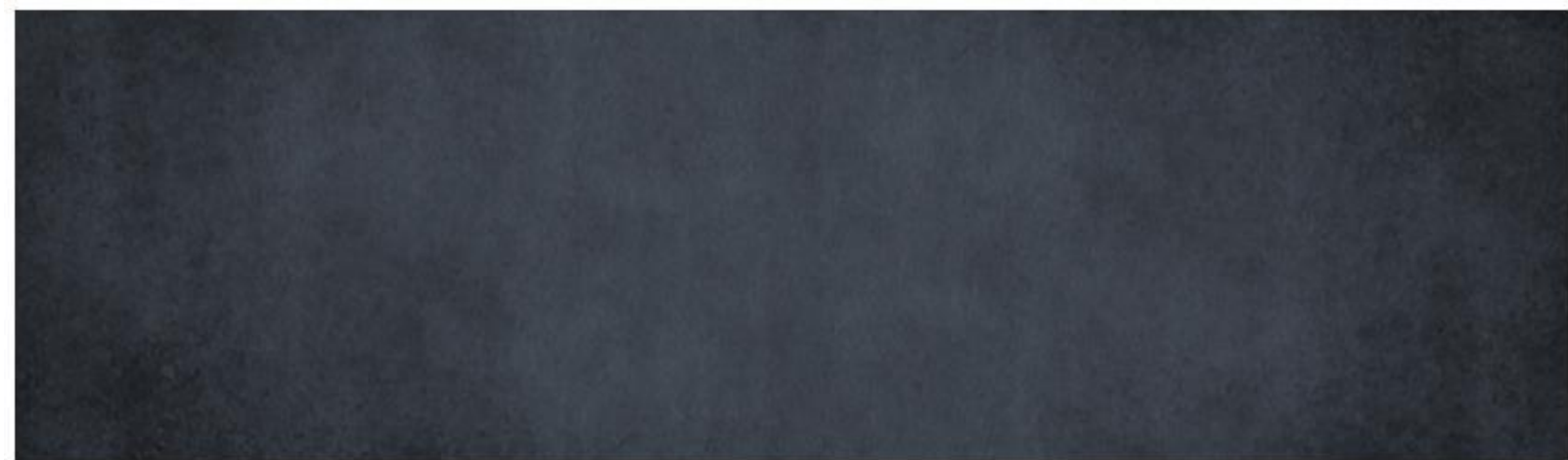
**A.** Aislamiento productor **B.** Aislamiento no productor

Productores 7/119 (6%); Matsumoto et al. 2003 18/193(9.32%) *S. warneri*

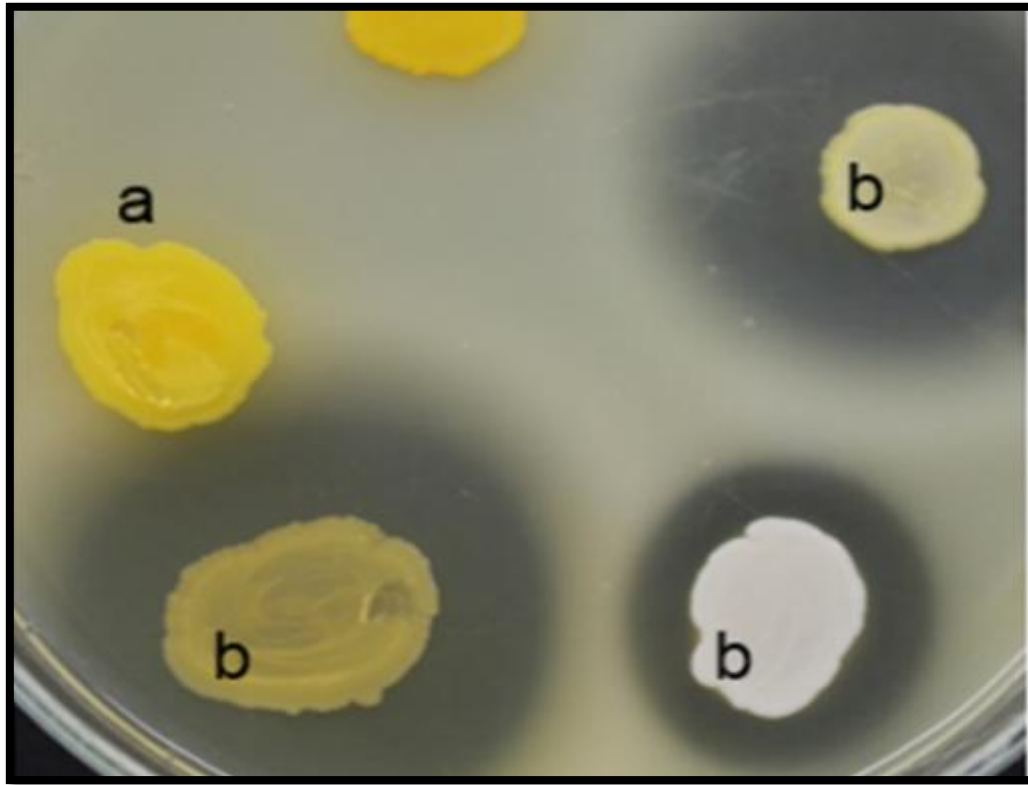
# LIPASAS



**Agar Tween 80. A. y B. Productor. C. No productor.**



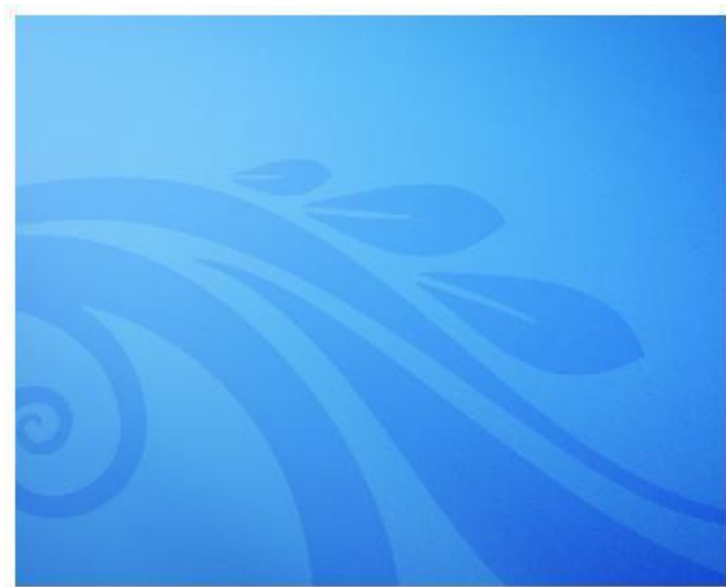
# PROTEASAS



**Agar leche al 3%.**

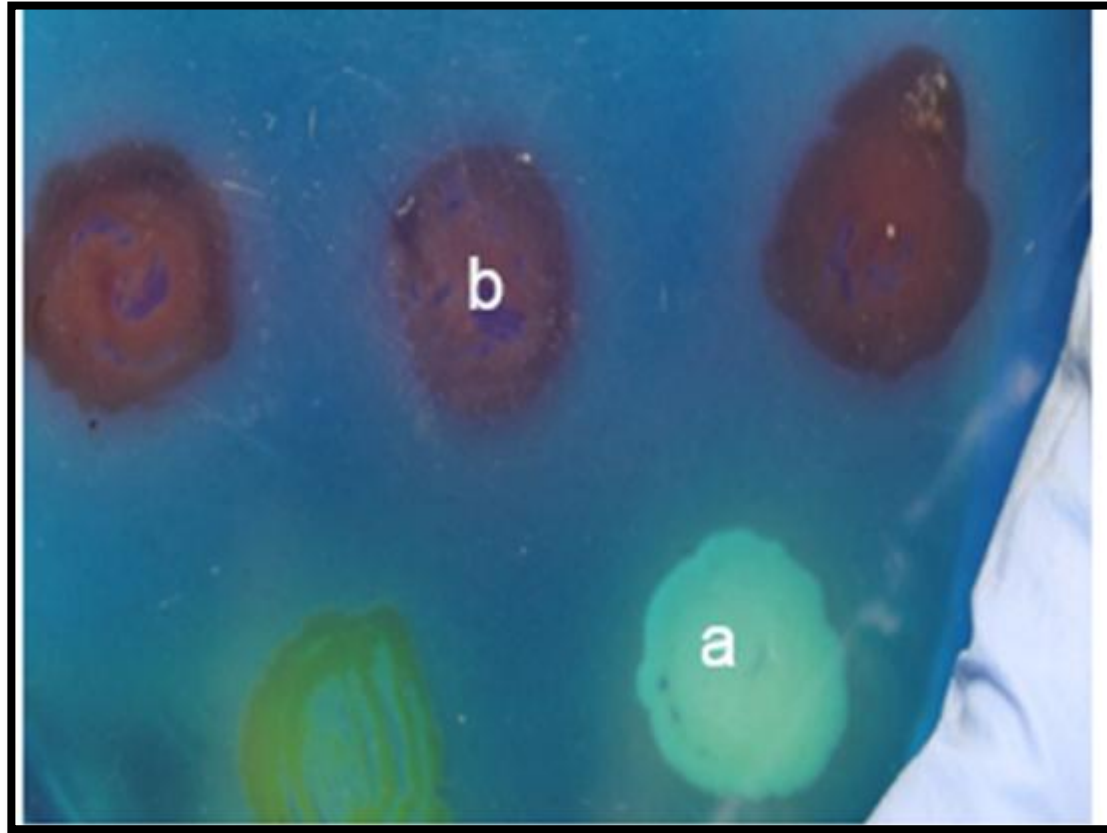
**a)** Aislamiento no productor

**b)** Aislamiento productor: Formación de halo claro





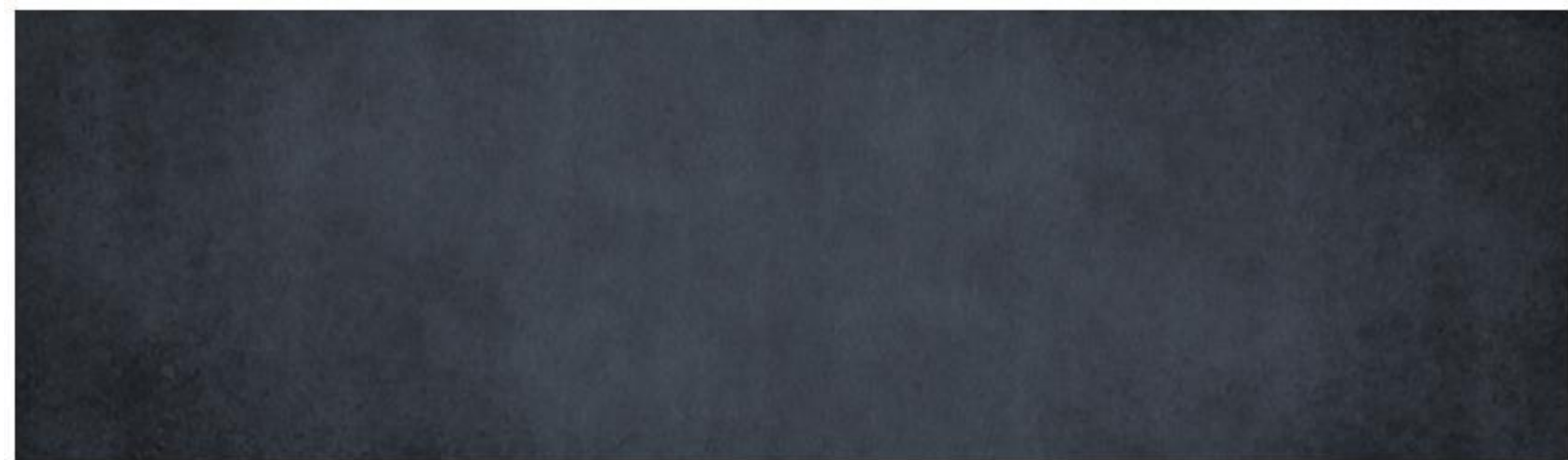
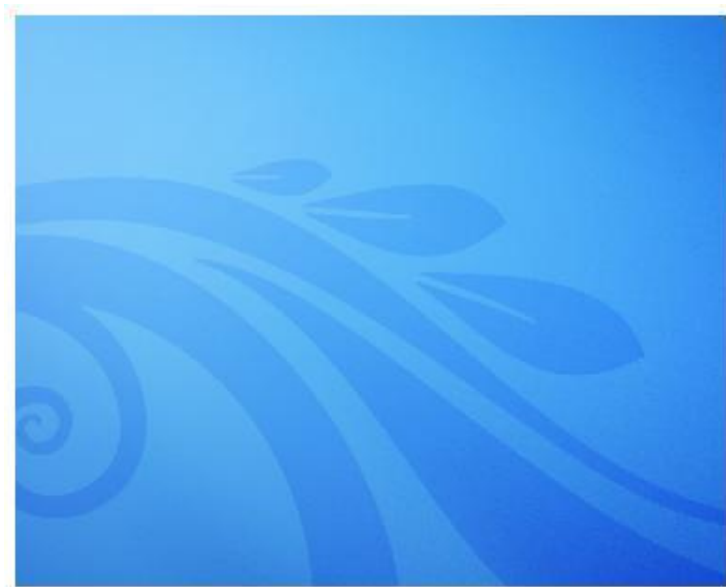
# DNAsas



**Agar DNAsa (azul de toluidina)**

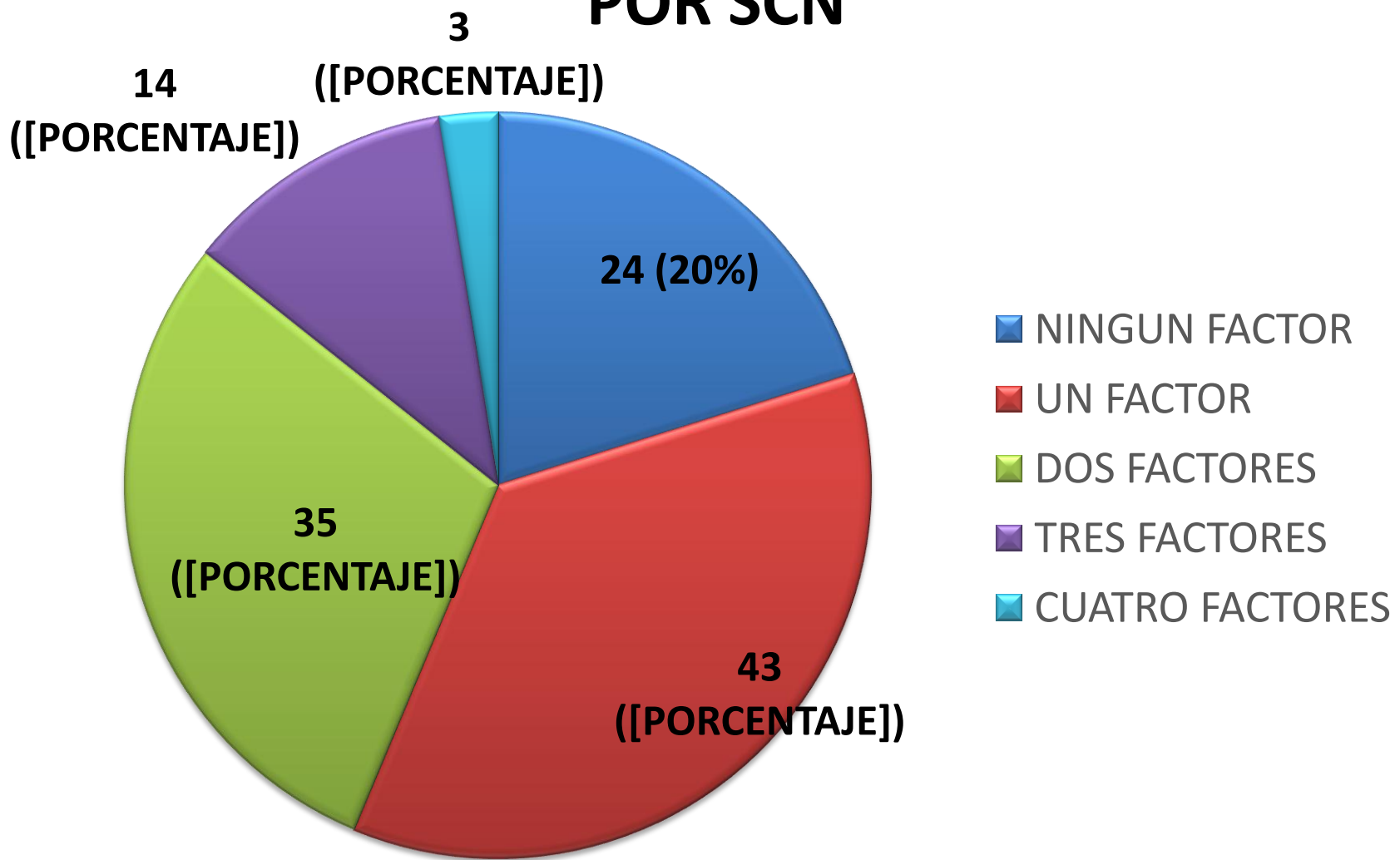
a) No productor.

**b) Productor:** Halo rosa alrededor de la colonia



# EXPRESION DE FACTORES DE VIRULENCIA

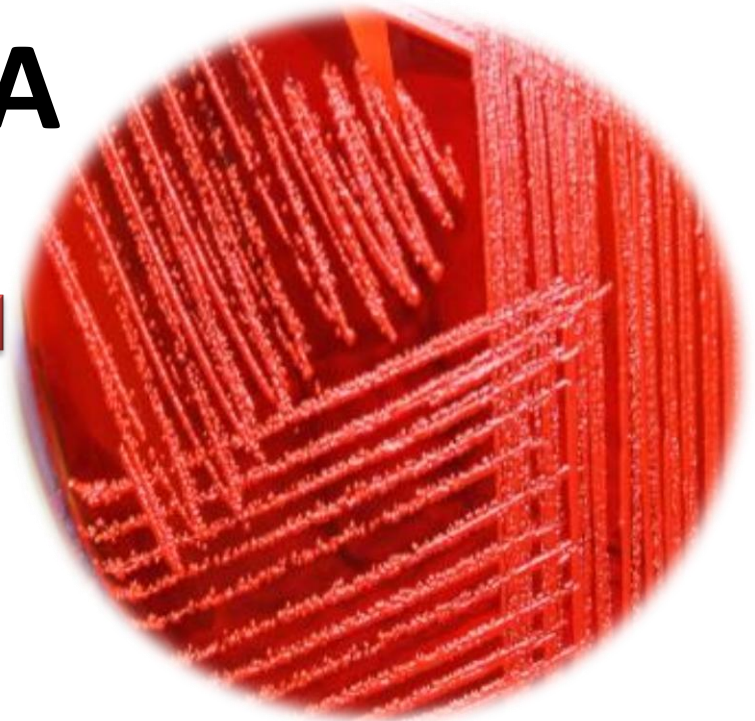
## POR SCN



Los aislamientos que presentaron 4 factores de virulencia correspondieron a las especies de *S. epidermidis*, *S. intermedius* Y *S. warneri*

# PRODUCCIÓN DE *SLIME*

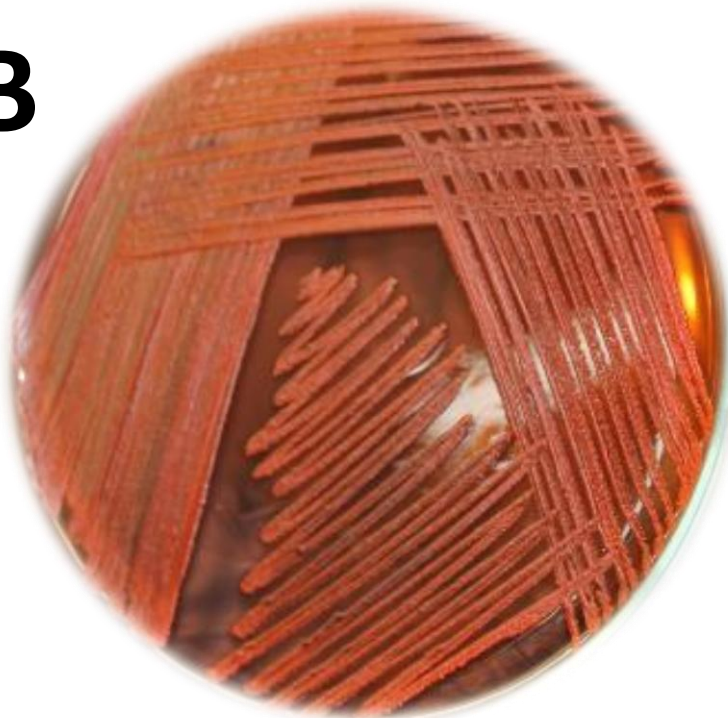
**A**



No productor  
de *slime*  
(Colonias rojas)



**B**



Productor  
intermedio  
de *slime*  
(Colonias marrón)

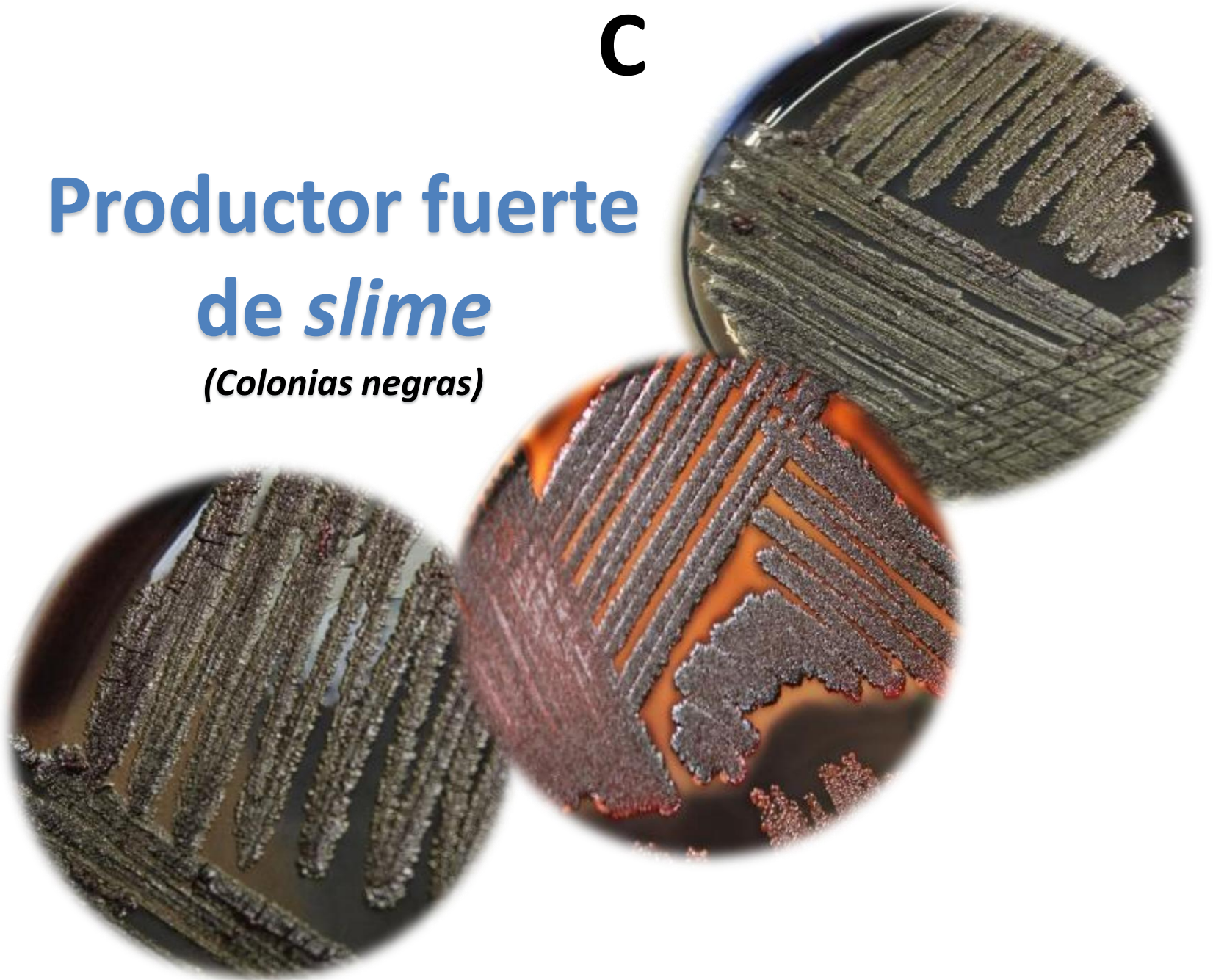




C

# Productor fuerte de *slime*

*(Colonias negras)*

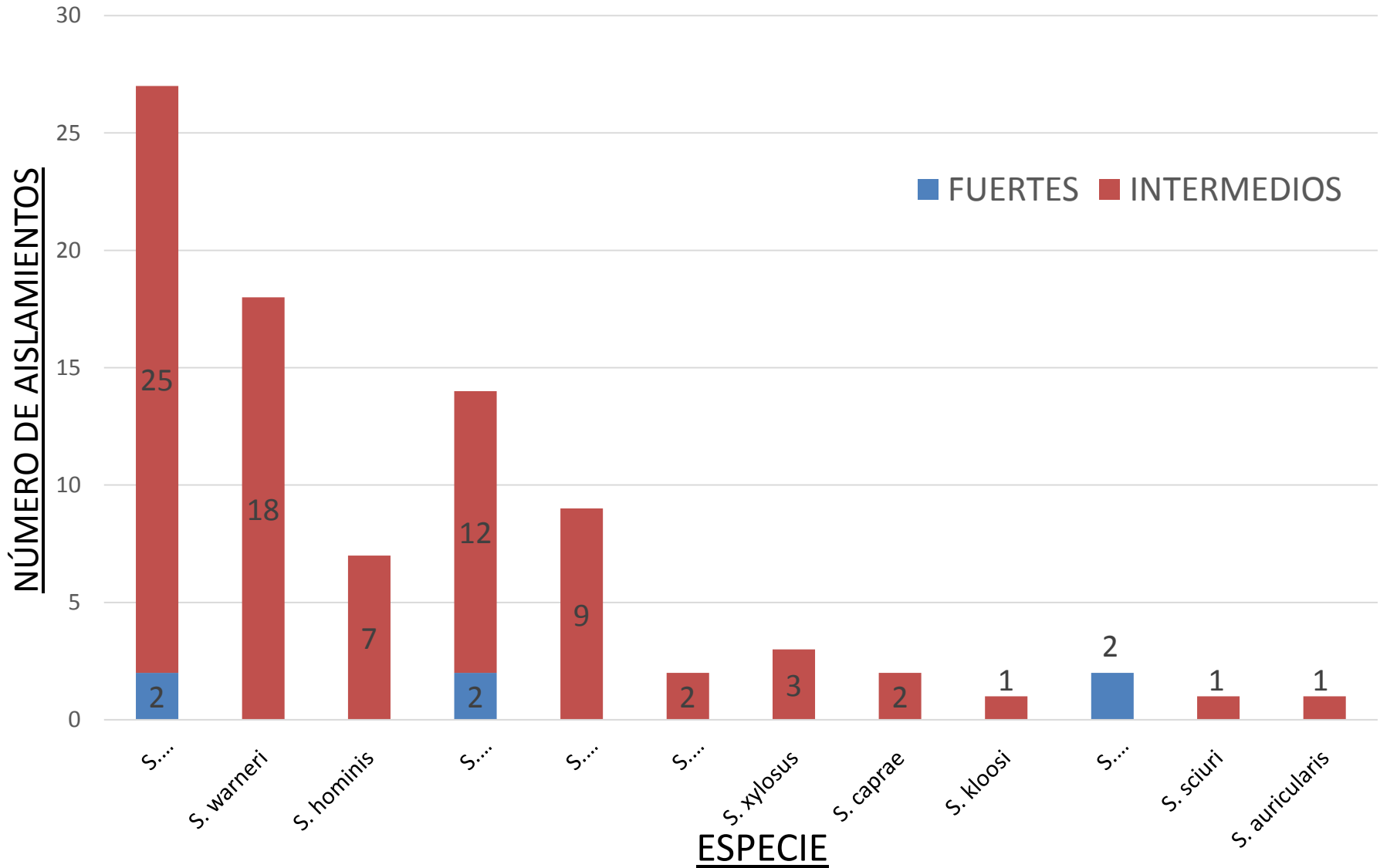


# PRODUCCIÓN DE SLIME EN AGAR ROJO CONGO (ARC)

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
<b>TOTAL</b>	119	6	81	32	87

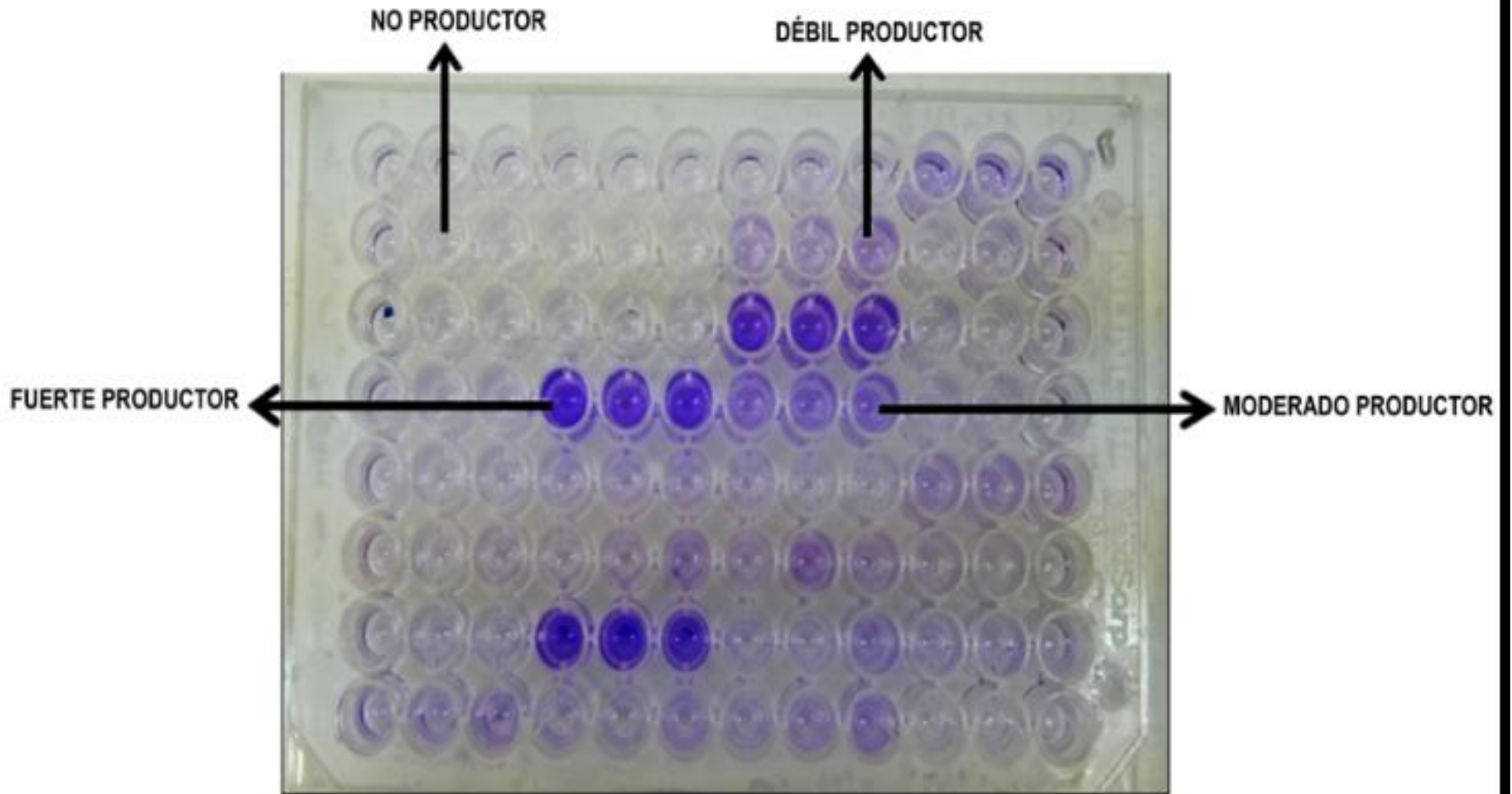


# PRODUCTORES DE SLIME



Productores 87/119(73%); Samah y Hanaa 2013 49/68(72.1%), Sumru et al. 2003 62/147(42.2%)

# ADHERENCIA EN MICROPLACA



# RESULTADOS MICROPLACA

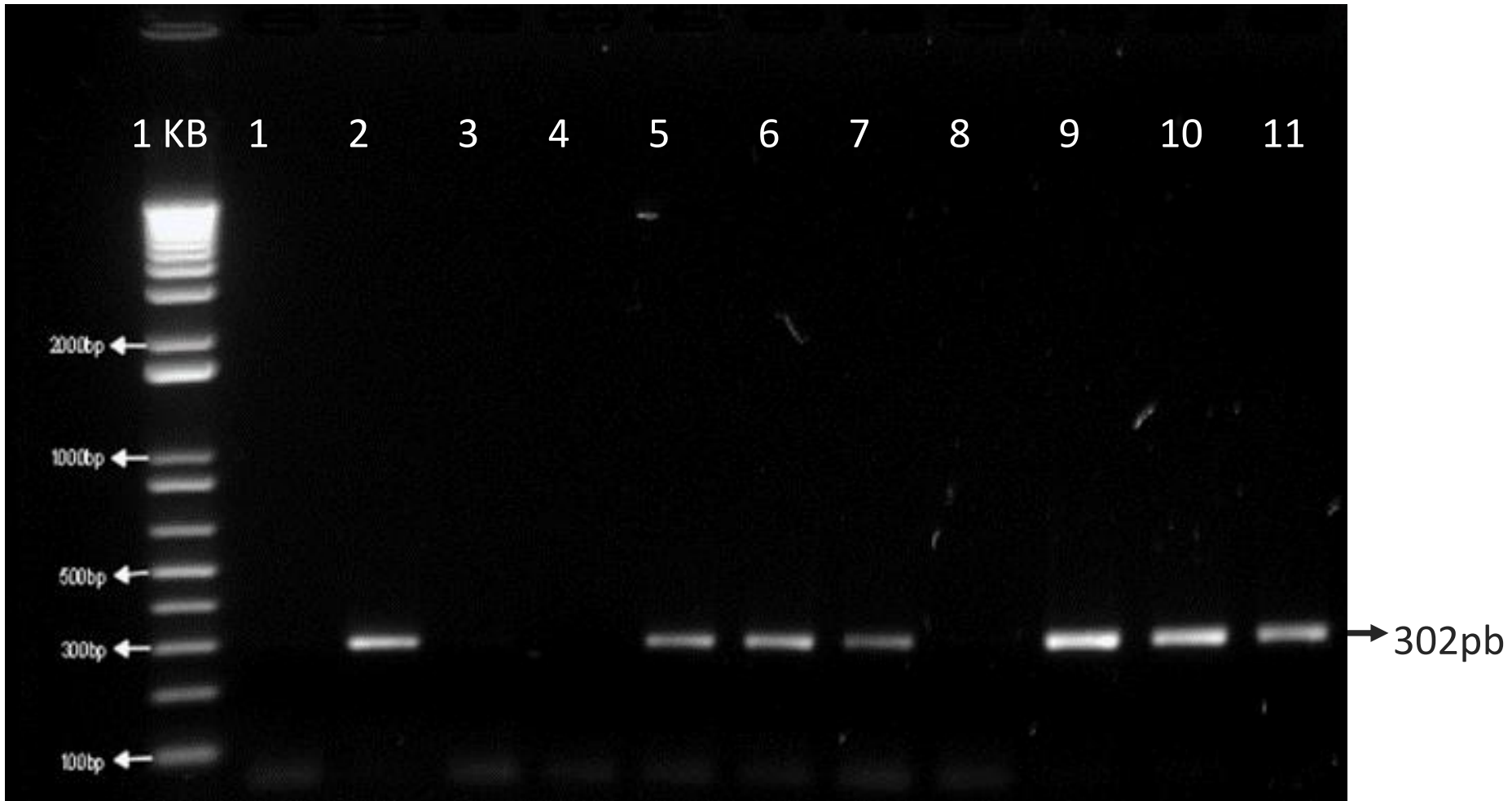
ESPECIE	N	No. (%) de aislamientos				TOTAL PRODUCTORES
		FUERTE	MODERADO	DEBIL	NEGATIVO	
<i>S. saprophyticus</i>	27	4 (14.8)	2 (7.4)	19 (70.4)	2 (7.4)	25
<i>S. warneri</i>	25	5 (20.0)	2 (8.0)	15 (60.0)	3 (12.0)	22
<i>S. hominis</i>	20	3 (15.0)	0 (0)	11 (55.0)	6 (30.0)	14
<i>S. epidermidis</i>	18	3 (16.7)	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
<b>TOTAL</b>	119	25 (21.0)	8 (6.7)	72 (60.5)	14 (11.8)	105 (88.2%)

Productores 105/119 (88.2%); Tremblay y col 2013 217/255(85.1%), Samah y Hanaa 2013 64/68(94.1%)

# COMPARACIÓN SLIME / MICROPLACA

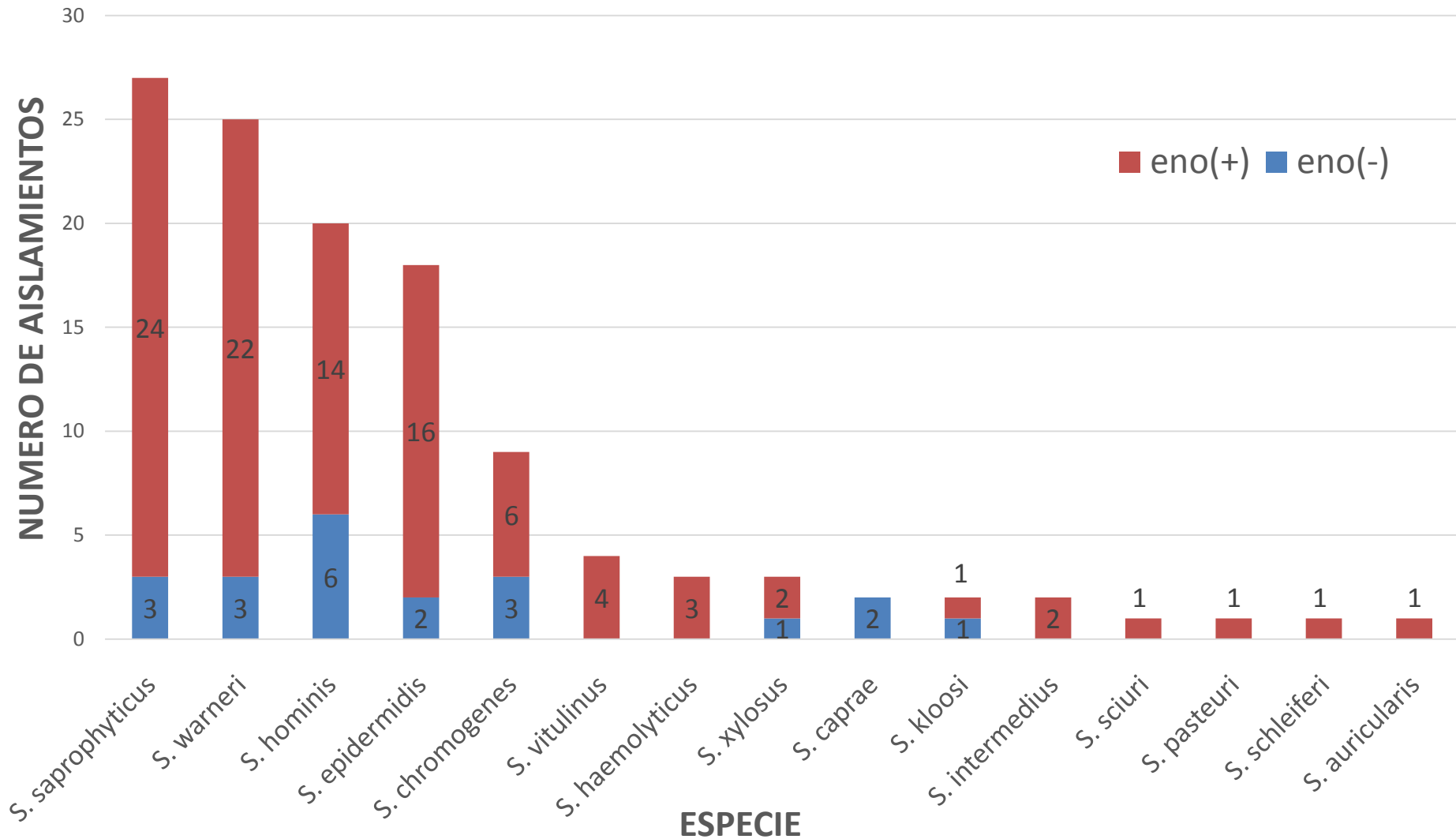
ESPECIES	AGAR ROJO CONGO		MICROPLACA			
		N	NEGATIVO	DÉBIL	MODERADO	FUERTE
<i>S. saprophyticus</i>	POSITIVO	27	2	19	2	4
<i>S. warneri</i>	POSITIVO	18	0	11	2	5
	NEGATIVO	7	3	4	0	0
<i>S. hominis</i>	POSITIVO	7	0	6	0	1
	NEGATIVO	13	6	5	0	2
<i>S. epidermidis</i>	POSITIVO	14	0	8	4	2
	NEGATIVO	4	0	3	0	1
<i>S. chromogenes</i>	POSITIVO	9	0	8	0	1
<i>S. vitulinus</i>	NEGATIVO	4	0	0	0	4
<i>S. haemolyticus</i>	POSITIVO	1	0	1	0	0
	NEGATIVO	2	0	2	0	0
<i>S. xylosus</i>	POSITIVO	3	0	2	0	1
<i>S. caprae</i>	POSITIVO	2	0	1	0	1
<i>S. kloosi</i>	POSITIVO	1	0	1	0	0
	NEGATIVO	1	1	0	0	0
<i>S. intermedius</i>	POSITIVO	2	0	0	0	2
<i>S. sciuri</i>	POSITIVO	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>	POSITIVO	1	0	0	0	1

# GEN *eno*



**Pozos:** Marcador 1:C(-) 2:C(+) Aislamientos: 5:88 6:89 7:90 9:92 10:93 11:94

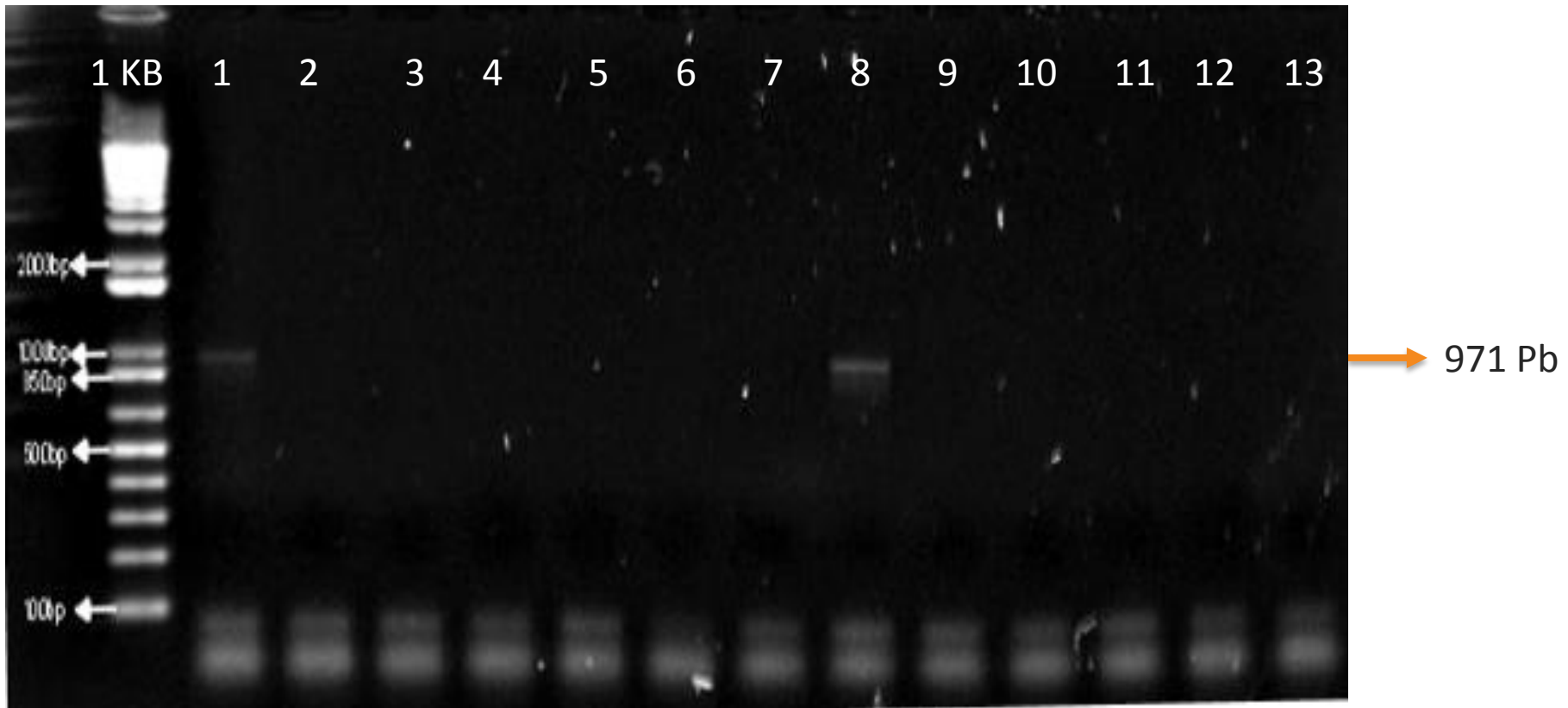
# PRESENCIA DEL GEN *eno*



***eno+* 98/119 (82.4%);** Bonetto 2014 113/145 (77.9%), Yeon-Soo et al. 2008 20/36 (56%),  
Simijoki et al. 2012 63/84 (75%)



# GEN *bap*



**Pozos:** Marcador 1: C(+) 2:C(-) Aislamientos: 3:12 4:13 5:14 6:15 7:16 8: 17 9:18  
10:19 11:20 12:21 13:22

*bap+* 2/119 (1.7%); Samah y Hanaa 2013 3/68(4.4%), Piessens et al. 2012 4/366 (11.2%)

**Correlación entre microplaca y la presencia de los genes eno y bap**

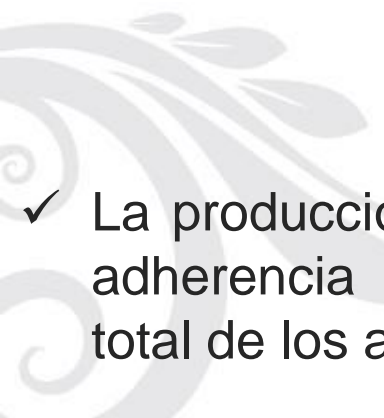
ESPECIES	MICROPLACA		eno +		bap +	
	RESULTADO	n	n	%	n	%
<i>S. saprophyticus</i>	POSITIVO	25	22	88	0	0
	NEGATIVO	2	2	100	0	0
<i>S. warneri</i>	POSITIVO	22	19	86.4	0	0
	NEGATIVO	3	3	100	0	0
<i>S. hominis</i>	POSITIVO	14	10	71.4	0	0
	NEGATIVO	6	4	66.7	0	0
<i>S. epidermidis</i>	POSITIVO	18	16	88.9	1	33.3
<i>S. chromogenes</i>	POSITIVO	9	6	66.7	0	0
<i>S. vitulinus</i>	POSITIVO	4	4	100	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	POSITIVO	3	3	100	0	0
<i>S. xylosus</i>	POSITIVO	3	2	66.7	1	33.3
<i>S. caprae</i>	POSITIVO	2	0	0	0	0
<i>S. kloosi</i>	POSITIVO	1	1	100	0	0
	NEGATIVO	1	0	0	0	0
<i>S. intermedius</i>	POSITIVO	2	2	100	0	0
<i>S. sciuri</i>	POSITIVO	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>	POSITIVO	1	1	100	0	0
<b>TOTAL</b>		119	98	82.4	2	1.7

# RESULTADOS PARA LA DETECCIÓN DE BIOPELÍCULA

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
<b>TOTAL</b>	3	9	14	2	17	69	1	1	116

# CONCLUSIONES

- ✓ En el presente estudio se evaluó por primera vez en Colombia la presencia de factores de virulencia y la producción de biopelícula en aislamientos de SCN procedentes de mastitis bovina.
- ✓ Del total de 119 aislamientos de SCN, 63 (53%) manifestaron la presencia de proteasas, 50 (42%) hemolisinas, 23 (20%) lipasas, 20 (17%) DNAsas y 7 (6%) lecitinasas.
- ✓ Del total de 119 aislamientos de SCN 43 (36%) expresaron 1, 35 (29%) expresaron 2, 14 (12%) evidenciaron 3, 3 (3%) aislamientos los 4 factores de los estudiados y 24 (20%) no manifestaron ninguno de los factores de virulencia enzimáticos.

- 
- ✓ La producción de *slime* en agar rojo congo se evidenció en 87 (73%) y la adherencia en microplaca se demostró en 109 aislamientos (88.2%) del total de los aislamientos estudiados.
  - ✓ La presencia del gen *bap* se evidenció en 2 (1,7%) aislamientos y gen *eno* en 98 (84,2%) del total de aislamientos estudiados.
  - ✓ Se logró confirmar la presencia de factores de virulencia en SCN aislados a partir de mastitis bovina, actualmente considerados patógenos emergentes.



# ***AGRADECIMIENTOS***

- Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Doctora Edith Hernández.
- Universidad Nacional FMVZ.
- Doctora Martha Cecilia Suarez.



