



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**“EVALUACIÓN DE INTERLEUCINAS PRO Y ANTIINFLAMATORIAS EN MASTITIS
DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON**

***Staphylococcus chromogenes*”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

MVZ. Esp. M en C. Cert. Rocio Angélica Ruiz Romero

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares – FMVZ UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Efrén Díaz Aparicio – INIFAP CENID MICROBIOLOGÍA

Dr. Daniel Martínez Gómez – UAM Xochimilco

COMITÉ TUTOR INVITADO

Dr. Andrés Ernesto Ducoing Watty – FMVZ UNAM

Ciudad Universitaria, CD.MX.

ENERO 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DECLARACIÓN

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis se encuentre disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ. EDV. M en C. Cert. Rocío Angélica Ruiz Romero

DEDICATORIA

A mi mamá y mi papá porque siempre me han dado su apoyo incondicional y este trabajo de doctorado no fue la excepción, gracias por todo su amor y por enseñarme a ser una persona comprometida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia ya que no solo me ha dado una profesión, me ha dado un trabajo de ensueño y la oportunidad de realizarme como profesionista.

A mis papás, en especial a mi mamá, porque cuando más deseaba estar junto a ti, siempre me diste ánimos para seguir con el posgrado y no renunciar a él por más feo que estuviera el panorama, aunque no lo sepas, gracias por darme una de las lecciones más importantes en mi vida, que es no dejarse vencer por nada.

A mis hermosos niños Dany, Fer y Alex porque muchas veces tuve que renunciar a estar tiempo con ustedes y aun así siempre me reciben con sus hermosas sonrisas y abrazos, los amo y hacen mi vida sumamente bonita :)

Al Dr. Roberto A. Cervantes Olivares mi director de tesis y padre académico, ya que no solo me ha guiado durante más de 11 años, también me ha escuchado, aconsejado y regañado como un padre, lo quiero con todo mi corazón y sin su apoyo y cariño no sería lo que soy ahora, definitivamente la vida me puso un ángel en mi camino, mil gracias por aguantar cada uno de mis berrinches y creer ciegamente en mí, aún y cuando yo no acabo de creer completamente en mí.

Al Dr. Daniel Martínez Gómez porque desde mis estudios de maestría no dudó en apoyarme y siguió haciéndolo en este trabajo de doctorado, gracias por recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio y apoyarme en los momentos más duros de este trabajo, gracias por su paciencia, por sus conocimientos, por sus consejos de tutor y padre y sobre todo gracias por adoptarme como un miembro más de su laboratorio.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio, ya que desde el primer momento recibí su apoyo incondicional para poder inscribirme al posgrado y por cada una de sus críticas que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Andrés Ducoing Watty, porque trabajar con usted siempre ha sido y será una grata experiencia, gracias por confiar en mí para echar a andar el proyecto PAPIIT y permitirme realizar mi trabajo de Doctorado.

A los miembros del jurado el Dr. Jorge Tórtora Pérez y la Dra. Gabriela Palomares Reséndiz por sus valiosas observaciones y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Dra. Estelita Méndez Olvera por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en la UAM-Xochimilco y permitirme utilizar los equipos de su laboratorio.

A la Dra. Sara Valdés Martínez por apoyarme en la compra de reactivos para concluir este trabajo.

Al Dr. Roberto Ángeles de la UAM Xochimilco por su ayuda para construir los dendogramas.

A la Dra. Cristina Rodríguez Sánchez por enseñarme hace más de 10 años lo maravillosas que son las bacterias.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes al cual me encuentro adscrita y me permitió realizar estos estudios de posgrado para seguir desarrollando esta investigación sobre mastitis caprina.

Al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA) de la FMVZ-UNAM en especial al Dr. Javier Guitérrez Molotla y a la Dra. Rosa Berta Angulo Mejorada por todas las facilidades que me otorgaron para alojar a las cabras utilizadas en este trabajo, así como a la Dra. Yazmín Arriaga Avilés, al MVZ Iván Sánchez y a la M en C. Patricia Manzanero por cuidar de mis cabras, ordeñarlas, alimentarlas y tenerlas muy consentidas.

A cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la UAM Xochimilco y del Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología e la FMVZ-UNAM, en especial a mis hermanitas académicas Sofi y Vero.

A Natalia y Alejandro que estuvieron siempre ahí para apoyarme, regañarme y reír por tonterías en los momentos de más desesperación, gracias por demostrarme que siempre van a estar ahí a pesar de mi dulce carácter, a Mariana y Pily que son de lo mejor que me dejó el Doctorado, a Osvaldo, Blanca y Luis porque su amistad es de lo mejor que hay en mi vida. GRACIAS.

Por último, a mis tres hermosas hijas, Cuca, Clara y Pancha, las cabritas con las que se trabajó en este proyecto, me recordaron que TODOS los animales son lo máximo.

Despite our monumental achievements in philosophy, technology and the arts, to bacteria, humans are no more than an organic mass to be utilized for growth and reproduction.

Sokurenko et al. 1999, Trends in Microbiology.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AGROPECUARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO, EN EL LABORATORIO DE MICOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA Y EN EL LABORATORIO DE ENSEÑANZA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE RUMIANTES DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

EL TRABAJO DE CAMPO SE REALIZÓ EN EL CENTRO DE ENSEÑANZA PRÁCTICA E INVESTIGACIÓN EN PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL (CEIPSA) DE LA FMVZ-UNAM Y FUE FINANCIADO PARCIALMENTE POR EL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) IN2203143.

LA SUSTENTATE RECIBIÓ BECA DEL PROGRAMA DE APOYOS PARA LA SUPERACIÓN DEL PERSONAL ACADÉMICO DE LA UNAM (PASPA) DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA).

ESTE TRABAJO FUE BENEFICIADO POR PARTE DEL PROGRAMA DE APOYO A ESTUDIOS DE POSGRADO (PAEP) DE LA UNAM.

ARTÍCULOS Y TRABAJOS GENERADOS

ARTÍCULOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS

- **Ruiz-Romero RA**, Cervantes-Olivares RA, Ducoing-Watty AE, Martínez-Gómez Daniel, Díaz-Aparicio E, Méndez-Olvera ET. Genetic Analysis Method for *Staphylococcus chromogenes* Associated with Goat Mastitis. Pol. J. Microbiol. 2018; 67:

ARTÍCULO EN REVISIÓN

- Se encuentra en revisión en SLOVENIAN VETERINARY JOURNAL el siguiente artículo: Manzanero-Martínez SP, **Ruiz-Romero RA**, Cervantes-Olivares RA, Espinosa-Ortíz VE, Ducoing-Wattu AE. Identification of and Antimicrobial Resistance in Bacteria Causing Caprine Mastitis in Three States and a City in Central Mexico under Manual and Mechanical Milking Conditions.

ARTÍCULO EN PREPARACIÓN

- **Ruiz-Romero RA**, Cervantes-Olivares RA, Ducoing-Watty AE, Navarro-Hernández JA, Martínez-Gómez D, Díaz-Aparicio E. Evaluation of Pro and Antiinflammatory Interleukins in Goat Mastitis Experimentally Infected with *Staphylococcus chromogenes*.

FOROS DE INVESTIGACIÓN

- **Ruiz-Romero RA**, Cervantes-Olivares RA, Ducoing-Watty AE, Martínez-Gómez Daniel, Díaz-Aparicio E, Méndez-Olvera ET “Método de Genotipificación para *Staphylococcus chromogenes* asociados con mastitis caprina” **MEMORIAS** de la LIII Reunión Nacional de Investigaciones Pecuarias del 15 al 17 de noviembre de 2017 en Acapulco, Guerrero, México.
- **Ruiz-Romero RA**. Participación como **PONENTE** en la LIII Reunión Nacional de Investigaciones Pecuarias con el tema “Método de Genotipificación para *Staphylococcus chromogenes* asociados con mastitis caprina” el 15 de noviembre de 2017 en Acapulco, Guerrero, México.

RESÚMEN

La mastitis caprina es causada principalmente por *Staphylococcus* coagulasa negativo (SNC). Para desarrollar un método de genotipificación, se analizó la secuencia del genoma de *Staphylococcus chromogenes* MU970. El análisis mostró nueve genes de virulencia descritos en *Staphylococcus aureus*. El MLVA se desarrolló utilizando cuatro loci identificados en el genoma de *S. chromogenes* MU970. Con este método de genotipificación, se examinaron 23 cepas de SNC aisladas de mastitis en cabras. La tasa de discriminación para MLVA fue 0.8893, y las tasas más altas de discriminación por el índice de Simpson y Hunter-Gaston fueron 0.926 y 0.968 para el locus 346_06, respectivamente. Los genes de virulencia estaban presentes en todas las cepas de *S. chromogenes*, pero no en otras especies de SNC. Gracias a esta genotipificación, se seleccionó un aislado de *S. chromogenes* el cual se inoculó de manera experimental en la glándula mamaria izquierda de tres cabras primíparas para evitar la exposición previa de la glándula a bacterias, la glándula no fue capaz de eliminar a la bacteria ya que se recuperó durante los muestreos realizados en toda la lactación, la glándula derecha utilizada como control mostró un perfil distinto de interleucinas con respecto a la glándula infectada, sin embargo, la glándula infectada no muestra un perfil de interleucinas del tipo antiinflamatorio que explique el fenómeno de persistencia bacteriana, por lo tanto, se recomienda realizar estudios en donde se puedan medir la expresión de interleucinas en lactaciones subsecuentes para poder esclarecer el fenómeno de persistencia bacteriana en casos de mastitis caprina.

Palabras clave: mastitis, cabras, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, MLVA, interleucinas.

ABSTRACT

Mastitis in goats is mainly caused by coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS). To develop a genotyping method, the genome sequence of *Staphylococcus chromogenes* MU970 was analysed. The analysis showed nine virulence genes described in *Staphylococcus aureus*. The MLVA was developed using four loci identified in the genome of *S. chromogenes* MU970. This genotyping method was examined in 23 strains of CNS isolated from goat mastitis. The rate of discrimination for MLVA was 0.8893, and the highest rates of discrimination per the index of Simpson and Hunter-Gaston were 0.926 and 0.968 for the locus 346_06, respectively. The virulence genes were present in all strains of *S. chromogenes* but not in another CNS. The genotyping method presented in this work is a viable and easy method for typifying CNS isolates from mastitis cases in different regions and is an ideal means of tracking this disease. Thanks to this genotyping method, a *S. chromogenes* isolate was experimentally inoculated in the left mammary gland of three goats calving for the first time, the mammary gland was not able to eliminate the bacterium since it was recovered through all lactation, the right gland was used as control and it showed a different interleukin profile respect to the infected gland, however, the infected gland does not show an anti-inflammatory interleukin profile that indicates bacterial persistence, therefore, it is recommended to carry out studies in which the expression of interleukins in subsequent lactations can be measured to clarify the phenomenon of bacterial persistence in cases of mastitis.

Key words: mastitis, goats, *Staphylococcus chromogenes*, coagulase-negative Staphylococci, MLVA, interleukins.

CONTENIDO

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: INMUNOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	3
1. REGULACIÓN GENÉTICA DEL SISTEMA INMUNE	4
2. MECANISMOS DE DEFENSA DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	5
A. Barreras anatómicas.....	5
B. Sistemas celulares de defensa.....	5
C. Factores solubles de defensa.....	13
3. FUNCIONES DE LAS CITOCINAS QUE PARTICIPAN EN LA INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	15
4. RECONOCIMIENTO DE BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS.....	22
5. INTERACCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA DURANTE LA MASTITIS.....	24
6. RESOLUCIÓN DE LA MASTITIS.....	26
CAPÍTULO II: EL GÉNERO <i>Staphylococcus</i>	27
1. <i>Staphylococcus</i> COAGULASA NEGATIVO COMO CAUSA DE MASTITIS CAPRINA.....	27
2. CARACTERÍSTICAS DE <i>Staphylococcus chromogenes</i>	28
3. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	29
CAPÍTULO III: PERSISTENCIA BACTERIANA	33
1. ANTECEDENTES.....	33
2. DIFERENCIA ENTRE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PERSISTENCIA BACTERIANA....	33
3. SIGNIFICADO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES PERSISTENTES.....	34
4. MODELOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LA PERSISTENCIA BACTERIANA <i>in vitro</i>	35
5. VARIANTES DE COLONIAS PEQUEÑAS EN <i>S. aureus</i>	38
JUSTIFICACIÓN	40
HIPÓTESIS	41

OBJETIVO GENERAL.....	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
METODOLOGÍA.....	42
I. GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus chromogenes</i> A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA).....	42
1. AISLADOS BACTERIANOS.....	42
2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA A NIVEL MOLECULAR.....	43
a) Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	43
b) Identificación de <i>Staphylococcus chromogenes</i>	44
3. IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM Y DISEÑO DE LOS INICIADORES.....	44
4. ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA).....	45
5. ANÁLISIS DE DATOS.....	45
II. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CABRAS.....	46
1. SELECCIÓN DE LA CEPA DE <i>Staphylococcus chromogenes</i> PARA REALIZAR LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN LAS CABRAS.....	46
a) Cultivo de células epiteliales de glándula mamaria de bovino.....	46
b) Ensayo de infección <i>in vitro</i>	47
c) Recuperación de <i>Staphylococcus chromogenes</i> a partir de la infección <i>in vitro</i>	47
2. MANEJO DE LAS CABRAS.....	48
a) Alojamiento.....	48
b) Calendarización de los muestreos de leche antes, durante y después de la infección experimental.....	48
c) Infección experimental de las cabras.....	49
3. MANEJO DE LAS MUESTRAS DE LECHE.....	49
a) Análisis bacteriológico general.....	49
b) Extracción de ADN a partir de células somáticas de leche de cabra.....	50

c) PCR 16s ARNr <i>Staphylococcus</i> spp	50
d) Obtención y lavado de células somáticas de leche de cabra.....	50
III. MANEJO DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RECUPERADOS DE LA LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE.....	51
1. Análisis bacteriológico general.....	51
2. Identificación molecular de los aislados bacterianos.....	51
3. MLVA para el loci 346_06 de <i>Staphylococcus chromogenes</i> inoculado experimentalmente.....	51
IV. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)	52
1. qRT-PCR para cuantificar bacterias a partir de muestras de leche.....	52
2. Cuantificación de interleucinas en leche de cabras infectadas experimentalmente.....	52
a) Extracción de ARN a partir de células somáticas de leche de cabra.....	52
b) Cuantificación de ARN y transcriptasa reversa.....	53
c) Diseño de iniciadores y verificación de amplicones.....	53
d) qRT-PCR para cuantificar al ARNm de las interleucinas a partir de las células somáticas de leche de cabras infectadas experimentalmente.....	55
e) Método C _T	55
3. Análisis estadístico.....	55
RESULTADOS.....	56
I. GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus chromogenes</i> A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA).....	56
1. Identificación bacteriana de los aislados bacterianos.....	56
2. Identificación molecular de los aislados bacterianos.....	56
3. Características fenotípicas de los aislados bacterianos.....	57
4. Estandarización del MLVA.....	57
II. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CABRAS.....	59
1. ELECCIÓN DE LA CEPA DE <i>Staphylococcus chromogenes</i>.....	59

2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CABRAS.....	59
3. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO.....	59
a) Periodo pre-infección.....	59
b) Periodo post-infección.....	59
4. AISLADOS BACTERIANOS RECUPERADOS DE LA LECHE DE CABRAS	
INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE.....	60
a) Análisis bacteriológico general, molecular y MLVA.....	60
III. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y DE ARNm DE INTERLEUCINAS	
POR MEDIO DE qRT-PCR.....	60
1. CUANTIFICACIÓN BACTERIANA EN LECHE DE CABRAS	
INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE.....	60
2. CUANTIFICACIÓN DE ARNm DE INTERLEUCINAS EN CÉLULAS SOMÁTICAS	
DE LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE.....	60
a) Diferencia en la expresión en el grupo control y el grupo infectado.....	61
b) Diferencias en la expresión de interleucinas en el grupo infectado	
durante los días post-infección.....	61
c) IL1 β disminuye su expresión al aumentar la expresión de IL10 y TGF- β	61
d) IFN- γ aumenta su expresión al disminuir la expresión de IL10	62
e) Correlación entre interleucinas y número de bacterias en la glándula mamaria.....	62
DISCUSIÓN.....	63
I. GENOTIPIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus chromogenes</i> A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS	
MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA).....	63
II. EXPRESIÓN DE INTERLEUCINAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA.....	66
CONCLUSIONES.....	74
ABREVIATURAS.....	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
CUADROS.....	88
FIGURAS.....	96

APÉNDICE DE SOLUCIONES.....	103
CARTA DE ACEPTACIÓN POLISH JOURNAL OF MICROBIOLOGY.....	105
ARTÍCULO “Genetic Analysis Method for <i>Staphylococcus chromogenes</i>	
Associated with Goat Mastitis.....	106

LISTA DE CUADROS

	PÁGINA
Cuadro 1. Iniciadores utilizados para identificar a <i>S. chromogenes</i>	88
Cuadro 2. Iniciadores utilizados para amplificar el VNTR.....	89
Cuadro 3. Iniciadores utilizados para amplificar el cDNA de interleucinas.....	90
Cuadro 4. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas con el Sistema API Staph y pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos.....	91
Cuadro 5. Genes identificados en los aislados de SCN.....	93
Cuadro 6: Número de VNTR detectados por electroforesis capilar.....	94
Cuadro 7: Índices de diversidad (Simpson, Hunter-Gaston) e intervalos de confianza para cada loci VNTR utilizados para <i>S. chromogenes</i>	95

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Análisis de conglomerados de acuerdo a las características fenotípicas y pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticas de los 23 aislados de <i>S. chromogenes</i>	96
Figura 2. Análisis de conglomerados de acuerdo al VNTR de los 23 aislados de <i>S. chromogenes</i> utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada.....	97
Figura 3. Conteo bacteriano durante los muestreos post-infección con <i>S. chromogenes</i>	98
Figura 4. Diferencia en el número de transcritos de ARNm del grupo infectado con respecto al grupo control en distintos días de muestreo post-infección.....	99
Figura 5. Diferencia en el número de transcritos de ARNm en los distintos días de muestreo post-infección en el grupo infectado.....	100
Figura 6. Diferencia en el número de transcritos de ARNm durante toda la lactación entre IL-1 β /IL10 e IL-1 β /TGF- β	101
Figura 7. Diferencia en el número de transcritos de ARNm de IFN- γ , IFN- γ /IL10 en el día 19 e IFN- γ /IL10 en el día 77 post-infección.....	102

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una de las enfermedades más importantes dentro de la industria lechera, ocasiona pérdidas económicas por la disminución en la cantidad y calidad de la leche producida, incrementando los costos de producción debido a los servicios médicos veterinarios, además del tratamiento y desecho de los animales (Oviedo y col. 2007, Bonilla y col. 2003, Amezcua, 1981). En cabras, los *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) son los principales agentes causantes de mastitis y se reporta que la prevalencia en los rebaños va del 10 al 30% y en ocasiones hasta el 71%; el diagnóstico correcto de este grupo bacteriano se basa en características genotípicas. (Bonilla y col. 2003; Amezcua 1981, Pyörälä y Taponen 2009). Las infecciones intramamarias (IIM) persistentes son un componente importante dentro de la problemática que implica el control de las mastitis; la presencia de IIM persistentes causan un alto contenido de células somáticas (CS) así como la aparición de casos clínicos que se repiten constantemente (Leitner y col. 2012). La persistencia es una estrategia que poseen las bacterias para evadir la respuesta inmune y de esta manera subsistir dentro del hospedero ocasionando infecciones crónicas, la adaptación de distintas especies bacterianas al hospedero resulta en infecciones persistentes que se asocian a daños menos severos en la glándula por lo que hay una mayor oportunidad de persistir y transmitir estas bacterias que son más resistentes en el hato. Las especies que se han reportado con mayor frecuencia como causa de mastitis en cabras incluyen a *Staphylococcus chromogenes*, *S. xylosum* y *S. simulans*. En el caso de *S. chromogenes*, distintos estudios *in vitro* han demostrado que es la más virulenta de los SCN (Simojoki y col. 2009), además, es capaz de generar infecciones crónicas persistentes, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación de la respuesta inmunitaria por parte del patógeno. La exposición hacia *Staphylococcus* spp, generalmente conlleva a la generación de una respuesta inmune humoral y celular que culmina con la eliminación del patógeno, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, la bacteria sobrevive en el hospedero e induce enfermedades persistentes. A pesar de la gran cantidad de estudios sobre los factores de virulencia que posee este género bacteriano y las estrategias de

sobrevivencia que emplea la bacteria para persistir dentro del hospedador, aún no se conoce del todo lo que sucede con la respuesta inmune durante la infección por *Staphylococcus* spp. Ziegler y col. (2011) demostraron que, la respuesta adaptativa, específicamente la inmunidad mediada por células T, es crítica para la contención de la proliferación de *S. aureus* durante la fase persistente en infecciones renales. También demostraron que el estado de anergia de las células T específicas aisladas de ratones infectados persistentemente, era irreversible en la ausencia del antígeno y no podía recuperarse después del descanso antigénico. Se ha reportado que las células T que presentan anergia *in vivo*, a menudo conllevan a un bloqueo a nivel de la señalización del receptor de las células T (TCR) lo que resulta en una disminución de la activación de PKC θ y de la translocación de NF- κ B (Ziegler y col. 2011).

CAPÍTULO I. INMUNOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria es la responsable de producir leche, para mantener una producción óptima, esta debe conservarse saludable. La mastitis es la respuesta inflamatoria del tejido glandular mamario a cambios fisiológicos, metabólicos, traumatismos, alergias y lo más común: a daños causados por varios microorganismos. La mastitis es la mayor amenaza de la industria lechera desde el punto de vista económico e higiénico (Ezzat y col. 2014). La inflamación intramamaria, acompañada por cambios patológicos e inmunológicos en el tejido glandular mamario, ocurre en distintos grados de intensidad y resulta en una amplia variedad de consecuencias físicas, químicas y microbiológicas de la leche secretada (Ezzat y col. 2014). Existe un amplio espectro de microorganismos incluyendo levaduras, algas, bacterias y virus, sin embargo, las bacterias siguen siendo los patógenos más importantes causantes de la enfermedad. Los principales géneros bacterianos causantes de mastitis clínica son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* y coliformes. Mientras que los patógenos menores como los *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN), otras especies de *Streptococcus*, *Corynebacterium* spp, *Pseudomonas* spp, *Serratia* spp, *Proteus* spp, *Pasteurella* spp, *Listeria* spp, *Leptospira* spp, *Yersinia* spp, *Enterobacter* spp, *Brucella* spp y *Mycobacterium* spp se asocian típicamente a mastitis subclínica, pero en ocasiones a mastitis clínicas. Los distintos patógenos que causan mastitis inducen distintas respuestas inmunes en la glándula mamaria, por lo tanto, el hospedero requiere una respuesta altamente específica dependiendo del patógeno para brindar una protección adecuada. La interacción entre los patógenos causantes de mastitis y el sistema inmune del hospedero es compleja, debido a que ambos tienen la habilidad de coevolucionar para reconocer, responder y adaptarse uno al otro. Debido a esto, los patógenos han desarrollado varias estrategias para alterar y evadir las defensas del hospedero para sobrevivir. El sistema inmune también se adapta y posee un amplio arsenal para controlar y eliminar las amenazas, además de que la susceptibilidad de los individuos dentro de una especie dada difiere contra el mismo patógeno. La variabilidad en la interacción hospedero-patógeno se controla por la carga

genética inherente al hospedero, incluyendo las respuestas innatas y adaptativas, particularmente la memoria inmunológica adquirida, así como la naturaleza del patógeno (Thompson y *col.* 2014).

1. REGULACIÓN GENÉTICA DEL SISTEMA INMUNE

Es crítico que los mecanismos de defensa del hospedero deban ser apropiados y funcionar a tiempo para eliminar de manera expedita a las bacterias para prevenir una mastitis y daño del epitelio mamario. Las bacterias poseen un amplio repertorio de factores de virulencia que se producen en distintas concentraciones dependiendo del estado de infección y estos en parte, determinan las diferencias en la magnitud y en la duración de la respuesta inmune del hospedero (Thompson y *col.* 2014). Tanto la inmunidad innata como la adaptativa se requieren para proteger al hospedero de la infección, las defensas innatas en contra de los patógenos causantes de mastitis son rápidas e incluyen el reclutamiento de neutrófilos en la glándula mamaria que facilitan la eliminación bacteriana a través de la fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno, péptidos antibacterianos como lactoferrina, β -lactoglobulina y defensinas, lo que produce un incremento del conteo de células somáticas. Las células epiteliales juegan un papel en la respuesta temprana a través de la producción de interleucinas como IL8 y otros factores con actividad antimicrobiana. Si las bacterias sobreviven a las defensas innatas del hospedero, se requiere la respuesta inmune adaptativa mediada por células T y B para eliminar la infección. La respuesta inmune ideal, es aquella que reconoce los epítomos del patógeno para iniciar mecanismos precisos de eliminación con consecuencias patológicas mínimas (Thompson y *col.* 2014).

La glándula mamaria se encuentra equipada con barreras anatómicas y una importante cantidad de mecanismos de defensa inmunomediados que incluyen respuestas innatas y adaptativas; la respuesta inmune innata estimula a la respuesta inmune adquirida e influencia su naturaleza, de este modo, la respuesta adquirida utiliza muchos efectores del sistema inmune innato para eliminar a los microorganismos, esta acción, generalmente incrementa la actividad antimicrobiana del sistema inmune innato. Esta respuesta es

relativamente inespecífica con una rápida cinética, mientras que la inmunidad adaptativa ofrece una respuesta altamente específica con una cinética relativamente tardada (Thompson y *col.* 2014; Nogueira y *col.* 2012; Paape y *col.* 2002).

2. MECANISMOS DE DEFENSA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

A. BARRERAS ANATÓMICAS

El canal del pezón es el mecanismo de defensa principal, actúa como barrera física y también es fuente de sustancias antimicrobianas. La barrera física está dada por el músculo liso que rodea al canal del pezón y actúa como barrera que previene la salida de la leche y la entrada de microorganismos. Normalmente la piel del pezón está recubierta por ácidos grasos que detienen el crecimiento de patógenos. El epitelio estratificado escamoso del pezón, produce queratina, la cual delimita el canal del pezón, este atrapa bacterias y previene la migración de bacterias al interior de la glándula (Ezzat y *col.* 2014). La queratina contiene agentes antimicrobianos como ácidos grasos esterificados y no esterificados, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmitoléico y ácido linoléico, así como proteínas que se unen electrostáticamente a los microorganismos alterando su pared celular haciéndolos más susceptibles a los cambios osmóticos que los llevan a la lisis celular y muerte. El tejido del canal del pezón responde rápidamente a la expresión de varios receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés) y a la producción de citocinas y péptidos antimicrobianos. Después del ordeño, el canal del pezón queda distendido hasta dos horas, tiempo en el que las bacterias pueden penetrar causando daño a la queratina (Nogueira y *col.* 2012; Paape y *col.* 2002; Sordillo 2005, Sordillo y Streicher 2002; Pereyra y *col.* 2014).

B. SISTEMAS CELULARES DE DEFENSA

a) CÉLULAS SOMÁTICAS

Las células somáticas son utilizadas como un índice de calidad de la leche de vaca y cabra. El conteo de células somáticas (CCS) en leche de cabras sin infectar es mayor que el CCS en leche de vacas. Existe gran variedad de factores que contribuyen a que el CCS en cabras sea más elevado, uno de estos factores es el hecho de que mientras que la secreción de

leche en vacas es de tipo merócrino, en cabras es apócrina lo que resulta en la eliminación de partículas de citoplasma en leche, otro factor es el estado de lactación, parto, infecciones intramamarias e infecciones con el virus de la artritis-encefalitis caprina, además de que más del 90% de la variación del CCS en cabras no se debe a infecciones intramamarias. En cuanto a la composición de las células, esta difiere entre vacas y cabras; en animales libres de infección, los neutrófilos constituyen del 5 al 20% en leche de vaca y del 45 al 74% en leche de cabra. Estos datos sugieren que la migración de los leucocitos hacia la glándula en cabras, es mucho mayor que en vacas y contribuyen a tener un mayor CCS. Debido a que el CCS en leche de cabra es influenciado por factores fisiológicos, no debe utilizarse la escala de medición de células somáticas de vacas en cabras (Nogueira y col. 2012).

b) NEUTRÓFILOS

Son la segunda línea de defensa, se encuentran de manera permanente en la glándula, la lactancia y el ordeño, inducen la migración de polimorfonucleares (PMN) jóvenes a la glándula, son las primeras células inmunes presentes en el posible sitio de la infección. Los neutrófilos se encuentran rodeados por una membrana plasmática que tiene un número importante de receptores funcionales, estos incluyen a la L-selectina y β 2-Integrina (moléculas de adhesión) que se adhieren a las células endoteliales y que son importantes para migrar a los sitios de la infección. Los receptores membranales para la porción Fc de las IgG2 e IgM y la fracción C3b del complemento son necesarios para mediar la fagocitosis de las bacterias. En el ciclo de vida de los PM, estos requieren estar en la médula ósea de 10 a 14 días para madurar, después de esto, se almacenan por algunos días y una vez maduros se liberan del compartimiento hematopoyético de la médula y entran al seno vascular. Los PMN circulan brevemente (8-9 horas), dejan el torrente sanguíneo y por medio de diapédesis llegan al tejido, en donde funcionan como fagocitos durante 1-2 días. La diapédesis de los neutrófilos hacia la glándula mamaria, en donde sobreviven de 1 a 2 días, ocurre en niveles bajos como parte de la vigilancia inmunológica pero el flujo incrementa rápidamente en respuesta a las infecciones. Los neutrófilos

migran rápidamente hacia la glándula en respuesta a la inflamación, sin embargo, este flujo de neutrófilos puede causar una reacción inflamatoria que resulta en la eliminación de la infección, pero también causa daño tisular que lleva a una fibrosis y por lo tanto altera la función de la glándula mamaria. Los neutrófilos promueven daño en el tejido y alteran la función mamaria debido a la generación de metabolitos reactivos de oxígeno (explosión respiratoria) y debido a la liberación de enzimas, el peroxinitrito producido durante la inflamación, ha sido implicado como un agente citotóxico, este es producto de la reacción del superóxido y del óxido nítrico. Los receptores de neutrófilos para inmunoglobulinas y proteínas del complemento actúan como puentes entre los neutrófilos y los patógenos, esto favorece la ingestión de los patógenos la cual es mediada por inmunoglobulinas y el sistema del complemento uniéndose a las bacterias en el proceso conocido como opsonización el cual ocurre en el torrente sanguíneo. Los neutrófilos seniles empiezan con el proceso de apoptosis antes de que sean ingeridos por macrófagos ya que los neutrófilos apoptóticos expresan receptores que los marcan para que sean rápidamente fagocitados por los macrófagos, este proceso se lleva a cabo para prevenir la desintegración de los neutrófilos *in vivo*, lo cual pudiera causar la liberación de compuestos tóxicos con el consecuente daño a la glándula (Nogueira y *col.* 2012; Paape y Capuco 1997). Existen dos vías de degradación utilizadas por los neutrófilos; la vía oxígeno dependiente, también conocida como explosión respiratoria, con producción de radicales libres de hidroxilo y oxígeno y la vía oxígeno independiente, con producción de peroxidasa, lisozimas, enzimas hidrolíticas y lactoferrina. Los PMN modulan la permeabilidad vascular y liberan mediadores de la inflamación que actúan en la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Los gránulos de los PMN contienen péptidos bactericidas como defensinas, enzimas como mieloperoxidasa y proteasas neutras y ácidas (elastasas, catepsinas tipo B, D y G, así como procatepsinas) (Oviedo y *col.* 2207; Ezzat y *col.* 2014; Nogueira y *col.* 2014; Paape y *col.* 2002).

c) MACRÓFAGOS

Durante la invasión bacteriana, los macrófagos sirven para facilitar la respuesta inmune innata o adquirida. Al igual que los neutrófilos, las funciones inespecíficas de los macrófagos son fagocitar bacterias y destruirlas por medio de proteasas y especies reactivas del oxígeno. La capacidad de fagocitar de estas células se ve incrementada dramáticamente en presencia de anticuerpos opsonizantes en contra de los patógenos, sin embargo, los macrófagos presentes en la glándula mamaria, tienden a disminuir durante la inflamación y poseen una menor cantidad de receptores Fc, también disminuyen su capacidad de fagocitar en comparación con los neutrófilos. La habilidad de los macrófagos de secretar sustancias que facilitan la migración y la actividad bactericida de los neutrófilos es su función principal durante la defensa inespecífica de la glándula mamaria, más que su actividad como células fagocíticas profesionales. De hecho, los macrófagos activados desencadenan la liberación de prostaglandinas, leucotrienos y citocinas que aumentan el proceso de inflamación local. Los macrófagos también juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune específica a través del procesamiento de antígenos y su presentación en asociación con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC II) (Paape y *col.* 2002). Durante el periodo del parto, hay una alteración dramática en la capacidad de los macrófagos y se relaciona directamente con la mayor incidencia de la enfermedad, a pesar de que los macrófagos son más numerosos en la última semana de gestación, su capacidad fagocítica disminuye, posiblemente se debe a una menor actividad opsonizante de las secreciones mamarias, esto podría deberse a una disminución de la IgM, la cual facilita la fagocitosis de los neutrófilos y los macrófagos, de igual manera, la expresión de las MHC II en los macrófagos disminuye durante el parto lo que lleva a una pobre respuesta inmune específica por parte de los linfocitos mamaros. La actividad bactericida varía de acuerdo a la actividad de la glándula, los macrófagos del periodo seco tienen una actividad bactericida mayor que los macrófagos lactacionales (Ezzat y *col.* 2014; Nogueira y *col.* 2014; Paape y *col.* 2002; Paape y Capuco 1997).

d) CÉLULAS EPITELIALES

Expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) principalmente a los receptores tipo Toll, expresan al receptor Ig polimérico en la mucosa, lo que facilita la translocación de inmunoglobulinas, especialmente IgA través del epitelio al lumen alveolar. Después de la estimulación bacteriana, estas células secretan moléculas efectoras del sistema inmune innato y mediadores de la inflamación que contribuyen al reclutamiento de leucocitos. En una glándula en lactación las células epiteliales también expresan interleucina 8 (IL8), además estas células constituyen una fuente importante de componentes de defensa del hospedero como metabolitos del ácido araquidónico, proteínas de la fase aguda de la inflamación, lactoferrina, β -defensinas, catelicidinas, calprotectina y lipopolisacárido (LPS), también expresan IL1 β , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL6, IL8 y oncogenes- α . Estas células llegan a expresar funciones protectoras y fagocíticas vía ingestión y posible digestión de microorganismos fagocitados, así como glóbulos de grasa y micelios de caseína. Durante las etapas tempranas de la infección, las células epiteliales mamarias, juegan un papel en el reclutamiento y activación de las células inflamatorias a través de la vía de señalización de la IL8 e inician la inducción de los genes de la inmunidad innata predominantemente asociada con la respuesta proinflamatoria. Las células epiteliales expresan genes que codifican para distintas proteínas de la fase aguda de la inflamación como SAA3, SERPINA1, PTX3 y distintos factores como S100A12 (Brenaut y *col.* 2014). El establecimiento, persistencia y gravedad de la infección depende en la rapidez y efectividad de las respuestas del hospedero contra los patógenos, además, la eliminación de los patógenos bacterianos de la glándula es usualmente realizado por la respuesta que ocurre en las horas inmediatas después de la infección. En las etapas iniciales de la infección, la principal estrategia de defensa es la rápida inducción de la respuesta inmune innata, esta respuesta es de corta acción y tiene como objetivo varios tipos de microorganismos. Las células de la respuesta innata incluyen neutrófilos y macrófagos que son las primeras en llegar al sitio de la infección, estas células secretan citocinas, quimiocinas y usan distintas estrategias celulares para eliminar

bacterias, sin embargo, poco se conoce acerca de los factores que se involucran en el rápido reclutamiento al sitio de la infección ya que los estudios se han enfocado en las células epiteliales mamarias (CEM) pues son las primeras células que se confrontan con el patógeno una vez que entra a la glándula mamaria. Cada vez hay más evidencias que indican el papel fundamental de las CEM en el inicio de la respuesta inmune que desencadena la consecuente infiltración de neutrófilos al tejido mamario, la activación de estas células inmunes y el incremento del CCS en la leche. Las CEM responden rápidamente a desafíos con niveles bajos de bacterias o a componentes de la pared bacteriana y las CEM son capaces de generar una variedad de mediadores de la inflamación como citocinas, quimiocinas y péptidos como β -defensinas, de hecho, las CEM actúan rápidamente secretando IL8 que es uno de los principales mediadores de la inflamación involucrado en el reclutamiento y activación de las células inmunes incluyendo a los neutrófilos, además de ser un factor quimiotáctico de estos en presencia de bacterias Gram positivas, Gram negativas, LPS o IL1 β (Nogueira y *col.* 2014). Estudios señalan que las CEM actúan como primera línea de defensa contra patógenos y son capaces de inducir la regulación de genes involucrados con la respuesta inflamatoria. También son capaces de secretar TNF- α que a su vez induce la expresión y liberación de la IL8. Las CEM expresan al receptor TLR2 que es un componente clave en el reconocimiento de bacterias Gram positivas, esto se debe a que las CEM contienen una vía de señalización de receptores tipo Toll que es ligeramente inducido por componentes bacterianos y responde de manera inmediata. Las CEM poseen un papel intrínseco en la vigilancia del tejido mamario, su función principal es reclutar células inmunes y este reconocimiento ocurre por la vía de señalización de TLR dependiente de MyD88. La estimulación de esta vía se considera el principal mecanismo que aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias y la activación de la respuesta inmune innata (Brenaut y *col.* 2014). La estimulación del TLR2 dispara las cascadas de señalización intracelular que lleva a la activación del NF- $\kappa\beta$, el cual resulta en la activación de varios genes que codifican mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL1 β e IL6, además el TLR2 compromete la

producción y la liberación de citocinas por parte de las CEM como la IL8 y en menor grado CCL2 y CCL4 que tienen actividad quimiotáctica de monocitos y macrófagos (Oviedo y *col.* 2007; Ezzat y *col.* 2014; Brenaut y *col.* 2014).

e) LINFOCITOS

Los linfocitos son capaces de reconocer antígenos a través de receptores específicos de membrana, lo cual define las características inmunológicas de especificidad, diversidad, memoria, reconocimiento y auto-reconocimiento. La leche contiene una población residente de macrófagos, neutrófilos y linfocitos, los linfocitos se dividen en dos grupos principales: linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos T se clasifican en linfocitos $\alpha\beta$ que incluyen a los CD4+ (T cooperadores) y CD8+ (T citotóxicos) y linfocitos T $\gamma\delta$. En el período de lactación los linfocitos $\alpha\beta$ predominan y expresan el fenotipo CD8+. La función de los linfocitos T citotóxicos activados (CD8+) es eliminar a células hospederas infectadas que detectan gracias a los antígenos expresados en la superficie de las células infectadas. En la glándula mamaria es mayor la población de CD8+ y en coordinación con las moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC I), las células T citotóxicas reconocen y eliminan a las células dañadas vía presentación de antígeno y son más específicas que las células Natural Killers (NK), sin embargo, en cabras, los linfocitos CD4+ son las células predominantes durante toda la lactación, durante la mastitis, los linfocitos T CD4+, prevalecen y son activados en respuesta al reconocimiento del complejo antígeno-MHC II en las células presentadoras de antígeno (CPA) como los linfocitos B y los macrófagos. Los rumiantes presentan altos niveles de linfocitos T $\gamma\delta$ en secreciones y parénquima de la glándula mamaria. Los linfocitos $\gamma\delta$ median la citotoxicidad similar a las células NK involucrando a las moléculas MHC y son capaces de destruir a las células epiteliales. Los linfocitos T cooperadores (CD4+) tienen un efecto indirecto, pero igualmente importante en la infección. Cuando una célula TH madura, se desarrolla en uno de cuatro tipos de células TH, la estimulación de estas células TH maduras causa la expresión de una amplia variedad de citocinas que dirigen la respuesta inmune a una respuesta proinflamatoria mediada por linfocitos citotóxicos TH1, respuesta mediada por linfocitos B (TH2), mediada por

neutrófilos (TH17) o reguladores de la respuesta (Treg) (Ezzat y *col.* 2014; Noguiera y *col.* 2012; Paape y *col.* 2002; Pereyra y *col.* 2014).

CUADRO I. ELEMENTOS CELULARES PRESENTES EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE RUMIANTES (Tomado de Ezzat y *col.* 2014)

CÉLULA	GLÁNDULA MAMARIA SANA	MASTITIS
Células somáticas	2 x 10 ⁵ cel/ml.	Más de 2 x 10 ⁵ cel/ml dependiendo de la severidad de la infección.
Leucocitos	75% del total de las células somáticas.	Puede ocurrir un alto incremento dependiendo de la severidad de la infección debido al reclutamiento de las células inmunes de las reservas de la glándula mamaria y de la médula ósea.
Macrófagos	35-79% del total de leucocitos en leche, constituyen el tipo celular predominante.	9-32% del total de los leucocitos.
Linfocitos	10-28% del total de leucocitos en leche. Linfocitos T: 40-50% Linfocitos B: 20-25% Linfocitos $\alpha\beta$: Predominan CD8+ y abarcan del 50-60% del total de la población de linfocitos.	14-24% del total de los leucocitos en leche. Los linfocitos CD4+ son el fenotipo activado predominante en respuesta al reconocimiento del complejo antígeno-MHCII en las CPA como los linfocitos B y los macrófagos.
Neutrófilos	3-26% del total de leucocitos en leche.	Son las células predominantes, constituyen hasta el 90% del total de los leucocitos en la leche. En infecciones crónicas permanecen como las células predominantes incluso durante meses.

C. FACTORES SOLUBLES DE DEFENSA

Los factores solubles, tanto específicos como innatos, representan una importante línea de defensa dentro de la glándula mamaria que pueden provocar respuestas protectoras efectivas hacia los patógenos. Los efectores solubles primarios de la respuesta inmune específica son los anticuerpos producidos por los linfocitos B activados. Existen cuatro clases de inmunoglobulinas que influyen los mecanismos de defensa bacterianos en la glándula mamaria: IgG1, IgG2, IgA e IgM, en general, las inmunoglobulinas alcanzan el pico de concentración durante la calostrogénesis y durante la inflamación. La IgG1 es el isotipo principal que se encuentra en las secreciones de la glándula mamaria, pero la IgG2 incrementa sustancialmente durante la inflamación de la misma. Varios isotipos actúan como opsoninas (IgG1, IgG2 e IgM) las cuales incrementan el proceso de fagocitosis de neutrófilos y macrófagos. Por otro lado, la IgA no participa en la opsonización, pero funciona en la aglutinación de las bacterias que previenen su diseminación en la glándula mamaria, además de los factores específicos, la glándula también posee factores bacteriostáticos inespecíficos que trabajan en coordinación con las Igs o de manera independiente a ellas (Ezzat y *col.* 2014; Paape y *col.* 2002; Pereyra y *col.* 2014).

a) LACTOFERRINA

Es una proteína de unión al hierro producida por leucocitos y células epiteliales que se unen al hierro libre en la leche para prevenir el crecimiento de bacterias que requieren del hierro para su metabolismo.

b) LISOZIMA

Es una proteína bactericida presente en leche y funciona rompiendo el peptidoglicano de la pared de las bacterias Gram positivas, así como la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

c) LACTOPEROXIDASA

En presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno, funciona como bacteriostático de bacterias Gram positivas y Gram negativas, se produce en pequeñas concentraciones en la glándula mamaria, los niveles de tiocianato en la glándula mamaria dependen de la dieta

del animal, el peróxido de hidrógeno se produce por constituyentes enzimáticos de la leche. El sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno ejerce sus propiedades antibacterianas a través de la producción de hipotiocianato, un metabolito reactivo formado por la oxidación del tiocianato.

d) MIELOPEROXIDASA

Producida por neutrófilos, cataliza la misma reacción que la lactoperoxidasa y además cataliza la oxidación del cloro, el producto que provee la actividad bactericida del sistema.

e) SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Presente en la leche y juega un papel importante dentro de los mecanismos de defensa de la glándula mamaria contra la mastitis. Las proteínas del complemento se producen en hepatocitos, así como en monocitos y macrófagos en diferentes tejidos. El complemento recluta neutrófilos a la glándula mamaria, opsoniza y mata bacterias. *Escherichia coli* es sensible a la acción lítica de complemento, mientras que las bacterias Gram positivas como *S. aureus* son resistentes, sin embargo, todas las bacterias son sensibles a la opsonización de C3b y C3bi. Las actividades bactericidas y hemolíticas del complemento se incrementan en las glándulas mamarias inflamadas y la intensidad depende de la respuesta inflamatoria. La actividad hemolítica y C3 en leche son mayores en glándulas mamarias con mastitis que en glándulas sanas. La menor concentración del complemento se observa en la leche de las glándulas mamarias sanas durante la lactación, mientras que la concentración más alta, se encuentra en calostro, leches con mastitis y secreciones mamarias obtenidas durante la involución, posiblemente debido a la movilización de los componentes del complemento de la sangre hacia la glándula mamaria (Ezzat y col. 2014).

f) CITOCINAS

Las citocinas son un puente entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, las quimiocinas son moléculas involucradas en la migración y en el reclutamiento de leucocitos, son inmunoreguladores. Los principales grupos de citocinas incluyen las interleucinas (IL), factores estimulantes de colonia (CSF), interferones (IFN) y factores de necrosis tumoral (TNF). En la glándula mamaria sana e infectada se han

encontrado distintas interleucinas como IL1 β , IL2, IL6, IL8 e IL12, también se han encontrado CSF, IFN- γ y TNF- α (Alluwaimi y *col.* 2003; Alluwaimi 2004).

CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

Algunas citocinas promueven la inflamación, las citocinas proinflamatorias más importantes son el TNF- α y la IL1 que a su vez se divide en IL1 α citoplasmática y la IL1 β secretora. El TNF- α y la IL1 β son mediadores de la respuesta inmune local y sistémica, no solo regulan la expresión de los genes de respuesta inmune como otras citocinas, enzimas involucradas en la síntesis de eicosanoides y proteínas de la fase aguda de la inflamación, también regulan genes involucrados en la proliferación celular y la apoptosis (Alluwaimi y *col.* 2003; Alluwaimi 2004).

CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS

Las citocinas IL4, IL10 e IL13, así como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) suprimen la producción de citocinas inflamatorias. Los interferones (IFNs) son una familia de citocinas con funciones de modular la inmunidad, los interferones tipo I se expresan en todos los tipos celulares, pero el IFN- γ es el más estudiado en la inmunidad de la ubre y es producido exclusivamente por leucocitos. Esta citocina induce las funciones de macrófagos como la presentación de antígenos e incrementa la actividad lisosomal, además el IFN- γ promueve la diferenciación de linfocitos TH1 y al mismo tiempo suprime la actividad de los linfocitos TH2 (Schukken y *col.* 2011).

3. FUNCIONES DE LAS CITOCINAS QUE PARTICIPAN EN LA INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA (Paape y *col.*2002; Pereyra y *col.* 2014; Schukken y *col.* 2011).

a) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

Producido por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales, participan en la actividad quimiotáctica de neutrófilos porque inducen la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, es la principal citocina producida en etapas tempranas de la lactación.

b) INTERLEUCINA 1 β

Producida por monocitos, macrófagos y células epiteliales, durante la respuesta inflamatoria, regula la expresión de adhesinas de células endoteliales y quimiotaxis de neutrófilos en infecciones por *E. coli*, en infecciones por *S. aureus* es importante solo en etapas tempranas.

c) INTERLEUCINA 2

Producida por linfocitos CD4, regula la respuesta inmune adquirida por estimular el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, aumenta la proliferación de timocitos, activa células NK y activa a los linfocitos T. Una alteración en la producción de esta citocina causa una disminución en la respuesta inmune de la glándula mamaria que contribuye a la presencia de mastitis.

d) INTERLEUCINA 6

Citocina proinflamatoria producida por macrófagos, en infecciones por coliformes o *S. aureus* está involucrada en el choque séptico agudo. Facilita el cambio de neutrófilos a monocitos en la glándula mamaria, el cual es necesario para disminuir los efectos detrimentales de neutrófilos.

e) INTERLEUCINA 8

Quimiocina producida por monocitos, linfocitos T y macrófagos, así como células epiteliales y endoteliales. En infecciones por *E. coli* se produce en gran cantidad y en infecciones por *S. aureus* se encuentra a bajas concentraciones.

f) INTERLEUCINA 12

Es un mediador entre la respuesta inmune innata y adquirida y regula la diferenciación de linfocitos T.

g) QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son una clase específica de citocinas que media el reclutamiento de células efectoras inmunes en el sitio de la inflamación. La CXCL8 (IL8) es la quimiocina mejor estudiada en la respuesta inmune de la glándula mamaria, muchos estudios han demostrado un incremento significativo en el ARNm de CXCL8 en tejido mamario después

de la infección con varios patógenos causantes de mastitis. Esta quimiocina interactúa como el receptor de quimiocina 1 (CXCR1) y CXCR2 que median el reclutamiento de granulocitos y la acumulación de macrófagos en el sitio de la infección. En la glándula mamaria, las quimiocinas que atraen a los neutrófilos son la CXCL1, CXCL2 y CXCL3 las cuales interactúan con los receptores CXCR1 y CXCR2 de neutrófilos, mientras que la CXCL1, CXCL2, CXCL3 y CXCL8 se expresan en tejido mamario y células epiteliales mediando el tráfico de leucocitos (Oviedo y *col.* 2007; Noguiera y *col.* 2012; Alluwaimi y *col.* 2003; Alluwaimi 2004).

h) INTERFERON

Los interferones constituyen una familia de citocinas con funciones inmunes moduladoras. Los IFN tipo I como el IFN- α y el IFN- β se expresan en todos los tipos de células, mientras que el IFN- γ es producido exclusivamente por linfocitos CD4, CD8 y células NK en respuesta a estímulos mitogénicos y antigénicos, activa la respuesta inmune adquirida, aumenta la capacidad de fagocitar de neutrófilos reclutados en la glándula mamaria. El IFN- γ promueve la diferenciación de células TH1 y suprime de forma concomitante la actividad de células TH2. Las mayores concentraciones de IFN- γ se han detectado en infecciones intramamarias caracterizadas por una persistencia de la infección y que estas elevadas concentraciones coincidieron con un mayor número de bacterias recuperadas de las glándulas mamarias infectadas en comparación con las glándulas mamarias no infectadas (Ezzat y *col.* 2014).

i) FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)

Su principal función es inhibir la proliferación y activación de linfocitos y otros leucocitos, es una proteína homodimérica sintetizada en forma de precursor y se activa mediante escisión proteolítica, es secretada por linfocitos T estimulados por antígeno, macrófagos activados por LPS y otros tipos celulares. Algunos linfocitos T reguladores producen TGF- β y este mismo tipo celular también puede sintetizar IL10, los receptores de TGF- β son dos receptores polipeptídicos de alta afinidad (tipo I y II) que envían señales a través de un dominio serina-treonina cinasa que fosforila factores de transcripción denominados

SMAD. Dentro de sus funciones biológicas se encarga de inhibir la proliferación y diferenciación de linfocitos T y la activación de macrófagos, también actúa sobre neutrófilos y células endoteliales en gran medida para contrarrestar los efectos de las citocinas proinflamatorias, mediante estas acciones inhibe respuestas inmunitarias e inflamatorias, también estimula la síntesis de IgA al inducir en linfocitos B el cambio de isotipo. TGF- β induce la síntesis de proteínas de matriz extracelular como colágenos, enzimas modificadoras de la matriz como metaloproteinasas y receptores celulares para proteínas de matriz como integrinas. Estas acciones pueden favorecer la reparación de tejidos tras controlarse las reacciones inflamatorias inmunitarias locales (Abbas 2003).

CUADRO II. FACTORES SOLUBLES PRESENTES EN LA GLÁNDULA MAMARIA

(Tomado de Oviedo y col. 2007)

FACTOR	FUNCIÓN
Citocinas	Factores proinflamatorios e inmunoreguladores.
Complemento	Bacteriolítico y/o facilita la fagocitosis.
Lisozima	Rompe las paredes celulares bacterianas.
Lactoferrina	Secuestra hierro para prevenir el consumo por parte de las bacterias, rompe la pared celular bacteriana, regula la actividad de los leucocitos.
IgG1	Selectivamente transportada en las secreciones mamarias, opsoniza bacterias para favorecer la fagocitosis.
IgG2	Transportada en secreciones durante la diapédesis de neutrófilos, opsoniza bacterias para favorecer la fagocitosis.
IgA	Asociada a la grasa de la leche, aglutina bacterias para prevenir la colonización bacteriana y neutraliza toxinas.
IgM	Eficiente en la fijación del complemento, aglutina y neutraliza toxinas, solo opsonizan para los neutrófilos en presencia del complemento.

CUADRO III. FUNCIÓN DE LAS CITOCINAS PRESENTES EN LA GLÁNDULA MAMARIA

(Tomado de Paape y col. 2002)

CITOCINA	ACTIVIDAD PRINCIPAL	FUENTE	FUNCIONES
IL1	Proinflamatoria	Macrófagos Linfocitos Monocitos Células endoteliales Fibroblastos	Mediador de la fase aguda de la inflamación. Incrementa el número de neutrófilos. Incrementa la actividad fagocítica de neutrófilos y su actividad bactericida. Estimula la migración de neutrófilos a la glándula infectada.
IL2	Proinflamatoria	Células CD4+ principalmente TH1	Incrementa la proliferación de células mononucleares. Incrementa la actividad citotóxica y bactericida de linfocitos.
IL4	Antiinflamatoria	CD4+ principalmente TH2 CD8+/linfocitos T supresores Linfocitos B	Contribuye a la regulación del sistema inmune innato regulando la diferenciación de linfocitos T, favorece el desarrollo de poblaciones TH2 Inhibe la producción de IFN- γ .
IL6	Proinflamatoria Antiinflamatoria	Macrófagos Linfocitos Monocitos Neutrófilos Epitelio glandular mamario Células endoteliales	Favorece el flujo de monocitos a la glándula mamaria. Induce la diferenciación de células B, así como su correspondiente producción de Igs y activación de células T por neutrófilos. Ejerce actividad antiinflamatoria inhibiendo la expresión de IL1 β y TNF- α . Participa en la respuesta febril.
IL8	Proinflamatoria	Monocitos Linfocitos T Macrófagos Polimorfonucleares Epitelio Glandular mamario	Induce respuesta inflamatoria, es un potente quimiotáctico de neutrófilos con efecto prolongado y en menor proporción de linfocitos T. Induce la degranulación de neutrófilos. Incrementa la actividad microbicida de PMN y estimula la fagocitosis de partículas opsonizadas.

CITOCINA	ACTIVIDAD PRINCIPAL	FUENTE	FUNCIONES
IL10	Antiinflamatoria	Linfocitos TH2 Linfocitos B Monocitos Eosinófilos Mastocitos	Principal citocina antiinflamatoria y juega un papel principal en la resolución de la inflamación. Previene la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y eicosanoides por parte de los leucocitos y disminuye la generación de todo tipo de células TH. Disminuye la presentación de antígenos de los macrófagos hacia las células T disminuyendo la expresión de MHCII.
IL12	Proinflamatoria	Macrófagos Linfocitos B Monocitos Neutrófilos	Es un mediador de la respuesta inmune innata y adquirida regulando la diferenciación de linfocitos T. Favorece la polarización de CD4+ y CD8+ en células TH1 y células citotóxicas respectivamente. Actúa como factor de crecimiento de células NK y aumenta su actividad citotóxica. Estimulando la producción de IFN- γ por células T y células NK, contribuye a la activación de macrófagos. Regula a las citocinas TNF- α , IL8 e IL10.
G-CSF M-CSF GM-CSF	Proinflamatorias	Fibroblastos Células endoteliales Macrófagos Linfocitos T	Incrementa el número de neutrófilos en leche y sangre. Regula la proliferación y diferenciación de macrófagos. Incrementa la actividad quimiotáctica y bactericida de neutrófilos.
IFN-γ	Proinflamatoria	Linfocitos T principalmente TH1 y CD8+ Células NK Monocitos	Incrementa la fagocitosis de neutrófilos y su actividad bactericida.
TNF-α	Proinflamatoria	Macrófagos Neutrófilos Epitelio glandular mamario	Incrementa la fase aguda de la inflamación.

4. RECONOCIMIENTO DE BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS

La respuesta inmune inicia cuando los PRRs de la superficie celular o dentro de las células hospederas como leucocitos y células epiteliales se unen a ligandos bacterianos o a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los cuales se liberan durante la replicación o la degradación bacteriana (Ovideo y col. 2007; Ezzat y col. 2014).

FAMILIAS DE RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS

1. Receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos)
2. Receptores tipo TOLL (TLR)
3. Receptores tipo ácido retinoico inducible del gen 1 (RIG-1)

La activación de estos PRRs inicia con una transducción de señal en donde el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) juega un papel primordial en coordinar múltiples señales y dirigir la expresión de los genes efectores de la respuesta inmune incluyendo citocinas y coordinando la respuesta inmune local y sistémica. Los TLR son una familia conservada, involucrada en la detección de patógenos, se han identificado 13 tipos en mamíferos de los cuales, 10 se encuentran en rumiantes y todas las vías de señalización activan al factor NF- $\kappa\beta$, las vías dependientes de MyD88 (proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide) se asocian con una fase temprana e respuesta NK- $\kappa\beta$, mientras que la vía independiente de MyD88 se asocia con una respuesta tardía de NF- $\kappa\beta$, Estos factores NF- $\kappa\beta$ entran subsecuentemente al núcleo y se une a sus promotores blanco. Una gran cantidad de genes reguladores de la inflamación presentan sitios de unión NF- $\kappa\beta$ en su región promotora y estos complejos actúan como un interruptor principal para orquestar toda una batería de genes de defensa inmune. El patrón de la respuesta inmune en la fase aguda está dominado por una sobrerregulación de citocinas y quimiocinas, vías de señalización de TLR y migración transendotelial de leucocitos. La importancia de la respuesta innata radica en el entendimiento de la interacción de los PAMPs con receptores específicos en las células del hospedero que reconocen estos PAMPs. Los TLR son sensores de las células hospederas que reconocen estos PAMPs, Los TLR4 y TLR2 son receptores importantes ya que reconocen moléculas microbianas conservadas como el LPS de bacterias Gram negativas y ácido lipoteicóico (LTA) de bacterias Gram positivas. S.

aureus evita mayormente la respuesta inmune por los que las infecciones intramamarias resultan en una respuesta moderada (Oviedo y col. 2007).

CUADRO IV. RECEPTORES TIPO TOLL INVOLUCRADOS EN EL RECONOCIMIENTO BACTERIANO (Tomado de Oviedo y col. 2007)

RECEPTOR	FUNCIÓN
TLR2	Reconoce al ácido lipoteicóico y peptidoglicano de bacterias Gram positivas.
TLR4	Reconoce al LPS de bacterias Gram negativas, fibrinógeno, polipéptidos y proteínas de choque de calor.
TLR5	Reconoce flagelina.
TLR9	Receptor asociado a endosomas, reconoce ADN y ARN bacteriano durante la infección intracelular.

Además de los TLRs, el reconocimiento de las estructuras químicas de *Staphylococcus* spp, está mediado por receptores peptídicos formilados, ficolinas, moléculas del complemento y lectinas de unión a manosas (MBL) El reconocimiento del peptidoglicano y del ácido lipoteicóico por ficolinas y MBL involucran la producción del quimiotáctico C5a y la deposición del fragmento del complemento C3b en la superficie de *Staphylococcus* spp que facilita su fagocitosis y muerte (Oviedo y col. 2007).

5. INTERACCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA DURANTE LA MASTITIS

Ambas respuestas se coordinan para dar una protección óptima, el reconocimiento del patógeno y la presentación del antígeno inician una respuesta proinflamatoria. Una vez que las bacterias entran en contacto con los leucocitos de la leche y el epitelio glandular, se activa la respuesta innata a través de genes transcripcionales. Los productos inflamatorios del epitelio dañado hacen que los leucocitos locales y el epitelio sano liberen quimiotácticos para que migren células de la médula ósea y de la circulación a la glándula mamaria, principalmente neutrófilos. Las citocinas proinflamatorias IL1 β , IL6 e IL7, así como la IL8 y el TNF α son los principales efectores que inician la respuesta inflamatoria a nivel local y sistémico, actúan en colaboración con el TGF- α , GM-CSF y varios factores quimiotácticos como las porciones C3a y C5a del complemento, leucotrienos B₄, el factor activador de plaquetas, eicosanoides, prostaglandinas F₂ α , radicales de oxígeno y proteínas de la fase aguda de la inflamación. Todos estos factores desencadenan la migración de neutrófilos debido a la inducción de la expresión de moléculas de adhesión al endotelio vascular (principalmente E y P selectinas) que promueven la migración transendotelial de neutrófilos al foco de la infección, como consecuencia hay un aumento de la expresión de otras moléculas de adhesión de neutrófilos como Mac-1, también conocida como CD11b/CD18 que permite que los neutrófilos se unan al endotelio activado en colaboración con otras moléculas de adhesión molecular como ICAM-1. Esta interacción de adhesión, permite a los neutrófilos migrar de la superficie endotelial de los tejidos de la glándula mamaria siguiendo al gradiente de concentración de los quimiotácticos como la IL8, se piensa que la IL17 aumenta el reclutamiento de los neutrófilos a la glándula mamaria regulando la expresión de la IL8 y aumenta la expresión de varias quimiocinas como CXCL3 y CXCL8, las cuales, además de reclutar neutrófilos, reclutan otros leucocitos mononucleares (CCL2, CCL20). Los leucocitos que migran expresan gran cantidad de receptores de superficie para inmunoglobulinas y proteínas del complemento. La estimulación de la actividad microbicida de varios leucocitos que se localizan en los tejidos infectados es regulada por algunas citocinas proinflamatorias. La

actividad de los neutrófilos y sus funciones son estimuladas por IL1, IL8, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, la actividad de los macrófagos es estimulada por la IL12, M-CSF, GM-CSF y la actividad de las células NK con ayuda de la IL2 y la IL12. Las respuestas fisiológicas que ocurren como consecuencia de las infecciones intramamarias son la generación de una respuesta febril, la alteración del metabolismo hepático por lo tanto hay un aumento de las proteínas de la fase aguda de la inflamación, además hay cambios en la permeabilidad vascular y su activación. Los antígenos de los patógenos son procesados por macrófagos y linfocitos B y aparecen en la membrana en asociación con las moléculas de histocompatibilidad tipo I y II (MHC-I y MHC-II), para ser reconocidos por los linfocitos. El IFN- γ contribuye a regular la expresión de MHC-I y MHC-II en la presentación del antígeno para aumentar el reconocimiento de linfocitos T citotóxicos de los péptidos extraños e inducir la actividad de los linfocitos T CD4. A través del reconocimiento de los antígenos en las MHC-II en los linfocitos B o macrófagos, las CD4 se activan y producen citocinas que participan en la activación y polarización de los linfocitos B, linfocitos T, macrófagos y otras células que participan en la respuesta inmune. Dependiendo de las citocinas producidas, la respuesta de los linfocitos TH facilita una respuesta celular TH1 o una respuesta humoral TH2. La IL2 y el IFN- γ son las principales citocinas secretadas por linfocitos TH1 y estimulan una respuesta celular contra patógenos intracelulares. En contraste, las IL4, IL5 e IL10 son secretadas por los linfocitos TH2 y promueven una respuesta inmune humoral que regula la función de macrófagos y la producción de citocinas. Las citocinas inflamatorias producidas por las células T inducen la proliferación y diferenciación de linfocitos B en anticuerpos o células de memoria. Los macrófagos activados liberan señales quimiotácticas para neutrófilos aumentando la inflamación, los macrófagos secretan prostaglandinas y leucotrienos que aumentan la inflamación local, así como citocinas específicas que regulan la diferenciación de células T como la IL12. La regulación de las poblaciones TH en linfocitos TH1 o TH2 es el eje principal en el que trabajan las citocinas reguladoras IL4 e IL12. La IL12 se produce en respuesta a bacterias y productos bacterianos, además contribuye a la respuesta inmune favoreciendo la polarización de CD4 en TH1 e incrementa la generación de IFN γ producida por CD8,

además, actúa como factor de crecimiento de células NK e induce otras actividades de citocinas y contribuye a la producción de IFN γ de linfocitos y células NK. En contraste con la IL12, la IL4 favorece poblaciones TH2 y tiene un efecto inhibitorio en la producción de IFN γ (Leitner y *col.* 2012; Nogueira y *col.* 2012; Sordillo 2005; Sordillo y Streicher 2005).

6. RESOLUCIÓN DE LA MASTITIS

La resolución de la inflamación es regulada por citocinas antagonistas de la inflamación como IL10 y TGF β y a los efectos antiinflamatorios de la IL6 e IL4. La IL10 es la contribuyente más potente y disminuye la producción de todos los tipos de linfocitos TH, así como de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y eicosanoides producidos por monocitos, macrófagos y neutrófilos, inhibe la habilidad de los macrófagos de estimular a los linfocitos TH1 para producir IFN- γ , con ayuda de la IL6, regula los receptores antagonistas de IL1 y del TNF- α debilitando los efectos proinflamatorios de estas últimas, sin embargo, la IL10 no inhibe la producción de citocinas por linfocitos B ni tampoco afecta la habilidad de los fagocitos de estimular la producción de citocinas por linfocitos TH2. El TGF- β inhibe la producción de quimiocinas, citocinas proinflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (ROS) de macrófagos, limita la producción de IFN- γ , incrementa la expresión de antagonista del receptor de la IL1 y aumenta la actividad de los macrófagos de fagocitar bacterias y detritus celulares. (Amezcuca 1981; Leitner y *col.* 2012).

La reparación de la glándula mamaria está mediada por TGF- α ya que promueve la proliferación tisular, también promueve la deposición de matriz extracelular, fibrosis y cicatrización. La restauración y la cicatrización es controlada por el balance entre los dos tipos de TGF. Las células alteradas son removidas por macrófagos y células T citotóxicas que reconocen células alteradas vía la presentación de antígenos con la ayuda de linfocitos $\gamma\delta$ y células NK. (Amezcuca 1981; Leitner y *col.* 2012).

La respuesta inmune es insuficiente para eliminar al género *Staphylococcus*, por lo tanto, hay persistencia bacteriana que eventualmente llevan a mastitis subclínicas o crónicas (Amezcuca 1981; Leitner y *col.* 2012).

CAPÍTULO II: EL GÉNERO *Staphylococcus* spp

El género *Staphylococcus* spp corresponde a cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 μm de diámetro que pueden estar solos, en pares, tetradas, cadenas cortas (3 – 4 células) o estar agrupados en forma de racimos irregulares. Estas bacterias son catalasa positivo y anaerobios facultativos con excepción de *S. aureus* subsp *anaerobius* y *S. saccharolyticus* que son anaerobios estrictos (Hermans y col. 2004) Hasta la fecha se han caracterizado 47 especies y 23 subespecies, este género se divide en *Staphylococcus* coagulasa positivo (SCP) y *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) basados en su habilidad para coagular el plasma sanguíneo (Pyorala y Taponen 2009; Watanabe y col. 2009). *S. aureus* es la especie más patógena de este género, además de *S. aureus*, se han reportado otras 6 especies de SCP los cuales son: *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp *coagulans*, *S. hyicus* y *S. lutrae*. Tales especies al igual que *S. aureus* colonizan la piel y mucosas de los mamíferos (Watanabe y col. 2009; Blaiotta y col. 2010; Foster y col. 1997). En el caso de los SCN, estos representan un grupo heterogéneo dentro del género *Staphylococcus*, pero esta agrupación no está dada en base a sus relaciones filogenéticas, solamente se denominaron así para diferenciarlos de aquellas especies que si coagulan el plasma sanguíneo. Los SCN poseen menor cantidad de factores de virulencia que *S. aureus*, pero cada vez se encuentran mayor cantidad de cepas resistentes a la meticilina, para finales de la década de los 80s se acepta que este grupo posee un potencial patogénico, entre las propiedades patogénicas se encuentra la habilidad de algunas especies como *S. epidermidis*, *S. capitis* y *S. lugdunensis* de formar variantes de colonias pequeñas (SCV), así como propiedades para adherirse e invadir el tejido, formación de biofilms, evasión del sistema inmune innato y adquirido aunque en menor grado en comparación con *S. aureus* (Becker y col. 2014).

1. SCN COMO CAUSA DE MASTITIS CAPRINA

En casos de mastitis, se han aislado más de 10 especies de SCN, pero solo algunas de estas predominan en las infecciones (Zadocks y Watts 2009; Vanderhaeghem y col. 2015; Taponen y Pyörälä 2009). Las especies aisladas difieren de aquellas cepas aisladas de leche a aquellas cepas aislada de la piel de los animales, en el caso de la piel del pezón y del

ápice del pezón se han identificado a *S. xylosus*, *S. sciuri* y *S. haemolyticus*, mientras que en muestras de leche de animales con mastitis se han identificado a *S. epidermidis*, *S. chromogenes* y *S. simulans*. En los estudios histopatológicos de tejido glandular mamario, generalmente se observa una respuesta inflamatoria crónica, así como tejido de reparación, resulta interesante destacar que no se reportan grandes diferencias en los cambios histológicos causados por *S. aureus* y algunas especies de SCN, en cuanto a la capacidad de adherencia e internalización de los SCN en las células epiteliales mamarias, es similar a *S. aureus*, pero la invasividad de este grupo es menor (Vanderhaeghem y col. 2015).

2. CARACTERÍSTICAS DE *S. chromogenes*

Esta especie es la más prevalente en casos de mastitis causadas por SCN, originalmente se consideraba una subespecie de *S. hyicus*; fue en 1987 cuando *S. hyicus* subsp *chromogenes* se clasificó como una especie nueva, *S. chromogenes*, la cual se asocia a infecciones persistentes y a un alto conteo de células somáticas, sin embargo, poco se sabe sobre la base genética de sus propiedades patogénicas. En el año 2014, se realizó por primera vez la secuenciación parcial de una cepa recuperada de un caso de mastitis bovina, la cepa MU970, la cual arrojó la presencia de 38 contigs con 2 344 537 pb y un contenido de guanina-citocina del 36.54%, presenta un plásmido con un transposón con una identidad del 99% del transposón Tn552 de *S. aureus* y además contiene una β -lactamasa. Otros factores de virulencia que presenta es la proteína SasH la cual codifica a una adenosina sintetasa asociada a la pared celular que convierte los nucleótidos de adenosina a adenosina, la cual es un potente inmunomodulador que ayuda a la bacteria a escapar de la fagocitosis, también presenta dos proteínas asociadas a biofilms con una identidad del 34 y 37% con respecto a las proteínas de *S. aureus*. Las cepas de *S. chromogenes* son susceptibles a antibióticos como neomicina, gentamicina, eritromicina, enrofloxacin y β -lactámicos, presentan el gen *linA* que les confiere resistencia a la lincomicina y algunas cepas presentan el plásmido de resistencia a eritromicina (Fry y col. 2014).

3. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Estos análisis están basados en cuatro loci: el gen 16s del ARN ribosomal y los genes *dnaJ*, *rpoB* y *tuf*, Lamers y col. (2012) propusieron una clasificación del género *Staphylococcus* en donde las especies se clasifican en 15 grupos y a su vez, estos grupos pertenecen a seis grupos de especies, los cuales de acuerdo a sus propiedades fenotípicas se clasifican en:

1. *auricularis*
2. *hyicus-intermedius*
3. *epidermidis-aureus*
4. *saphrophyticus*
5. *simulans*
6. *sciuri*

Los métodos de identificación fenotípica de este grupo se basan en la evaluación de la expresión de características codificadas genéticamente en los aislados bacterianos, dentro de estos rasgos fenotípicos se incluyen la morfología de las colonias, características de crecimiento, la habilidad de metabolizar distintos sustratos, pruebas de resistencia a antimicrobianos y otras características resultantes de la expresión del ADN (Zadocks y Watts 2009; Vanderhaeghem y col. 2015; Taponen y Pyörälä 2009; Fry y col. 2014; Lamers y col. 2012). Una de las desventajas de los métodos fenotípicos de identificación es la variabilidad de la expresión de las características fenotípicas entre los aislados que pertenecen a la misma especie (Zadocks y Watts 2009; Stepanovick y col. 2012). Ante esta problemática, se han utilizado los métodos genotípicos de identificación los cuales están basados en la detección del material genético del organismo, por lo tanto, son independientes de los cambios en el patrón de expresión genética y de las influencias ambientales, ofreciendo una alternativa con mayor estabilidad y reproducibilidad; no requieren necesariamente el aislamiento y cultivo de los microorganismos, siendo posible obtener los resultados en tiempos más cortos y usualmente con mayor poder de resolución, sensibilidad y especificidad que los métodos fenotípicos (Stepanovick y col. 2006; Monir y col. 2007); estos métodos también se utilizan para identificar y tipificar los aislados hasta el nivel de especie (Zadocks y col. 2009; Vilchez y Alonso 2009; Van Der Zee

y col. 1999). Algunos de los métodos genotípicos utilizados para identificar a los SCN hasta el nivel de especie incluyen al polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismos de longitud del espacio intergénico del ADNt (tDNA-ILP), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), ribotipificación, secuenciación del ADN, secuenciación del gen 16s del ARNr y en el caso de *S. aureus* también se utiliza la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), la amplificación por PCR de secuencias repetitivas (Rep-PCR) y el análisis multilocus del número variable de repeticiones en tándem (MLVA) (Wang y col. 2016; Bergonier y col. 2014; Sobral y col. 2012; Sabat y col. 2003). Los métodos moleculares brindan información útil sobre las conexiones genéticas entre los aislados de distintas fuentes y permiten un seguimiento epidemiológico en brotes de enfermedad (Van Der Zee y col. 1999; Pourcel y col. 2009).

El reconocimiento de las repeticiones en tándem se conoce desde inicios de la década de los 80s en células eucariotes y procariotes (Paape y Capuco 1997; Brenaut y col. 2014), el número variable de repeticiones en tándem (VNTR) consiste en la existencia de varias secuencias repetidas de ADN que se clasifican como satélites, los cuales abarcan megabases de ADN asociados a cromatina, minisatélites en los cuales las repeticiones van de 6 a 100 pares de bases (pb) y microsatélites que van de 1 a 5 pb (Hollender y col. 2013), estas repeticiones en tándem han ganado mucha atención debido a su utilidad práctica en tipificaciones epidemiológicas, el MLVA, el cual está basado en el polimorfismo de dichas secuencias de ADN repetidas en tándem, se ha convertido en el método de tipificación para varias especies bacterianas como *Mycobacterium tuberculosis* en donde se realizan estudios evolutivos de los aislados, *Bacillus anthracis* para hacer estudios de medicina forense microbiana ya que esta bacteria es utilizada en ataques bioterroristas, *Yersinia pestis* para establecer estudios de polimorfismo ya que es una especie monomórfica, *Brucella spp* en donde se han realizado estos análisis para detectar polimorfismos ya que es un género bacteriano altamente homogéneo y así establecer características asociadas a virulencia. *Legionella pneumophila* en donde el MLVA se utiliza para realizar estudios de epidemiología molecular y *S. aureus* en el que han utilizado este

tipo de análisis para inferir la estructura de las poblaciones de esta bacteria aislada de casos de mastitis en rumiantes en diferentes regiones y países (Wang y *col.* 2016; Sabat y *col.* 2003; Le Fleche y *col.* 2001).

El desarrollo de la secuenciación de genomas ha demostrado que dichas secuencias están presentes en todas las especies analizadas y que el polimorfismo existe en al menos una fracción de ellas, cabe señalar que la longitud de esas repeticiones puede variar de uno a cientos de nucleótidos (Sabat y *col.* 2003; Le Fleche y *col.* 2001). Las repeticiones en tándem en el genoma de microorganismos patógenos se identificaron en un inicio dentro de genes asociados a virulencia bacteriana y proveen información acerca de los aspectos funcionales y evolutivos de la diversidad genética bacteriana (Vergnaud y *col.* 2009; Ramisse y *col.* 2004), estas repeticiones son una fuente de marcadores utilizados para la identificación de bacterias patógenas, aún y cuando hayan emergido recientemente (Hollender y *col.* 2013). Las regiones repetidas en tándem, que se localizan dentro de genes pueden afectar la codificación de un transcrito al causar cambios en el marco de lectura, pueden bloquear la replicación, el término de la transcripción o afectar la eficiencia de esta última, sin embargo, la mayoría de las repeticiones en organismos procariotes se encuentran en regiones extragénicas (Ramisse y *col.* 2004). Algunos VNTR tienen funciones dentro de la regulación genética y se cree que estas repeticiones son cortas que van de uno a seis nucleótidos, mientras que las repeticiones más largas de más de 15 nucleótidos se encuentran relacionadas con la patogenicidad y variación antigénica. Estas secuencias repetidas también son importantes en el comportamiento adaptativo en respuesta a los cambios ambientales y por lo tanto las variaciones genéticas en los loci repetidos de ADN pueden ser forzados por la presión ambiental (Ramisse y *col.* 2004). La identificación de las repeticiones en tándem a partir de secuencias de datos se consigue fácilmente debido a la disponibilidad de los datos de las secuencias del genoma y a la existencia de software para analizar dichas secuencias, aun cuando estas se encuentren incompletas por lo que las repeticiones en tándem de distinto tamaño entre dos cepas son identificadas de manera automática (Le Fleche y *col.* 2002; Arvidsson 2002). El análisis mediante MLVA consiste en el estudio del número de repeticiones de distintos loci de

VNTR de un mismo organismo, de forma que se crea un perfil característico del mismo, estos análisis son de bajo costo y accesibles para cualquier laboratorio con el mínimo equipo de biología molecular, además, esta técnica es completamente compatible con técnicas de electroforesis capilar que determinan el tamaño de los fragmentos (Vergnaud y *col.* 2009). Esta información puede utilizarse para identificar distintas cepas dentro de especie, así como para comparar y agrupar distintas cepas para análisis posteriores. El patrón genético obtenido puede ser fácilmente compartido con la comunidad científica mediante bases de datos existentes en internet (Sabat y *col.* 2003; Le Fleche y *col.* 2001).

CAPÍTULO III: PERSISTENCIA BACTERIANA

1. ANTECEDENTES

Las células persistentes son variantes dormantes de células regulares que se forman de manera estocástica en poblaciones microbianas y son altamente tolerantes a los antibióticos (Lewis 2007; Kaldadu y *col.* 2016; Gefen y Balaban 2008). Estas células persistentes son las responsables de las infecciones crónicas (Kaldadu y *col.* 2016, Gefen y Balaban 2008). Reportadas por primera vez en 1942 por Hobby *et al* (Maisonneuve y Gerdes 2014), al trabajar con *Streptococcus* spp y posteriormente en 1944 Joseph Bigger, médico de la Universidad de Dublin; descubrió a las células persistentes al estar trabajando con la recién descubierta penicilina, Bigger añadía penicilina a los cultivos de *Staphylococcus* spp y aunque las bacterias morían, una pequeña subpoblación sobrevivía, la cual no era capaz de crecer en presencia de la droga, pero volvían a crecer una vez que el antibiótico era removido, a esta subpoblación la llamó persistente (Maisonneuve y Gerdes 2014). Diversos experimentos con citometría de flujo han demostrado la presencia de una subpoblación que no crece dentro de un cultivo bacteriano y las células persistentes se originan de entre esas bacterias sin crecer. Estas observaciones sustentan la hipótesis de que las bacterias persistentes son una subpoblación minoritaria de bacterias que mantienen un nulo estado de replicación en condiciones donde la mayoría de ellas se replican (Maisonneuve y Gerdes 2014).

2. DIFERENCIA ENTRE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PERSISTENCIA BACTERIANA

Debido a que los cultivos comienzan con las células sobrevivientes, los cuales además contienen células persistentes con la misma frecuencia que el cultivo original, ahora se sabe que la persistencia no es heredable, pero se debe a una diversificación fenotípica. El interés de la persistencia resurgió en el año 2000 cuando Lewis sugirió la relación entre las células sobrevivientes y la subpoblación tolerante a los antibióticos y la resistencia de los biofilms bacterianos a estos. El desarrollo de nuevos antibióticos se ve quebrantado por la evolución bacteriana que lleva al desarrollo de diferentes mecanismos que reducen su

eficacia. Uno de estos mecanismos es la resistencia la cual es heredable y recae sobre genes específicos o mutaciones como cambios genéticos responsables de modificar los sitios de unión del antibiótico o modificación de las moléculas del antibiótico (Maisonneuve y Gerdes 2014; Schmidt y Hung 2013).

Otra de las estrategias empleadas por las bacterias para contrarrestar el efecto de los antibióticos es la “tolerancia”, a diferencia de las células resistentes, las células tolerantes son incapaces de multiplicarse en presencia de la droga, pero sobrevive a la exposición de antibióticos (Schmidt y Hung 2013). Un caso especial en esta estrategia de sobrevivencia es la formación de un grupo extremadamente tolerante llamadas células “persistentes” (Schmidt y Hung 2013). En un cultivo isogénico sensible a antibióticos, las células persistentes constituyen una subpoblación que sobrevive al tratamiento con bactericidas sin que estas bacterias presenten algún determinante de resistencia en específico, es decir, las células persistentes ya son una subpoblación pre-existente que se encuentran de manera temporal en un estado de crecimiento lento o sin crecimiento y que son tolerantes a los antibióticos, por lo tanto las células persistentes, no se forman en respuesta a los antibióticos (Balaban y *col.* 2011).

3. SIGNIFICADO CLÍNICO DE LAS INFECCIONES PERSISTENTES

El fenómeno de persistencia es complejo y no hay un mecanismo general que pueda aplicarse a todas las especies bacterianas independientemente de las condiciones de crecimiento o el tipo de antibiótico utilizado (Ezzat y *col.* 2014). Las bacterias persistentes son las responsables de las infecciones crónicas, las consecuencias de las infecciones persistentes incluyen un aumento en la mortalidad y morbilidad, así como un elevado riesgo de diseminación de la enfermedad (Kaldadu y *col.* 2016; Schmidt y Hung 2013). La erradicación de las infecciones persistentes es difícil y requieren repeticiones prolongadas de antibióticos. En ciertas infecciones, las bacterias evaden el sistema inmune y persisten dentro del hospedero. En algunos casos, las infecciones persistentes son asintomáticas por largos periodos de tiempo, pero pueden reactivarse en un futuro en enfermedades clínicas y con la consecuente diseminación de la enfermedad; de forma alterna, las

infecciones persistentes resultan en enfermedades clínicas y crónicas (Schmidt y Hung 2013).

Existen muchos factores que contribuyen a la habilidad de los patógenos en establecer infecciones persistentes, incluyendo factores bacterianos y del hospedero, algunos patógenos parecen adaptados a evadir el sistema inmune y persisten décadas en ausencia de síntomas como *Mycobacterium tuberculosis* o *Salmonella Typhi* (Schmidt y Hung 2013). Las células persistentes son células dormantes con un metabolismo disminuido, sin embargo, las células dormantes a pesar de ser refractarias a los antibióticos, no son los principales contribuyentes al progreso de la infección ya que no se dividen, las células que se replican son las contribuyentes al progreso de la infección (Kaldadu y col. 2016). Muchas infecciones persistentes son clínicamente asintomáticas, puede haber supresión de la respuesta inmune adaptativa, así como una adaptación a un ambiente intracelular durante parte del ciclo de vida de la bacteria. Algunas infecciones persistentes están asociadas a signos clínicos aparentes durante la infección o estos aparecen de manera intermitente. Muchas infecciones persistentes sintomáticas están asociadas a cambios en el hospedero el cual facilita el establecimiento de las infecciones. En algunos casos las infecciones persistentes se desarrollan aún en ausencia de un cambio de ambiente dentro del hospedador (Lewis 2007; Schmidt y Hung 2013).

4. MODELOS UTILIZADOS PARA ESTUDIAR LA PERSISTENCIA BACTERIANA *in vitro*

Existen numerosos factores que contribuyen a la dificultad de esterilizar infecciones persistentes; uno de los factores que contribuyen a que las bacterias establezcan infecciones persistentes dentro de nichos protegidos dentro del hospedero. En otros casos, la respuesta inmune puede crear un nicho protegido que secuestra a las bacterias como son los granulomas y abscesos, algunos patógenos pueden desarrollar su propio nicho protegido, ya sea a partir de la formación de comunidades como biofilms o adaptándose al crecimiento intracelular; sin embargo, estos nichos protegidos no son suficientes para explicar la dinámica de las infecciones persistentes, además las bacterias

tienen la habilidad de adoptar estados fisiológicos que alteran la eficacia de los antibióticos (Schmidt y Hung 2013).

Existen cinco modelos para estudiar la persistencia:

- a. Crecimiento intracelular facultativo
- b. Subpoblación persistente
- c. Variantes de colonias pequeñas
- d. Indiferencia a antibióticos
- e. Formación de biofilms.

En cada modelo, las bacterias entran en estados fisiológicos diferentes durante la infección persistente que se asocia a una refracción a los antibióticos.

a) PATÓGENOS INTRACELULARES

Los estudios sugieren que la adaptación a un ambiente intracelular ocasiona que las bacterias no se dividan, después de la entrada a los macrófagos, un conjunto de la población no se replica. No está claro como una respuesta inmune severa induce cambios fenotípicos en las bacterias que conducen a una infección crónica o si es que la respuesta inmune facilita la cronicidad a través del daño al epitelio (Schmidt y Hung 2013).

b) SUBPOBLACIÓN PERSISTENTE

Se han descrito dos tipos de células persistentes: Tipo I que corresponden a células persistentes generadas durante la fase estacionaria de crecimiento y se caracterizan por presentar una fase lag prolongada y persistentes tipo II las cuales se generan continuamente por un mecanismo de cambio de “switch” independientemente de la fase de crecimiento (Balaban y *col.* 2011).

c) VARIANTES DE COLONIAS PEQUEÑAS

También relacionadas con la persistencia, descritas por primera vez en *Salmonella* Typhi en 1910, así como en *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus* en pacientes con fibrosis quística. El fenotipo más estudiado es el de *S. aureus*, estas variantes de colonias pequeñas o SCV por sus siglas en inglés (small colony variants), disminuyen la expresión de toxinas, pero aumentan la expresión de adhesinas, así como el crecimiento intracelular y la resistencia a antibióticos (Atalla y *col.* 2011, Melter y Radojevic 2010). Estas SCV

presentan una pared celular más gruesa, además, existe una regulación de genes bajo control del factor transcripcional sigB el cual juega un papel en la respiración oxidativa del estrés, lo que sugiere que estas SCV son un mecanismo de defensa contra el estrés ambiental. Las SCV obtenidas de muestras clínicas revierten rápidamente al fenotipo “wild type” cuando se cultivan *in vitro*, lo que complica el estudio de este fenómeno. Las SCV se originan a partir de mutaciones en genes metabólicos resultando en subpoblaciones auxotróficas, estas SCV no son particularmente virulentas, pero son capaces de persistir dentro de las células hospederas. La base bioquímica de este fenotipo es debido a un auxotropismo sencillo o múltiple causado por mutaciones en genes involucrados en la biosíntesis de tiamina, menadiona, hemina o timidina estos defectos resultan en una disminución en las funciones de ciertas vías metabólicas como el transporte de electrones y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Melter y Radojevic 2010). En estas SCV, el factor sigma B alterno a través de RsaA regula a MgrA el cual participa en la regulación de las respuestas al estrés bacteriano y se involucra en estrategias bacterianas para tolerar factores estresantes ambientales como pH, temperatura y osmolaridad. Las SCV poseen paredes gruesas y su potencial eléctrico a través de la membrana citoplasmática disminuye inmediatamente cuando se acaban los nutrientes limitando su crecimiento. La adhesión de estas SCV no es suficiente para iniciar el proceso de señalización con la consiguiente respuesta inflamatoria (Melter y Radojevic 2010). Las células que presentan mutaciones en la cadena de transporte de electrones, las mutantes hemB, mimetizan el fenotipo SCV y al trabajar con estas mutantes, se sugiere que el fenotipo SCV representa una adaptación para facilitar la sobrevivencia intracelular y su crecimiento. Las SCV se asocian con una disminución en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la tiamina (requerida para la síntesis de menadiona, un componente de la cadena de transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa). Estas SCV también presentan defectos en la cadena respiratoria y son tolerantes a los antibióticos debido a estos defectos en la cadena del transporte de electrones. Las SCV son probablemente un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, la represión en la cadena de transporte de electrones disminuye la producción de radicales libres endógenos y disminuye el estrés

por superóxido, así, las SCV se protegen del estrés oxidativo que encuentran en la persistencia intracelular (Melter y Radojevic 2010).

d) INDIFERENCIA A ANTIBIÓTICOS

El estrés ambiental derivado de la limitación de nutrientes, hipoxia o disminución del pH, induce una indiferencia a los antibióticos, caracterizada por arresto en el crecimiento y tolerancia a antibióticos, también las bacterias en fase estacionaria con carencia de nutrientes y cambios en el pH exhiben indiferencia a antibióticos (Schmidt y Hung 2013).

e) FORMACIÓN DE BIOFILMS

Los biofilms se adhieren a superficies vivas e inertes, la capa de exopolisacáridos rodea al biofilm y provee protección contra el estrés ambiental como el calor y la desecación. La formación de biofilms se induce por el estrés y limitación de nutrientes como el hierro. La respuesta general al estrés, regulado por la subunidad alternativa de sigma de la ARN polimerasa RpoS es importante para la formación de biofilms. Al liberarse las bacterias del biofilm, se establecen en nuevos focos explicando la historia natural de infecciones crónicas y recurrentes. Al parecer diversos mecanismos juegan un papel en el establecimiento de infecciones crónicas, así como la respuesta celular al estrés oxidativo es el tema común entre las distintas vías de infecciones crónicas y tolerancia a los antibióticos (Schmidt y Hung 2013; Melter y Radojevic 2010).

5.VARIANTES DE COLONIAS PEQUEÑAS EN *S. aureus*

En el género *Staphylococcus*, en especial *S. aureus*, tiene la habilidad de formar SCV, las cuales están bien adaptadas al medio intracelular, en comparación con las células normales, estas células son fagocitadas con mayor facilidad por las células del hospedero, tienen una mayor resistencia a la degradación intracelular y estimulan en menor grado la inmunidad del hospedero (Atalla y col. 2011). La persistencia de la mastitis causada por *S. aureus*, se asocia a estas SCV, la internalización de *S. aureus* explica porqué la respuesta mediada por anticuerpos no es protectora, lo que sugiere la necesidad de una respuesta celular y de anticuerpos para controlar a las células persistentes. Estas SCV son capaces de sobrevivir dentro de las células del hospedero y causar mínima perturbación en la fisiología celular y el mínimo estímulo a las defensas del hospedero. Existe muy poca

información acerca de la fisiopatología de este patógeno y su importancia clínica en la medicina veterinaria, especialmente en la mastitis persistente en rumiantes (Melter y Radojevic 2010, Sendi y Proctor 2008).

JUSTIFICACIÓN

La persistencia es una estrategia que poseen las bacterias para evadir la respuesta inmune y de esta manera asegurar su sobrevivencia ocasionando infecciones crónicas. La adaptación de distintas especies bacterianas al hospedero resulta en infecciones persistentes que se asocian a daños menos severos en la glándula, por lo que tienen mayor oportunidad de persistir y transmitirse por ser más resistentes. Las infecciones causadas por este grupo, ocasionan daños en la glándula mamaria y a pesar de que se han realizado infecciones experimentales en cabras utilizando patógenos como *S. aureus* y enterobacterias como *E. coli*, poco se sabe sobre el mecanismo por el cual los SCN permanecen infectando de manera crónica la glándula mamaria y como es que el proceso inflamatorio tiende a revertirse después de la infección. Las especies que se han reportado con mayor frecuencia como causa de mastitis en cabras incluyen a *S. chromogenes*, *S. xylosum* y *S. simulans*. En el caso de *S. chromogenes*, distintos estudios *in vitro* han demostrado que es la especie más virulenta de los SCN (Simojoki y col. 2009), esta especie es capaz de generar infecciones crónicas persistentes, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación de la respuesta inmunitaria por parte del patógeno. En este trabajo se trataron de establecer las bases del fenómeno, para lo cual se planteó infectar cabras de manera experimental con este agente, para estudiar la respuesta inmune que se desencadena en la glándula mamaria y establecer las bases de la persistencia bacteriana en la glándula mamaria.

HIPÓTESIS

La inflamación crónica de la glándula mamaria en cabras por *S. chromogenes*, como fenómeno de persistencia bacteriana, está asociada a la sobreexpresión de las interleucinas IL4, IL10 y TGF- β .

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de interleucinas IL1 β , IL4, IL10, IL8, IL12, IFN- γ y TGF- β en muestras de glándula mamaria de cabras infectadas experimentalmente con *S. chromogenes* mediante el análisis de expresión de genes, con la finalidad de esclarecer el fenómeno de la persistencia bacteriana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar una cepa de campo de *S. chromogenes* asociada a casos de mastitis subclínica en cabras, mediante pruebas bioquímicas y moleculares.
2. Establecer una infección crónica en glándula mamaria de cabras con *S. chromogenes*.
3. Evaluar la producción de las interleucinas IL1 β , IL4, IL10, IL8, IL12, IFN- γ y TGF- β en distintos tiempos, en cabras infectadas con *S. chromogenes*.
4. Establecer mediante análisis estadístico cuál de las interleucinas evaluadas podría estar asociada a la persistencia bacteriana de *S. chromogenes*.

METODOLOGÍA

I. GENOTIPIFICACIÓN DE *S. chromogenes* A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA)

1. AISLADOS BACTERIANOS E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Se recuperaron 53 aislados de bacterias Gram positivas a partir de leche de cabras sanas y con mastitis subclínica de tres granjas especializadas en la producción de leche del estado de Guanajuato (granja 1: sistema extensivo de producción) y dos granjas del municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México (granja 2: sistema intensivo de producción y granja 3: sistema intensivo y semi-intensivo de producción). El sistema extensivo se basa en la utilización de especies ganaderas de interés zotécnico capaces de aprovechar eficazmente los recursos naturales mediante el pastoreo, en general estas especies ganaderas están adaptadas a los factores limitantes y ecológicos del medio en el que se desarrollan; en el sistema intensivo los animales son alimentados con una proporción elevada de concentrados por lo que el crecimiento del ganado es rápido.

Las muestras de leche se sembraron en agar tripticosa soya y se incubaron a 37 °C durante 24 horas; transcurrido este tiempo se observaron las características macroscópicas de las colonias y se realizó la tinción de Gram para observar afinidad tintorial, morfología y agrupación de las bacterias; se realizó la prueba de catalasa para identificar a los aislados dentro del género *Staphylococcus* y la prueba de coagulasa para distinguirlos de los SCP. Para realizar la identificación de la especie de los SCN se utilizó el sistema API Staph® (V4.1) de laboratorios Biomérieux siguiendo las instrucciones del fabricante; el sistema API Staph® contiene 19 pruebas bioquímicas: glucosa, fructuosa, manosa, maltosa, lactosa, trehalosa, manitol, xilitol, melobiosa, rafinosa, xilosa, sacarosa, N-acetil-glucosa, metil-D-glucopiranosidasa, nitratos, L-arginina- urea, Voges-Proskauer y fosfatasa alcalina. A los aislados identificados como *S. chromogenes*, se les realizó la prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos utilizando la técnica de Kirby-Bauer

(Bernal y Guzmán 1984), con sensidiscos de polimixina B, ampicilina, tobramicina, gentamicina y tetraciclinas (Becton-Dickinson and Company NJ, USA)

2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA A NIVEL MOLECULAR

a) EXTRACCIÓN DE ADN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La extracción de ADN a partir de los 53 aislados bacterianos se hizo de acuerdo al protocolo descrito por Cremonesi y *col.* (2006). Se cuantificó la concentración del ADN por medio de espectrofotometría (espectrofotómetro SmartSpec-Plus BIORAD Laboratories, USA) a una absorbancia de 260 de 45 µg/mL, se realizó una dilución inicial para obtener una concentración del ADN de 100 ng/µl. Para lograr la identificación del género *Staphylococcus spp.*, se utilizó el par de iniciadores diseñados por Mason y *col.* (2001), que corresponden a la región 16s del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) esperando un producto de 791 pares de bases (pb). Para identificar a los aislados dentro del grupo de los SCN, se utilizó el par de iniciadores correspondientes al gen *coa* de *S. aureus* el cual codifica para la enzima coagulasa (coagulasa libre); este par de iniciadores fueron diseñados por Ruiz y *col.* (2013), utilizando el programa DNAMAN versión 7.02 (Lynnon Corporate) para Windows, esperando un producto de 1200 pb. Para validar la prueba de PCR se utilizaron las cepas *S. chromogenes* ATCC 43764TM y *S. aureus* ATCC 29737TM, para cada uno de los iniciadores.

Cada reacción de PCR consistió en 25 µl de Master Mix (ThermoFisher Scientific No. catálogo K0171), 2 µl de cada iniciador (forward y reverse), a una concentración de 10 µM, 2 µl de ADN a una concentración de 100 ng/ µl y c.b.p 50 µl de agua libre de nucleasas para cada reacción. El protocolo del termociclador (Termociclador Corbett Research Modelo CG1-96.) para los iniciadores 16s, consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 m, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 m, alineamiento 56 °C por 1 m, extensión 72 °C por 1 m y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 m. Para el caso del gen *coa*, el protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 m, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 m, alineamiento 56 °C por 1 m 30 s, extensión 72 °C por 2 m y finalmente un ciclo de extensión final de 72 °C por 5 m. En cada reacción se utilizó como control negativo, 2 µl de

agua en sustitución de ADN para descartar la contaminación de los iniciadores. Para observar los productos de cada amplificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida, el gel fue teñido con bromuro de etidio y se observó con un fotodocumentador (ChemiDoc XRS+ de Bio-RAD).

b) IDENTIFICACIÓN DE *S. chromogenes*

Para identificar a los 53 aislados como *S. chromogenes*, se diseñaron nueve pares de iniciadores, lo cuales amplifican para distintas proteínas y factores de virulencia (**CUADRO 1**); dichos genes se reconocieron a partir del genoma de *S. chromogenes* MU970 aislado del cuarto posterior derecho de una vaca Holstein con mastitis en la Universidad de Missouri, Estados Unidos y que representa la única secuencia de *S. chromogenes* disponible hasta el momento (Fry y col. 2014). El diseño de los iniciadores se realizó obteniendo la secuencia de aminoácidos de los genes de interés, comprobando la homología de la secuencia por medio de la base de datos BLAST (Basic local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center of Biotechnology Information <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Posteriormente, se localizó la secuencia de aminoácidos dentro del genoma y se diseñaron los iniciadores utilizando el programa DNAMAN versión 7.02. Se realizó la PCR para los 53 aislados de SCN, para cada uno de los 9 pares de iniciadores, cada reacción de PCR consistió en 25 µl de Master Mix, 2 µl de cada iniciador (forward y reverse) a una concentración de 10 µM, 2 µl de ADN a una concentración de 100 ng/ µl y c.b.p 50 µl de agua libre de nucleasas para cada reacción.

3. IDENTIFICACIÓN DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM Y DISEÑO DE LOS INICIADORES

Se analizó el genoma de la cepa de *S. chromogenes* MU970 para localizar el número variable de repeticiones en tándem (VNTR) utilizando el programa “TANDEM REPEATS FINDER” (Benson 1999), y con el programa DNAMAN versión 7.02 se diseñaron los iniciadores de las regiones flanqueantes de los loci de las repeticiones en tándem. Se seleccionaron seis loci de 15 a 96 pb de longitud de repeticiones en tándem y con un número de copias que van 7.4 a 23.1 de tal manera que se pudieran observar los

amplificados en un gel de agarosa. Las repeticiones en tándem se nombraron de acuerdo al conting del genoma en donde se encontraron y al tamaño del producto esperado en la cepa de *S. chromogenes* MU970 (**CUADRO 2**).

4. ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA)

Se realizó la PCR en los aislados de *S. chromogenes* para cada uno de los iniciadores flanqueantes del VNTR, cada reacción de PCR consistió en 25 µl de Master Mix, 2 µl de cada iniciador (forward y reverse) a una concentración de 10 µM, 2 µl de ADN a una concentración de 100 ng/ µl y c.b.p 50 µl de agua libre de nucleasas para cada reacción. Para observar los productos de cada amplificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida. Los productos de PCR de las secuencias repetidas se colocaron en el analizador de fragmentos QIAxcel DNA High Resolution Kit (QIAGEN, No. Catálogo 929002) siguiendo las instrucciones del fabricante, se determinó el tamaño de cada VNTR utilizando un marcador de peso molecular de 100 a 3000 pb.

5. ANÁLISIS DE DATOS

El tamaño de cada amplicón se determinó manualmente utilizando el marcador de peso molecular de 3000 pb, el número de repeticiones de cada alelo derivó del tamaño del amplicón obtenido. Para cada locus del VNTR se calcularon los índices de diversidad de Simpson y Hunter-Gaston (1988), con intervalos de confianza del 95% utilizando el programa “VNTR Diversity and Confidences Extractor Software” (V-DICE) disponible en la página web de la Agencia de Protección de la Salud (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>).

El poder de discriminación del MLVA se calculó utilizando el programa “Discriminator Power Calculator” (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php).

Las agrupaciones de los 23 aislados de *S. chromogenes* de acuerdo a sus características fenotípicas, se realizó a través de un análisis de conglomerados utilizando como punto de unión la distancia euclidiana usando el método de varianza mínima de Ward con el programa DELL STATISTICA (Data Analysis Software System, Dell Inc. 2015,

software.dell.com). El análisis de conglomerados de los VNTR de *S. chromogenes* se hizo con el software BioNumerics versión 7.6.1 (Applied Maths, St-Martens-Latern, Belgium) utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (UPGMA).

II. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CABRAS

1. SELECCIÓN DE LA CEPA DE *S. chromogenes* PARA REALIZAR LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN LAS CABRAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el MLVA, se seleccionó la cepa de *S. chromogenes* aislada de leche de cabra diagnosticada con mastitis subclínica que presentó 78 VNTR en el locus 346_06.

a) CULTIVO DE CELULAS EPITELIALES DE GLÁNDULA MAMARIA DE BOVINO

Para evaluar que la bacteria seleccionada para infectar a las cabras de manera experimental, causara daño celular, se realizó un cultivo celular de células epiteliales de quinta generación de glándula mamaria de bovino, se observó la integridad de la monocapa de células y el porcentaje de confluencia celular, se retiró con ayuda de una pipeta el medio de cultivo de la caja de Roux y las células se lavaron con 5 mL de solución de fosfatos (PBS) estéril, se decantó el PBS y se añadieron 5 mL de tripsina a las células epiteliales incubando durante 5 m a temperatura ambiente, al finalizar este tiempo, se colectaron las células en un tubo Falcon estéril de 15 mL; se añadieron 2 mL de medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) adicionado con suero fetal bovino a las botellas de cultivo celular realizando tres enjuagues, se colectó el DMEM colocándolo en los tubos Falcon donde previamente fueron colocadas las células epiteliales; los tubos se cerraron perfectamente y se centrifugaron a 500 g durante 5 m, transcurrido este tiempo, se retira el sobrenadante recuperando la pastilla celular, se agregó 1 mL de medio de cultivo DMEM y se resuspendió suavemente. Se realizó el conteo de células añadiendo 50 µl de azul de Tripán a 50 µl de la suspensión celular hasta homogenizarlas (proporción 1:1), se realizó el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer, obteniendo el promedio de células por mL y se colocaron 250 µl de células equivalente a 270 000 células/mL en una caja de Roux de 25 cm² a la que previamente se le añadieron 5 mL de

DMEM, se agregaron 50 µl de antibiótico y antimicótico (Penicilina, estreptomicina y anfotericina B) y 50 µl de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) (ThermoFisher No. Catálogo 15630080) a una concentración 1 M como estabilizador de pH, por último, se incubaron a 37 °C revisando cada 24 horas la confluencia celular.

b) ENSAYO DE INFECCIÓN *in vitro*

Una vez obtenido el cultivo de células epiteliales de glándula mamaria de bovino, se realizó un ensayo de infección *in vitro* para reactivar la virulencia de la cepa de *S. chromogenes* seleccionada, se inocularon cinco colonias en 25 mL de caldo infusión cerebro-corazón (Becton Dickinson, No. Catálogo 211200), dejando incubar 18 horas a 37 °C en agitación constante, transcurrido ese tiempo, se centrifugó el cultivo durante 15 m a 600 g y se recuperó la pastilla bacteriana la cual se resuspendió en 1 mL de PBS estéril, se determinó la absorbancia por medio espectrofotometría a una longitud de onda de 625 nm hasta alcanzar una longitud de onda de 0.08 a 0.1 nm equivalente a concentración de 1×10^8 UFC/mL, una vez alcanzada la absorbancia deseada, se realizó la infección de las células epiteliales de glándula mamaria bovina eliminando el medio de cultivo de las células y lavando con 5 mL de PBS estéril, se decantó y se agregó 1 mL del inóculo bacteriano diluido en 4 mL de DMEM sin suero en la caja de Roux y se dejaron en contacto durante 2 horas a 37 °C, transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo bacteriano de las cajas de cultivo celular y se lavaron de nuevo las cajas con 3 mL de PBS estéril, se agregaron 5 mL de DMEM con suero fetal bovino y se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

c) RECUPERACIÓN DE *S. chromogenes* A PARTIR DE LA INFECCIÓN *in vitro*

Al finalizar las 24 horas de incubación a 37 °C, se observó la integridad celular, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 600 g durante 5 m, a partir del sobrenadante, se tomaron 100 µl y se inocularon en 100 mL de caldo infusión cerebro-corazón (CICC) , también se inocularon 50 µl del sobrenadante en una placa de agar tripticasa soya (TSA) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C para corroborar la ausencia de contaminación bacteriana, transcurrido este tiempo, se centrifugó el CICC a 600 g durante 15 m y se

conservó la pastilla bacteriana con leche descremada con glicerol al 10% a -80 °C hasta el momento de la infección.

2. MANEJO DE LAS CABRAS

a) ALOJAMIENTO DE LAS CABRAS

Se utilizaron 3 cabras de la raza Alpina Francesa, primas de 7 meses de edad, pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud (CEPIPSA) propiedad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) ubicado en Avenida Cruz Blanca No. 486, en San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan, C.P. 14500 Ciudad de México, México. Las cabras pertenecen a un rebaño que trabaja con un sistema intensivo de producción, fueron alimentadas de acuerdo a sus requerimientos nutricionales e inseminadas artificialmente al alcanzar el peso óptimo y 5 días antes de la fecha esperada de parto, fueron separadas del rebaño, colocadas en corrales de aislamiento con vado sanitario para reducir la introducción de agentes infecciosos y una ventilación adecuada. El área del corral del aislamiento fue lavada con agua y jabón y posteriormente desinfectada con hipoclorito de sodio al 6% y óxido de calcio al 95% para disminuir la humedad de la cama generando un ambiente ácido. Al momento del parto, los cabritos fueron separados de sus madres y fueron alimentados y criados artificialmente.

b) CALENDARIZACIÓN DE LOS MUESTREOS DE LECHE ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Se tomaron un total de 38 muestras de leche por cada cabra que se comenzaron a realizar a partir del parto con un muestreo semanal (nueve muestreos en total) hasta llegar al pico de lactación (aproximadamente a los 56 días post-parto), al alcanzar la máxima producción de leche, se realizó la infección experimental, a partir de este día, se realizaron muestreos por 21 días seguidos, al terminar este lapso, se regresó a los muestreos semanales hasta el final de la lactación (ocho muestreos). Los muestreos se realizaron desinfectando los pezones con torunda y alcohol al 70% , se realizó la extracción manual de leche, desechando los tres primeros chorros de cada una de las glándulas, posteriormente, se realizó la prueba de California y se obtuvieron 50 mL de leche de cada

uno de los medios en frascos nuevos, estériles y herméticos, las muestras se trasladaron inmediatamente en refrigeración al laboratorio de Microbiología Agropecuaria de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM Xochimilco) para realizar el cultivo, aislamiento e identificación bacteriana, así como la extracción de ADN y ARN.

c) INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CABRAS

La cepa resguardada y reactivada previamente a través de cultivo celular, se descongeló paulatinamente y se inocularon 20 μ l de la cepa en caldo infusión cerebro-corazón y en agar sangre, se incubaron 18 horas a 37 °C, transcurrido este tiempo, se corroboró la pureza del cultivo y se inocularon 5 colonias en caldo tripticasa soya durante 18 horas a 37 °C en agitación; al terminar este tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó durante 10 m a 600 g, se eliminó el sobrenadante y la pastilla bacteriana se lavó y se resuspendió en 1 mL de solución salina fisiológica estéril. A partir de esta suspensión bacteriana, se determinó la longitud de onda por espectrofotometría a una absorbancia de 625 nm, hasta obtener una longitud de onda de 0.08 correspondiente a $1 - 1.5 \times 10^8$ UFC, una vez obtenida la absorbancia, se realizaron diluciones hasta obtener la concentración de la dosis infectante de 2.1×10^6 UFC (Simojoki y col. 2009). Las dosis infectantes se resuspendieron en 6 mL de solución salina fisiológica (SSF) estéril y se refrigeraron hasta el momento de la inoculación en la glándula mamaria de las cabras. El día del desafío, las glándulas mamarias se lavaron y desinfectaron con clorhexidina, se realizó el ordeño manual y antes de colocar el sellador en los pezones, se inocularon las glándulas izquierdas de cada cabra con la dosis infectante de *S. chromogenes* resuspendida en 6 mL de SSF estéril y se realizó un ligero masaje en la glándula para favorecer la distribución del inóculo, los medios derechos fueron inoculados con 6 mL de SSF estéril, tres días después de la primera dosis, se inoculó una segunda dosis nuevamente en el medio izquierdo.

3. MANEJO DE LAS MUESTRAS DE LECHE

a) ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO GENERAL

Con el fin de identificar bacterias presentes en la leche, se realizó el primocultivo en una placa de agar sangre y otra placa de agar McConkey utilizando 30 μ l de la muestra en la primera estría, ambas placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones de

aerobiosis, en caso de no observar crecimiento se incubaron durante 48 horas más hasta descartar crecimiento bacteriano. Los cultivos fueron examinados para determinar la morfología macroscópica de las colonias desarrolladas y su número relativo de acuerdo al número de cuadrantes del agar en donde se observó crecimiento bacteriano. A partir de las colonias representativas se realizó un frotis teñido con Gram para la identificación bioquímica recomendada por Carter (1984).

b) EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE LECHE DE CABRA

Para obtener ADN de las muestras de leche de cabra se realizó el procedimiento descrito por *Cremonesi y col.* (2006). Para observar el ADN resultante, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida, para cada extracción de ADN se cargaron en cada pozo 3 µl de ADN resuspendido en solución de elusión mezclados con 3 µl de solución de carga, las condiciones de la electroforesis fueron 45 m a 85 volts, el gel fue teñido con bromuro de etidio para observarlo en un fotodocumentador (fotodocumentador BIORAD) el ADN se cuantificó por medio de espectrofotometría con las mismas condiciones descritas anteriormente, se realizó una dilución inicial para obtener 100 ng/µl y se conservó a -20 °C hasta su uso.

c) PCR 16s ARNr *Staphylococcus* spp

Para confirmar que la leche de las cabras estuviera libre de cualquier agente bacteriano antes de la infección experimental, se realizó una PCR con los iniciadores 16s del ARNr de *Staphylococcus* spp siguiendo las mismas constantes descritas anteriormente. Para observar los productos de cada amplificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida, para cada pozo se cargaron 5 µl de cada reacción mezclados con 5 µl de solución de carga, las condiciones de la electroforesis fueron 40 m a 80 volts, finalmente el gel fue visualizado utilizando bromuro de etidio como colorante para poder observarlo por medio de un fotodocumentador.

d) OBTENCIÓN Y LAVADO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE LECHE DE CABRA

Para obtener ARN de las células somáticas, se realizó el siguiente protocolo para eliminar la grasa de la leche: se colocaron 50 mL de leche en tubos Falcon añadiendo 500 µl de EDTA pH 8 al 0.5M, los tubos se centrifugaron a 1500 g durante 15 m a 4 °C, se eliminaron

25 mL de sobrenadante y se agregaron 25 mL de PBS más 250 µl de EDTA pH 8 al 0.5 M, se centrifugó de nuevo utilizando las constantes anteriores y se eliminó la capa superior y la capa media, los tubos se aforaron a un volumen de 50 mL utilizando PBS-EDTA al 2 mM, los tubos se centrifugaron una vez más, aforando a un volumen de 50 mL en cada uno de los lavados, la pastilla obtenida se disolvió en 1 mL de PBS y se congeló hasta la extracción de ARN.

III. MANEJO DE LOS AISLADOS BACTERIANOS RECUPERADOS DE LA LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

1. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO GENERAL

A las colonias recuperadas de las leches de cabras infectadas experimentalmente, se les realizó una tinción de Gram para corroborar que se trataban de bacterias Gram positivas, con agrupación en racimo y se les realizó la prueba de catalasa y coagulasa para identificarlas como *Staphylococcus* spp.

2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

Se seleccionaron aleatoriamente 10 aislados bacterianos recuperados en días distintos post-infección a los que se les realizó la PCR para identificar al gen *16s* y el gen *coa*, así como para los nueve genes de virulencia y la PCR para identificar las secuencias repetidas del loci 346_06 con el fin de corroborar que los aislados correspondieran a la misma cepa del desafío.

3. MLVA PARA EL LOCI 346_06 DE *S. chromogenes* INOCULADO EXPERIMENTALMENTE

Los productos de PCR del locus 346_06 se colocaron en el analizador de fragmentos QIAxcel DNA High Resolution Kit siguiendo las instrucciones del fabricante, para corroborar que el tamaño de cada producto de los aislados seleccionados, correspondiera a los mismos VNTR de la cepa de desafío y que la cepa recuperada fuera la misma que se aisló hasta el final de los muestreos.

IV. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qRT-PCR)

1. qRT-PCR PARA CUANTIFICAR BACTERIAS A PARTIR DE MUESTRAS DE LECHE

Para conocer la carga bacteriana en cada una de las muestras de leche desde el día cero de la infección hasta el último muestreo antes del secado, se inocularon 100 µl de cada una de las muestras de leche en 1 mL de CICC y se incubaron durante 18 horas a 37 °C en agitación, esto se realizó con el fin de detectar el ADN bacteriano de la leche, transcurrido este tiempo, se realizó la extracción de ADN con isotiocianato de guanidina y silica, de acuerdo con el protocolo descrito por Cremonesi y *col.* (2006). Una vez obtenido el ADN, se realizó el conteo de bacterias utilizando los iniciadores del gen de la proteína extracelular específico para *S. chromogenes*. Cada reacción de qRT-PCR consistió en 12.5 µl de SYBR Green (ThermoFisher No. Catálogo K0251), 1 µl de cada iniciador (forward y reverse) a una concentración de 5 µM, 1 µl de ADN y c.b.p 25 µl de agua libre de nucleasas para cada reacción. EL PCR en tiempo real se realizó en un equipo QIAGEN Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform, el protocolo del termociclador consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 m, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 m, alineamiento 50 °C por 1 m, extensión 72 °C por 1 m y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 m. En cada ciclo de qRT-PCR se utilizó una curva estándar con concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/µl de ADN de *S. chromogenes* ATCC, como control negativo, se sustituyó el ADN por agua libre de nucleasas para descartar la contaminación de los iniciadores.

2. CUANTIFICACIÓN DE INTERLEUCINAS EN LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

a) EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE LECHE DE CABRA

Se descongelaron las células somáticas a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 5 m a 500 g a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de trizol, homogenizando hasta disolver la pastilla y se centrifugó durante 5 m a 600 g, se agregaron 200 µl de cloroformo y se mezcló durante 15 s con vórtex; se centrifugó durante 15 m a 600 g a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo mezclando durante 15 s con vórtex. Se centrifugó de nuevo utilizando las constantes

anteriores, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de isopropanol frío al 100% con DPEC al 0.1%, se homogenizó por inversión durante 30 s, se centrifugó de nuevo con las constantes ya mencionadas, se desechó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70% con DPEC al 0.1%, se centrifugó a 600 g durante 5 m a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet parcialmente colocándolo a 56 °C durante 5 m, finalmente, el ARN obtenido se resuspendió en 20 μ l de agua con DPEC al 0.1%. Para observar el ARN resultante, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida, para cada extracción de ADN se cargaron en cada pozo 2 μ l de ARN resuspendido en agua con DPEC al 0.1% mezclados con 3 μ l de solución de carga, las condiciones de la electroforesis fueron 45 m a 85 volts, finalmente el gel fue teñido con bromuro de etidio para poder observarlo en un fotodocumentador.

b) CUANTIFICACIÓN DE ARN Y TRANSCRIPTASA REVERSA

Se cuantificó la concentración del ARN por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm (DO_{260}) y se evaluó la pureza determinando la proporción DO_{260}/DO_{280} que se encuentra entre 1.9 y 2. Para sintetizar el ADN complementario (cDNA) se utilizó el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher No. Catálogo 1672) de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando 1 μ l de ARN y los tubos se incubaron utilizando el siguiente protocolo en el termociclador que consistió en un solo ciclo de 65 °C por 1 m, 25 °C por 10 m, 65 °C por 30 m y 80 °C por 1 m, una vez terminado el ciclo, se realizó la cuantificación del cDNA obtenido por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm y los tubos se congelaron a -80 °C hasta su uso.

c) DISEÑO DE INICIADORES Y VERIFICACIÓN DE AMPLICONES

Los iniciadores utilizados para las interleucinas IL1 β , IL8, IL12, IFN- γ , IL4, IL10 y TGF- β , así como para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) utilizada como normalizador en la qRT-PCR, fueron diseñados utilizando el programa DNAMAN versión 7.02. Se diseñaron seleccionando iniciadores sentido y antisentido de secuencias en exones en lados opuestos de un intrón, para asegurar la especificidad del iniciador para el

ADN blanco y para evitar la amplificación de pseudogenes u otros genes relacionados **(CUADRO 3)**.

Con la finalidad de corroborar la utilidad de los iniciadores utilizados para cada una de las interleucinas y de la GADPH utilizada como normalizador en la qRT-PCR, se realizó la PCR punto final utilizando ADN complementario (cDNA) de linfonodo bovino como testigo positivo, para obtener el cDNA del linfonodo. Se extrajo el ARN con trizol de acuerdo al siguiente protocolo: se pesaron 200 mg de linfonodo mesentérico bovino y se colocaron en viales de plástico estériles de 2 mL, se aforó a 500 μ l de agua con DPEC al 0.1% y se agregaron 500 μ l de trizol, se homogenizó perfectamente por inversión y se añadieron 500 μ l de cloroformo frío, homogenizando suavemente, posteriormente, se centrifugó a 600 g durante 2 m a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa a un tubo de 2 mL estéril, se adicionaron 500 μ l de fenol-cloroformo (1:1) y se homogenizó suavemente durante 30 s, se centrifugó nuevamente con las constantes mencionadas anteriormente y se añadió 1 mL de isopropanol frío homogenizando nuevamente, se dejó reposar durante 5 m a -70 °C y se centrifugó a 600 g durante 20 m a 4 °C, se añadieron 500 μ l de etanol frío al 70 % con DPEC al 0.1% sin resuspender la pastilla, se centrifugó por última vez a 600 g durante 20 m a 4 °C y se dejó secar la pastilla a 37 °C durante 15 m, por último, se resuspendió la pastilla en 20 μ l de agua con DPEC al 0.1 % y se mantuvo a -70 °C hasta su uso.

Con el cDNA, se realizó la PCR de punto final para cada una de las interleucinas utilizadas; cada reacción de PCR consistió en 12.5 μ l de Master Mix, 1 μ l de cada iniciador (forward y reverse) a una concentración de 5 μ M, 5 μ g de cDNA y c.b.p 25 μ l de agua libre de nucleasas para cada reacción. Las constantes utilizadas en el termociclador consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 m, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 m, alineamiento 60 °C por 1 m, extensión 72 °C por 1 m y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 m. En cada reacción se utilizó como control negativo, 2 μ l de agua en sustitución del ADN, para descartar la contaminación de los iniciadores. Para observar los productos de cada amplificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando TAE 1X como solución de corrida.

d) qRT-PCR PARA CUANTIFICAR AL ARNm DE LAS INTERLEUCINAS A PARTIR DE LAS CÉLULAS SOMÁTICAS DE LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

El qRT-PCR se realizó en el termociclador QIAGEN Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform utilizando 12.5 μ l de SYBR Green como sistema de detección, 1 μ l de cada iniciador (forward y reverse) a una concentración de 5 μ M, 5 μ g de cDNA y c.b.p 25 μ l de agua libre de nucleasas para cada reacción. Las constantes utilizadas en el termociclador consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C por 5 m, 40 ciclos de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C por 30 s, alineamiento 60 $^{\circ}$ C por 30 s, extensión 72 $^{\circ}$ C por 20 s y finalmente un ciclo de extensión final a 72 $^{\circ}$ C por 5 m. En cada reacción se utilizó como control negativo, 2 μ l de agua en sustitución del ADN para descartar la contaminación de los iniciadores.

e) MÉTODO C_T

Existen dos métodos de cuantificación de la transcripción de genes, la cuantificación absoluta utilizando una curva estándar y la cuantificación relativa utilizando el método de comparación del ciclo umbral (Cycle threshold o C_T) que consiste en comparar los C_T de las muestras con el C_T del calibrador; en primer lugar, la C_T de la muestra problema y la C_T para el control interno en este caso GAPDH, se determinaron para cada muestra. Las diferencias en la C_T de las muestras y la C_T para el control interno es llamada ΔC_T , las cuales se calcularon para normalizar las diferencias en la cantidad de ácido nucleico total añadido a cada reacción y la eficacia de la etapa de qRT-PCR. El ΔC_T para cada muestra experimental se restó del ΔC_T del calibrador, esta diferencia se denomina valor $\Delta\Delta C_T$. Finalmente, la cantidad de cada muestra normalizada a GAPDH y relativa al calibrador, fue calculada por $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Por lo tanto, todas las muestras experimentales se expresan como un cambio de n veces con respecto al calibrador (Livack y Schmiigen 2001).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la significancia estadística de los transcritos del ARNm entre las glándulas infectadas y las glándulas control se utilizó la prueba de Wilcoxon para datos no paramétricos, para conocer la correlación entre interleucinas y las UFC se utilizó la correlación de Spearman con el Software GraphPad Prism Versión 7.0.

RESULTADOS

I. GENOTIPIFICACIÓN DE *S. chromogenes* A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA)

1. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

Los 53 aislados bacterianos correspondieron a cocos Gram positivos, agrupados en racimos, catalasa positivos, coagulasa negativos con morfología macroscópica característica del género, de acuerdo a los resultados del sistema API Staph[®], 23 aislados correspondieron a *S. chromogenes*, 18 a *S. simulans*, 9 a *S. xylosus*, 2 a *S. sciuri*, 1 a *S. warneri*. Los resultados para *S. chromogenes* se muestran en el **CUADRO 4**.

2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

Para confirmar el tamaño esperado de cada producto, se estandarizó la PCR para la detección de la región 16s de *Staphylococcus* spp y el gen *coa* de *S. aureus* utilizando ADN de cepas ATCC a concentraciones de 100 ng/μl, los 53 aislados fueron positivos para el gen 16s y negativos para el gen *coa*. Para los aislados de *S. chromogenes*, el 100% de los aislados fueron positivos a todos los genes de virulencia, a excepción del gen que codifica el factor de virulencia B, en donde el 95.65% de los aislados fueron positivos. El 100% de los aislados de *S. simulans* fueron positivos a los genes que codifican para la proteína extracelular, metaloproteasa de zinc, SasH y FemA; el 27.78 % fueron positivos al gen de la aureolisina, 16,67% al gen TRAP, 11.11% a la hemolisina y al antígeno B respectivamente y el 100% fueron negativos al factor de virulencia B. Los aislados de *S. xylosus* fueron 100% positivos a los genes de la proteína extracelular, metaloproteasa de zinc y FemA, el 66.67% fueron positivos a SasH, 44,44% a la aureolisina, 33,33% a SasH y al factor de virulencia B respectivamente y ningún aislado fue positivo al antígeno B. El 100% de los aislados de *S. sciuri* fueron positivos a todos los genes de virulencia a excepción de la hemolisina y al antígeno B en donde ningún aislado fue positivo a la presencia de estos dos genes. Por último, el único aislado de *S. warneri* fue positivo a la proteína extracelular,

metaloproteasa de zinc y factor de virulencia B y fueron negativos al resto de los genes de virulencia **(CUADRO 5)**.

3. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS AISLADOS BACTERIANOS

Para conocer la variabilidad de los 23 aislados de *S. chromogenes* de acuerdo a las distintas pruebas bioquímicas y a la prueba de susceptibilidad a quimioterapéuticos, se realizó un análisis de conglomerados utilizando la varianza mínima de Ward que agrupa a los 23 aislados de acuerdo a la similitud de respuestas que presentaron entre sí, este análisis arrojó tres subgrupos a partir de los 23 aislados. El primer subgrupo está conformado por seis aislados, dos aislados pertenecen a la granja 2 con un sistema de producción intensivo y cuatro aislados de la granja 1 con sistema de producción extensivo, este grupo se caracteriza por ser negativos a la utilización de maltosa, respuesta variable a N-acetil-glucosa y sensibles a los cinco antibióticos utilizados. En el segundo subgrupo se encuentran siete aislados de la granja 3 obtenidos de animales en sistema intensivo y semiintensivo de producción, en este subgrupo se encuentran aislados positivos a la utilización de maltosa, negativos a la utilización de N-acetil-glucosa y resistentes a la polimixina B y a la ampicilina. En el tercer subgrupo se encuentran 10 aislados, 6 de estos aislados pertenecen a la granja 3 en sistema intensivo de producción, 2 aislados pertenecen a la granja 2 y dos aislados de la granja 1, este subgrupo se caracteriza por ser positivos a maltosa, positivos a N-acetil-glucosa y resistentes a la polimixina B y a la ampicilina **(FIGURA 1)**.

4. ESTANDARIZACIÓN DEL ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM

Los aislados bacterianos identificados como *S. chromogenes* se utilizaron para realizar el MLVA, se identificaron 63 loci de VNTR en el genoma de *S. chromogenes* MU970 y seis de ellos se utilizaron en los aislados identificados como *S. chromogenes* y en los 23 aislados se amplificaron cuatro loci identificados como 266_07, 346_06, 360_06, y 854_08 llamados así de acuerdo al producto esperado en la cepa de *S. chromogenes* MU970 y el conting del genoma en el que se presentan **(CUADRO 6)**. A partir de los VNTR se

agruparon los 23 aislados utilizando el método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada y el coeficiente de correlación de Pearson, el cual arrojó una similitud del 85.7% entre los 23 aislados, estos se agruparon de acuerdo al número de VNTR que presentaron en los cuatro loci, los cuales se dividieron en dos subgrupos, en el primero, los seis aislados de Guanajuato se agrupan con los cuatro aislados de Querétaro, de estos, dos de ellos fueron aislados de la misma cabra a los 60 días de lactación de la glándula izquierda y posteriormente a los 150 días de lactación de la glándula derecha. En el segundo subgrupo se agrupan los 13 restantes, conformado únicamente con aislados de Querétaro, se encuentran los de la cabra J a los 15, 60 y 195 días de lactación a partir de la glándula derecha, lo mismo ocurre con la cabra K en donde el MLVA indica que los aislados recuperados a los 15 y 60 días de lactación de la glándula izquierda y a los 60 días de la glándula derecha son la misma cepa de *S. chromogenes* (**FIGURA 2**). La capacidad de discriminación del MLVA se determinó utilizando el índice de discriminación (D) para los 23 aislados y mostró un nivel de discriminación con un valor de D de 0.8893. El poder de discriminación de cada VNTR se estimó de acuerdo al número de alelos detectados y la diversidad del alelo. Los índices de diversidad más altos utilizando el índice de Simpson y de Hunter-Gastón fue de 0.926 y 0.968 respectivamente para el loci 346_06, mientras que los índices de diversidad más bajos los obtuvo el loci 854_08 con 0.654 y 0.684 respectivamente (**CUADRO 7**).

II. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CABRAS

1. ELECCIÓN DE LA CEPA DE *S. chromogenes*

La cepa seleccionada para infectar a las cabras de manera experimental, presentó los siguientes VNTR:

LOCUS	VNTR
266_07	27
346_06	78
360_06	39
854_08	3

2. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LAS CABRAS

Se logró infectar de manera experimental la glándula izquierda de las tres cabras y la glándula derecha se mantuvo como testigo negativo, excepto en la cabra 2130 que presentó mastitis en la glándula derecha por *Streptococcus* spp y se eliminó del estudio el día de la inoculación experimental.

3. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

a) PERIÓDO PRE-INFECCIÓN

Ambas glándulas mamarias se mantuvieron libres de infección hasta el día de la inoculación experimental, en el análisis bacteriológico general, no se observó desarrollo de colonias bacterianas y ambas glándulas en las dos cabras fueron negativas en la PCR para el fragmento 16s de *Staphylococcus* spp.

b) PERIÓDO POST-INFECCIÓN

La glándula izquierda de las cabras 2133 y 2165 fueron positivas a crecimiento bacteriano de colonias compatibles con *Staphylococcus* spp durante los 21 muestreos consecutivos, al igual que en los 8 muestreos de la etapa final de la lactación; en la cabra 2133 se obtuvieron 24 aislados, a partir del día 17 post-infección, siete de ellos presentaron características compatibles con variantes de colonias pequeñas; es decir, colonias que

medían aproximadamente la décima parte de las colonias habituales y que al resembrarlas volvieron a mostrar las características fenotípicas de *Staphylococcus* spp (Arvidsson 2002); En la cabra 2165 se obtuvieron 26 aislados y a partir del día 14 post-infección, ocho de ellos mostraron características compatibles con variantes de colonias pequeñas. La glándula derecha de las cabras 2133 y 2165 se mantuvieron libres de infección, en el análisis bacteriológico general no se observó desarrollo de colonias bacterianas y en la PCR fueron negativas para el gen 16s y *coa* de *Staphylococcus* spp.

4. AISLADOS BACTERIANOS RECUPERADOS DE LA LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

a) ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO GENERAL, MOLECULAR y MLVA

Los 10 aislados seleccionados por conveniencia aleatoriamente de las cabras 2133 y 2165 correspondieron a bacterias Gram positivas agrupadas en racimo, catalasa positivo y coagulasa negativo; todos los aislados resultaron positivos a la PCR del gen 16s y negativos al gen *coa*, todos ellos fueron positivos a la PCR de los nueve genes de virulencia y a la PCR del locus 346_06, al analizar los productos de esta PCR se obtuvieron los 78 VNTR de la cepa de *S. chromogenes*.

III. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y DE ARNm DE INTERLEUCINAS POR MEDIO DE qRT-PCR

1. CUANTIFICACIÓN BACTERIANA EN LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

Se obtuvo el conteo relativo de *S. chromogenes* para cada uno de los muestreos post-infección realizados en la glándula izquierda de ambas cabras, los cuales resultaron positivos a la presencia de bacterias en los 29 muestreos post-infección que se realizaron **(FIGURA 3)**.

2. CUANTIFICACIÓN DE ARNm DE INTERLEUCINAS EN CÉLULAS SOMÁTICAS DE LECHE DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE

Para realizar el conteo de las interleucinas pro y antiinflamatorias se seleccionaron días de muestreo que pudieran representar la respuesta inmune en la glándula mamaria en etapa

aguda y crónica de la enfermedad, los días seleccionados fueron el 3, 19, 70 y 77 post-infección que corresponden a los días 59, 75, 126 y 133 de lactación respectivamente.

a) DIFERENCIA EN LA EXPRESIÓN EN EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO INFECTADO

Se obtuvieron las diferencias en la magnitud de la expresión de las siete interleucinas evaluadas del grupo infectado entre al grupo control con respecto al día cero de la infección, es decir, antes de que la respuesta inmune de la glándula mamaria fuera estimulada. En el día tres la IL1 β , IL8, IL12, IFN- γ y TGF- β tuvieron expresión estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($P < 0.05$). En los días 19 y 70 post-infección, la IL1 β , IL12, IFN- γ , IL10 y TGF- β mostraron diferencias con respecto al grupo control ($P < 0.05$) y en el día 77, la IL1 β , IL12, IFN- γ e IL10 mantuvieron diferencias con respecto al grupo control ($P < 0.05$) (**FIGURA 4**).

b) DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE INTERLEUCINAS EN EL GRUPO INFECTADO DURANTE LOS DÍAS POSTINFECCIÓN.

La IL1 β presenta diferencias en su expresión en el día 3 y 19 con respecto a los días 70 y 77 ($P < 0.05$), la IL8 presenta diferencias significativas entre el día 3 y el día 70, así como en el día 19 y 77 ($P < 0.05$). La IL12 solamente presenta diferencias en su expresión entre el día 3 y 77 ($P < 0.05$), en cuanto al IFN- γ el día 3 presentó diferencias significativas con respecto a los días 19, 70 y 77, así como en el día 19 con respecto al 77 ($P < 0.05$). En cuanto a las interleucinas antiinflamatorias, la IL4 únicamente muestra diferencia entre el día 3 y 77 ($P < 0.05$), la IL10, presenta diferencias el día 19 con respecto a los días 70 y 77 ($P < 0.01$), así como el día 70 con respecto al día 77 ($P < 0.001$). Por último, el TGF- β , únicamente hay diferencia en la expresión entre el día 3 y 70 ($P < 0.05$) (**FIGURA 5**).

c) IL1 β DISMINUYE SU EXPRESIÓN AL AUMENTAR LA EXPRESIÓN DE IL10 y TGF- β

Durante los cuatro muestreos se observó que la expresión de IL1 β fue estadísticamente significativa contra la IL10 ($P < 0.05$) y el TGF- β ($P < 0.01$) (**FIGURA 6**).

d) IFN- γ AUMENTA SU EXPRESIÓN AL DISMINUIR LA EXPRESIÓN DE IL10

Conforme aumentan los días post-infección, se observó que el IFN- γ mostró diferencias significativas en su expresión en los días 19 y 77 con respecto a la IL10 ($P < 0.05$) (**FIGURA 7**).

e) CORRELACIÓN ENTRE INTERLEUCINAS Y NÚMERO DE BACTERIAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA

De acuerdo a la prueba de correlación de Spearman, se encontraron correlaciones positivas entre la IL12 con respecto al número de bacterias ($r = 0.77$) ($P < 0.05$) y con el TGF- β con respecto al conteo bacteriano ($r = 0.95$) ($P < 0.01$), únicamente se observó una correlación negativa entre el IFN- γ y el número de bacterias (-0.83) ($P < 0.01$)

DISCUSIÓN

I. GENOTIPIFICACIÓN DE *S. chromogenes* A TRAVÉS DE UN ANÁLISIS MULTILOCUS DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (MLVA)

El género *Staphylococcus* se aísla de manera común en casos de mastitis en rumiantes. Las mastitis subclínicas en cabras son causadas principalmente por el grupo de los SCN, las especies de este grupo son considerados patógenos menores y oportunistas (Vliegheer y col. 2004; Zhang y Maddox 2000; Park y col. 2011; Supré y col. 2011). Este grupo es capaz de ocasionar mastitis porque presenta diversos factores de virulencia. Algunos de estos genes de virulencia los comparten con *S. aureus* como hemolisinas, leucocidinas, toxinas, formación de biofilms y adhesinas (Vliegheer y col. 2004; Haveri y col. 2007; Sampaio y col. 2015; Thordberg y col. 2006; Shimizu y col. 1997; Zaliuga y col. 2013.) En este trabajo, algunos de los factores de virulencia que resultaron compartidos con *S. aureus*, fueron la aureolisina, una metaloproteinasa extracelular y la proteasa SasH; aunque las especies de SCN se consideran menos virulentas que *S. aureus*, los distintos factores de virulencia que presenta este grupo podrían determinar cuadros clínicos, así como la persistencia de las infecciones intramamarias, por lo que deben considerarse como patógenos y no como parte de la microbiota normal (Vliegheer y col. 2004; Zhang y Maddox 2000; Vogler y col. 2006; Van Belkum y col. 1998). En este trabajo se identificaron los aislados de *S. chromogenes* con genes de *S. chromogenes* MU970, única secuencia reportada hasta el momento, aislada de un caso de mastitis bovina en Estados Unidos, *S. chromogenes* ocupa el primer lugar como causante de mastitis subclínica en cabras reportada en varias partes del mundo (Fry y col. 2014). En el presente trabajo se lograron detectar adhesinas, antígenos asociados a la pared celular y hemolisinas los cuales son compartidos con algunas otras especies de SCN; con estos resultados y los reportados en la literatura se puede señalar que dependiendo de los factores de virulencia que presente la especie, determinarán la intensidad y grado de daño en la glándula mamaria, debido a que no hay

estudios dirigidos a alguna especie en particular del grupo, es importante conocer todos factores de virulencia de los SCN causantes de mastitis en rumiantes, para considerarlos en las medidas de control y prevención de la enfermedad (Vliegheer y col. 2004; Zhang y Maddox 2000; Haveri y col. 2007). Con la identificación de estos genes de virulencia en *S. chromogenes*, es evidente que las mastitis causadas por esta bacteria no deben considerarse de poca importancia. En este estudio se desarrolló el primer MLVA específico para aislados de *S. chromogenes*, en otros trabajos se han utilizado otros métodos de genotipificación para los SCN en general y dirigidos a una especie en particular. Se han realizado estudios en donde se han estandarizado métodos de genotipificación para *S. epidermidis* aislados de leche bovina y de piel humana, utilizando PFGE, se obtuvieron cinco patrones y uno de los aislados de piel, mostró uno de los patrones encontrados en la leche, lo que apoya la hipótesis de que esta especie puede ser zoonótica y transmitida de humanos a animales (Taylor y Breden 2000).

Shimizu y col. (1997), reportaron la genotipificación por medio de PFGE, de 138 aislados de *S. hyicus* de cerdos, pollos, vacas y cabras y de 21 aislados de *S. chromogenes* obtenidos de cerdos y de leche de vaca con mastitis; los patrones obtenidos para *S. hyicus* fueron distintos de acuerdo al país de origen, los patrones de *S. chromogenes* fueron más conservados y diferentes de los aislados de *S. hyicus*.

Los resultados obtenidos en el análisis de conglomerados de las pruebas bioquímicas permitieron diferenciar tres grandes subgrupos, los subgrupos 1 y 3 que se aislaron de Querétaro y Guanajuato, mientras que el subgrupo 2 solo se aisló de Querétaro (**FIGURA 1**); estos métodos fenotípicos de identificación se basan en la determinación de características bioquímicas y fisiológicas e históricamente constituyeron la primera herramienta que permitió la comparación de microorganismos y siguen siendo importantes para la tipificación de muchos patógenos, pero estos rasgos fenotípicos son susceptibles a la influencia del ambiente, que pueden provocar variaciones en la expresión genética, por lo que los resultados obtenidos a través de este tipo de caracteres puede

presentar poca estabilidad, reproducibilidad y poder discriminatorio, con en estas pruebas es difícil saber si los aislados presentan el mismo patrón genético (Zaluga y *col.* 2013).

Con el MLVA desarrollado en este trabajo, se observó que las bacterias aisladas de las mismas cabras persistieron a lo largo de la lactación, los resultados en las cabras G, J y K, podrían indicar una mastitis crónica y persistente, en la que el microorganismo se eliminó constantemente por la leche (**FIGURA 2**), por lo anterior, se debe tener cuidado en las medidas de higiene para evitar la propagación de la bacteria a otros animales del hato, ya que con los resultados obtenidos es evidente que la misma bacteria está infectando a distintas cabras, tal vez a través de la máquina de ordeño, así como por el personal que realiza esta actividad. Por otro lado, estos resultados indican que los genogrupos de *S. chromogenes* difieren de acuerdo a su localización geográfica; los métodos genotípicos de identificación como el desarrollado en este trabajo, pueden ser empleados para clasificar a los microorganismos en grupos relacionados o divergentes, por lo que con el conocimiento derivado de los estudios epidemiológicos se puede determinar la historia natural de las enfermedades, frecuencia de aparición, distribución, vías y patrones de diseminación, reservorios o factores que incrementan el riesgo de contraerla (Vogler y *col.* 2006).

De acuerdo a los índices de discriminación que presentó el MLVA de *S. chromogenes* de 0.8893, fue capaz de distinguir a los distintos aislados entre sí, ya que un valor de D de 1 indicaría que el método es capaz de distinguir a cada miembro de la población de cualquier otro miembro de ella, un índice de 0 indica que todos los miembros de esa población son idénticos y un índice de 0.50 indica que si un aislado se elige aleatoriamente, hay un 50% de probabilidades de que el siguiente aislado elegido sea indistinguible del primero (Schukken y *col.* 2011; Mokrousov 2017).

El índice de discriminación más alto lo presentó el loci 346_06 lo que representa una opción viable para genotipificar a los aislados de *S. chromogenes*. Los MLVA presenta varias ventajas, una de las características más importantes es que el análisis de un número limitado de loci provee información de la diversidad que existe dentro de la especie

bacteriana, por lo que esta técnica está tomando un lugar importante dentro de las herramientas moleculares empleadas para tipificar a distintas bacterias (Zaluga y *col.* 2013).

Una de las características de las repeticiones en tándem y su utilidad para utilizarlas como marcadores moleculares, es que representan uno de los loci genómicos más diversos en las poblaciones bacterianas al estar conformados por secuencias cortas conocidas como unidades de repetición o secuencias que se repiten en tándem y varían en su número de copias. Estas copias repetidas resultan de mutaciones de inserción y deleción, por lo que pueden ganar o perder varias de estas unidades, lo que origina una gran cantidad de alelos; se ha propuesto que estas mutaciones ocurren principalmente por un desemparejamiento por deslizamientos de las cadenas, aunque también podrían ocurrir fenómenos de recombinación (Van Belkum y *col.* 1998).

La mayoría de estos VNTR no presentan efectos fenotípicos y generan variaciones genéticas neutras, por lo que no se les ha asociado con efectos biológicos (Van Belkum y *col.* 1998). En cuanto al índice de mutaciones de estos VNTR, aún no queda claro cuál es la probabilidad de mutación de estas secuencias repetidas, por lo que el realizar estudios para determinar la velocidad de mutación, se facilitarían sin duda las investigaciones en cuanto a la epidemiología molecular. En conclusión, el MLVA presentado en este trabajo demuestra ser una herramienta fácil de reproducir y representa una opción viable y sencilla para tipificar a los SCN aislados de casos de mastitis de distintas regiones y poder hacer un seguimiento de la enfermedad.

II. EXPRESIÓN DE INTERLEUCINAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA

Con el conteo bacteriano, utilizando el gen de la proteína extracelular de *S. chromogenes*, se comprobó la presencia bacteriana en la glándula, desde las primeras 24 horas post-infección, hasta el último muestreo de leche antes del secado de las cabras (**FIGURA 3**). En infecciones experimentales en seis bovinos Holstein realizadas por Simojoki y *col.* (2009), utilizando aislados de *S. chromogenes*, reportaron que todos los animales alcanzaron un pico de crecimiento bacteriano a las 8 horas post-infección, 46 horas después, no

detectaron crecimiento bacteriano en medios de cultivo, excepto en un animal que continuó eliminando bacterias hasta 14 días post-infección, la dosis utilizada por Simojoki y col. (2009) fue la dosis utilizada en este estudio, en ambos se logró infectar a la glándula mamaria a pesar de trabajar con especies animales distintas y en ambos, los animales desarrollaron mastitis subclínica, no presentaron cambios físicos visibles en la glándula mamaria, ni ninguna signología clínica; si bien, las vacas lograron eliminar la infección, se debe considerar que las cepas utilizadas son distintas por lo que pueden existir diferentes factores de virulencia que contribuyan a la presentación de mastitis crónica y a la eliminación de los microorganismos en los animales (Piccart y col. 2016). Esta deficiencia en la eliminación de la bacteria por parte de los animales es similar a la que ocurre en mastitis causadas por *S. aureus* en bovinos, hay reportes de autores de distintos países que indican que *S. aureus* persiste durante lactaciones completas, incluso reportan un fallo en el reconocimiento bacteriano por parte del TLR2 (Yang y col. 2008). En la investigación realizada por Yang y col. (2008), reportan que al infectar células epiteliales de glándula mamaria de bovinos con *S. aureus* y *E. coli*, ambos agentes indujeron la expresión de genes de IL8 y TNF- α , en el caso de *S. aureus*, el ácido lipoteicoico (LTA), así como la bacteria completa, fallan al activar a NF- κ B en los cultivos celulares. Probablemente existan diversos mecanismos que bloquean la transducción de señal del TLR, se sabe que el TGF- β bloquea la vía de señalización dependiente de MyD88 a través de la ubiquitinización y degradación proteosomal subsecuente de este factor, al bloquear MYD88, no se activan inductores como β -defensinas, iNOS (sintetasa de óxido nítrico), proteínas de la fase aguda de la inflamación como SAA3 o HP lo que lleva a infecciones persistentes (Yang y col. 2008; Günther y col. 2011). Se ha demostrado en estudios realizados por Andreotti y col. (2014), que las mastitis causadas por *S. aureus* incrementa la expresión de TGF- β en la glándula mamaria lo que podría ser indicativo de la activación del mecanismo mencionado. Existen otros mecanismos que bloquean directamente la activación de NF- κ B como la interferencia en el complejo IK β o que incluso interfieren con la translocación al núcleo del componente p65 de NF- κ B (Yang y col. 2008).

En esta investigación se demostró por métodos bacteriológicos tradicionales y métodos moleculares la presencia de la bacteria en la glándula mamaria. Al comparar la expresión de genes de interleucinas con respecto al control, se observó que en el día tres post-infección, ocurrió una mayor expresión de IL1 β , IL12, IFN- γ , IL10 y TGF- β (**FIGURA 4A**) con respecto al grupo control. Fournier y Philpott (2005), reportaron que *S. aureus* era capaz de inducir respuestas proinflamatorias con un pico de interleucinas a las 50-75 horas post-infección, en comparación con bacterias Gram negativas en donde el pico de interleucinas aparecía dentro de las 5 horas post-infección. Sin embargo, también se reporta que los antígenos de pared de *Staphylococcus* spp como el PG, el LTA y otras proteínas en conjunto, no son suficientes para incrementar interleucinas proinflamatorias como TNF- α (Bulgari y col. 2017; Bannerman y col. 2004). En esta infección, utilizando a *S. chromogenes* se observó la presencia de transcritos de IL1 β una de las principales citocinas proinflamatorias producida por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales que a su vez estimula la producción de IL8, principal quimiotáctico de neutrófilos hacia el sitio de infección (Abbas y col. 2003). También se observó la producción de IL12 producida por macrófagos, neutrófilos, monocitos y linfocitos B, una de las principales funciones de IL12 es actuar como mediador entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa regulando la polarización de células T hacia una respuesta de tipo TH1 caracterizada por una actividad fagocítica intensa (Ezzat y col. 2014). Alluwami y col. (2003) reportaron la presencia de IL12 a las 24 horas post-infección con *S. aureus*, IL12 a su vez, activa macrófagos estimulando la producción de IFN- γ por parte de células T y células NK, aunque en el día tres post-infección no se observa una sobreexpresión de sus transcritos, IFN- γ también funciona como mediador entre la respuesta inmune innata y adaptativa y regula la expresión de moléculas MHC-I y MHC-II (Abbas y col. 2003). En otro estudio realizado por el mismo autor en 2004, menciona que el IFN- γ se detecta en glándulas mamarias sanas y con mastitis, a diferencia de Bougarn y col. (2010), que reportan ausencia de esta interleucina en mastitis causadas por *Staphylococcus* spp. Bannerman y col. (2006), encontraron que las infecciones intramamarias persistentes en

vacas se caracterizan por un incremento en el número de bacterias recuperadas, autores como Person y *col.* (1997), al trabajar con borregas e infectarlas de manera experimental con *S. aureus* encontraron un incremento de IFN- γ las primeras 24 horas post-infección, en esta investigación, el IFN- γ se expresó el día 19 post-infección, lo que podría reflejar la intención de incrementar la respuesta inmune TH1 para erradicar a las bacterias que no se eliminaron por los mecanismos de la respuesta inmune innata (Bannerman 2009).

En cuanto a la expresión de TGF- β , esta citocina, además de tener una actividad antiinflamatoria regula el desarrollo de la glándula mamaria, actúa sobre macrófagos y otros tipos celulares al inhibir las respuestas proinflamatorias, al disminuir la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Persson y *col.* 1997) (**FIGURA 6A**). Varios autores detectan a esta citocina incluso antes de las infecciones experimentales, en que el pico de TGF- β se mantiene hasta 72 horas; otras funciones de esta citocina incluyen el crecimiento de los conductos galactóforos y el desarrollo alveolar (Abbas y *col.* 2003; Bannerman y *col.* 2006). El incremento de esta citocina se ha reportado en infecciones crónicas por *S. aureus*, quizás para disminuir el daño tisular y contribuir con los mecanismos de reparación de la glándula mamaria, TGF- β es esencial para limitar el foco inflamatorio (Andreotti y *col.* 2014). En el día 19 y 70 post-infección aún se expresaba TGF- β , esto puede deberse a que suprime la inflamación e incrementa la fagocitosis de residuos bacterianos y células inflamatorias, también podría estar involucrada en reparar el parénquima lesionado en infecciones crónicas durante la involución mamaria (Andreotti y *col.* 2014). Probablemente por esta actividad se estaría presentando TGF- β dentro de la glándula mamaria y en el día 77 post-infección no existió una diferencia con el grupo control, ya que la glándula mamaria no infectada también está disminuyendo la producción de leche debido al secado.

En la interleucina antiinflamatoria IL4, no se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control, coincidiendo con la investigación de Riollet y *col.* (2000), quienes también reportan la falta de expresión de IL4 en bovinos infectados con *S. aureus*. De acuerdo con Faoucon y *col.* (2009), las cabras en lactación tienen una regulación

negativa en la señalización de la IL4, que se caracteriza por una disminución en los genes IL4R y NFATc2, las proteínas codificadas por estos genes son los linfocitos TH2, lo que podría estar relacionado con la subexpresión de la IL4. La IL10, se expresó de manera significativa el día 19 post-infección, IL10 es producida por macrófagos y actúa durante la infección aguda o crónica previniendo la producción de citocinas proinflamatorias **(FIGURA 6B)**, quimiocinas y debilita a las células presentadoras de antígenos, los linfocitos T, disminuyendo la expresión de MHC-II (Couper y *col.* 2007), también disminuye la respuesta excesiva de TH1 caracterizada por una sobreproducción de IFN- γ y TNF α , reduce la inflamación y disminuye los cambios patológicos regulando las respuestas TH2 para evitar la sobreproducción de IL4, IL5 e IL13 que pueden llevar a fibrosis severas, esta podría ser la razón por la cual la IL4 no se encuentra sobreexpresada en las glándulas infectadas. Tanto en el día 19 como en el día 70 post-infección se encontraron sobreexpresadas IL1 β , IL12, IFN- γ , IL10 y TGF- β , **(FIGURA 4B, 4C)**. El sistema inmune innato no fue capaz de controlar la infección y eliminar a *S. chromogenes*, por el patrón expresado de interleucinas, es probable que haya predominando una respuesta de tipo TH1. En el último muestreo realizado correspondiente al día 77 post-infección, dejó de ser significativa la expresión de TGF- β , ya que probablemente estaba llevando a cabo funciones encaminadas a reparar la glándula mamaria **(FIGURA 4D)**.

La expresión de IL1 β presentó diferencias entre los días 3 y 70 así como en los días 3 y 77 post-infección ($P < 0.05$). La mayor expresión se observó en el día 3 post-infección, probablemente por la actividad proinflamatoria de ese momento. La expresión también presenta diferencias entre los días 19 y 77 post-infección, aunque hay mayor expresión. Bougarn y *col.* (2010), reportan que el estímulo producido por el LTA y el muramilo dipéptido, no fue suficiente para detectar la presencia de la citocina en el sobrenadante del cultivo celular, estos antígenos de pared en forma sinérgica inducen inflamación. Megyeri y *col.* (2002), mencionan que *S. aureus* y *S. epidermidis*, otra especie que pertenece a los SCN, incrementan en la misma magnitud la expresión de IL1 β pero no *S. saprophiticus* que también pertenece a los SCN, esto podría ser causado por los factores

de virulencia que presentan cada una de las distintas especies pertenecientes al género *Staphylococcus* spp (Piccart y col. 2016) **(FIGURA 5A)**.

En cuanto a IL8 solo se encontró diferencia en su expresión en el día tres post-infección, Bannerman y col. (2006), no fueron capaces de detectar IL8 después de la infección experimental en bovinos con *S. aureus* y Lee y col. (2006), reportan que los transcritos de IL8 fueron considerablemente menores en comparación con la infección por *E. coli*. Otras investigaciones señalan que una disminución o una completa ausencia de expresión e IL8 en respuesta a las infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* (Piccart y col. 2016).

En el caso de IL12 e IFN- γ siempre mantuvieron una diferencia significativa en su expresión con respecto al grupo control, a excepción de IFN- γ , su expresión no fue significativa en el día tres post-infección. La IL12 mostró una diferencia significativa entre los días 3 y 77 post-infección, siempre hubo expresión de esta interleucina, probablemente fue mayor su expresión en el día tres al actuar como un regulador de la producción de TNF- α , IL8 e IL10. La expresión de IFN- γ , fue más alta conforme transcurrieron los días y se observó que al aumentar su expresión, disminuyó la expresión de IL10, **(FIGURA 7)** este comportamiento ha sido reportado por Bannerman y col. (2006), mencionan que los niveles en la expresión de IFN- γ fueron más altos cuando disminuyó la expresión de IL10. Rodríguez y col. (2015), trabajaron con una infección experimental con *Mycoplasma agalactiae* en cabras, reportaron altos niveles de IFN- γ e IL10 en infecciones crónicas. El IFN- γ aumenta la inducción de citocinas proinflamatorias como TNF- α inhibiendo al mismo tiempo la producción de IL10, el IFN- γ es capaz de alterar la transducción de señal de TLR2 al aumentar la actividad de la cinasa glucógeno sintetasa (GSK3) e inhibiendo la activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que conllevan a una disminución de la producción de IL10, IFN- γ también inhibe la actividad de los factores de transcripción CREB (cAMP response element-binding) y de AP-1 (proteína activadora 1) que inducen la expresión de IL10 (Hu y col. 2006). Una excesiva producción de citocinas proinflamatorias lleva al daño tisular perjudicial para el hospedero, a su vez, activan mecanismos homeostáticos que limitan la activación celular, la producción de citocinas y el daño

tisular, un mecanismo es la inducción de IL10, una potente citocina antiinflamatoria que inhibe a las citocinas proinflamatorias, así como las funciones de macrófagos y células dendríticas, jugando un papel crítico al limitar el daño a los tejidos durante la infección. Los ligandos de TLR2 y TLR4 son inductores potentes de IL10, la inducción de IL10 por TLR2 promueve respuestas del tipo TH2 y es un mecanismo por el cual, los microorganismos suprimen la respuesta inmune; los efectos supresores de IL10 dependen de la transducción de señal y del activador de la transcripción STAT-3 (Hu y col. 2006).

La IL4 no mostró diferencias significativas con el grupo control, aunque si hubo expresión de la misma, entre el día tres y 77 post-infección, siendo la mayor expresión en el día tres, la baja expresión en el día 77 puede indicar que la IL10 es la principal interleucina antiinflamatoria asociada a la infección. Fonseca y col. (2009), no encontraron diferencias significativas en la expresión de IL4 entre glándulas sanas e infectadas, de hecho, reportan que la expresión fue ligeramente menor en las glándulas infectadas, aunque tampoco fue significativa. La principal función de la IL4 es mediar respuestas inmunes humorales, las mastitis causadas por *Staphylococcus* spp desarrollan principalmente una inmunidad de tipo celular. El TGF- β solo muestra diferencias significativas entre los días tres y 77 post-infección, en el día tres hubo una expresión ligeramente mayor, de acuerdo a Lahoussa y col. (2007), esta interleucina se expresa de manera normal en glándula sana por sus funciones en la glándula mamaria (Lahoussa y col. 2007).

En cuanto a las infecciones experimentales con *S. chromogenes*, solo se han realizado en vacas Picoart y col. (2009), reportan una respuesta inmune moderada por parte de los animales, incluso infectó a distintos animales con diferentes aislados de *S. chromogenes* y mientras uno de estos aislados fue capaz de inducir la expresión de IL1 β , otro no indujo ningún cambio en la expresión de genes. Leitner y col. (2012), reportan que la respuesta inmune provocada por los SCN es similar, sin embargo, los animales no son capaces de eliminar a la bacteria.

Finalmente, la correlación positiva que se encontró entre la IL12 y el número de bacterias en leche puede estar indicando la presencia de un ambiente celular influido por una

respuesta TH1, esta IL12 a su vez estimula la expresión de IFN- γ y al aumentar la expresión de este último, el número de bacterias se ve disminuido, tanto la IL12 como el IFN- γ , se caracterizan por propiciar una actividad fagocítica intensa que puede causar daño a la glándula, lo que explica la correlación positiva entre el conteo bacteriano y el TGF- β que previene el daño excesivo; durante la involución de la glándula mamaria.

La actividad de los neutrófilos es crítica para prevenir las mastitis, ya que la involución es un período vulnerable, lo neutrófilos a través de la fagocitosis erradican bacterias y la coexpresión de genes antiinflamatorios limitan los efectos detrimentales de la actividad de neutrófilos y la apoptosis, de acuerdo con Atabai y *col.* (2007), sin embargo, en los días cercanos al secado, no hay sobreexpresión de las interleucinas antiinflamatorias, lo que puede ser reflejo del esfuerzo que está realizando la glándula mamaria para erradicar al microorganismo.

CONCLUSIONES

1. Se implementó un MLVA para la genotipificación de los aislados bacterianos.
2. Fue posible infectar glándulas mamarias de cabras primaras con un aislado de *S. chromogenes* proveniente de un caso de mastitis caprina en México.
3. La glándula mamaria fue incapaz de eliminar al agente infeccioso a lo largo de la lactación.
4. Se estudiaron las interleucinas pro y antiinflamatorias, encontrándose que las interleucinas antiinflamatorias no se encuentran sobreexpresadas hacia el final de la lactación, por lo que se recomienda realizar estudios en donde se puedan medir las interleucinas en dos o tres lactaciones subsecuentes para poder esclarecer el fenómeno de persistencia bacteriana.
5. Se recomienda realizar infecciones experimentales con distintas cepas que presenten otros factores de virulencia para evaluar la respuesta inmune que desencadenan en la glándula mamaria.
6. Es necesario conocer los mecanismos de evasión de la respuesta inmune que presenta el grupo de los SCN para comprender porque la glándula mamaria es incapaz de eliminar a estos agentes.
7. Es necesario conocer los mecanismos de evasión que presenta *S. chromogenes* ya que la glándula mamaria fue incapaz de eliminar a este agente a lo largo de la lactación.

ABREVIATURAS

AFLP: polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados

AP-1: proteína activadora 1

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

cADN: ácido desoxirribonucleico complementario

CCS: conteo de células somáticas

CS: Células somáticas

CEM: células epiteliales mamarias

CEIPSA: Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal

CICC: caldo infusión cerebro corazón

CPA: célula presentadora de antígeno

CREB: cAMP response elemento binding

CSF: fator estimulante de colônias

CT: cycle treshold o ciclo umbral

CXR: receptor de quimiocina

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco

FMVZ: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

GADPH: gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa

GSK3: cinasa glucógeno sintetasa

HEPES: ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico)

IFN: interferón

IIM: infecciones intramamarias

IL: interleucina

iNOS: sintetasa del óxido nítrico

LTA: ácido lipoteicoico

MAPK: cinasas activadas por mitógenos

MBL: lectinas de unión a manosas

MHC I: molécula de histocompatibilidad tipo I

MHC II: molécula de histocompatibilidad tipo II

MLVA: análisis multilocus del número variable de repeticiones en tándem

MyD88: proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide

NF- κ B: factor de transcripción nuclear κ B

NK: células natural killers

NOD: dominio de oligomerización de nucleótidos

pb: pares de bases

PBS: solución de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado

PMN: Polimorfonucleares

qRT-PCR: quantitative real time- PCR o PCR en tiempo real

RAPD: amplificación aleatoria del ADN polimórfico

Rep-PCR: amplificación por PCR de secuencias repetitivas

RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

RIG-1: receptores tipo ácido retinóico inducible del gen 1

ROS: especies reactivas de oxígeno

SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativo

SCV: small colony variants o variantes de colonias pequeñas

SSF: solución salina fisiológica

TCR: receptor de células T

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: receptores tipo Toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TSA: agar tripticasa soya

UPGMA: agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada

UAM: Universidad Autónoma Metropolitana

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

VNTR: número variable de repeticiones en tándem

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oviedo BJ, Valdés AJ, Cajero JM, Ochoa ZA, López MJ, Bravo PA, Baizabla AV. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect* 2007; 54: 399-409.
2. Bonilla CS, Rosas MS, Hernández AL, Díaz AE, Villa GR, Hernández ZJS. Agentes etiológicos involucrados en la mastitis subclínica en cabras lecheras. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Buiatria; 2003 Villahermosa (Tabasco) México.
3. Amezcua MA. Prevalencia de mastitis subclínica en hatos caprinos en la zona central del bajío. (Tesis de licenciatura) México (CDMX) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM 1981.
4. Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol* 2009; 134: 3-8.
5. Leitner G, Merin U, Krifucks O, Blum S, Rivas AL. Effects of intra-mammary infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: comparison among cows, goats and sheep. *Vet Immunol and Immunopathol* 2012; 147: 202-210.
6. Simojoki H, Orro T, Taponen S, Pyörälä S. Host response in bovine mastitis experimentally induced with *Staphylococcus chromogenes*. *Vet Microbiol* 2009; 134: 95-99.
7. Ziegler C, Goldman O, Hobeika E, Geffers R, Peters G, Medina E. The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to *in vivo* anergy. *EMBO Mol Med* 2011; 3: 652-666.
8. Ezzat-Alnakip M, Quintela-Baluja, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calomata P, Barros-Velázquez J. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J Vet Med* 2014; 1-31.

9. Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard B. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front Immunol* 2014; 5: 10.
10. Nogueira de Souza F, Ramos-Sánchez EM, Heineman MB, Ake-Gidlund M, Campos-Reis L, García-Blagitz M, Della-Libera AM, Pinho-Cerqueira MM. The innate immunity in bovine mastitis: the role of pattern-recognition receptors. *Am J Immunol* 2012; 8: 166-178.
11. Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 109-121.
12. Sordillo L. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livest Prod Sci* 2005; 98: 89-99.
13. Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7: 135-144.
14. Pereyra E, Dallard B, Calvino L. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Rev Argent Microbiol* 2014; 46: 363-375.
15. Paape MJ, Capuco AV. Cellular Defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *J Anim Sci* 1997; 75: 556-565.
16. Brenaut P, Lefevre L, Rau A, Laloe D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stage of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res* 2014; 45:16.
17. Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med* 2003; 50: 105-111.
18. Alluwami A. The cytokines of bovine mammary gland; prospects for diagnosis and therapy. *Res Vet Sci* 2004; 77: 211-222.
19. Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O Leigh J, Petzl W, Schubert HJ, Sipka A, Smith DGE, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A,

- Zadoks RN, Seyfert HM. Host-Response patterns of Intramammary Infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 270-289.
20. Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. 5ta Edición, Elsevier, España.
 21. Hermans K, Devriese LA, Haesebrouck F. *Staphylococcus*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 3rd Ed. USA: Blackwell Publishing, 2004.
 22. Watanabe S, Ito T, Sasaki T, Li S, Uchiyama I, Kishii K *et al*. Genetic diversity of staphylocoagulase gene (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 2009; 4: e5714.
 23. Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, Pepe O, Coppola S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* and *S. Schleiferi* subsp. *coagulans*) *J Clin Microbiol* 2010; 48: 192-201.
 24. Foster G, Ross HM, Hutson RA, Collins MD. *Staphylococcus lutrae* sp. Nov. a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 724-726.
 25. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014; 870-925.
 26. Zadocks RN, Watts JL. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet Microbiol* 2009; 20-28.
 27. Vanderhaeghem W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. Identification, typing; ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *Vet J* 2015: 44-51.
 28. Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis: not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol* 2009: 29-36.
 29. Fry P, Calcutt M, Foecking M, Hsieh H, Suntrup D, Perry J, Stewart G, Middleton J. Draft Genome sequence of a *Staphylococcus chromogenes* strain MU970, isolated from a case of chronic bovine mastitis. *Genome A*. 2014; e00835-14.

30. Lamers RP, Muthukrishnan G, Castoe TA, Tafur S, Cole AM, Parkinson CL. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *Evol Biol* 2012; 1-15
31. Stepanovic S, Hauschild T, Dakic I, Al-Doori Z, Svabic-Vlahovic M, Ranin L, Morrison D. Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* Group. *J Clin Microbiol* 2006; 934-937.
32. Monir Shah M, Ihara H, Noda M, Xiao Song S, Hong Nhung P, Ohkusu K, Kawamura Y. DNAJ gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Evol Micr* 2007; 25-30.
33. Vilchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Ven Microbiol* 2009; 6-12.
34. Van Der Zee A, Verbakel H, Van Zon JC, Frenay I, Van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol* 1999; 342-349.
35. Wang H, Diao B, Cui Z, Yan M, Kan B. Genotyping of *Salmonella* Typhi using 8 loci multilocus VNTR analysis. *Gut Pathog* 2016; 8:14.
36. Bergonier D, Sobral D, Febler A, Jacquet E, Gilbert F, Schwarz S, Treilles M, Bouloc P, Pourcel C, Vergnaud G. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Vet Res* 2014; 45:97.
37. Sobral D, Schwarz S, Bergonier D, Brisabois A, Febler A, Gilbert F, Kadlec K, Lebeau B, Loisy-Hamon F, Treilles M, Pourcel C, Vergnaud G. High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. *Plos one* 2012; 5-e33967.
38. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka-W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, Travis J, Potempa J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: Multi-locus variable

- number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2003; 1801-1804.
39. Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, Sakwinska O, Deurenberg R, Vergnaud G. Improved multiple locus variable number tandem repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. *J Clin Microbiol* 2009; 3121-3128.
 40. Hollender D, Conde S, Salustio E, Samartino L. Detección de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 como fundador de aislamientos de *B. abortus* en Argentina. *Rev Argen Microbiol* 2013; 229-239.
 41. Le Fleche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramiisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramiisse F, Vergnaud G. A Tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiology* 2001; 1:2.
 42. Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. molecular epidemiology of microorganisms. *Methods in Molecular Biology*; Vol. 551M 2009.
 43. Ramiisse V, Houssu P, Hernández E, Denoeud F, Hilaire V, Lisanti O, Ramiisse F, Cavallo JD, Vergnaud G. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. *J Clin Microbiol* 2004; 5722-5730.
 44. Arvidsson E. Stability of variable number of tandem repeat (VNTR) Markers in *Francisella tularensis*. Master's Degree Project, Molecular Biotechnology Programme Uppsala University School of Engineering, Sweden, 2002.
 45. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature* 2007; 5: 48-56.
 46. Kaldadu N, Hauryliuk V, Tenson T. Persisters-as elusive as ever. *Appl Microbial Biotechnol* 2016.
 47. Gefen O, Balaban N. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 1-14.

48. Maisonneuve E, Gerdes K, Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell* 2014; 539-548.
49. Schmidt S, Hung DT. Persistent bacterial infections antibiotic tolerance and the oxidative stress response. *Virulence* 2013; 273-283.
50. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2011; 1622-1625.
51. Atalla H, Gules C, Mallard B. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim Health Res Rev* 2011; 33-45.
52. Melter O, Radojevic B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*-review. *Folia Microbiol* 2010; 55: 548-558.
53. Sendi P, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol* 2008; 17: 54-58.
54. Bernal M, Guzmán M. El antibiograma de discos. normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica* 1984; 112-121.
55. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni *et al.* Improved method for rapid extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J Dairy Sci* 2006; 89: 168-169.
56. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smelter MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection, *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3332-3338.
57. Ruiz-Romero RA, Cervantes-Olivares RA, Martínez-Gómez D, Ducoing-Watty AE, Hernández-Andrade L. Desarrollo de una PCR multiple para la identificación de *Staphylococcus* spp como causa de mastitis caprina. *Arch Med Vet* 2013; 327-331.
58. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:573-580.
59. Hunter P, Gaston M. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems; an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 2465-2466.

60. Carter GR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4th Edition, Charles C Thomas Publisher, EUA, 1984.
61. Livack KJ, Schmiigen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 2001; 402-408.
62. Vlieghe S, Opsomer G, Vanrolleghem A, Devriese L, Sampimom O. *In vitro* growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Vet Microbiol* 2004; 101: 215-221.
63. Zhang S, Maddox C. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect Immun* 2000; 68: 1102-1108.
64. Park YJ, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sicho WM, Bohach GA. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet microbiol* 2011; 147: 149-154.
65. Supré K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Vanechoutte M, Piepes S, De Vlieghe S. Some coagulase-negative *staphylococcus* species affect udder health more than others. *J Dairy Sci* 2011; 94: 2329-2340.
66. Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol* 2007, 103: 993-1000.
67. Sampaio S, Simoes SA, Zuniga E, Melville PA, Bispo SG, Carvalho GE, Gregori F, Roberti BN. Virulence factor genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. *Microb Pathog* 2015, 85: 35-39.
68. Thordberg M, Kühn I, Moller F, Brandstrom B, Jonsson P, Danielson. Tham ML. Phenond Genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol* 2006; 163-172.
69. Shimizu A, Kloos W, Berkhoff H, George C, Ballard D. Pulsed-field electrophoresis of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus chromogenes* genomic DNA and its

- taxonomic, epidemiologic and ecologic applications in veterinary medicine. *J Vet Med Sci* 1997; 443-450.
70. Zaluga J, Stragier P, Van Vaerenberg J, Maes M, De Vos P. Multilocus variable number tandem repeats analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC Microbiology* 2013; 13:126.
 71. Vogler A, Keys C, Nemoto Y, Colman R, Jay Z, Keim P. Effect of repeats copy number on variable number tandem repeat mutations in *Escherichia coli coli* O157:H7. *J Bacteriol* 2006; 4253-4263.
 72. Van Belkum A, Scherer S, Van Alphen L, Verbrough H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Micobiol Mol Biol Rev* 1998; 275-293.
 73. Taylor J, Breden F. Slipped-strand mispairing and noncontiguous repeats in *Poecilia reticulata* a model for minisatelitte birth. *Genetics* 2000; 1313-1320.
 74. Mokrousov I. Revisiting the Hunter-Gaston discriminatory index: Note of caution and courses of change. *Tuberculosis* 2017; 104: 20-23. oi: 10.1016/j.tube.2017.02.002.
 75. Piccart K, Verbeke J, De Visscher A, Piepers S, Haesebrouck F, De Vlieghe S. Local host response following an intramammary challenge with *Staphylococcus fleuretti* and different strains of *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers. *Vet Res* 2016; 47-56.
 76. Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner R, Günther J, Draing C, Von Aulock S, Schubert H, Seyfert H. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, but *Staphylococcus aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF- α and interleukin-8 (CXCL) expression in the udder. *Mol Immun* 2008; 1385-1397.
 77. Günther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert H. Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *Staphylococcus aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 2011; 695-707.

78. Andreotti C, Pareyra E, Baravalle C, Renna M, Ortega H, Calvinho L, Dallard B. *Staphylococcus aureus* chronic intramammary infection modifies protein expression of transforming growth factor beta (TGF- β) subfamily components during active involution. Res Vet Sci 2014; 5-14.
79. Fournier B, Philpott D. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. Clin Microbiol Rev 2005; 521-540.
80. Bulgari O, Dong X, Roca A, Caroli A, Loor J. Innate immune response induced by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid in primary goat mammary epithelial cells. J Anim Sci Technol 2017; 8:29.
81. Bannerman D, Paape M, Lee J, Zhao X, Hope J, Rainard P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 463-472.
82. Bougarn S, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert F, Rainard P. Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. Clin Vacc Immunol 2010; 1797-1809.
83. Bannerman D, Paape M, Chockalingam A. *Staphylococcus aureus* intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor α , β 1 and β 2. Vet Immunol Immunopathol 2006; 309-315.
84. Persson-Waller K, Colditz IG, Seow HF. Accumulation of leucocytes and cytokines in the lacting ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Res Vet Sci 1997; 63-66.
85. Bannerman D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. J Anim Sci 2009; 10-25.
86. Riollet C, Rainard P, Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 161-167.

87. Faoucon F, Rebours E, Bevilacqua JC, Aubert J, Makhzami S, Dhorne-Pollet S, Robin S, Martin P. Terminal differentiation of goat mammary tissue during pregnancy requires the expression of genes involved in immune functions. *Physiol Genomics* 2009; 61-82.
88. Couper K, Blount D, Riley E. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2007; 5771-5777.
89. Megyeri K, Mandi Y, Degre M, Rosztoczy I. Induction of cytokine production by different staphylococcal strains. *Cytokine* 2002; 206-212.
90. Lee JW, Bannerman D, Paape M, Huang M, Zhao X. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res* 2006; 219-229.
91. Rodriguez F, Castro P. Differential cytokine expression in natural and experimental mastitis induced by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goats. *Reprod Dom Anim* 2015; 159-163.
92. Hu X, Paik P, Chen J, Yarilina A, Kockeritz L, Lu T, Woodgett J, Ivashkiv L. IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 2006; 563-574.
93. Fonseca I, Vendramini P, Lange C, Guimaraes M. del Cambre M, Silva K, Savio P, Domingos J, Guimaraes S. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet Mol Biol* 2009; 776-778.
94. Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollot C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine* 2007; 12-21.
95. Atabai K, Sheppard D, Werb Z. Roles of the Immune System in Mammary Gland Remodeling During Involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007; 37-45.

CUADRO 1: INICIADORES UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR A *S.chromogenes*

GEN	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5-3')	TAMAÑO (pb)
16s	CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG	CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG	791
<i>coa</i>	CAAAGCAGATGCGATAG	CCTGTACCAGCATCTCTAT	1200
Aureolisina	GCATTAAACGAAASCTTYTCWG	GTATGCAGCTTTATTTGGWATACC	247
Hemolisina	ATGAATATTGGAATAACTTTAGTCAG	TTAGGAAGCATACAATTGATGT	600
Proteína extracelular	ACGTGAGCAATATATGAACGC	TTATAAATACCTGTTAATGCGCC	133
Metaloproteasa de zinc	ATTTGCAATCGGGATGG	ATGTTGATCATCTAAAATAATATGCG	250
Proteína de superficie SasH	GGCWAAAGCRATGAATGC	ACCGATAATKCCRTAACG	201
Proteína de transducción de señal TRAP	AACTCTATATCACTTATGGAACATATGG	CTGTTCAACATTTTGCTGTTG	529
Antígeno B	CAAAAACACTATTAGCGACTGG	CTTTTATGACGATGGAGTTTCC	488
Factor de virulencia B	ATGTCTTTTAAAGAAAATGAAATCG	TATGCATGATTTTCACTGTGC	905
Proteína FemA	GTGTGCTTRTACCWYTAGC	CCAGCATAATAAACWASTTC	250

**CUADRO 2: INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR EL
NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TANDEM (VNTR) DE LOS
AISLADOS DE *S. chromogenes***

VNTR	FORWARD (5´-3´)	REVERSE (5´-3´)	TAMAÑO (pb)
266_07	ATTCTGGATTTTGCACAGC	ATCTGCTAAAATGACAGAATTACAAC	266
346_06	CAAACAACGATATCTGTATCTGA	TGTCGGTTTATTAGGTTGAGAAG	346
360_06	CAAGTGCATAACCGTTATTCC	TGTCTGATGTCGGTTTATTAGG	360
854_08	GAAGCACTTACACTTTCGGAG	GACTTCACTAAGTGAGTCAACAAGTAC	854
638_07	TGAGGTCTCCGCTGTAGG	GCAGACGTCCCTGTTGAG	638
613_12	AGTAGCTAACCATTTTGTTAATTGC	GTAAAGAAAATTCTTCACAGTCG	613

**CUADRO 3: INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR EL cDNA
DE INTERLEUCINAS**

PRIMER	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')	TAMAÑO (pb)
IL-1β	TGCAGCTGGAGGAAGTAGACC	GTACAGGACAGACTCAAATTCAACTG	112
IL-4	GACGTCTTTGCTGCCCC	CCTGTCAAGTCCGCCCA	122
IL-8	AGTACAGAACTTCGATGCCAATG	GTAAGCTTAACAATGATTTCTGAATTTTC	127
IL-10	GCGAAAACAAGAGCAAGGC	GCTTCAGTTTTRCATCTTCGTTGTC	115
IL-12	CTCAGCAGTTGGTCGTTTCC	ACATAAACATTTTTCTCCAGTTCCC	87
IFN-γ	CATCTACTCRCAGGTCCTCTTC	GCAATGCGGCTGATGGT	120
TGF-β	TTA CAA CAG TAC CCG CGA CC	ATT TTGTTGCCGTATTCCACC	110

CUADRO 4: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS CON EL SISTEMA API STAPH Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A QUIMIOTERAPÉUTICOS POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *S. chromogenes*

CEPA	ORIGEN	CABRA	GRANJA	SISTEMA DE PRODUCCIÓN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Guanajuato	A	1	Extensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	S	S	S	S
2	Guanajuato	B	1	Extensivo	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	S	S	S	S
3	Guanajuato	C	1	Extensivo	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	S	S	S	S
4	Guanajuato	D	1	Extensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
5	Guanajuato	E	1	Extensivo	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S
6	Guanajuato	F	1	Extensivo	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	S	R	S	S	S
7	Querétaro	G-105R	2	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
8	Querétaro	H-105R	2	Intensivo	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
9	Querétaro	G-60L	2	Intensivo	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	S	S	S	S	S
10	Querétaro	G-150R	2	Intensivo	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	S	S	S	S	S
11	Querétaro	I-15R	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S
12	Querétaro	J-15R	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S
13	Querétaro	K-15L	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S
14	Querétaro	J-60R	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
15	Querétaro	K-15L1	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S
16	Querétaro	K-15L2	3	Intensivo	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	R	R	S	S	S
17	Querétaro	K-15R3	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	S	R	S	S	S
18	Querétaro	L-15R	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	I	R	S	S	S
19	Querétaro	J-195R	3	Intensivo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	I	R	S	S	S
20	Querétaro	M-15L	3	Mixto	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	R	R	S	S	S
21	Querétaro	N-60R	3	Mixto	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	S	R	S	S	S

CEPA	ORIGEN	CABRA	GRANJA	SISTEMA DE PRODUCCIÓN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
					22	Querétaro	O-150L	3	Mixto	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
23	Querétaro	O-150R	3	Mixto	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	R	R	S	S	S

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *S. chromogenes* fueron las siguientes: 1. Glucosa; 2. Fructosa; 3. Manosa; 4. Maltosa; 5. Lactosa; 6. Trehalosa; 7. Manitol; 8. Xilitol; 9. Melobiosa; 10. Nitratos; 11. Fosfatasa alcalina; 12. Voges-Proskauer; 13. Rafinosa; 14. Xylosa; 15. Sacarosa; 16. Metil-Gluco-Pyranosidasa; 17. N-Acetyl-Glucosa; 18. Arginina dihidrolasa; 19. Urea; 20. Polimixina B; 21. Ampicilina; 22. Gentamicina; 23. Tobramicina y 24. Tetraciclina.

CUADRO 5: GENES IDENTIFICADOS EN LOS AISLADOS DE *Staphylococcus coagulasa* negativo

GEN	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>		<i>S. xylosus</i>		<i>S. sciuri</i>		<i>S. warneri</i>	
	+/total	%	+/total	%	+/total	%	+/total	%	+/total	%
Aureolisina	23/23	100	5/18	27.78	4/9	44.44	2/2	100	0/1	0
Hemolisina	23/23	100	2/18	11.11	0/9	0	0/2	0	0/1	0
Proteína extracelular	23/23	100	18/18	100	9/9	100	2/2	100	1/1	100
Metaloproteasa de zinc	23/23	100	18/18	100	9/9	100	2/2	100	1/1	100
Proteína de superficie SasH	23/23	100	18/18	100	6/9	66.67	2/2	100	0/1	0
Proteína de transducción de señal TRAP	23/23	100	3/18	16.67	3/9	33.33	2/2	100	0/1	0
Antígeno B	23/23	100	2/18	11.11	0/9	0	0/2	0	0/1	0
Factor de virulencia B	22/23	95.65	0/18	0	3/9	33.33	2/2	100	1/1	100
Proteína FemA	23/23	100	18/18	100	9/9	100	2/2	100	0/1	0

**CUADRO 6: NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TANDEM (VNTR) DETECTADOS
POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN LOS AISLADOS DE *S. chromogenes***

No. AISLADO	ID	ESTADO	GRANJA	SISTEMA DE PRODUCCIÓN	266_07 (36 pb)	VNTR	346_06 (15 pb)	VNTR	360_06 (30 pb)	VNTR	854_08 (96 pb)	VNTR
1	A	Guanajuato	1	Extensivo	955	27	1092	73	1187	40	1101	11
2	B	Guanajuato	1	Extensivo	955	27	1166	78	1156	39	301	3
3	C	Guanajuato	1	Extensivo	963	27	1153	77	1183	39	1101	11
4	D	Guanajuato	1	Extensivo	953	26	1161	77	1181	39	1077	11
5	E	Guanajuato	1	Extensivo	952	26	1159	77	1181	39	1210	13
6	F	Guanajuato	1	Extensivo	936	26	1164	78	1175	39	1201	13
7	G-105R	Querétaro	2	Intensivo	453	13	1181	79	1175	39	329	3
8	H-105R	Querétaro	2	Intensivo	453	13	1177	78	1177	39	329	3
9	G-60L	Querétaro	2	Intensivo	1075	30	1176	78	1176	39	1221	13
10	G-150R	Querétaro	2	Intensivo	1080	30	1178	79	1182	39	1229	13
11	I-15R	Querétaro	3	Intensivo	384	11	1155	77	1176	39	329	3
12	J-15R	Querétaro	3	Intensivo	383	11	1157	77	1178	39	329	3
13	K-15L	Querétaro	3	Intensivo	385	11	1156	77	1172	39	329	3
14	J-60R	Querétaro	3	Intensivo	382	11	1164	78	1181	39	204	2
15	K-15L1	Querétaro	3	Intensivo	382	11	1150	77	1181	39	329	3
16	K-15L2	Querétaro	3	Intensivo	382	11	1155	77	1183	39	330	3
17	K-15R3	Querétaro	3	Intensivo	385	11	1178	79	1181	39	329	3
18	L-15R	Querétaro	3	Intensivo	989	27	1158	77	1181	39	329	3
19	J-195R	Querétaro	3	Intensivo	384	11	1156	77	1178	39	329	3
20	M-15L	Querétaro	3	Mixto	383	11	1168	78	1186	40	328	3
21	N-60R	Querétaro	3	Mixto	386	11	1163	78	1186	40	205	2
22	O-150L	Querétaro	3	Mixto	872	24	1192	79	1185	40	329	3
23	O-150R	Querétaro	3	Mixto	0	0	1187	79	1186	40	329	3

CUADRO 7: ÍNDICES DE DIVERSIDAD (SIMPSON, HUNTER-GASTON) E INTERVALOS DE CONFIANZA PARA CADA LOCI DEL NÚMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TÁNDEM (VNTR) UTILIZADOS PARA *S. chromogenes*

LOCUS	TAMAÑO (pb)	ÍNDICE DE SIMPSON	INTERVALO DE CONFIANZA 95%	ÍNDICE DE HUNTER-GASTON	INTERVALO DE CONFIANZA 95%
266_07	36	0.87	0.803-0.936	0.909	0.843-0.975
346_06	15	0.926	0.896-0.957	0.968	0.938-0,999
360_06	30	0.756	0.650-0.862	0.791	0.684-0.897
854_08	96	0.654	0.449-0.859	0.684	0.479-0.888

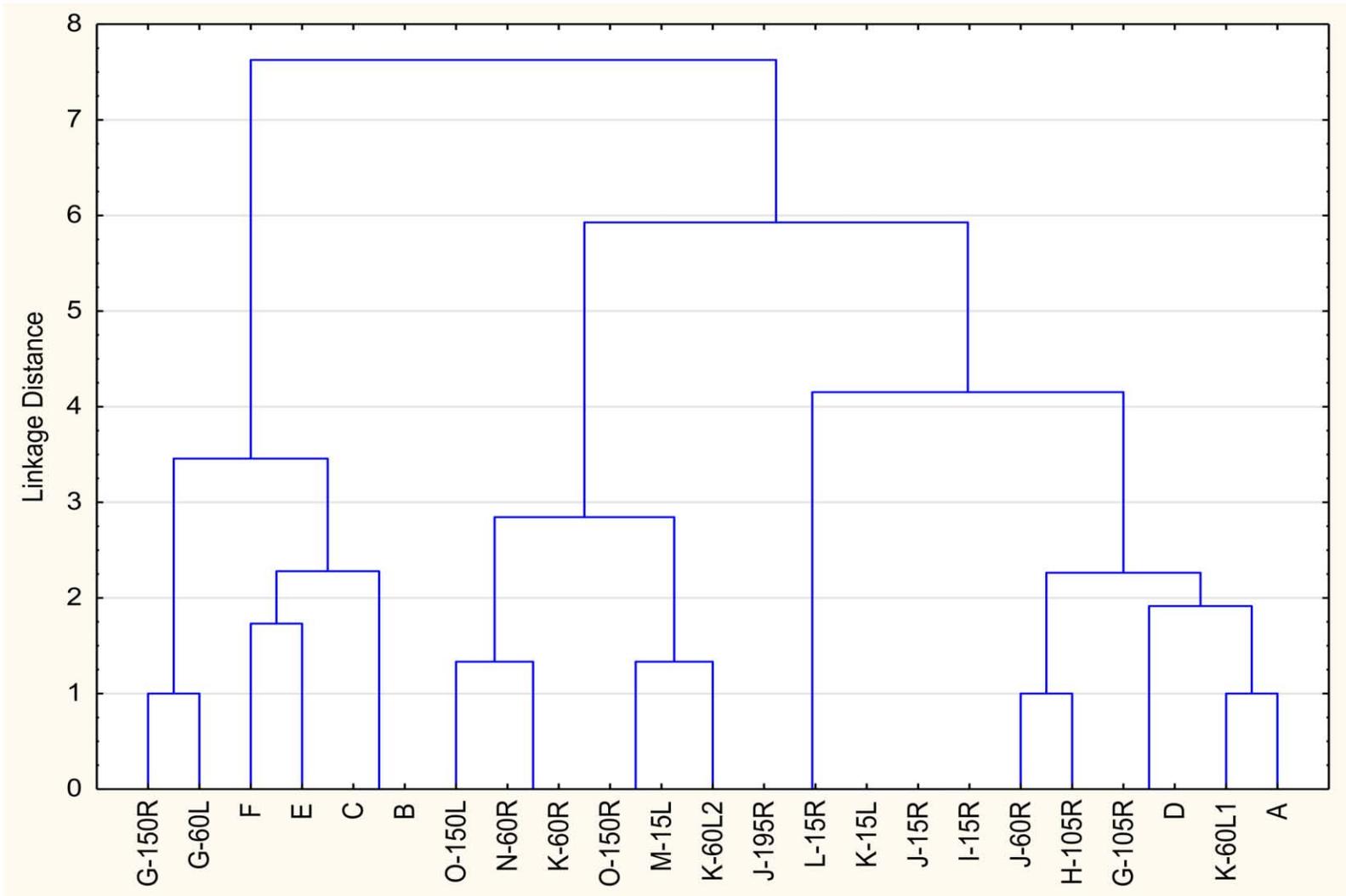


Figura 1: Análisis de conglomerados de acuerdo a las características fenotípicas y pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticas de los 23 aislados de *S. chromogenes*.

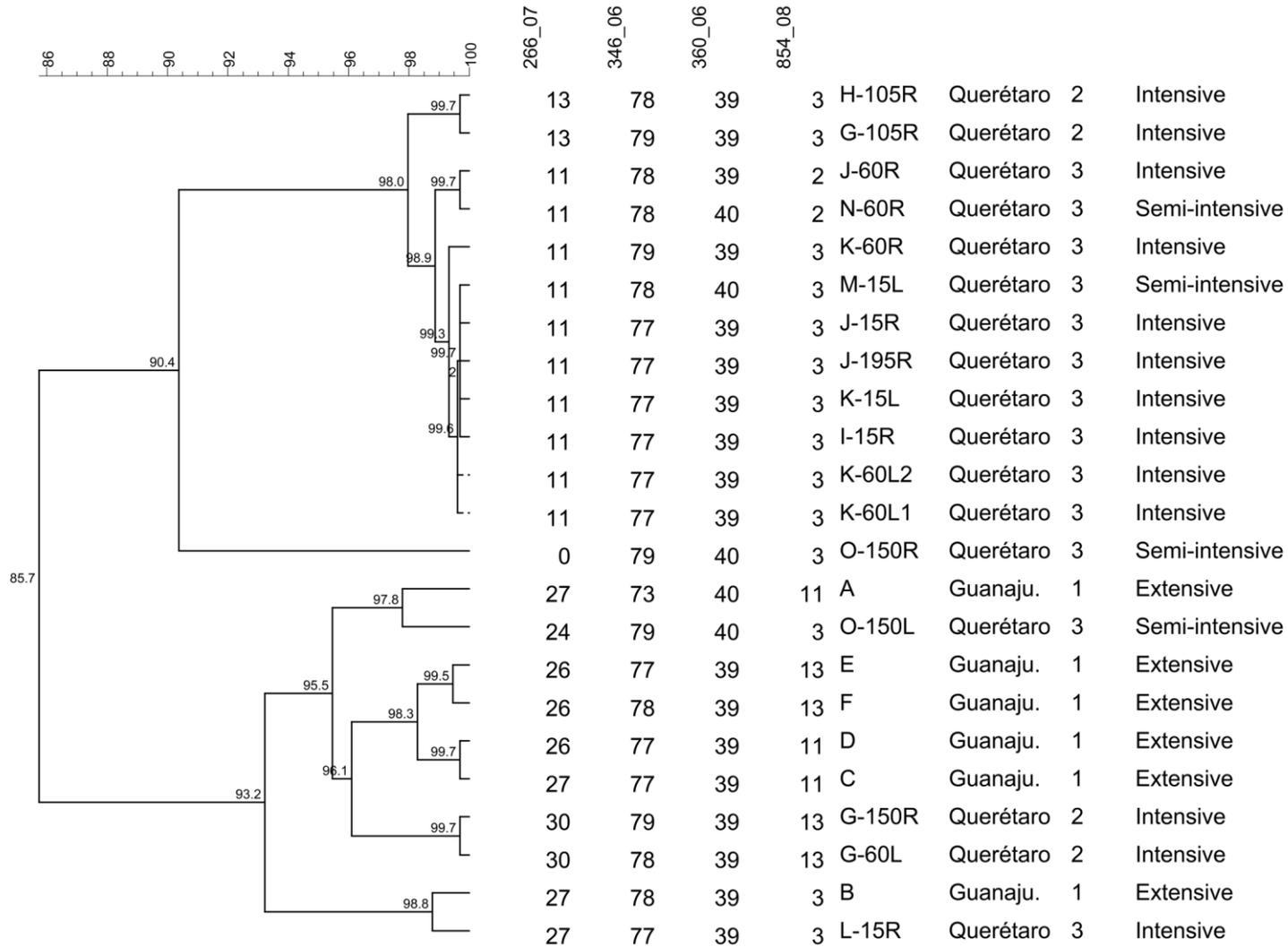
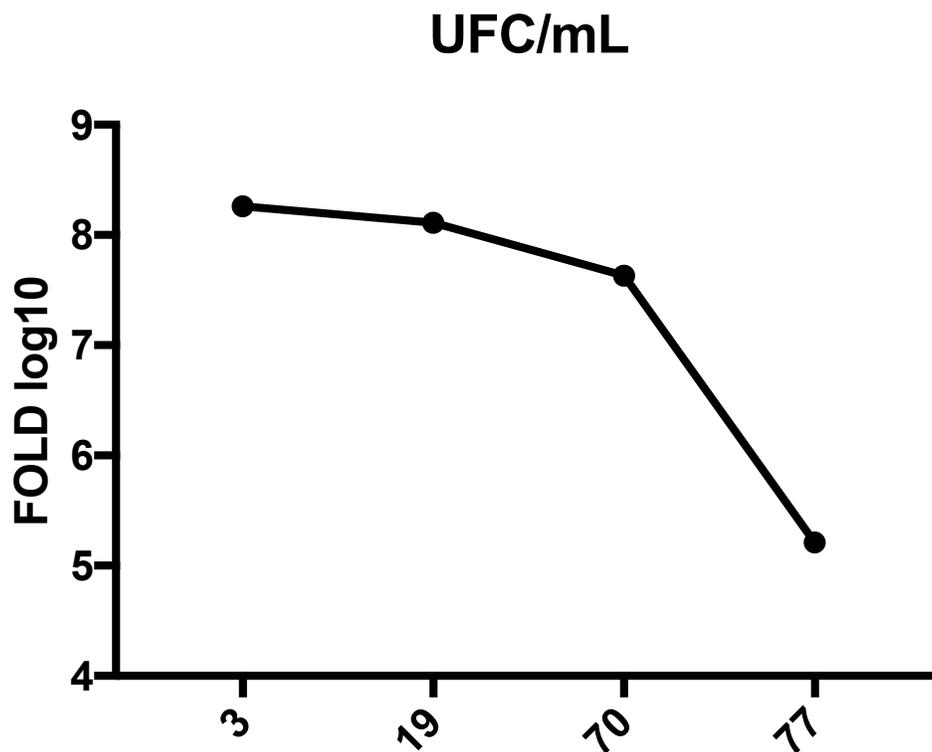


Figura 2: Análisis de conglomerados de acuerdo al VNTR de los 23 aislados de *S. chromogenes* utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (UPGMA).



DIA POST-INFECCIÓN	UFC	UFCLOG10/ML
3	1.81×10^8	8.26
19	1.29×10^8	8.11
70	4.24×10^7	7.63
77	1.62×10^5	5.21

Figura 3. Conteo bacteriano durante los muestreos post-infección con *S. chromogenes*, utilizando el gen de la proteína extracelular.

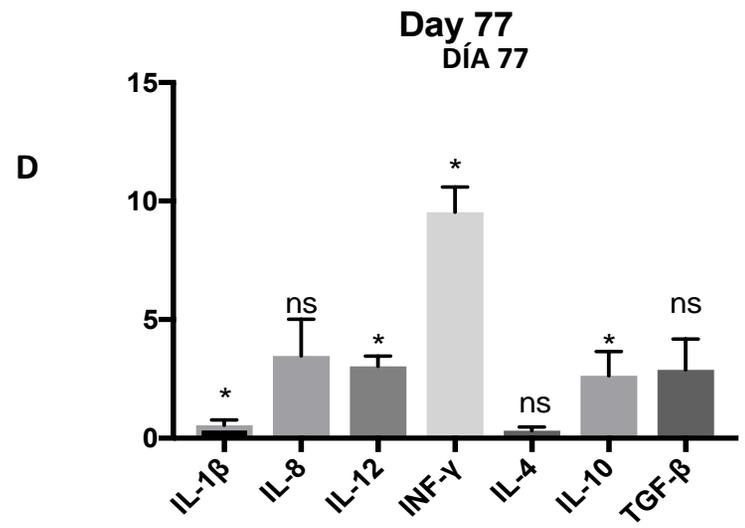
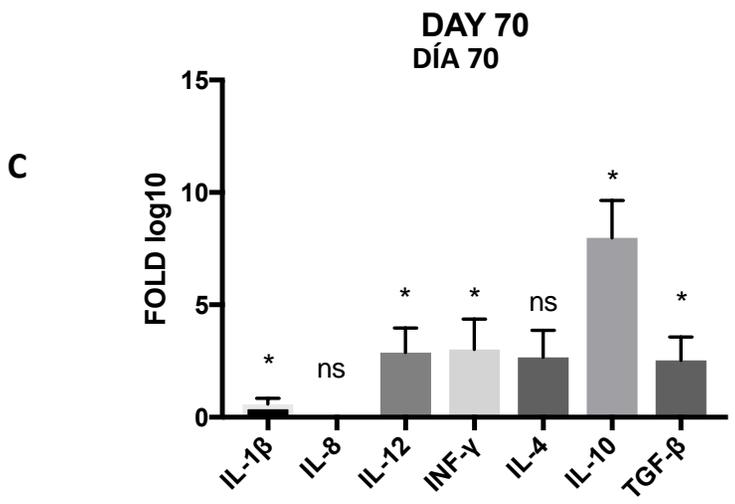
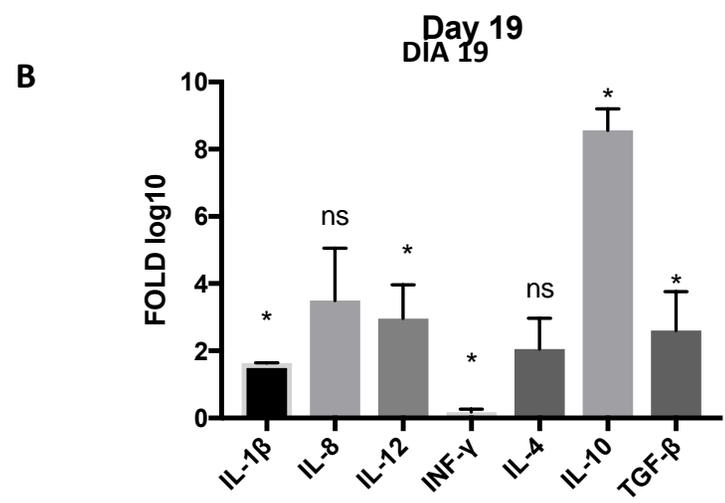
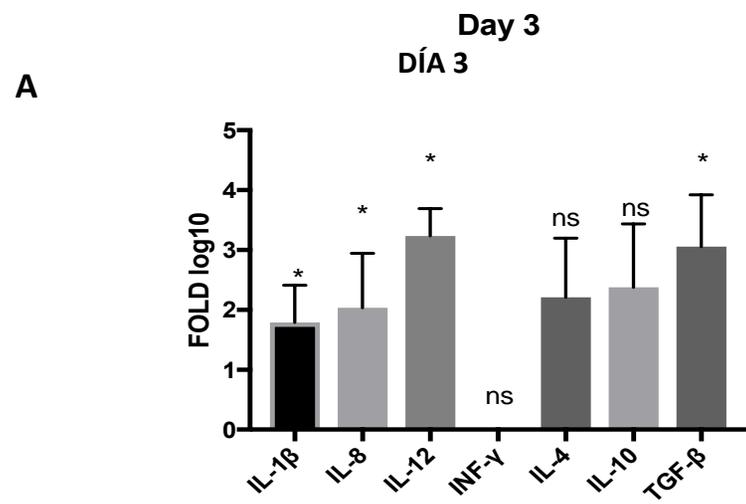


Figura 4: Diferencia en el número de transcritos de ARNm del grupo infectado con respecto al grupo control en distintos días de muestreo post-infección. NS no significativo, $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

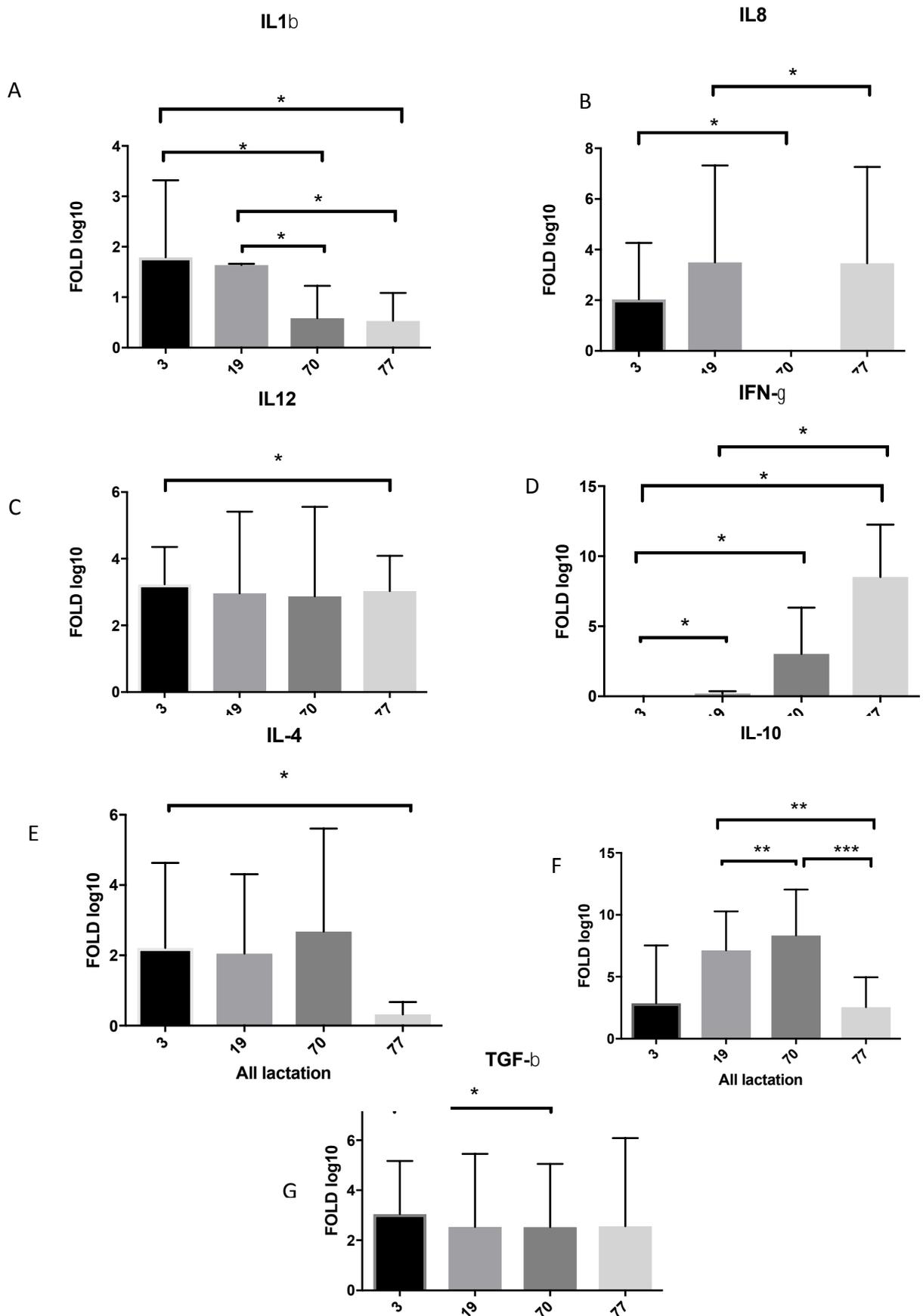


Figura 5: Diferencia en el número de transcritos de **IL-1b**, **IL-8**, **IL-12**, **IFN-g**, **IL-4**, **IL-10** y **TGF-b** en los distintos días de muestreo post-infección en el grupo infectado. NS no significativo, $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

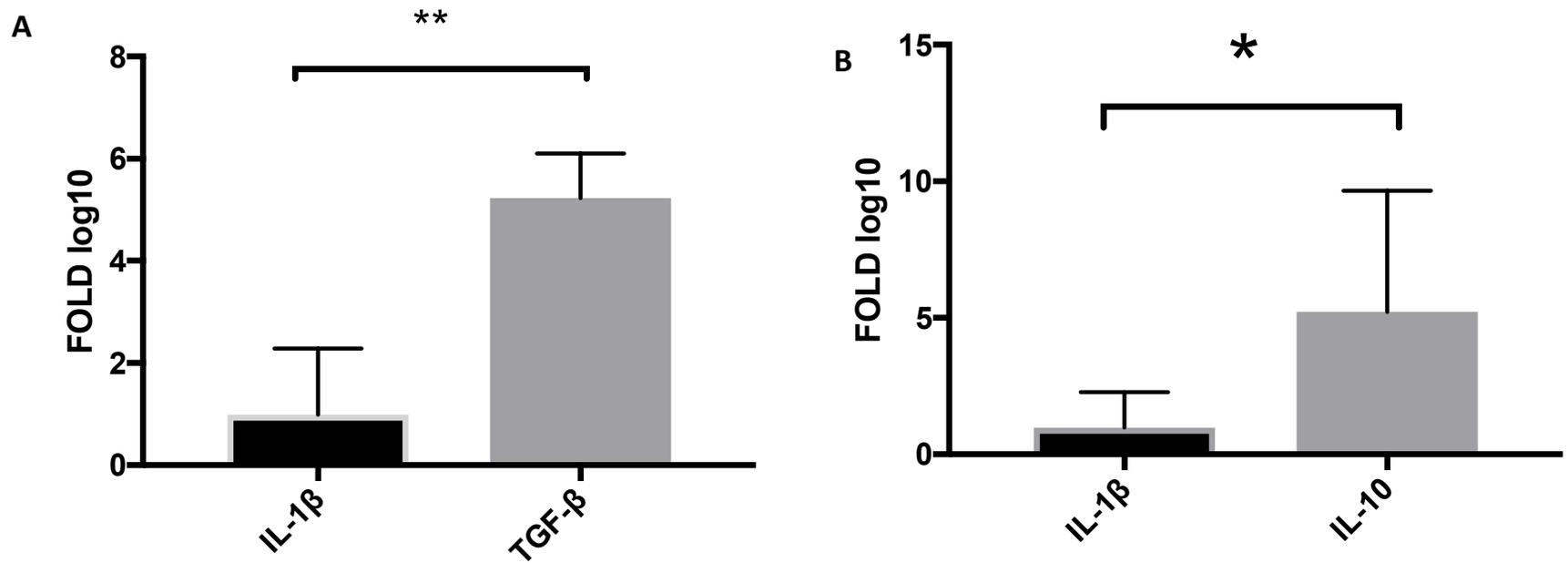


Figura 6: Diferencia en el número de transcritos de ARNm durante toda la lactación entre A) IL-1 β y TGF- β y B) IL-1 β e IL10. NS no significativo, P>0.05, * P<0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001

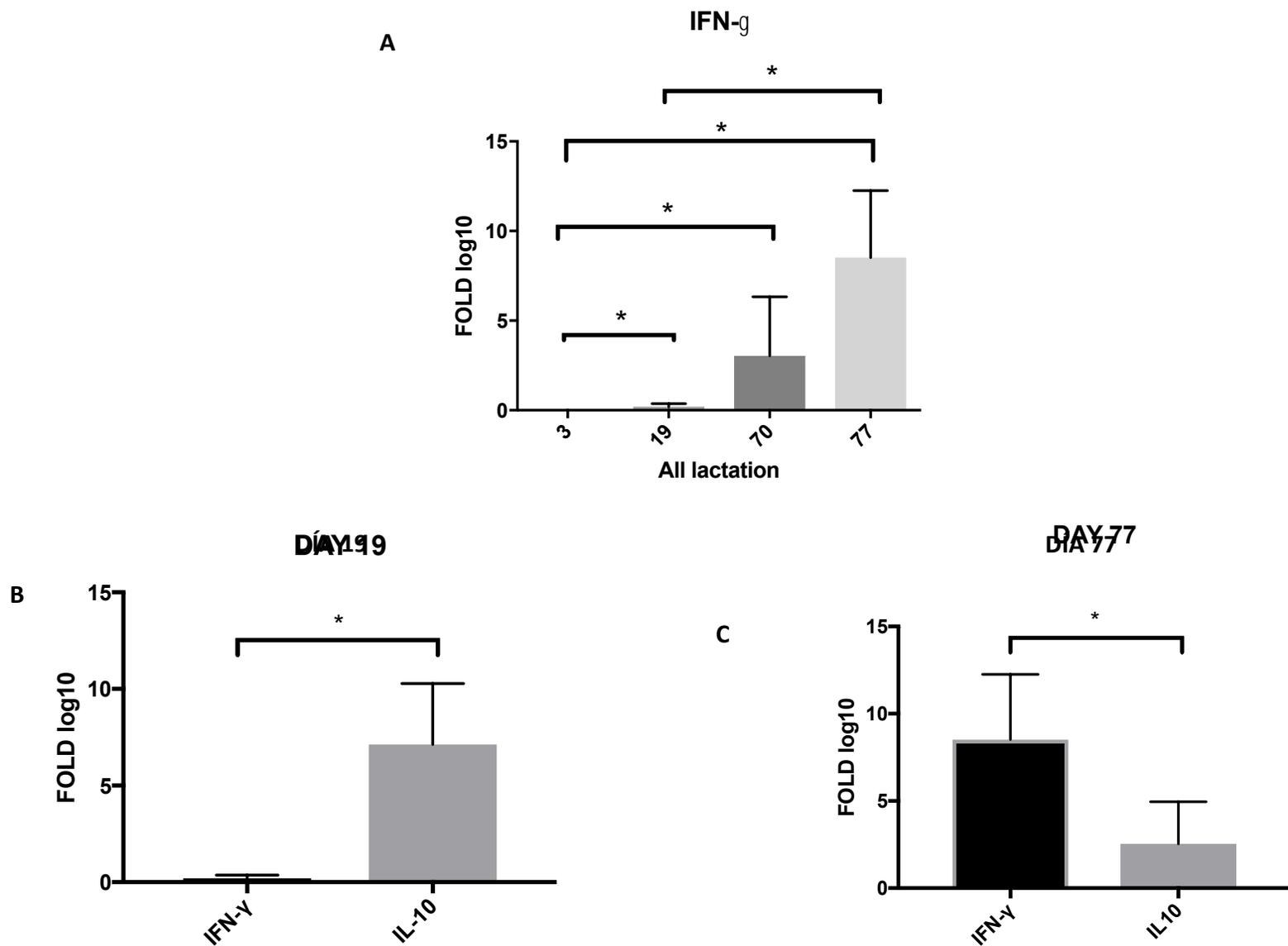


Figura 7: Diferencia en el número de transcritos de ARNm A) IFN- γ , B) IFN- γ e IL10 en el día 19 y C) IFN- γ e IL10 en el día 77. NS no significativo, $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

APÉNDICE DE SOLUCIONES

1. TRIS tris(hidroximetil)aminometano

- a) Disolver 121.14 g de Tris en 800 mL de agua destilada.
- b) Ajuster el pH a 7 con HCL, aforar a 1 L con agua destilada.
- c) Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

2. EDTA (ÁCIDO ETILEN-DIAMINO-TETRA-ACÉTICO)

- a) Disolver 186.1 g de EDTA en 800 mL de agua destilada.
- b) Ajustar al pH deseado con perlas de NaOH.
- c) Esterilizar en autoclave y almacenar en temperatura ambiente.

3. PBS (SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA POR FOSFATOS) 10X

- a) Disolver 87.7 g de cloruro de sodio con 1.5 g de fosfato de sodio monobásico y 13 g de fosfato de sodio dibásico en 800 mL de agua destilada y aforar a 1000 mL.

4. PBS 1X

- a) Disolver 100 mL de PBS 10X y aforar a 1000 mL con agua destilada.

5. BUFFER 1X Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X

- a) Disolver 242.28 g de tris base con 57.1 mL de ácido acético glacial en 100 mL de EDTA 0.5 M (pH 8).
- b) La solución de trabajo 1X se obtuvo diluyendo 20 mL de TAE 50X en 980 mL de agua destilada.

EXTRACCIÓN DE ADN

I.BUFFER DE LISIS

3 M isotiocianato de guanidina

20 mM EDTA

10 mM Tris-HCL (pH 6.8)

40 mg/ml Tritón 100

10 mg/mL DL-ditiotreitol

II.SOLUCIÓN DE UNIÓN

40 mg/mL silica suspendida en buffer de lisis.

III.SOLUCIÓN DE LAVADO

25% etanol absoluto

25 % isopropanol

100' mM NaCL

10 mM Tris-HCL pH 8

IV.BUFFER DE ELUSIÓN

10 mM Tris-HCL pH 8

1 mM EDTA

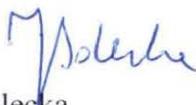
Warsaw, 28th of November 2017

Polish Journal of Microbiology
Warsaw 00-791, 24 Chocimska Str

Dear Dr. Daniel Martínez Gómez

I would like to confirm that your manuscript "**Genetic Analysis Method for *Staphylococcus chromogenes* Associated with Goat Mastitis**" was accepted on the 4th of October 2017 for the publication in PJM. It will be published in volume 67(1) of the next year.

Sincerely,



Jolanta Solecka
Editor in Chief PJM

Genetic Analysis Method for *Staphylococcus chromogenes* Associated with Goat

Mastitis.

ROCÍO A. RUIZ-ROMERO¹, ROBERTO A. CERVANTES-OLIVARES², ANDRÉS E. DUCOING-WATTY³, DANIEL MARTÍNEZ-GÓMEZ⁴, EFRÉN DÍAZ-APARICIO⁵ AND ESTELA T. MÉNDEZ-OLVERA⁶

¹ Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México. rarr2212@unam.mx

² Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México. raco@unam.mx

³ Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México. ducoing@unam.mx

⁴ Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, México. dmartinez@correo.xoc.uam.mx.

⁵ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria- Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. diaz.efren@inifap.gob.mx

⁶ Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, México. etmendez@correo.xoc.uam.mx

***Staphylococcus chromogenes* Genotyping Method**

Corresponding author:

DANIEL MARTÍNEZ-GÓMEZ

Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del hueso 1100, Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México, Telephone 52(55) 54 83 7000 ext.3060, fax number 52 (55) 54837238. Email: dmartin@correo.xoc.uam.mx

Abstract

Mastitis in goats is mainly caused by coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS). The identification methods for this group are based on evaluating the expression of phenotypic characteristics such as the ability to metabolize various substrates; however, this is disadvantageous, as these methods are dependent on gene expression. In recent years, genotyping methods such as the Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) and gene identification have been useful for epidemiological study of several bacterial species. To develop a genotyping method, the genome sequence of *Staphylococcus chromogenes* MU970 was analysed. The analysis showed nine virulence genes described in *Staphylococcus aureus*. The MLVA was developed using four loci identified in the genome of *S. chromogenes* MU970. This genotyping method was examined in 23 strains of CNS isolated from goat mastitis. The rate of discrimination for MLVA was 0.8893, and the highest rates of discrimination per the index of Simpson and Hunter-Gaston were 0.926 and 0.968 for the locus 346_06, respectively. The virulence genes were present in all strains of *S. chromogenes* but not in other CNS. *The genotyping method presented in this paper is a viable and easy method for typifying CNS isolates from mastitis cases in different regions and is an ideal means of tracking this disease.*

Key words:

Genotyping, Mastitis in Goats, MLVA, *Staphylococcus chromogenes*, VNTR.

Introduction

Goat mastitis is primarily caused by CNS. CNS are classified into 47 species and 23 subspecies (Becker *et al.*, 2014), and in mastitis cases, more than 10 CNS species have been isolated (Taponen and Pyörälä, 2009; Zadocks and Watts, 2009). The CNS represent a heterogeneous group within the *Staphylococcus* genus, and the identification methods for this group evaluate the expression of genetically encoded characteristics, such as enzyme production (Stepanovick *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2014; Vanderhaeghem *et al.*, 2015). One disadvantage of the phenotypic identification method is the expression variability of phenotypic characteristics between isolates of the same species, and because of this, genotypic identification methods have been developed (Monir *et al.*, 2007). These methods are based on the genetic material analysis of the organism; therefore, they are independent of changes in the gene expression pattern. Molecular methods represent a more stable and reproducible alternative and provide useful information about the genetic connections between isolates from different sources, allowing epidemiological monitoring of disease outbreaks (Hollender *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Genotyping bacteria by typing their loci containing a variable number of tandem repeats (VNTR) may become the gold standard for many pathogens (Ramisee *et al.*, 2004; Vergnaud and Pourcel, 2009). Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA) is a DNA-based molecular typing method frequently used in the study of prokaryotes. It records size polymorphisms in several VNTR loci amplified by stringent PCR protocols (Le Fleche *et al.*, 2001). MLVA is useful in epidemiology because it replaces older, slower and dangerous methodologies (phenotypic identification methods require handling live pathogenic bacteria) for typing microorganisms. VNTRs are a powerful tool for determining evolutionary relationships and population genetics of bacteria (Hardy *et al.*,

2004). The development of genome sequencing has shown that VNTR sequences are present in many bacterial species and that polymorphism exists in most of them. These repetitions have become a source for locating markers to identify pathogenic bacteria (Vergnaud and Pourcel, 2009). In *S. aureus*, MLVA is useful for strain typing. An MLVA analysis of 130 strains isolated from raw-milk dairy products (122 isolates) and human samples (eight isolates) revealed marked genomic variability among the samples. In this study, the MLVA technique correctly assigned isolates from outbreaks and discriminated isolates that were not from outbreaks (Ikawaty *et al.*, 2008). In this study, we developed an MLVA for *S. chromogenes* using the *S. chromogenes* MU970 genome sequence (NCBI Reference Sequence: NZ_JMJF00000000.1). This genotyping method included nine virulence genes previously described in other *Staphylococcus* spp.

Experimental

Materials and Methods

Bacterial isolates.

Fifty-three *Staphylococcus* strains were isolated from the milk of both healthy goats and goats with subclinical mastitis from farms in Queretaro and Guanajuato, Mexico. To isolate the strains, the milk was plated on trypticase soy agar and incubated at 37°C for 24 hours. The microorganisms were Gram-stained and catalase tested to identify the *Staphylococcus* isolates. Coagulase tests were performed to identify coagulase-negative *Staphylococcus*, using the API Staph® (V4.1) Biomerieux laboratory system per the manufacturer's instructions. A chemotherapeutic susceptibility test was conducted on all isolates identified as *S. chromogenes* using the Kirby-Bauer technique (Bernal and Guzman 1984) with

antimicrobial susceptibility disks (polymyxin B, ampicillin, tobramycin, gentamicin and tetracyclines).^Ψ

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR).

DNA extraction from the 53 bacterial isolates was made as per the protocol described by Cremonesi *et al.* (2006). DNA concentration was obtained by spectrophotometry^ε. To identify the *Staphylococcus* genus, primers designed by Mason *et al.* (2001) were used. To identify the isolates within the CNS group, we used a pair of primers corresponding to the *coa* gene of *S. aureus*. This primer amplifies a 1200-bp fragment from these genes (Ruiz *et al.*, 2013). DNA from *S. chromogenes* ATCC® 43764 TM and *S. aureus* ATCC® 29737 TM were used to validate the PCR test (PCR Master Mix, Fermentas)^β. The thermocycler conditions were specific for each primer. The PCR products, were analysed by electrophoresis on 1% agarose gel using TAE 1X as the running solution. To identify the virulence genes in *S. chromogenes*, nine pairs of primers were designed to amplify different proteins defined as virulence factors in *S. aureus*. Primer design was performed by obtaining the amino acid sequence of the aim genes, using the BLAST database (Basic Local Alignment Search Tool) from the NCBI (National Center of Biotechnology Information)[¥] for verifying the sequence homology. We then located the amino acid sequence within the genome, and the primers were designed using the DNAMAN program (Lynnon Corporate) version 7.02 for Windows (Table I).

MLVA.

The *S. chromogenes* MU970 strain genome was analysed to locate the tandem repetitions using the Tandem Repeats Finder Program (Benson, 1999). The primers of the loci flanking

^Ψ BD Becton-Dickinson and Company

^ε BIORAD SmartSpec-Plus Spectrophotometer.

[¥] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

regions from the tandem repetitions were designed using the DNAMAN v. 7.02 program. Six loci of 15- to 96-bp were selected from the tandem repetitions, with the number of copies ranging from 7 to 23, to observe the amplifications on an agarose gel. Tandem repetitions were named according to the genome where they were found and the size of the expected product in the *S. chromogenes* MU970 strain (Table II). MLVA analysis was performed with all *S. chromogenes* isolates. The PCR products of the repeated sequences were analysed with the fragment QIAxcel DNA High Resolution Kit^δ analyser, following the manufacturer's instructions. The size of each VNTR was determined using a molecular weight marker of 100- to 3000-bp.

Data Analysis.

The size of each amplicon was determined using the molecular weight marker of 3000-bp, and the repetition number of each allele was derived from the size of the obtained amplicon. For each VNTR locus, we calculated the diversity indexes of Simpson and Hunter-Gaston (1988) with confidence intervals of 95%, using the VNTR Diversity and Confidences Extraction Software program (V-DICE), from the Health Protection Agency website (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>). The MLVA discrimination power was calculated using the Discriminator Power Calculator program (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php). The 23 *S. chromogenes* isolates were grouped by their phenotypic characteristics through a cluster analysis, using the Euclidean distance and the Ward minimum variance method with the DELL STATISTICA (Data Analysis Software System) program. The cluster analysis of the *S. chromogenes* genogroups was performed with the BioNumerics software version 7.6.1

^δ QIAGEN México S. DE R.L. DE C.V. CP 01090, México City. Catalogue number 929002

(Applied Maths, St-Martens-Latern, Belgium) using the Pearson correlation coefficient and the pair grouping method with an unweighted arithmetic mean (UPGMA).

Results

Bacterial Identification.

The 53 bacterial isolates were Gram-positive cocci and were grouped in clusters of catalase positive and coagulase negative using a macroscopic morphology characteristic of the genus. From the results of the API system Staph®, 23 isolates corresponded to *S. chromogenes*, 18 to *S. simulans*, 9 to *S. xylosus*, 2 to *S. sciuri*, and 1 to *S. warneri*. These results, as well as the results of the chemotherapeutic susceptibility test for the isolates identified as *S. chromogenes*, are shown in Table III.

Molecular identification.

PCR was standardized for the detection of the 16s *Staphylococcus* region and for the *coa* gene from *S. aureus* to confirm the expected size of each product using DNA from the ATCC strains at concentrations of 100 ng/μl. The 53 isolates were positive for the 16s gene and negative for the *coa* gene. The *S. chromogenes* isolates were positive for all virulence genes, except for the gene encoding the *virulence B factor*, in which only 95.65% of the isolates were positive. All *S. simulans* isolates were positive for the genes encoding the *extracellular protein*, *zinc metalloprotease*, *SasH* and *FemA*, and 27.78% were positive for the *aureolysin* gene, 16.67% for the *TRAP* gene and 11.11% for *haemolysin* and *B antigen*. In addition, all of these were negative for the *virulence B factor*. All *S. xylosus* isolates were positive for the *extracellular protein* genes, *zinc metalloprotease* and *FemA*. Of these, 66.67% were positive for *SasH*, 44.44% for *aureolysin*, 33.33% for *SasH* and for the *virulence B factor*; however, none of these isolates were positive for the *B antigen*. All *S. sciuri* isolates were positive for all virulence genes except *haemolysin* and the *B antigen*,

for which none of the isolates were positive. Finally, the *S. warneri* isolate was positive for the *extracellular protein*, *zinc metalloprotease* and the *virulence B factor* and was negative for the rest of the virulence genes. (Table IV)

Phenotypic characteristics.

To determine the variability of the 23 *S. chromogenes* isolates from the different biochemical tests and the chemotherapy susceptibility test, a dendrogram was constructed showing three clusters from the 23 *S. chromogenes* isolates. The first cluster contains six isolates, divided into two subgroups. In the first subgroup, there are two isolates from farm number 2, which has an intensive production system, and four isolates from farm number 1, which has an extensive production system. This group is characterized for being maltose-negative, having a variable N-acetyl-glucose response, and being sensitive to the five antibiotics that were used. The second cluster has six isolates from farm number 3, which are divided into two subgroups. In this cluster, the isolates are maltose-positive, N-acetyl-glucose-negative, and polymyxin B and ampicillin-resistant. The third cluster has one subgroup with two isolates from farm number 1, two isolates from farm number 2 and five isolates from farm number 3, which has an intensive production system. This cluster is characterized as being maltose-positive, N-acetyl-glucosamine-positive and polymyxin B and ampicillin-resistant. In the principal component analysis, the *S. chromogenes* isolates are further grouped according to cluster analysis. (Figures 1)

MLVA.

The *S. chromogenes* isolates were used to perform the MLVA, and 63 VNTR loci were identified in the genome of *S. chromogenes* MU970. Six were used in the *S. chromogenes* isolates, and the amplification of four loci was achieved in the 23 isolates (Table V). From the VNTR, the 23 isolates were grouped using the Unweighted Pair Group Method with

Arithmetic Mean (UPGMA) and the Pearson correlation coefficient. An 85.7% similarity was obtained for the 23 isolates, which were then grouped in ten genogroups and divided into two larger groups. Per the MLVA results, the six Guanajuato isolates are grouped with four isolates from Queretaro with a 93.2% similarity, while the 13 remaining isolates from Queretaro are grouped with a 90.4% similarity. (Figure 2) The discrimination ability of the MLVA was determined using the discrimination index (D) for the 23 isolates, which showed a discrimination level with a D value of 0.8893. The discrimination power of each VNTR was estimated from the number of alleles detected and their diversity. The highest diversity rates using the Simpson and Hunter-Gaston index were 0.926 and 0.968, respectively, for the 346_06 locus, whereas the lowest diversity indexes were from the 854_08 locus with rates of 0.654 and 0.684, respectively. (Table VI)

Discussion

The *Staphylococcus* genus is commonly isolated from mastitis cases in ruminants. Subclinical mastitis in goats is primarily caused by coagulase-negative *Staphylococcus*, which is considered a minor and opportunistic pathogen (Bergonier *et al.*, 2003; Vlieghe *et al.*, 2004; Schukken *et al.*, 2009; Taponen and Pyörala, 2009). This group can cause mastitis due to its many virulence factors, both in human and animal isolates. Some of these virulence genes are shared with *S. aureus*, such as haemolysins, leucocidins, toxins, biofilm formation and adhesins (Pyörälä and Taponen, 2009; Taponen and Pyörala, 2009; Vergnaud and Pourcel, 2009; Park *et al.*, 2011; Supré *et al.*, 2011; Vanderhaeghem *et al.*, 2015). In this study, some of the virulence factors that are shared with *S. aureus* corresponded to *aureolysin*, an *extracellular metalloproteinase*, and the *SasH* protein. Although CNS species are less virulent than *S. aureus*, the different virulence factors in this group could influence their clinical features and the persistence of intramammary

infections, which should be regarded as pathogenic and not part of the normal microbiota (Haveri *et al.*, 2007; Schukken *et al.*; 2009; Taponen and Pyorala, 2009). We identified the isolates of *S. chromogenes* with *S. chromogenes* MU970 genes, which is presently the only reported sequence and was isolated from a bovine mastitis case in the United States. This type of CNS is the primary cause of subclinical mastitis in goats worldwide (Ruiz *et al.*, 2013). In this work, we detected adhesins, antigens associated with the cell wall and haemolysins, which are shared with other species of CNS. From these results and those in the literature, the presentation of the mammary gland disease and the resultant damage is influenced by the virulence factors that are present in the bacteria. Because there are no studies that focus on a single species in this group, it is important to know the virulence factors of CNS mastitis in ruminants to develop control measures and disease prevention (Schukken *et al.*, 2009; Sampaio *et al.*, 2015; Vanderhaeghem *et al.*, 2015). From the identification of these virulence genes in *S. chromogenes*, it is clear that the mastitis caused by this bacterium is significant; therefore, we developed the first specific MLVA for *S. chromogenes* isolates. Other studies used different genotyping methods that rarely focus on a particular species; for example, authors have standardized genotyping methods for *S. epidermidis* isolates from bovine milk and human skin using PFGE, where five patterns were obtained. One of these skin isolates showed a pattern common to animal milk, indicating that it may be zoonotic (transmitted from humans to animals) (Thordberg *et al.*, 2006) For *S. chromogenes*, Shimizu *et al.* (1997) reported genotypification by PFGE of 138 *S. hyicus* isolates from pigs, chickens, cows and goats, and 21 isolates of *S. chromogenes* obtained from pigs and dairy cows with mastitis. The patterns obtained for *S. hyicus* were different according to the animal's country of origin, whereas the *S. chromogenes* patterns were more conservative; however, the authors managed to differentiate them from the *S.*

hyicus isolates (Shimizu *et al.*, 1997). The MLVA presented here, could be used for molecular epidemiology studies on *S. chromogenes*, as well as other CNS species, since other species were identified in this work that were also isolated from subclinical mastitis cases in goats. Therefore, this analysis would be useful to examine CNS isolates from both animals and humans, in different geographic locations, in order to compare the genetic diversity within this group and standardize genotyping techniques. It is worth noting the importance of genotyping methods, as per the results of our cluster analysis that revealed three large clusters in which 2 clusters had isolates from Queretaro and Guanajuato, whereas the other cluster contained only isolates from Queretaro. The main disadvantage of these phenotypic identification methods is that they require determining biochemical and/or physiological characteristics. These phenotypic methods represent the first tool for comparing microorganisms and are an important tool for characterizing many pathogens; however, phenotypic traits are susceptible to environmental influence, which can cause variation in gene expression. Therefore, these results would be less stable, less reproducible and less discriminatory, making it difficult to determine whether the isolates have the same genetic pattern (Vilchez and Alonso, 2009). In this study, the MLVA classified the six isolates from Guanajuato within a cluster with four isolates from Queretaro, whereas the rest of the isolates from the two farms of Queretaro are grouped in a second cluster. In addition, isolates from the same goat were obtained on different lactation days, which indicates that the bacteria can survive for long periods of time in the mammary gland. In addition, isolates from different animals on the same farm belonged to the same genogroup, indicating that the isolates were from the same strain, and transmission was likely due to improper hygiene and/or management practices during milking. Furthermore, these results indicate that the genogroups of *S. chromogenes* differ based on geographical location since

the genotypic identification methods developed in this work can be used to classify closely related or divergent microorganisms. Thus, the knowledge derived from epidemiological studies can determine the natural history of a disease, its aetiology, occurrence frequency, distribution, pathways and spreading patterns, reservoirs and factors that increase the risk of contracting the disease (Vilchez and Alonso, 2009). The discrimination index of the *S. chromogenes* MLVA was 0.8893, indicating that this method is capable of distinguishing between different isolates, because a D value of 1 indicates that the genotyping method is able to distinguish each member of the population from any other member of the same population, while an index of 0 indicates that all members of the population are identical, and a 0.50 index indicates that if an isolate is chosen randomly, there is a 50% chance that the next isolate chosen will be indistinguishable from the first (Hunter and Gaston, 1988; Zaluga *et al.*, 2013). The highest discrimination rate pertained to the 346_06 locus, representing a viable option for genotyping the *S. chromogenes* isolates, since this locus present more variability. The MLVA has several advantages, such as the use of common and inexpensive laboratory equipment. One of the most important features of the MLVA is that analysing a limited number of loci can provide information about the diversity that exists within the species, which is crucial for typifying different bacteria (Vergnaud and Pourcel, 2009). Tandem repetitions are useful as molecular markers because they represent one of the most diverse genomic loci in bacterial populations. They are made of smaller sequences known as repetition units or motifs, which are repeated in tandem and vary in their number of repeated copies (Van Belkum *et al.*, 1998; Vogler *et al.*, 2006.). These repeated copies result from insertion mutations and/or deletions, so they can gain or lose several of these repetition units and create many alleles. It has been proposed that these mutations occur primarily due to a mismatch by strain landslides, but recombination events

also occur (Taylor et al., 2000; Vogler et al., 2006). Most VNTR do not have any phenotypic effects and generate neutral genetic variations, so they have not been associated with biological effects (Vogler et al., 2006). The speed of these repetition sequences remains unclear, so studies to determine the mutation rate would facilitate molecular epidemiologic investigations. In conclusion, the MLVA presented in this paper is an easy and viable method of typifying CNS isolates from mastitis cases from different regions and is an ideal option for tracking this disease.

Acknowledgements

This research was supported by grant IN2203143 from PAPIIT-UNAM.

Literature

Becker K., C. Heilmann, G. Peters. 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol. Rev.* 27: 870-925.

Benson G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids. Res.* 27: 573-580.

Bergonier D., R. De Cremoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34: 689-716.

Bernal M. and M. Guzmán. 1984. The Disc Antibigram. Standardization of the Kirby-Bauer technique (El Antibiograma de Discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer). *Biomédica.* 4: 112-121.

Cremonesi P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati, P. Moroni, S. Morandi, M. Luzzana. 2006. Improved method for rapid extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J. Dairy. Sci.* 89:168-169.

Fry P., M. Calcutt, M. Foecking, H. Hsieh, D. Suntrup, J. Perry, G. Stewart, J. Middleton. 2014. Draft genome sequence of a *Staphylococcus chromogenes* strain MU 970, isolated from a case of chronic bovine mastitis. *Genome Announc.* 2:e00835-14. doi:10.1128/genomeA.00835-14.

Hardy J., D. Ussery, B. Oppenheim, P. Hawkey. 2004. Distribution and characterization of staphylococcal interspersed repeat units (SIRUs) and potential use for strain differentiation. *Microbiol.* 150: 4045-4052.

Haveri M., A. Roslöf, L. Rantala, S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 103: 993-1000.

- Hollender D., S. Conde, E. Salustio, L. Samartino.** 2013. Detección de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 como fundador de aislamientos de *B. abortus* en argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 45: 229-239.
- Hunter P. and M. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems; an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466.
- Ikawaty R., J. Rob, T. Adrienne, J. Verhoef.** 2008. Novel multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis method for rapid molecular typing of human *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3147-3151.
- Le Fleche P., Y. Hauck, L. Onteniente, A. Prieur, F. Denoeud, V. Ramisse, P. Sylvestre, G. Benson, F. Ramisse, G. Vergnaud.** 2001. Tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiology.* doi: 10.1186/1471-2180-1-2.
- Mason W., J. Blevins, K. Beenken, N. Wibowo, N. Ojha, M. Smelter.** 2001. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3332-3338.
- Monir S., H. Ihara, M. Noda, S. Xiao, P. Hong, K. Ohkusu, Y. Kawamura.** 2007. DNAJ gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 57: 25-30.
- Park Y., L. Fox, K. Seo. M. McGuire, Y. Park. F. Rurangirwa, W. Sischo, G. Bohach.** 2011. Detection of Classical and Newly Described Staphylococcal Superantigen Genes in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Intramammary Infections. *Vet. Microbiol.* 147: 149–154.
- Pyörälä S., S. Taponen.** 2009. Coagulase-Negative Staphylococci-Emerging Mastitis Pathogens. *Vet. Microbiol.* 134: 3–8.

Ramisse V., P. Houssu, E. Hernández, F. Denoed, V. Hilaire, O. Lisanti, F. Ramisse, D. Cavallo, G. Vergnaud. 2004. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5722-5730.

Ruiz-Romero R., R. Cervantes-Olivares, D. Martínez-Gómez, A. Ducoing-Watty, L. Hernández-Andrade. 2013. Most frequent bacteria isolated from goats' milk in two farms located in Tequisquiapan Querétaro, México. (Principales géneros bacterianos aislados de leche de cabra en dos granjas del municipio de Tequisquiapan, Querétaro, México). *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 4: 93-106.

Sampaio S., S. Simoes, E. Zuniga, P. Melville. A. Bispo, G. Carvalho. Gregori. F., Roberti B. 2015. Virulence factor genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. *Microb. Pathog.* 85: 35-39. doi: 10.1016/j.micpath.2015.05.007.

Shimizu A., W. Kloos, H. Berkhoff, C. George, D. Ballard. 1997. Pulsed-field electrophoresis of *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus chromogenes* genomic DNA and its taxonomic, epidemiologic and ecologic applications in veterinary medicine. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 443-450.

Schukken Y., R. González., L. Tifosky, H. Schulte, C. Santisteban, F. Welcome. G. Bennet, M. Zurakowski, R. Zadoks. 2009. CNS mastitis: nothing to worry about? *Vet. Microbiol.* 134: 9-14. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.014.

Stepanovic S., T. Hauschild, L. Dakic, Z. Al-Doori, M. Svabic-Vlahovic, L. Ranin, D. Morrison. 2006. Evaluation of phenotypic and molecular methods for detection of oxacillin resistance in members of the *Staphylococcus sciuri* Group. *J. Clin. Microbiol.* 44: 934-937.

Supré K., F. Haesebrouck, R. Zadoks, M. Vaneechoutte, S. Piepes, S. De Vlieghe.

2011. Some Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species Affect Udder Health More Than Others. *J. Dairy Sci.* 94: 2329-2340.

Taponen S. and S. Pyörälä. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis: not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 34:29-36. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.011.

Taylor J. and F. Breden. 2000. Slipped-strand mispairing and noncontiguous repeats in *Poecilia reticulata* a model for minisatellite birth. *Genetics.* 155:1313-1320.

Thordberg M., I. Kühn, F. Moller, B. Brandstrom, P. Jonsson, M. Danielson-Tham. 2006. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet. Microbiol.* 115:163-72.

Van Belkum A., S. Scherer, L. Van Alphen, H. Verbrough. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 275-293.

Vanderhaeghem W., S. Piepers, F. Leroy, E. Van Coillie, F. Haesebrouck, S. De Vlieghe. 2015. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative Staphylococci associated with ruminants. *Vet. J.* 203: 44-51. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.11.001.

Vergnaud G. and C. Pourcel. 2009. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. molecular epidemiology of microorganisms. *Methods. Mol. Biol.* 551:141-58. doi: 10.1007/978-1-60327-999-4_12.

Vilchez G. and G. Alonso. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 29: 6-12.

Vogler A., C. Keys, Y. Nemoto, R. Colman, Z. Jay, P. Keim. 2006. Effect of repeats copy number on variable number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* 188: 4253-4263.

Wang H., B. Diao, Z. Cui, M. Yan, B. Kan. 2016. Genotyping of *Salmonella* Typhi using 8 loci multi locus VNTR analysis. *Gut. Pathog.* 8:14. doi: 10.1186/s13099-016-0094-4.

Zadocks R., and J. L. Watts. 2009. Species Identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet. Microbiol.* 134: 20-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.012.

Zaluga J., P. Stragier, J. Van Vaerenberg, M. Maes, P. De Vos. 2013. Multilocus variable number tandem repeats analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp *Michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC Microbiol.* 13:126. doi: 10.1186/1471-2180-13-126.

Table I. Primers used to identify *Staphylococcus chromogenes*

PRIMERS	SEQUENCE (5'-3')	CONDITIONS	SIZE (bp)
16s	F'- CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG R'- CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	791
<i>coa</i>	F'- CAAAGCAGATGCGATAG R'- CCTGTACCAGCATCTCTAT	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	1200
<i>Aureolysin</i>	F'- GCATTAAACGAAASCTTYTCWG R'- GTATGCAGCTTTATTTGGWATACC	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	247
<i>Hemolysin</i>	F'- ATGAATATTGGAATAACTTTAGTCAG R'- TTAGGAAGCATACAATTGATGT	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	600
<i>Extracelular protein</i>	F'- ACGTGAGCAATATATGAACGC R'- TTATAAATACCTGTTAATGCGCC	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	133
<i>Zin Metaloprotease</i>	F'- ATTTGCAATCGGGATGG R'- ATGTTGATCATCTAAAATAATATGCG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	250

Surface protein <i>SasH</i>	F' - GGCWAAAGCRATGAATGC R' - ACCGATAATKCCRTAACG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	201
<i>TRAP*</i>	F'-AACTCTATTCACTTATGGAACATATGG R' - CTGTTCAACATTTTGCTGTTG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	529
<i>B antigen</i>	F' - CAAAAACACTATTAGCGACTGG R' - CTTTTATGACGATGGAGTTTCC	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	488
<i>Virulence B factor</i>	F' - ATGTCTTTTAAAGAAAATGAAATCG R' - TATGCATGATTTTCACTGTGC	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	905
<i>FemA</i> protein	F' - GTGTGCTTTRTACCWYTAGC R' - CCAGCATAATAAACWASTTC	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 50 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	250

*Transduction signal protein

Table II. Primers used to amplify the VNTR

PRIMER	SEQUENCE(5'-3')	CONDITIONS	SIZE (bp)
266_07	F' - ATTCTGGATTTTGCACAGC R' - ATCTGCTAAAATGACAGAATTACAAC	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	266
346_06	F' - CAAAACAACGATATCTGTATCTGA R' - TGTCGGTTTATTAGGTTGAGAAG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	346
360_06	F' - CAAGTGCATAACCGTTATTCC R' - TGTCTGATGTCGGTTTATTAGG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	360
854_08	F' - GAAGCACTTACACTTTCGGAG R' - GACTTCACTAAGTGAGTCAACAAGTAC	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	854
638_07	F' - TGAGGTCTCCGCTGTAGG R' - GCAGACGTCCCTGTTGAG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	638
613_12	F' - AGTAGCTAACCATTTTGTTAATTGC R' - GTTAAAGAAAATTCTTCACAGTCG	1 cycle 95 °C/5 m, 30 cycles 95 °C/1 m, 56 °C/1 m, 72 °C/1 m/ 1 cycle 72 °C/5 m.	613

Table III. Biochemical tests results with Api Staph System and antibiograms

STRAIN	ORIGIN	GOAT ID	FARM	PRODUCTION SYSTEM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Guanajuato	A	1	Extensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	S	S	S	S
2	Guanajuato	B	1	Extensive	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	S	S	S	S
3	Guanajuato	C	1	Extensive	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	S	S	S	S
4	Guanajuato	D	1	Extensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
5	Guanajuato	E	1	Extensive	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	S	S	S	S	S
6	Guanajuato	F	1	Extensive	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	S	R	S	S	S
7	Querétaro	G-105R	2	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
8	Querétaro	H-105R	2	Intensive	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
9	Querétaro	G-60L	2	Intensive	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	S	S	S	S	S
10	Querétaro	G-150R	2	Intensive	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	S	S	S	S	S
11	Querétaro	I-15R	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S
12	Querétaro	J-15R	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S
13	Querétaro	K-15L	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S

14	Querétaro	J-60R	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	S	R	S	S	S
15	Querétaro	K-15L1	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	R	R	S	S	S
16	Querétaro	K-15L2	3	Intensive	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	R	R	S	S	S
17	Querétaro	K-15R3	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	S	R	S	S	S
18	Querétaro	L-15R	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	I	R	S	S	S
19	Querétaro	J-195R	3	Intensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	I	R	S	S	S
20	Querétaro	M-15L	3	Semiintensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	R	R	S	S	S
21	Querétaro	N-60R	3	Semiintensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	S	R	S	S	S
22	Querétaro	O-150L	3	Semiintensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	I	R	S	S	S
23	Querétaro	O-150R	3	Semiintensive	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	R	R	S	S	S

The physiological tests used with *S. chromogenes* were: 1. Glucose; 2. Fructose; 3. Manose; 4. Maltose; 5. Lactose; 6. Trehalose; 7.

Manitol; 8. Xilitol; 9. Mellobiose; 10. Nitrates; 11. Alkaline Phosphatase; 12. Voges-Proskauer; 13. Rafifnose; 14. Xylose; 15.

Saccharose; 16. Metil-Gluco-Pyranosidase; 17. N-Acetyl-Glucose; 18. Arginin Dihydrolase; 19. Urea; 20. Polymyxin B; 21.

Ampicillin; 22. Gentamicine; 23. Tobramycine and 24. Tetracycline

Table IV. Genes identified in the isolated CNS

GEN	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. simulans</i>		<i>S. xylosum</i>		<i>S. sciuri</i>		<i>S. warneri</i>	
	+/total	%	+/total	%	+/total	%	+/total	%	+/total	%
<i>Aureolysin</i>	23/23	100	5/18	27.78	4/9	44.44	2/2	100	0/1	0
<i>Hemolysin</i>	23/23	100	2/18	11.11	0/9	0	0/2	0	0/1	0
<i>Extracellular protein</i>	23/23	100	18/18	100	9/9	100	2/2	100	1/1	100
<i>Zin metalloprotease</i>	23/23	100	18/18	100	9/9	100	2/2	100	1/1	100
Surface protein <i>SasH</i>	23/23	100	18/18	100	6/9	66.67	2/2	100	0/1	0
<i>TRAP*</i>	23/23	100	3/18	16.67	3/9	33.33	2/2	100	0/1	0
<i>B Antigen</i>	23/23	100	2/18	11.11	0/9	0	0/2	0	0/1	0
<i>Virulence B factor</i>	22/23	95.65	0/18	0	3/9	33.33	2/2	100	1/1	100
<i>FemA</i> protein	23/23	100	18/18	100	9/9	100	2/2	100	0/1	0

*Transduction signal protein

Table V. Number of VNTR detected by capillary electrophoresis

STRAIN	ORIGIN	FARM	PRODUCTION SYSTEM	266_07	VNTR	346_06	VNTR	360_06	VNTR	854_08	VNTR
1	Guanajuato	1	Extensive	955	27	1092	73	1187	40	1101	11
2	Guanajuato	1	Extensive	955	27	1166	78	1156	39	301	3
3	Guanajuato	1	Extensive	963	27	1153	77	1183	39	1101	11
4	Guanajuato	1	Extensive	953	26	1161	77	1181	39	1077	11
5	Guanajuato	1	Extensive	952	26	1159	77	1181	39	1210	13
6	Guanajuato	1	Extensive	936	26	1164	78	1175	39	1201	13
7	Querétaro	2	Intensive	453	13	1181	79	1175	39	329	3
8	Querétaro	2	Intensive	453	13	1177	78	1177	39	329	3
9	Querétaro	2	Intensive	1075	30	1176	78	1176	39	1221	13
10	Querétaro	2	Intensive	1080	30	1178	79	1182	39	1229	13
11	Querétaro	3	Intensive	384	11	1155	77	1176	39	329	3
12	Querétaro	3	Intensive	383	11	1157	77	1178	39	329	3
13	Querétaro	3	Intensive	385	11	1156	77	1172	39	329	3

14	Querétaro	3	Intensive	382	11	1164	78	1181	39	204	2
15	Querétaro	3	Intensive	382	11	1150	77	1181	39	329	3
16	Querétaro	3	Intensive	382	11	1155	77	1183	39	330	3
17	Querétaro	3	Intensive	385	11	1178	79	1181	39	329	3
18	Querétaro	3	Intensive	989	27	1158	77	1181	39	329	3
19	Querétaro	3	Intensive	384	11	1156	77	1178	39	329	3
20	Querétaro	3	Semi-intensive	383	11	1168	78	1186	40	328	3
21	Querétaro	3	Semi-intensive	386	11	1163	78	1186	40	205	2
22	Querétaro	3	Semi-intensive	872	24	1192	79	1185	40	329	3
23	Querétaro	3	Semi-intensive	0	0	1187	79	1186	40	329	3

Table VI. Diversity Index (Simpson and Hunter-Gaston) and confidence intervals for each VNTR loci for *Staphylococcus chromogenes*.

LOCUS	SIZE (bp)	SIMPSON INDEX	CONFIDENCE INTERVALS 95%	HUNTER- GASTON INDEX	CONFIDENCE INTERVALS 95%
266_07	36	0.87	0.803-0.936	0.909	0.843-0.975
346_06	15	0.926	0.896-0.957	0.968	0.938-0.999
360_06	30	0.756	0.650-0.862	0.791	0.684-0.897
854_08	96	0.654	0.449-0.859	0.684	0.479-0.888

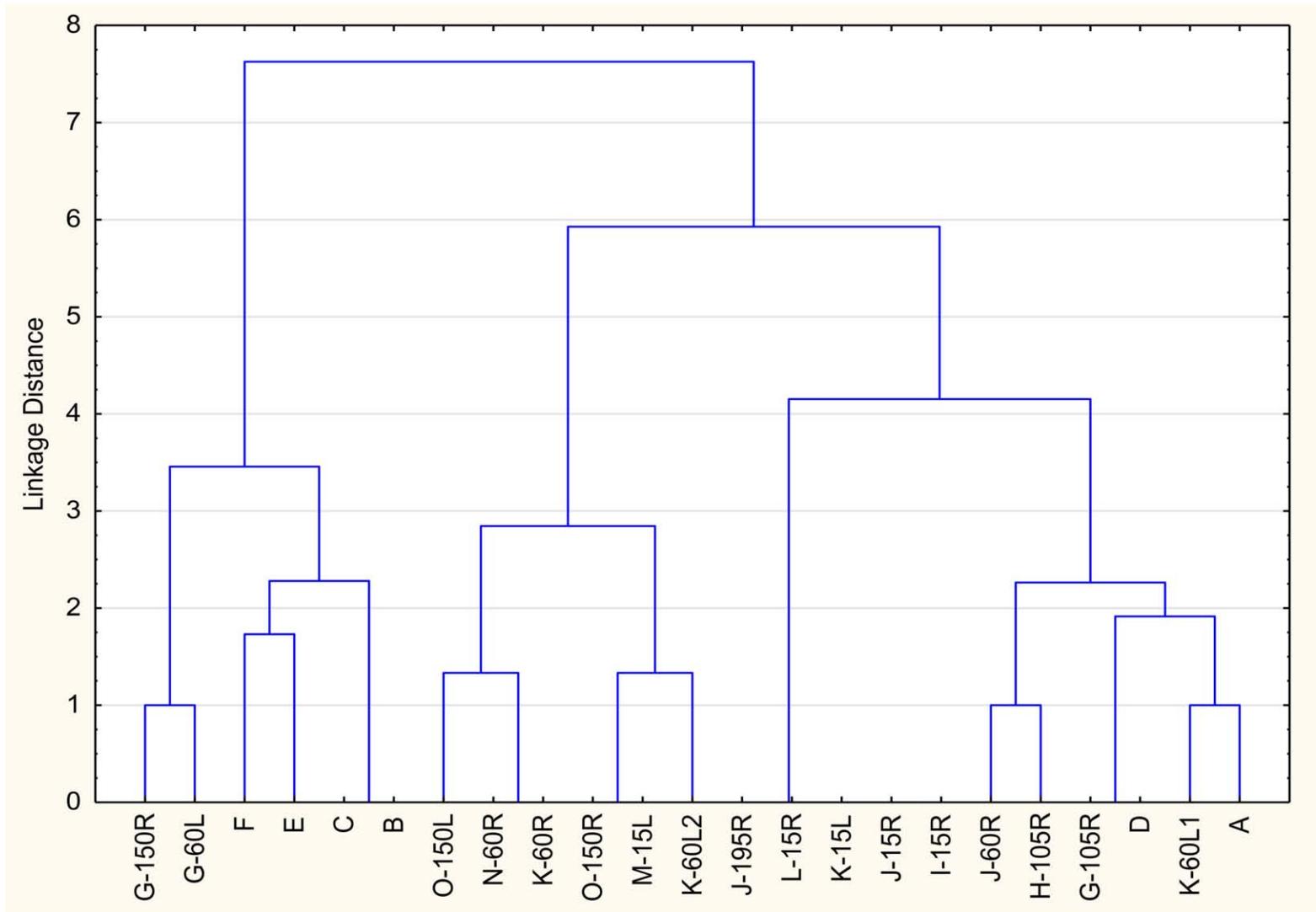


Figure 1. Cluster analysis according to the phenotypic characteristics and chemotherapy susceptibility of 23 *S. chromogenes* strains according to Ward's minimum variance method.

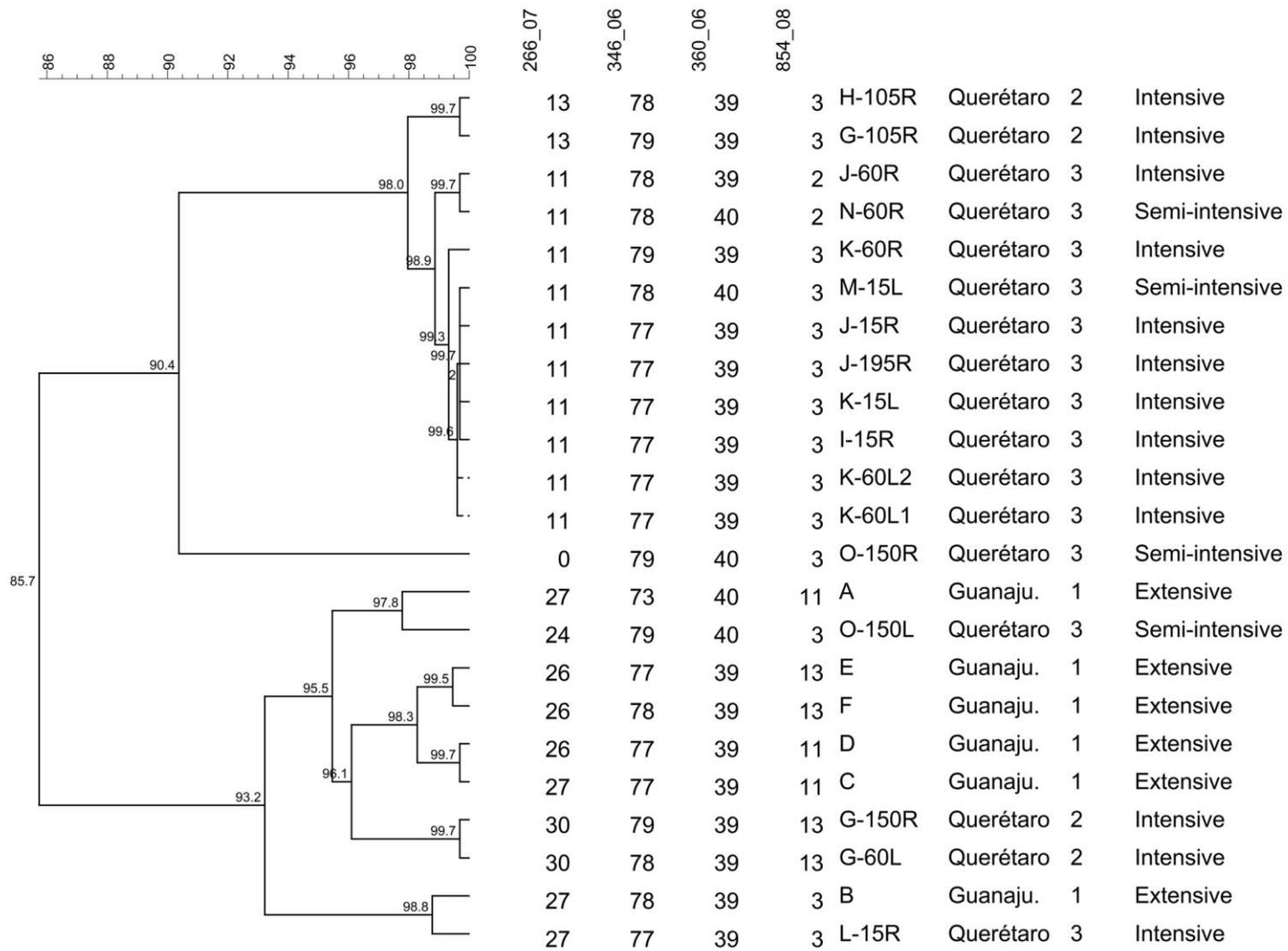


Figure 2. Cluster analysis according to the VNTR of 23 strains of *Staphylococcus chromogenes* using Pearson's correlation coefficient and the UPGMA (Unweighted-Pair Group Method with Arithmetic Mean) algorithm.