



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA, FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA Y  
RESISTENCIA A QUIMIOTERAPÉUTICOS EN CEPAS DE *Staphylococcus  
aureus* Y *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVOS AISLADOS DE  
MASTITIS BOVINA.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**MVZ MALVA DÁNAE PÉREZ GERARDO**

**ASESORA:**

**M.C. LAURA HERNÁNDEZ ANDRADE  
CENID-SALUD ANIMAL E INOCUIDAD, INIFAP**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM  
DR. JOSÉ ABEL CIPRIÁN CARRASCO  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM**



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.

## **Dedicatoria**

**A mi familia (Elida, Modesto y Diana), por la comprensión.**

**A Gustavo, por la paciencia.**

**A Molly, por la compañía.**

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis padres que siguen apoyándome y creyendo en mí, a mi hermana por compartir los hábitos de la investigación y a mis primos quienes siempre muestran interés en los proyectos, el interés es mutuo. Agradezco a Gustavo por apoyarme en la decisión de continuar mi formación con una maestría. Les agradezco el extraordinario nivel de paciencia que manejaron en esta etapa.

Extiendo mis agradecimientos a mi comité tutor: la Dra. Susana Mendoza Elvira y el Dr. Abel Ciprián Carrasco por las enseñanzas, comentarios y consejos que me guiaron para la realización de este trabajo. Agradezco a la M. C. Laura Hernández Andrade por la paciencia, la ayuda y la confianza que deposito en mí, también le agradezco el haber compartido sus conocimientos y por la compañía en los viajes a los tutorales.

Agradezco especialmente la ayuda y apoyo del Dr. Marco Santillán, su colaboración y amabilidad fueron muy valiosas para mí, así como la ayuda de la Dra. Rocío Parra y la Dra. Magda Limón, su colaboración y apoyo también fueron y son muy valiosos para mí. Agradezco a Anita, ya que sus ánimos y ayuda continuaron haciendo mi experiencia en el laboratorio muy agradable; a Edith que de igual manera me brindó su apoyo y ayuda para el muestreo; a Lys por ser mi compañera de tutorales y apoyarme. Agradezco a Daniel Ricardo González por el apoyo brindado a través de los años. Al Dr. Miguel Ángel Blanco por animarme a continuar con la formación en microbiología.

A mi amiga Anahí, quién fue la primera persona que conocí en esta travesía y vaya que fue una gran guía. A mis amigos Dan, Betita y Rafael que formaron una parte de esta travesía conmigo, la hicieron bastante agradable y su compañía fue muy importante para mí. Y a los que no fueron parte de la travesía pero estuvieron dando ánimos siempre: Fer, Arcelia, César, Adriana, Oscar, Ceci y Patrick, gracias por siempre estar.

Agradezco también a todas las chicas de la USB que me hicieron sentir en confianza y me abrieron las puertas sin dudarlo.

A CONACYT por la beca número: 629869.

## **Contenido**

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
Aislamiento e identificación .....	11
Factores de virulencia.....	12
Prueba de adherencia en tubo y placa .....	13
Susceptibilidad a los antimicrobianos.....	14
Detección de serotipos capsulares, genes de producción de biopelícula y genes de resistencia a antimicrobianos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	16
Análisis estadístico.....	22
RESULTADOS.....	24
Aislamiento e identificación .....	24
Factores de virulencia.....	24
Prueba de adherencia en tubo.....	32
Prueba de adherencia en placa.....	34
Susceptibilidad antimicrobiana.....	36
Análisis estadístico.....	39
Detección de serotipos capsulares, genes de producción de biopelícula y genes de resistencia a antimicrobianos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	42
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	55
ANEXO 1 Extracción DNA con CTAB .....	56
REFERENCIAS .....	58

## Índice de figuras

Figura 1 Pasos para la producción de biopelícula. ....	5
Figura 2 Muestreo en la Cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo. ....	11
Figura 3 Aislamiento e identificación de cepas del género <i>Staphylococcus</i> . ....	11
Figura 4 Pruebas de ureasa y fosfatasa en microsistema de identificación ApiStaph .....	24
Figura 5 Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. lecitinasa positivas. ....	25
Figura 6 Cepa de <i>S. chromogenes</i> positiva a gelatinasa, .....	25
Figura 7 Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp positivas a la prueba de caseínasa .....	26
Figura 8 Cepas de <i>S. aureus</i> positivas a lipasa. ....	26
Figura 9 Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp positivas a termonucleasa. ....	27
Figura 10 Clasificación de producción de biopelícula en la prueba de adherencia en tubo. .....	32
Figura 11 Placa teñida con cristal violeta al 0.1%. ....	34
Figura 12 Susceptibilidad a antimicrobianos, método Kirby Bauer. ....	36
Figura 13 <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes a meticilina. ....	37
Figura 14 Agar cromogénico para evaluar resistencia a meticilina. Cepas de <i>S. aureus</i> y SCN con coloración rosa y azul indicativos de resistencia a meticilina. ....	38
Figura 15 Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con Red Gel que muestra los productos de PCR para detección del gen <i>cap5</i> . ....	42
Figura 16 Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con Red Gel que muestra los productos de PCR para detección de gen <i>cap8</i> . ....	43
Figura 17 Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñido con Red Gel que muestra los productos de PCR gen <i>icaA</i> en <i>S. aureus</i> . ....	44
Figura 18 Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR múltiplex para detección de genes <i>mecA</i> , <i>femA</i> e <i>icaD</i> . ....	45

## Índice de cuadros

Cuadro 1 Concentración y zona de inhibición de los antimicrobianos utilizados para la prueba de susceptibilidad en difusión de disco. ....	15
Cuadro 2 Secuencias de iniciadores para genes de serotipos capsulares y genes de producción de biopelícula utilizados para PCR punto final. ....	21
Cuadro 3 Secuencia de iniciadores para PCR multiplex. ....	22
Cuadro 4 Producción de enzimas por especie de <i>Staphylococcus</i> . ....	28
Cuadro 5 Identificación bioquímica y producción de factores de virulencia por las 54 cepas de <i>Staphylococcus</i> aisladas .....	29
Cuadro 6 Clasificación de la producción de biopelícula en la prueba de adherencia en tubo .....	33
Cuadro 7 Promedio de absorbancias obtenidas en la prueba de adherencia en placa. ....	35
Cuadro 8 Porcentaje de resistencia de <i>S. aureus</i> y SCN a diferentes antimicrobianos.....	37
Cuadro 9 Análisis de varianza y Tukey de adherencia en placa.....	40
Cuadro 10 Correlación entre las pruebas de adherencia de tubo y placa. ....	41
Cuadro 11 Asociación de producción de biopelícula y factores de virulencia en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y SCN.....	41
Cuadro 12 Resultados PCR punto final por especies de <i>Staphylococcus</i> aislados de mastitis bovina. ....	44
Cuadro 13 Resultados de PCR multiplex en <i>S. aureus</i> y SCN aislados de mastitis bovina. ....	45

## RESUMEN

PÉREZ GERARDO MALVA DÁNAE. Detección de genes de virulencia, formación de biopelícula y resistencia a quimioterapéuticos en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos aislados de mastitis bovina. (Asesora: M.C. Laura Hernández Andrade; Comité tutor: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira y Dr. José Abel Ciprián Carrasco)

La mastitis bovina tiene repercusiones económicas para la industria lechera, entre los principales agentes etiológicos de la mastitis infecciosa se encuentra a *Staphylococcus aureus* y en reportes recientes se incluye a los *Staphylococcus coagulasa* negativos. Ambas especies de microorganismos tienen la capacidad de formación de biopelícula que contribuye a la persistencia de la infección. Así como también llegan a presentar resistencia a antimicrobianos por lo que los tratamientos para controlar la mastitis son nulos o poco eficaces, el objetivo del trabajo fue analizar cepas de *S. aureus* y SCN aisladas de casos de mastitis bovina para detectar producción de biopelícula, factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos. Para evaluar la producción de biopelícula, virulencia y la resistencia a antimicrobianos se trabajó con 22 cepas *S. aureus* y 32 cepas SCN aislados de casos de mastitis bovina, se realizaron pruebas de adherencia en tubo y placa, pruebas bioquímicas para detectar factores de virulencia, y pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para los genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaR*, *bap*, *atlE*, *cap5* y *cap8*; y PCR múltiplex para los genes *icaD*, *femA* y *mecA*; también se realizaron pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Las 54 cepas, mostraron capacidad de producir biopelícula. Se observaron altos porcentajes de resistencia a ampicilina y oxacilina 100% de los *S. aureus* (n=22) para ambos casos; 93.75% y 96,87% respectivamente en el caso de los SCN (n=32). Los genes *icaA* y *cap5* fueron los de mayor frecuencia en *S. aureus*; el gen *cap5* se presentó en *S. intermedius*, *S. simulans* y *S. haemolyticus*. El 9% de cada grupo, 2 cepas de *S. aureus* y 3 cepas de SCN, presentaron el gen *mecA*. El PCR múltiplex sirve como herramienta para la detección de producción de biopelícula y resistencia a meticilina. En México el nivel de resistencia alto a los betalactámicos, incluyendo a la meticilina, es mucho mayor a lo reportado a nivel mundial



## INTRODUCCIÓN

La mastitis es una de las enfermedades que tiene más impacto en la industria lechera, ya que provoca grandes pérdidas económicas debido a la reducción en la producción de leche y el deterioro de la calidad de la misma (Muñoz; *et al.*, 2012; Ávila, 2015; Acosta, 2018). El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estima que la presentación de esta enfermedad tiene costo de aproximadamente \$730.00 a \$850.00 MXN por cada caso de mastitis, esto refiriéndose a los costos directos que incluyen el uso de antimicrobianos, los servicios veterinarios, la mano de obra para la aplicación de los tratamientos y el descarte de la leche que no puede ser comercializada. En México se han reportado pérdidas económicas de aproximadamente 2 millones y medio de pesos, de estos se atribuye que el 80% de estos costos son representados por la mastitis subclínica y el resto debido a la mastitis clínica (Bedolla, 2008; Mera *et al.*, 2017).

La mastitis puede ser ocasionada por diversos factores ya sean físicos, químicos, de origen mecánico por una mala práctica de ordeño o de origen infeccioso (Ávila, 2015). La mastitis de origen infeccioso es la más común, se han identificado 130 especies de microorganismos causantes de mastitis infecciosa, siendo aislados con mayor frecuencia son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.*, *Corynebacterium bovis* y algunos patógenos ambientales como: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Trueperella pyogenes* y *Streptococcus uberis* (Ruiz *et al.*, 2001; Frey *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2012; Abebe *et al.*, 2016). Por otra parte, la mastitis se puede clasificar como clínica y subclínica; la clínica se caracteriza por alteraciones en la glándula mamaria y cambio en la apariencia y composición de la leche; la presentación subclínica es la más prevalente y no se puede detectar de forma visual para su detección se deben realizar pruebas como la de California (Sánchez y Gutiérrez, 2015. Abebe *et al.*, 2016).

La mastitis causada por *Staphylococcus aureus* tiene una baja tasa de curación. *S. aureus* es el principal causante de mastitis clínica, sin embargo, también puede ser asociado a mastitis subclínica e infecciones crónicas (Aslantaş y Demir, 2016;

Kamaruzzaman *et al.*, 2017). *S. aureus* se caracteriza por tener la capacidad de invadir las células alveolares de la glándula mamaria y se internaliza en macrófagos, también produce toxinas que pueden provocar la muerte celular del tejido secretor reduciendo la producción láctea (Kamaruzzaman *et al.*, 2017).

Los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) se consideraban patógenos menores, recientemente se les considera como los principales microorganismos causantes de mastitis subclínica (Taponen y Pyörälä, 2009; Pellegrino 2011; Tremblay *et al.*, 2013; Sánchez y Gutiérrez, 2015; Ávila, 2015). Hace tiempo los SCN se clasificaban como un grupo y no se identificaban las especies, sin embargo, ya que actualmente son los patógenos más prevalentes en infecciones intramamarias se han identificado; las especies más comunes son las siguientes: *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus* y *S. haemolyticus*. No obstante, existe poca información respecto a su virulencia y de los mecanismos con los que cuentan para causar mastitis. (Tremblay *et al.*, 2013).

#### Género *Staphylococcus*

Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos que tienden a agruparse en pares, tétradas o grupos irregulares que toman la forma de racimos. Las colonias son generalmente blanquecinas con bordes regulares, son microorganismos no móviles y no forman esporas. Para diferenciarlos de otros cocos Gram positivos se debe considerar que *Staphylococcus* es catalasa positivo y oxidasa negativo, excepto en caso de *Staphylococcus sciuri*, ya que en esta especie se han encontrado cepas oxidasa positiva (Markey *et al.*, 2013). Los *Staphylococcus* cuentan con diversos factores de virulencia que pueden contribuir a la adhesión, invasión y colonización de la glándula mamaria (Figueira *et al.*, 2017; Acosta, 2018). Uno de los principales factores con los que cuentan *S. aureus* y los SCN es la habilidad de producir biopelícula (Tremblay *et al.*, 2013; Aslantaş y Demir, 2016; Khoramrooz *et al.*, 2016).

## Biopelícula

La biopelícula se define como un agregado de microorganismos que se encuentran cubiertos por una matriz de polímeros extracelulares que producen los mismos microorganismos y están adheridos a una superficie o a otros microorganismos (Flemming *et al.*, 2016). La biopelícula confiere a las bacterias protección ante los cambios del medio ambiente, concentra nutrientes aprovechables por los microorganismos y facilita la eliminación de desechos (Nazar, 2007; Becerra *et al.*, 2009). Es uno de los factores de virulencia más importantes ya que asegura la permanencia de las bacterias en el tejido glandular (Vanderhaeghen *et al.*, 2014).

La formación de estas comunidades sésiles o adheridas, puede resultar en infecciones crónicas o persistentes ya que la formación de biopelícula contribuye a la evasión de la respuesta inmune, ya sea la respuesta humoral o la respuesta celular, y a la resistencia a antimicrobianos; algunas cepas de *Staphylococcus* multiresistentes han mostrado la capacidad de generar grandes cantidades de biopelícula (Barberis *et al.*, 2001; Sauer, 2003; Márquez *et al.*, 2008; Khoramian *et al.*, 2015; Flemming *et al.*, 2016).

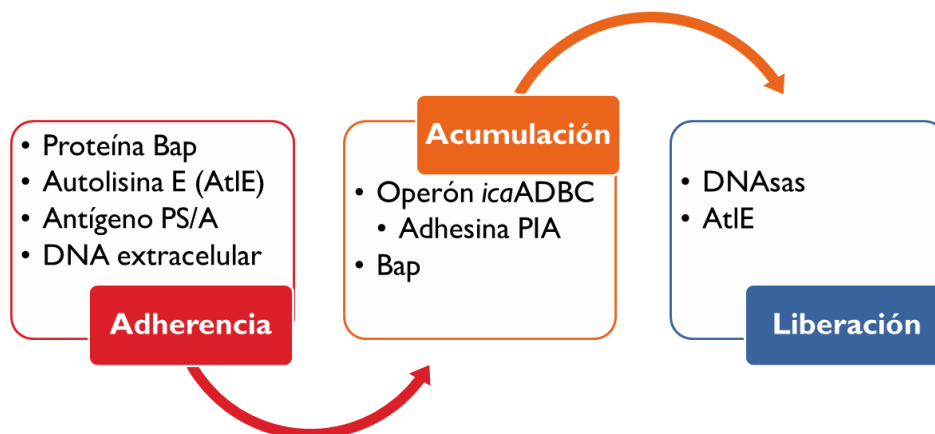
Para la formación de biopelícula se requieren de tres pasos (Figura 1). En el primer paso: **adherencia primaria**, se involucran proteínas como autolisina E (AtlE) que tiene como función degradar la pared celular, su activación cambia la hidrofobicidad de la superficie celular y también funciona como adhesina ya que es mediadora de la unión del microorganismo al poliestireno. El gen *atlE* es el que se encarga de codificar la proteína AtlE (Vanderhaeghen *et al.*, 2014; Büttner *et al.*, 2015). En el caso de *Staphylococcus epidermidis* se ha encontrado que AtlE tiene un rol en la formación de biopelícula mediada por ADN extracelular y también puede otorgarle la capacidad de adherirse a la vitronectina, componente de la matriz extracelular (Büttner *et al.*, 2015). Otros factores involucrados en la adhesión primaria son la lipasa extracelular GehD que tiene una actividad enzimática y funciona como una proteína de unión al colágeno (componente de la matriz extracelular) (Büttner *et al.*, 2015); y el antígeno capsular de adhesión

(PS/A) sintetizado por el operón de la adhesina intracelular (*ica*) (Khoramrooz *et al.*, 2016).

El segundo paso: **acumulación**, que esta mediada por las adhesinas intracelulares que hacen el papel de un adhesivo en la biopelícula, la más estudiada es la adhesina polisacárida intracelular (PIA). El operón *ica* también es responsable de la síntesis de la adhesina polisacárida intracelular (Khoramrooz *et al.*, 2016), el locus *ica* se conforma por los genes *icaADBC*, se requiere la expresión de los cuatro genes para obtener una molécula funcional de PIA (Büttner *et al.*, 2015).

La proteína asociada a biopelícula (Bap), codificada por el gen *bap*, es una de las adhesinas con mayor importancia durante las fases de adherencia y acumulación (Cucarella, *et al.*, 2001; Khoramrooz *et al.*, 2016). Esta proteína que promueve la acumulación de *S. aureus* en células epiteliales, sólo se ha encontrado en cepas aisladas a partir de muestras tomadas de bovinos y no todas las cepas pueden presentarla. Esta es una proteína de superficie que también puede verse involucrada en la adhesión primaria a superficies inertes y tejidos (Foster *et al.*, 2014; Aslantaş y Demir, 2016).

Finalmente, el tercer paso es la **liberación**: la estructura de la matriz se pierde y se liberan bacterias para la colonización en una nueva superficie (Büttner *et al.*, 2015).



**Figura 1 Pasos para la producción de biopelícula.**

## Resistencia a antimicrobianos

Los tratamientos utilizados contra la infección intramamaria por *S. aureus* son menos efectivos que los utilizados contra otros patógenos ya que este microorganismo posee diferentes capacidades como la de invadir las células para evitar el efecto de los antibióticos, característica que además permite la evasión de la respuesta inmune (Schönborn y Krömker, 2016).

Por otra parte, los tratamientos con antibióticos pueden no eliminar por completo a todos los microorganismos, lo que puede ocasionar el desarrollo de mastitis subclínica crónica. La persistencia de *S. aureus* en glándula mamaria causa pérdidas económicas ya que es una de las principales razones de desecho de ganado (Pereyra *et al.*, 2016). También se ha dado a conocer que los SCN son más resistentes a los antimicrobianos que los *S. aureus*, por lo que el monitoreo de los casos de mastitis por SCN es de suma importancia (Kim *et al.*, 2019).

En la industria lechera se utilizan comúnmente antimicrobianos betalactámicos como tratamiento para las infecciones ocasionadas por *Staphylococcus*, estos tratamientos se han complicado debido a la resistencia adquirida a este tipo de antimicrobianos (López y Vázquez, 2015). Otros antimicrobianos que son utilizados para tratamiento de mastitis son los aminoglucósidos y macrólidos (Pellegrino *et al.*, 2011). Por otra parte, se atribuye al uso indiscriminado de antimicrobianos como: cefalosporinas de tercera generación, macrólidos y fluoroquinolonas, como un factor que contribuye a la emergencia de resistencia a la meticilina o vancomicina (Khodadadi *et al.*, 2016).

Los microorganismos pueden adquirir resistencia por mutaciones o adquisición de genes de resistencia y evitando la incorporación del antibiótico a la célula bacteriana. Por otra parte, hay tres mecanismos de resistencia adaptativa: 1) indiferencia al fármaco, ya que al no estar en división celular o por falta de nutrientes las bacterias son parcial o completamente resistentes al antibiótico; 2) persistencia, cuando una fracción de la población sobrevive a la exposición al

fármaco por no estar en replicación y 3) la formación de biopelícula (Márquez *et al*, 2008; Becerra *et al*, 2009).

La resistencia a betalactámicos con las que algunas cepas de *Staphylococcus* cuentan se puede dar por la presencia del gen *blaZ* que codifica la producción de enzimas beta lactamasas. Otro mecanismo de resistencia a betalactámicos es la resistencia intrínseca a meticilina que se da por la presencia del gen *mecA*, los microorganismos que cuentan con este gen en el genoma pueden producir la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) de baja afinidad a betalactámicos, este mecanismo se conoce como resistencia a meticilina/oxacilina (López y Vázquez, 2015; Figueira *et al.*, 2017). El gen *femA* junto con el *femB* actúan como regulador para la expresión de la resistencia a meticilina; la proteína FemA es necesaria para la síntesis de la pared celular de *Staphylococcus*. Aunque la proteína que codifica el gen *femA* es necesaria para la expresión de la resistencia a meticilina, también se puede encontrar en cepas sensibles. Si se llega a dar una mutación o la inactivación del gen *femA*, la resistencia a meticilina se reduce (Barzani, 2017, Khodadadi *et al.*, 2016).

Cuando el mecanismo de resistencia se debe a la formación de biopelícula pueden presentarse tres diferentes situaciones que contribuyan a la resistencia (Márquez *et al.*, 2008; Becerra *et al.*, 2009) tales como:

- 1.- Las bacterias que se encuentran dentro de la matriz glucoproteica son menos accesibles a la difusión de los antibióticos. La penetración del antibiótico es lenta o incompleta y no llega a entrar en contacto con la pared celular.
- 2.- No hay replicación bacteriana debido a que la biopelícula otorga una protección al microorganismo y el metabolismo bacteriano no es suficiente para el correcto funcionamiento del antibiótico.
- 3.- Los antibióticos sufren una alteración química debido al cambio de pH que hay en el microambiente creado dentro de la biopelícula.

## Problemática de la resistencia

La problemática de la resistencia a antimicrobianos, como se mencionó anteriormente, se debe al uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento de mastitis bovina y al uso indiscriminado de antibióticos como profilaxis para el periodo seco en vacas lecheras ya que puede ocasionar la selección de bacterias multirresistentes (Pellegrino *et al.*, 2011; Aslantaş y Demir, 2016, Kim *et al.*, 2019). En el caso de *S. aureus* se ha reportado resistencia a diversos antimicrobianos como: vancomicina, tetraciclina, eritromicina, dicloxacilina, penicilina G, gentamicina, ampicilina, oxacilina e inclusive a sulfametoxazol y trimetoprim (Zendejas *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Aslantaş y Demir, 2016; Khodadadi *et al.*, 2016), mientras que en el caso de los SCN, se ha reportado resistencia a ampicilina, eritromicina, estreptomina, tetraciclina, penicilina G, vancomicina, oxacilina y novobiocina (Ruiz *et al.*, 2001; Frey *et al.*, 2012; Fariña *et al.*, 2013; Sánchez y Gutiérrez, 2015; Saidi *et al.*, 2019). Estos reportes son indicadores de que las opciones terapéuticas contra las infecciones de glándula mamaria provocadas por microorganismos del género *Staphylococcus* son cada vez más limitadas.

## Factores de virulencia

Además de la formación de biopelícula y la resistencia a la meticilina, actualmente se han descrito varios factores de virulencia que están involucrados en la patogenia de las infecciones causadas por *Staphylococcus* spp. Estos factores se pueden dividir en: a) enzimas; b) exotoxinas y c) componentes de superficie celular (Seija, 2008).

Tanto *S. aureus* y SCN cuentan con enzimas como la lipasa, DNAsa, fosfatasa, entre otras que contribuyen a la persistencia de la infección (Seija, 2008; Fariña *et al.*, 2013). A continuación, se detallan las funciones de algunas de estas enzimas. La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico del tejido conectivo, esto facilita la diseminación de *S. aureus*; la lipasa se encarga de hidrolizar los lípidos produciendo tres diferentes ácidos grasos; la fosfolipasa C tiene un papel en la

fisiología de la infección ya que permite la hidrólisis de los lípidos epiteliales de la piel, permitiendo que la colonización por *S. aureus* se facilite (MacFaddin, 1999); la fibrinolisis disuelve los coágulos de fibrina facilitando la colonización (Zendejas *et al.*, 2014); las enzimas DNasa y fosfatasa colaboran en el proceso infeccioso y la producción de lesiones (Seija, 2008); la caseinasa es una exoenzima proteasa que hidroliza la caseína; la lecitinasa C, junto con las lecitinasas A, B y D hidrolizan el fosfolípido lecitina en diferentes regiones de la molécula produciendo otras sustancias además de fosforilcolina y diglicéridos (MacFaddin, 1999); otra exoenzima es la gelatinasa que es proteolítica, algunos microorganismos secretan estas enzimas para degradar las proteínas en aminoácidos ya que algunas proteínas son de gran tamaño y no pueden ser utilizadas para el metabolismo bacteriano como tal, y la ureasa que al hidrolizar la urea libera dos moléculas de amoníaco (MacFaddin, 2003).

Los *Staphylococcus* spp también cuentan con serotipos capsulares de naturaleza polisacárida a la que se le conoce como *slime* o cápsula mucoide que otorga capacidad de adherencia y antifagocítica. En *S. aureus* se han identificado 11 serotipos capsulares. Sólo los polisacáridos de los serotipos 1,2, 5 y 8 han sido purificados y químicamente caracterizados (Salimena *et al.*, 2016); el serotipo 1 produce una gran cantidad de polisacárido, así brinda a la bacteria un aspecto mucoide; los serotipos 5 y 8 son más frecuentes y junto a las adhesinas intercelulares incrementan el desarrollo de la biopelícula y aumentan la capacidad de adhesión a la misma (Cervantes *et al.*, 2014). Los *S. aureus* de importancia clínica generalmente cuentan con alguno de estos serotipos capsulares, ya sea el 5 ó el 8; se han identificado estos serotipos en *S. aureus* aislados de infecciones en humanos y en bovinos. Se ha reportado una gran variabilidad en la distribución de los serotipos capsulares en diferentes países. Existen reportes de que del 94 al 100% de los *S. aureus* aislados de mastitis bovina, cuentan con la cápsula polisacárida extracelular (Salimena *et al.*, 2016).



## HIPÓTESIS

Las cepas de *S. aureus* y SCN aisladas de casos de mastitis bovina que tengan la capacidad de producir biopelícula, contarán con los genes del locus *icaADBC*, el gen *icaR*, el gen *atlE*, o el gen *bap* y además de los genes de los serotipos capsulares 5 y 8 (*cap5* y *cap8*); así como la resistencia a meticilina por lo que presentaran los genes *mecA* y *femA*; el producir ciertos factores de virulencia permitirá mayor capacidad de producción de biopelícula.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del trabajo fue analizar cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos aisladas de casos de mastitis para detectar producción de biopelícula, factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la producción de biopelícula en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos aisladas de casos de mastitis bovina
2. Detectar factores de virulencia, DNAsa, fosfatasa, ureasa, gelatinasa, caseinasa, lecitinasa, fibrinolisisina y lipasa.
3. Detectar serotipos capsulares 5 y 8 en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos productoras de biopelícula mediante PCR punto final.
4. Detectar la presencia de los genes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaR*, *atlE* y *bap* por medio de PCR punto final.
5. Estandarizar un PCR múltiplex para detectar la presencia de los genes *femA*, *icaD* y *mecA*.
6. Evaluar la resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos productoras de biopelícula.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamiento e identificación

Se obtuvieron cepas de *Staphylococcus* spp a partir de muestras de leche de casos de mastitis bovina proveniente de los estados de Querétaro y Coahuila, así como de un muestreo realizado en la cuenca lechera de Tizayuca en el estado de Hidalgo (Figura 2). Las muestras de leche fueron homogenizadas con 30 movimientos del tubo según el manual del National Mastitis Council, después se sembraron en agar sangre y agar sal manitol e incubaron en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 48 h. Una vez transcurrido este tiempo se observó el crecimiento y la hemolisis en el agar sangre; mientras que en el agar sal manitol se observó la coloración del medio de cultivo. Se realizaron frotis a partir de los crecimientos y se realizó la tinción de Gram, para observar la morfología microscópica y la pureza de los cultivos. La identificación de las especies se realizó con microsistemas de identificación API Staph de Biomeriux®; obteniendo un perfil numérico que fue ingresado a una plataforma con la base de datos del software para la identificación de las especies de *Staphylococcus* (Figura 3).



Figura 2 Muestreo en la Cuenca lechera de Tizayuca,

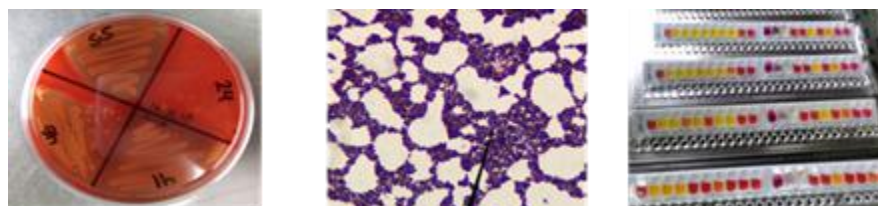


Figura 3 Aislamiento e identificación de cepas del género *Staphylococcus*.

## **Factores de virulencia**

### Ureasa y fosfatasa

Las pruebas de ureasa y fosfatasa son parte de los microsistemas de identificación Api Staph de Biomeriux®. Al realizar las lecturas de los microsistemas se evaluó individualmente si las cepas contaron con dichas enzimas.

### Lecitinasa

Para la prueba de lecitinasa se utilizó agar infusión cerebro corazón (ICC) enriquecido con 10% de yema de huevo. Para la preparación del medio la yema de huevo se extrajo de la siguiente manera:

Primero se sumergió un huevo en etanol al 95% durante una hora, posteriormente se separó la yema de manera aséptica. Se adicionó una yema de huevo por cada 500 ml de ICC preparados previamente esterilizado a 15 psi (125°C) por 15 min. Finalmente se sirvió el medio en cajas de Petri estériles (MacFaddin, 1999).

Una vez preparado el medio, se sembraron las cepas en el agar ICC adicionado con yema de huevo y se incubaron por 24 horas a 37°C en aerobiosis.

### Gelatinasa

La acción de la gelatinasa se evaluó observando la licuefacción de la gelatina que contienen los rollos de películas fotográficas (Markey *et al.*, 2013). Para esta prueba, se cortaron rectángulos de la película fotográfica y se colocaron individualmente en tubos de vidrio con tapa de rosca, una vez preparados los tubos se esterilizaron en autoclave a una presión de 10 psi (116°C) durante 10 minutos. Después se agregó a cada tubo 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (CICC) enriquecido con glucosa al 2% y previamente esterilizado a 10 psi (116°) por 10 min. Finalmente se inocularon las cepas e incubaron por 72 horas a 37°C en aerobiosis (MacFaddin, 1999).

### Caseinasa

La prueba de caseinasa se realizó en agar leche. Para la preparación de este medio se agregó leche descremada en una proporción de 1:10 a un agar nutritivo. El agar nutritivo y la leche fueron esterilizados por separado a 15 psi (125°C) por 15 minutos. Una vez estériles se mezclaron y sirvieron en cajas de Petri. Posteriormente se sembraron las cepas e incubaron a 37°C durante 24 h (MacFaddin, 1999).

### Lipasa

La prueba de lipasa se realizó con una suspensión al 2% de yema de huevo en agar sal manitol, la obtención de la yema se realizó con los mismos pasos que se realizaron para la prueba de lecitinasa. Una vez preparado el medio, se inocularon las cepas en el agar e incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se observó si había formación de un halo opaco alrededor de las colonias, las cepas que lo presentaron se consideraron productoras de lipasa (MacFaddin, 1999).

### DNAsa

La detección de la producción de la DNAsa se evaluó con el agar para prueba de DNAsa con azul de toluidina marca BD BBL™, referido en la NOM 210 SSA1 2014. "Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos". En las cajas se inocularon las cepas de *S. aureus* y SCN formando una línea recta, se incubaron a 37°C por 24 horas, pasado este periodo se realizó la lectura tomando como positivas aquellas cepas que formaron un halo color rosa a su alrededor. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente por 24 horas más y se realizó una segunda lectura.

### **Prueba de adherencia en tubo y placa**

Las cepas de *Staphylococcus* obtenidas se sembraron en agar sangre e incubaron por 24 h a 37°C; posteriormente se inocularon en tubos de poliestireno estériles que contenían 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (CICC) enriquecido con

glucosa al 2% y se incubaron bajo las mismas condiciones. Posteriormente se realizaron diluciones 1:100 para efectuar el ensayo en microplacas de poliestireno para cultivo celular de 96 pozos de fondo plano, se inocularon por duplicado colocando 2  $\mu$ l de CICC inoculado y 198  $\mu$ l de CICC estéril y se incubó la microplaca por 24 h a 37°C en condiciones de aerobiosis.

Después de haber realizado el pase del CICC inoculado de los tubos a la placa, se eliminó el caldo y se lavaron los tubos con PBS tres veces y se dejaron secando a temperatura ambiente; una vez secos se tiñeron con cristal violeta al 0.1% durante un minuto y finalmente se lavaron con agua destilada y secaron a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se realizó con los pozos de la microplaca una vez pasado el tiempo de incubación.

Con los tubos teñidos y secos se realizó la lectura clasificando a las cepas como altas, medianas, bajas y no productoras de biopelícula según la intensidad de la coloración. La lectura de adherencia en placa se realizó por espectrofotometría con un lector de placas de ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) Labsystems multiskan Ascent 354 microplate Lector®, con una absorbancia de 492 nm. El proceso se realizó tres veces por cada cepa incluidas las cepas de *S. aureus* ATCC 976, 977, 1026, 29213 y la cepa de *S. aureus* Cowan y como testigo negativo se utilizó CICC estéril.

### **Susceptibilidad a los antimicrobianos**

Para evaluar la susceptibilidad a antimicrobianos se utilizó el método de Kirby Bauer. A partir cultivos en agar sangre se diluyeron las cepas en 4.5 ml de solución salina esterilizada ajustando la turbidez equivalente a 0.5 de McFarland. Una vez alcanzada la turbidez se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión e inoculó en agar Mueller Hilton (MH) por estría continua. Posteriormente se colocaron sensidiscos con los antimicrobianos descritos en el Cuadro 1, presionando firmemente cada disco con unas pinzas estériles para asegurar el contacto completo con el agar. Se incubaron las placas a 37°C por 24 h, finalmente se realizó la lectura midiendo las zonas de inhibición y

clasificándolos como sensibles, intermedios y resistentes de acuerdo a los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute Cuadro 1 (CLSI, 2008; Pellegrino *et al.*, 2011). Se utilizó el mismo método para detectar la resistencia a la oxacilina, la concentración de los discos de esta fue de 1 µg.

<b>Cuadro 1 Concentración y zona de inhibición de los antimicrobianos utilizados para la prueba de susceptibilidad en difusión de disco.</b>				
<b>Antimicrobiano</b>	<b>Concentración</b>	<b>Zona de inhibición (mm)</b>		
		<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>
<b>Cefalotina</b>	30 µg	≤14	15-17	≥18
<b>Ceftazidima</b>	30 µg	≤14	15-17	≥18
<b>Eritromicina</b>	15 µg	≤13	14-22	≥23
<b>Ampicilina</b>	10 µg	≤28	-	≥29
<b>Tetraciclina</b>	30 µg	≤14	15-18	≥19
<b>Trimetoprim/Sulfametoxazol</b>	25 µg	≤10	11-15	≥16
<b>Cefotaxima</b>	30 µg	≤14	15-22	≥23
<b>Gentamicina</b>	10 µg	≤12	13-14	≥15
<b>Cefuroxima</b>	30 µg	≤14	15-22	≥23
<b>Pefloxacina</b>	5 µg	≤14	15-22	≥23
<b>Dicloxacilina</b>	1 µg	≤10	11-12	≥13
<b>Penicilina</b>	10 UI	≤28	-	≥29
<b>Oxacilina</b>	1 µg	≤17	-	≥18
<b>Diámetros de inhibición según CLSI</b>				

#### Resistencia a meticilina

Se utilizó agar cromogénico CHROMagar MRSA de BD BBL, para detectar la resistencia a meticilina, se sembraron en las cajas de Petri las cepas previamente aisladas, se incubaron a 37°C por 48 horas. Se observaron y clasificaron las cepas según la coloración que tomaron, los *S. aureus* resistentes a meticilina tomaron

una coloración rosada o malva, mientras que los SCN resistentes a meticilina tomaron una coloración azulada a verdosa.

### **Detección de serotipos capsulares, genes de producción de biopelícula y genes de resistencia a antimicrobianos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

#### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por el método de CTAB (Anexo 1) a partir de colonias de las cepas previamente inoculadas e incubadas en agar sangre a 37°C en condiciones de aerobiosis por 24 horas. Una vez concluida la extracción de ADN, se realizó un análisis cualitativo en gel de agarosa al 1.2%, posteriormente se cuantificó mediante espectrofotometría (ThermoScientific™ NanoDrop™) y se estandarizó a una concentración de trabajo de 20 ng/μl.

#### Serotipos capsulares 5 y 8

Para la detección del gen que codifica el serotipo capsular 5, las reacciones se prepararon con un volumen final de 25.5 μl: 12.5 μl correspondían a PCR Master Mix (2x) ® de Thermo Scientific, 8.5 μl de agua libre de nucleasa, 1 μl de cada oligonucleótido con una concentración de 20 pmol/μl (Cuadro 2) y 2 μl de templado (ADN molde). Las condiciones utilizadas para la PCR se estandarizaron a partir de las reportadas por Sayed *et al*, 2006; se inició con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 seg, alineación a 58°C por 15 seg y una extensión a 72°C por 15 seg, finalmente una extensión a 72°C durante 5 min. Se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 1026 como control positivo y se utilizó agua destilada estéril como control negativo.

El serotipo capsular 8 se identificó con el gen *cap8*, las reacciones en este caso se prepararon con un volumen final de 25 μl de los cuales 10.5 correspondían a GoTaq® Green Master Mix de Promega, 12 μl de agua libre de nucleasas, 0.25 μl de cada oligonucleótido (Cuadro 2) con una concentración de 20 pmol/ μl y 2 μl de

templado. Las condiciones de PCR se basaron en las utilizadas por Sutter, *et al.*, 2011, empezando con la desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, alineación a 51°C por 20 seg y extensión a 72°C por 50 seg, finalizando con una extensión final a 72°C por 10 min. Se utilizaron como controles positivos las cepas de *S. aureus* ATCC 977 y ATCC 25923.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con 8 µl de Gel Red® por cada 100 ml y se corrió a 70 V durante 50 min, y se expuso en un transiluminador con luz ultravioleta.

#### Gen *icaA*

Para la detección de este gen se prepararon reacciones con un volumen final de 25 µl compuestos por 12.5 µl de PCR Master Mix de Thermo Scientific, 8.5 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cada iniciador descritos en el Cuadro 2, se agregaron 2 µl de templado. Se programó una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min, seguidos por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg, alineación a 52°C por 45 seg y una extensión de 72°C por 1 min; terminando con una extensión a 72°C por 7 min (Budri *et al.*, 2015). Se utilizaron las cepas de *S. aureus* Cowan y ATCC 1026 como control positivo. La visualización se hizo por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con 8 µl de Gel Red® por cada 100 ml sometido a 60 V durante 100 min expuesto en un transiluminador con luz UV.

#### Gen *icaB*

Para la detección del gen *icaB* se realizaron pruebas de estandarización con dos diferentes juegos de iniciadores (Cuadro 2), los iniciadores fueron evaluados con el programa de alineamiento de secuencias de tipo local, BLAST por sus siglas en inglés, del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Como base para realizar las pruebas se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC 976, 977, 1026, 29214 y la Cowan.



Para las pruebas con los iniciadores descritos por Cafiso *et al.*, 2004, se prepararon reacciones con un volumen final de 25 µl compuestos por 12.5 µl de PCR Master Mix de Thermo Scientific, 8.5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada iniciador y 2 µl de templado. Las primeras condiciones que se utilizaron fueron las descritas por Cafiso: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguidos por 30 ciclos a 93°C por 1 min, 53°C por 30 seg, 68°C por 2 min, 53°C por 1 min, finalizando con 68°C por 10 min. Después se probó un gradiente de temperaturas de alineación (56°C, 56.5°C, 57°C y 58°C), determinado a partir de las temperaturas de disociación de los iniciadores. Se realizó otra prueba con GoTaq® Green Master Mix de Promega con un volumen por reacción de 25 µl: 10.5 µl de GoTaq®, 12 µl de agua libre de nucleasas, 0.25 µl de cada iniciador y 2 µl de templado, se probaron las condiciones descritas por Cafiso con temperaturas de alineación de 56°C y 57°C, también se realizó una variación de 30 a 40 ciclos.

El segundo juego de iniciadores descritos por Sahab en 2012 (Cuadro 2) se probó con un volumen por reacción de 25 µl: 12.5 µl de GoTaq® Green Master Mix, 8.5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada iniciador y 2 µl de templado; las condiciones utilizadas iniciaron con 94°C por 10 min, seguidos por 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 55°C por 1 min y alineación a 72°C por un min; finalizando con 72°C por 10 min. Los productos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con 8 µl de Gel Red® por cada 100 ml sometido a 60 V durante 100 min expuesto en un transiluminador con luz UV.

### Gen *icaC*

En este caso sólo se utilizó un juego de iniciadores (Cuadro 2). Las condiciones se modificaron de Cafiso *et. al.*, 2004: la desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido por 30, 35 y 40 ciclos de 93°C por 1 min, 57°C; gradiente para la temperatura de alineación (57.5°C, 58°C y 58.7°C) por 30 seg; además se intentó 68°C por 2 min seguido por un gradiente de alineación (57°C, 57.5°C, 58°C y 58.7°C) por 1 min, y extensión final a 68°C por 10 min. Las temperaturas de alineación se probaron con una reacción de las cepas de *S. aureus* ATCC 976,

977, 1026, 29213 y la Cowan por cada temperatura. Durante la estandarización las reacciones de 25  $\mu\text{l}$  se realizaron a diferentes volúmenes de los reactivos: el reactivo GoTaq® Green Master Mix se manejó a 12.5  $\mu\text{l}$  y 10.5  $\mu\text{l}$ , el agua libre de nucleasas se manejó a 12  $\mu\text{l}$  y 10  $\mu\text{l}$ , los iniciadores se mantuvieron en 0.25  $\mu\text{l}$  y 2  $\mu\text{l}$  de templado. Para visualizar los productos, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con 8  $\mu\text{l}$  de Gel Red® por cada 100 ml sometido a 60 V durante 100 min expuesto en un transiluminador con luz UV.

### Gen *icaR*

Se utilizaron los iniciadores descritos en el Cuadro 2, se realizaron pruebas con 30 ciclos de 94°C de desnaturalización, un gradiente de temperatura de alineación desde los 53°C hasta los 56°C y extensión a 72°C, las temperaturas fueron evaluadas con tiempos de 30, 45 y 60 seg. Para el proceso de estandarización, se manejaron variaciones en el volumen de las reacciones a 15, 25 y 30  $\mu\text{l}$ ; los volúmenes de GoTaq® Green Master Mix fueron de 7.5  $\mu\text{l}$ , 12.5  $\mu\text{l}$  y 15  $\mu\text{l}$ ; del agua libre de nucleasas 5.1  $\mu\text{l}$ , 8.5  $\mu\text{l}$  y 10.2  $\mu\text{l}$ ; los iniciadores se agregaron en volúmenes de 0.6  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$ , y 1.2  $\mu\text{l}$ ; el ADN se agregó en volúmenes de 1.2  $\mu\text{l}$  y 2  $\mu\text{l}$ . Las cepas utilizadas para estas pruebas fueron *S. aureus* ATCC 976, 977, 1026, 29213, y la Cowan y se probaron cepas aisladas e identificadas como *S. epidermidis*. Se visualizaron los productos por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con 8  $\mu\text{l}$  de Gel Red® por cada 100 ml sometido a 60 V durante 100 min y expuesto en un transiluminador con luz UV.

### Gen *atfE*

Se realizaron pruebas con dos diferentes juegos de iniciadores (Cuadro 2). Se iniciaron las pruebas con las condiciones descritas por Frebourg *et al.*, 2000 y a partir de estas se realizaron modificaciones para estandarizar la reacción; se realizaron pruebas de 30 y 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 2 min, temperaturas de alineación, 55°C y 56°C por 1 min y 72°C por 2 min. Las pruebas se realizaron con reacciones de un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ : 12.5  $\mu\text{l}$  de GoTaq®

Green Master Mix, 8.5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada iniciador y 2 µl de templado.

Para los iniciadores descritos por Vandecasteele *et al.*, 2002 se programaron 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 seg, alineación a 55°C por 60 seg y 72°C por 60 seg. El volumen final de la reacción fue de 25 µl, los volúmenes de cada reactivo fueron iguales a las pruebas con los iniciadores descritos por Frebourg. Las condiciones se probaron con las cepas de *S. aureus* ATCC 976, 977, 1026, 29213 y la Cowan y *S. epidermidis* ATCC 12228. Analizando los productos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con 8 µl de Gel Red® por cada 100 ml sometido a 60 V durante 100 min expuesto en un transiluminador con luz UV.

#### Gen *bap*

El juego de iniciadores utilizados para la detección de este gen se describe en el Cuadro 2, se realizaron pruebas con 30 ciclos de 94°C por 1 min, variaciones en la temperatura de alineación probando los 52°C, 53°C, 55°C, 56°C y 62°C por 1 min; finalmente 72°C por 1 min. El volumen final de cada reacción fue de 25 µl compuestos por 12.5 µl de PCR Master Mix de Thermo Scientific, 8.5 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada iniciador y 2 µl de templado. Se usaron como control las cepas de *S. aureus* ATCC 976, 977, 1026, 29213 y la Cowan para estas pruebas. Finalmente se analizaron los productos de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 8 µl de Gel Red® por cada 100 ml y se visualizaron en un transiluminador.

**Cuadro 2 Secuencias de iniciadores para genes de serotipos capsulares y genes de producción de biopelícula utilizados para PCR punto final.**

Gen	Secuencia oligonucleótidos	Producto	Referencia
<i>cap5</i>	F- ATGACGATGAGGATAGCG	880 pb	Sayed <i>et.al.</i> , 2006
	R- CTCGGATAACACCTGTTGC		
<i>cap8</i>	F- GCGCTACAAACATTAAGCAT	217 pb	Sutter <i>et. al.</i> , 2011
	R- TTCTTAGCCTGCTGGCATC		
<i>icaA</i>	F- CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315 pb	Budri <i>et. al.</i> , 2015
	R- AAGATATAGCGATAAGTGC		
<i>icaB</i>	F- ATGGCTTAAAGCACACGACGC	526 pb	Cafiso <i>et.al.</i> , 2004
	R- TATCGGCATCTGGTGTGACAG		
	F- AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT	900 pb	Sahab <i>et. al.</i> , 2012
	R- TCTAATCTTTTTTCATGGAATCCGT		
<i>icaC</i>	F- ATCATCGTGACACACTTACTAACG	934 pb	Cafiso <i>et.al</i> 2004
	R- CTCTCTTAACATCATTCCGACGCC		
<i>icaR</i>	F- TACTGTCCTCAATAATCCCGAA	453 pb	Cafiso <i>et.al</i> 2004
	R- GGTACGATGGTACTACACTTGATG		
<i>Bap</i>	F- CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG	971 pb	Cucarella <i>et. al.</i> , 2004
	R- CTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC		
<i>atfE</i>	F- CAACTGCTCAACCGAGAACA	682 pb	Frebourg <i>et al.</i> , 2000
	R- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
	F- CAACTGCTCAACCGAGAACA	500 pb	Vandecasteele <i>et. al.</i> , 2002
	R- CATCGTTTTTCAGCGCTATCA		

### PCR múltiplex

Se estandarizó un PCR múltiplex para detectar los genes *femA*, *mecA* e *icaD* con los iniciadores descritos en el Cuadro 3 con la finalidad de identificar *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), evaluar la resistencia de las cepas de SCN obtenidas y detectar la capacidad de producción de biopelícula. La reacción se hizo a un volumen de 25.5 µl: 10.5 µl correspondían a GoTaq® Green Master Mix de Promega, 7 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cada par de

oligonucleótidos para cada gen (*icaD*, *mecA* y *femA*), a cada reacción se le agregaron 2 µl de templado. Las cepas de *S. aureus* ATCC 976, 977, 1026, 29213 y *S. aureus* Cowan fueron utilizadas como controles positivos.

El programa que fue utilizado consistía en la desnaturalización inicial por 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineación a 55.5°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg; finalmente una extensión a 72°C por 3 min. Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% utilizando bromuro de etidio, se corrió la electroforesis por 90 minutos a 80 V. Finalmente se visualizó el gel en un fotodocumentador con luz UV.

**Cuadro 3 Secuencia de iniciadores para PCR multiplex.**

Gen	Secuencia oligonucleótidos	Producto	Referencia
<b>femA</b>	F-AAAAAAGCACATAACAAGCG	132	Majumder <i>et. al.</i> , 2014
	R- GATAAAGAAGAAACGAGCAG		
<b>icaD</b>	F- AAACGTAAGAGAGGTGG	381	Budri <i>et. al</i> 2015
	R- GGCAATATGATCAAGATAC		
<b>mecA</b>	F- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533	López <i>et.al.</i> , 2015
	R- AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		

### **Análisis estadístico**

Para el ensayo de adherencia en placa, se llevó a cabo la prueba de normalidad con los datos obtenidos en la espectrofotometría, posteriormente con un análisis de varianza se determinó si existían diferencia entre los datos obtenidos para cada cepa, los controles positivos y el control negativo, y finalmente se realizó una comparación con el método de Tukey (Ducoing, 2016) para identificar los grupos con diferencias significativas y clasificarlas como productoras de biopelícula.

Para el ensayo de adherencia en tubo, se realizó la prueba de correlación de Spearman (Lizama *et al.*, 2014) para asociar aquellas cepas que se clasificaron

como productoras de biopelícula en la prueba de adherencia en placa con los resultados observados de manera cualitativa en la prueba de adherencia en tubo.

Para asociar la producción de la biopelícula con la capacidad de producir DNAsa, fosfatasa, ureasa, gelatinasa, caseinasa, lecitinasa y lipasa; se realizó la prueba de distribución Chi cuadrada (Ducoing, 2016).

## RESULTADOS

### Aislamiento e identificación

Se aislaron en total 54 cepas de *Staphylococcus* de las cuales se identificaron 13 especies diferentes del género. Las 13 especies identificadas fueron: *S. aureus* (n=22), *S. sciuri* (n=8), *S. intermedius* (n=4), *S. xylosus* (n=4), *S. epidermidis* (n=3), *S. saprophyticus* (n=3), *S. chromogenes* (n=3), *S. simulans* (n=2), *S. lugdunensis* (n=1), *S. capitis* (n=1), *S. hyicus* (n=1), *S. haemolyticus* (n=1) y *S. cohnii* (n=1).

### Factores de virulencia

#### Ureasa y fosfatasa

El 66.6% (36/54) de las cepas presentaron la enzima ureasa. De las 36 que resultaron positivas 19/22 (86.36%) fueron *S. aureus* y 17/32 (53.12%) SCN. El 49.30% (25/54) de las cepas resultaron positivas a fosfatasa. De estas 8/22 (36.36%) fueron *S. aureus* y 17/32 (53.12%) SCN (Figura 4).

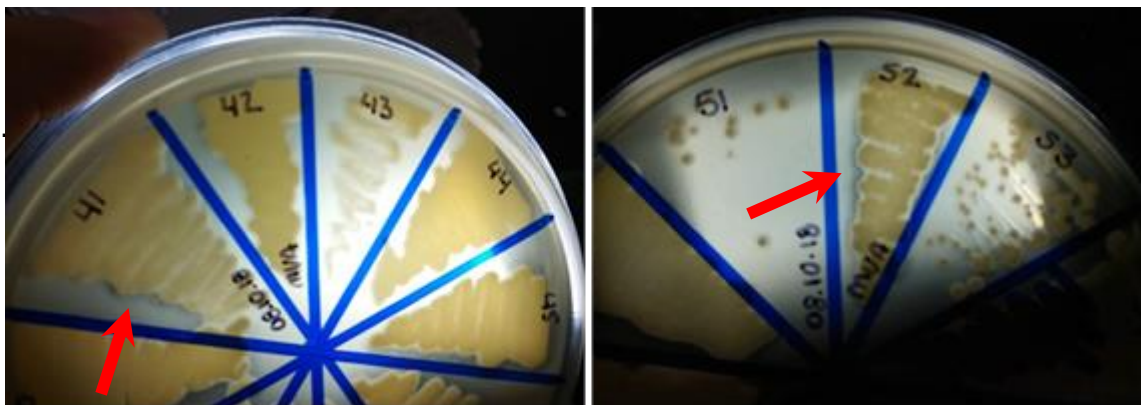


Figura 4 Pruebas de ureasa y fosfatasa en microsistema de identificación ApiStaph

#### Lecitinasa

En la prueba de lecitinas se detectó que el 75.92% (41/54) de las cepas presentan la actividad enzimática. De las 41 cepas que resultaron positivas, 19 (86.36%) fueron identificadas como *S. aureus* y 22 (68.75%) SCN, las cepas de *S. aureus* Cowan, ATCC 976, ATCC 997 y ATCC 1026 resultaron positivas a la

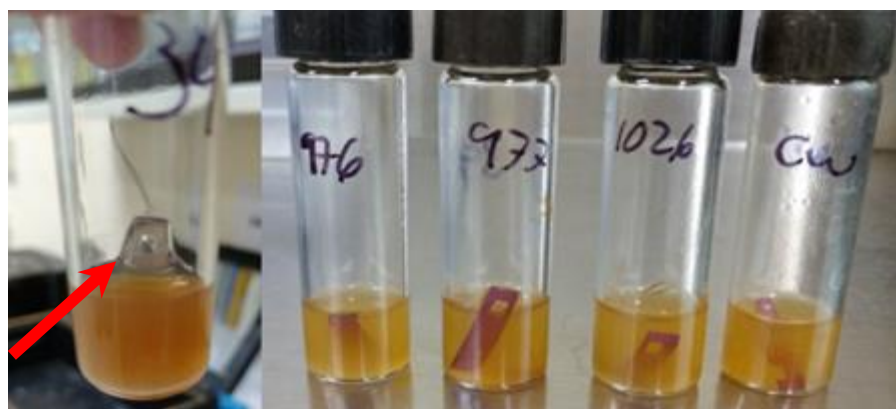
enzima lecitinasa. En la Figura 5 las flechas señalan el halo transparente que indica la actividad de la enzima lecitinasa.



**Figura 5 Cepas de *Staphylococcus* spp. lecitinasa positivas.**

### Gelatinasa

En la prueba de gelatinasa sólo dos cepas resultaron positivas; una cepa de *S. aureus* y otra de *S. chromogenes*, las cepas de *S. aureus* Cowan, *S. aureus* ATCC 976, ATCC 997 y ATCC 1026 resultaron negativas a gelatinasa. En la Figura 6 la flecha señala la actividad de la enzima gelatinasa sobre la película fotográfica, esta cepa fue identificada como *S. chromogenes*, a la derecha se observan las cepas de *S. aureus* ATCC que resultaron negativas a la producción de esta enzima.

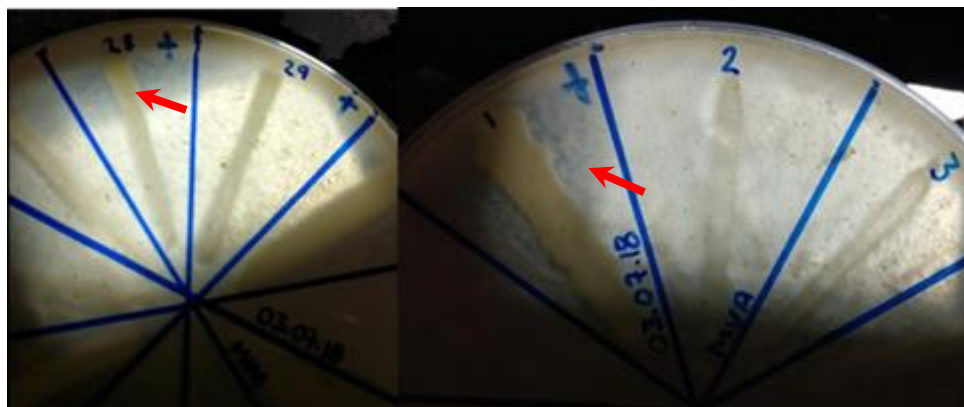


**Figura 6 Cepa de *S. chromogenes* positiva a gelatinasa,**



## Caseinasa

En la prueba de detección de caseinasa, el 20.37% (11/54) de las cepas resultaron positivas. Se observa en la Figura 7, señalados los halos transparentes indicativos de la producción de la enzima caseinasa. De las 11 cepas que presentan la enzima, 4 (18.18%) se identificaron como *S. aureus*, mientras que 7 (21.88%) se identificaron como SCN. Las cepas de *S. aureus* Cowan, ATCC 976, ATCC 997 y ATCC 1026 resultaron negativas a caseinasa.



**Figura 7 Cepas de *Staphylococcus* spp positivas a la prueba de caseína**

## Lipasa

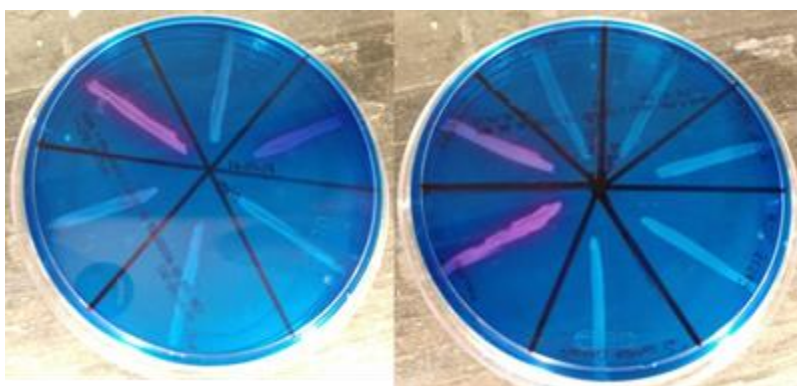
En la prueba de lipasa, el 18.5% (10/54) de las cepas resultaron positivas, de las 10 cepas que resultaron positivas el 8/22 (36.36%) fueron *S. aureus* y 2/32 (6.25%) SCN; las cepas de *S. aureus* Cowan, ATCC 976, ATCC 1026 y ATCC 29213 produjeron la enzima lipasa. En la Figura 8, están señalados los halos opacos alrededor de las colonias, estos son indicativos de la producción de la enzima lipasa.



**Figura 8 Cepas de *S. aureus* positivas a lipasa.**

## DNAsa

El 33.33% (18/54) cepas resultaron positivas a la producción de la termonucleasa; en la Figura 9, se observa la coloración rosada que toman las colonias de las cepas productoras de esta enzima. De todas las productoras, 5/22 (22.72%) fueron identificadas como *S. aureus* y 12/32 (37.5%) se identificaron como SCN. Ninguna de las cepas de *S. aureus* Cowan o ATCC produjo la enzima termonucleasa, sin embargo, la cepa control de SCN aislada a partir de una infección en un canino resultó positiva a la producción de esta enzima.



**Figura 9 Cepas de *Staphylococcus* spp positivas a termonucleasa.**

En el Cuadro 4 se presenta el resumen de los resultados de la producción de enzimas en cada cepa de *Staphylococcus* incluida en el estudio.

En el Cuadro 5 se presentan por especie, las pruebas de identificación y los factores de virulencia de cada una de las 54 cepas de *Staphylococcus* aisladas.

**Cuadro 4 Producción de enzimas por especie de *Staphylococcus*.**

<b>Especie</b>	<b>DNAsa</b>	<b>Fosfatasa</b>	<b>Ureasa</b>	<b>Gelatinasa</b>	<b>Caseinasa</b>	<b>Lecitinasa</b>	<b>Lipasa</b>
<b><i>S. aureus</i></b>	5/22 (22.7%)	8/22 (36.4%)	19/22 (86.4%)	1/22 (4.5%)	4/22 (18.2%)	19/22 (86.4%)	8/22 (36.4%)
<b><i>S. capitis</i></b>	-	-	-	-	1/1 (100%)	1/1 (100%)	-
<b><i>S. chromogenes</i></b>	2/3 (66.7%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/3 (33.3%)	-	2/3 (66.7%)	-
<b><i>S. cohnii cohnii</i></b>	-	-	-	-	-	1/1 (100%)	-
<b><i>S. epidermidis</i></b>	1/3 (33.3%)	2/3 (66.7%)	3/3 (100%)	-	1/3 (33.3%)	-	-
<b><i>S. haemolyticus</i></b>	-	1/1 (100%)	-	-	-	-	-
<b><i>S. hyicus</i></b>	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	-	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
<b><i>S. intermedius</i></b>	2/4 (50%)	4/4 (100%)	4/4 (100%)	-	2/4 (50%)	3/4 (75%)	-
<b><i>S. lugdunensis</i></b>	-	-	-	-	-	1/1 (100%)	-
<b><i>S. saprophyticus</i></b>	-	-	2/3 (66.7%)	-	-	2/3 (66.7%)	1/3 (33.3%)
<b><i>S. sciuri</i></b>	4/8 (50%)	4/8 (50%)	-	-	1/8 (12.5%)	7/8 (87.5%)	-
<b><i>S. simulans</i></b>	1/2 (50%)	-	2/2 (100%)	-	-	1/2 (50%)	-
<b><i>S. xylosus</i></b>	1/4 (25%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	-	1/4 (25%)	3/4 (75%)	-

**Cuadro 5** Identificación bioquímica y producción de factores de virulencia por las 54 cepas de *Staphylococcus* aisladas

ID	Especie	Cat	Oxi	Coa	OF	DNAsa	F	Ure	Gel	Cas	Lec	Lip
CW	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	+
1	<i>S. intermedius</i>	+	-	+	Ferm	+	+	+	-	+	+	-
2	<i>S. intermedius</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	-
3	<i>S. intermedius</i>	+	-	+	Ferm	+	+	+	-	-	+	-
4	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	Ferm	+	-	+	-	-	-	-
5	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	+	+	+	-	+	+	-
6	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	+	+	+	+	+	+	-
7	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	+	+	+	-	+	+	-
8	<i>S. simulans</i>	+	-	-	Ferm	+	-	+	-	-	-	-
9	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
10	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	-	-	-	-	-	+	-
11	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	-	-	-	+	-
12	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	-	+	-	-	-	+	-
13	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	-	+	-	-	+	+	-
14	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	+	-	-	-	-	+	-
15	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
16	<i>S. lugdunensis</i>	+	-	-	Ferm	-	-	-	-	-	+	-
17	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	+	-	-	-	-	+	-
18	<i>S. capitis</i>	+	-	-	Ferm	-	-	-	-	+	+	-
19	<i>S. saprophyticus</i>	+	-	-	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
20	<i>S. xylosus</i>	+	-	-	Ferm	-	-	-	-	-	+	-
21	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	+	-	-	-	-	+	-
22	<i>S. saprophyticus</i>	+	-	-	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
23	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	+	-	-	-	-	+	-
24	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	+	+	-	-	-	+	-

• Cat: catalasa, Oxi: oxidasa, Coa: coagulasa en tubo, OF: Óxido-fermentación, DNAsa, F: fosfatasa, Ure: ureasa, Gel: gelatinasa, Cas: caseinasa, Lec: Lecitinasas, Lip: lipasa.

Cont. Cuadro 5

ID	Especie	Cat	Oxi	Coa	OF	DNAsa	F	Ure	Gel	Cas	Lec	Lip
25	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	+
26	<i>S. xylosum</i>	+	-	-	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
27	<i>S. chromogenes</i>	+	-	-	Ferm	+	+	+	-	-	+	-
28	<i>S. hyicus</i>	+	-	-	Ferm	+	+	+	-	+	+	+
29	<i>S. xylosum</i>	+	-	-	Ferm	+	+	+	-	+	+	-
30	<i>S. intermedius</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	+	-	-
31	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	+	+	+	-	+	+	-
32	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	-
33	<i>S. chromogenes</i>	+	-	-	Ferm	-	+	+	-	-	-	-
34	<i>S. chromogenes</i>	+	-	-	Ferm	+	+	+	+	-	+	-
35	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	Ferm	-	+	+	-	-	-	-
36	<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	Ferm	-	+	+	-	+	-	-
37	<i>S. xylosum</i>	+	-	-	Ferm	-	+	-	-	-	-	-
38	<i>S. sciuri</i>	+	-	-	Ferm	-	+	-	-	-	-	-
39	<i>S. haemolyticus</i>	+	-	-	Ferm	-	+	-	-	-	-	-
40	<i>S. saprophyticus</i>	+	-	-	Ferm	-	-	-	-	-	-	+
41	<i>S. simulans</i>	+	-	-	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
42	<i>S. cohnii cohnii</i>	+	-	-	Ferm	-	-	-	-	-	+	-
43	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
44	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	-	+
45	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
46	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	+
47	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	+

- Cat: catalasa, Oxi: oxidasa, Coa: coagulasa en tubo, OF: Óxido-fermentación, DNAsa, F: fosfatasa, Ure: ureasa, Gel: gelatinasa, Cas: caseinasa, Lec: Lecitinasa, Lip: lipasa.

Cont. Cuadro 5

ID	Especie	Cat	Oxi	Coa	OF	DNAsa	F	Ure	Gel	Cas	Lec	Lip
48	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	-
49	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	+
50	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	-	-	-	+	+
51	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	-	+
52	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	-	-
53	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	-	+	-	-	+	+
54	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	-
976	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	+
977	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	-
1026	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	-	+	+
29213	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	-	+	+	-	+	+	+
Mimi	<i>S. aureus</i>	+	-	+	Ferm	+	+	+	-	-	-	-
Prague	SCN	+	-	-	Ferm	+	-	-	-	-	-	-

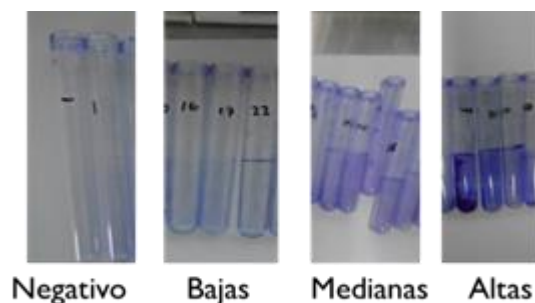
- Cat: catalasa, Oxi: oxidasa, Coa: coagulasa en tubo, OF: Óxido-fermentación, DNAsa, F: fosfatasa, Ure: ureasa, Gel: gelatinasa, Cas: caseinasa, Lec: Lecitinasas, Lip: lipasa.

## Prueba de adherencia en tubo

Se detectaron cepas altas, medianas, bajas y no productoras de biopelícula según la intensidad de la coloración de la pared de los tubos (Figura 10). De las 54 cepas, en la primera repetición el 87% (47/54) produjeron biopelícula, 13 se clasificaron como altas productoras de biopelícula de las cuales 11 fueron *S. aureus* y 2 SCN. Se identificaron 19 cepas como medianas productoras de las cuales 6 fueron *S. aureus* y 13 SCN. En cuanto a las bajas productoras, se identificaron 15 cepas de las cuales 4 fueron *S. aureus* y 11 SCN. Sólo 7 cepas se clasificaron como no productoras de las cuales 1 se identificó como *S. aureus* y 6 como SCN.

En la segunda repetición de la prueba de adherencia en tubo el 92.5% (50/54) de las cepas produjeron biopelícula, de estas 16 cepas se clasificaron como altas productoras, de las cuales 9 fueron *S. aureus* y 7 SCN. Se identificaron como medianas productoras 16 cepas de las cuales 5 fueron *S. aureus* y 11 SCN. Como bajas productoras se identificaron 18 cepas, de las anteriores, 7 fueron *S. aureus* y 11 SCN.

Los resultados de la tercera repetición destacan ya que el 100% de las cepas resultaron productoras de biopelícula. En total, 24 cepas resultaron altas productoras; 11 corresponden a *S. aureus* y 13 a SCN. Las medianas productoras fueron en total 22, de estas 9 fueron *S. aureus* y 13 SCN. Por último, 8 cepas en total se clasificaron como bajas productoras, de estas 2 fueron *S. aureus* y 6 corresponden a SCN (Cuadro 6).



**Figura 10** Clasificación de producción de biopelícula en la prueba de adherencia en tubo.

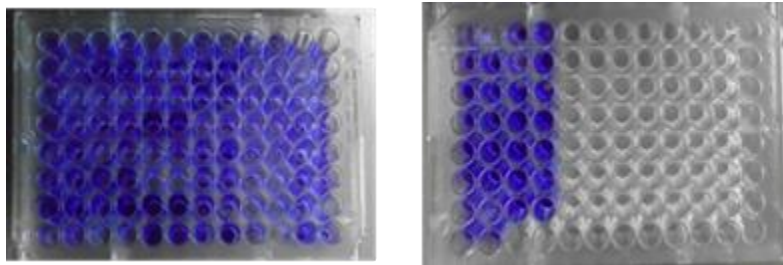
**Cuadro 6 Clasificación de la producción de biopelícula en la prueba de adherencia en tubo**

	1° repetición		2° repetición		3° repetición	
	<i>S. aureus</i>	SCN	<i>S. aureus</i>	SCN	<i>S. aureus</i>	SCN
<b>Altas</b>	11/22 (50%)	2/32 (6.25%)	9/22 (40.90%)	7/32 (21.87%)	11/22 (50%)	13/32 (40.62%)
<b>Medianas</b>	6/22 (27.27%)	13/32 (40.63%)	5/22 (22.73%)	11/32 (34.38%)	9/22 (40.90%)	13/32 (40.62%)
<b>Bajas</b>	4/22 (18.18%)	11/32 (34.37%)	7/22 (31.82%)	11/32 (34.38%)	2/22 (9.09%)	6/32 (18.75%)
<b>TOTAL</b>	<b>21/22 (94.45%)</b>	<b>26/32 (81.25%)</b>	<b>21/22 (94.45%)</b>	<b>29/32 (90.62%)</b>	<b>22/22 (100%)</b>	<b>32/32 (100%)</b>
<b>Negativo</b>	1/22 (4.54%)	6/32 (18.75%)	1/22 (4.54%)	3/32 (9.37%)	0/22	0/32



### **Prueba de adherencia en placa**

Se obtuvieron en total seis lecturas de absorbancia para cada cepa en la prueba de adherencia en placa (Figura 11). Para determinar si las cepas fueron capaces de producir biopelícula, se promediaron las seis absorbancias obtenidas por cada cepa. En el Cuadro 7 se observa que el 100% de las cepas tienen un promedio de absorbancia mayor que el del control negativo, con esta información se determinó que las el 100% de las cepas tienen la capacidad de producir biopelícula.



**Figura 11 Placa teñida con cristal violeta al 0.1%.**

**Cuadro 7 Promedio de absorbancias obtenidas en la prueba de adherencia en placa.**

Identificación	Especie	Absorbancia	Identificación	Especie	Absorbancia
<b>Cowan</b>	<i>S. aureus</i>	0.602	<b>31</b>	<i>S. aureus</i>	0.224
<b>1</b>	<i>S. intermedius</i>	0.271	<b>32</b>	<i>S. aureus</i>	0.477
<b>2</b>	<i>S. intermedius</i>	0.321	<b>33</b>	<i>S. chromogenes</i>	0.376
<b>3</b>	<i>S. intermedius</i>	0.451	<b>34</b>	<i>S. chromogenes</i>	0.329
<b>4</b>	<i>S. epidermidis</i>	0.439	<b>35</b>	<i>S. epidermidis</i>	0.359
<b>5</b>	<i>S. aureus</i>	0.569	<b>36</b>	<i>S. epidermidis</i>	0.160
<b>6</b>	<i>S. aureus</i>	0.561	<b>37</b>	<i>S. xylosum</i>	0.144
<b>7</b>	<i>S. aureus</i>	0.521	<b>38</b>	<i>S. sciuri</i>	0.117
<b>8</b>	<i>S. simulans</i>	0.345	<b>39</b>	<i>S. haemolyticus</i>	0.261
<b>9</b>	<i>S. aureus</i>	0.637	<b>40</b>	<i>S. saprophyticus</i>	0.227
<b>10</b>	<i>S. sciuri</i>	0.898	<b>41</b>	<i>S. simulans</i>	0.180
<b>11</b>	<i>S. aureus</i>	0.258	<b>42</b>	<i>S. cohnii cohnii</i>	0.253
<b>12</b>	<i>S. sciuri</i>	0.507	<b>43</b>	<i>S. aureus</i>	0.269
<b>13</b>	<i>S. sciuri</i>	0.442	<b>44</b>	<i>S. aureus</i>	0.632
<b>14</b>	<i>S. sciuri</i>	0.389	<b>45</b>	<i>S. aureus</i>	0.447
<b>15</b>	<i>S. aureus</i>	0.392	<b>46</b>	<i>S. aureus</i>	0.744
<b>16</b>	<i>S. lugdunensis</i>	0.238	<b>47</b>	<i>S. aureus</i>	0.436
<b>17</b>	<i>S. aureus</i>	0.272	<b>48</b>	<i>S. aureus</i>	0.710
<b>18</b>	<i>S. capitis</i>	0.410	<b>49</b>	<i>S. aureus</i>	0.747
<b>19</b>	<i>S. saprophyticus</i>	0.255	<b>50</b>	<i>S. aureus</i>	0.629
<b>20</b>	<i>S. xylosum</i>	0.456	<b>51</b>	<i>S. aureus</i>	0.307
<b>21</b>	<i>S. sciuri</i>	0.213	<b>52</b>	<i>S. aureus</i>	0.639
<b>22</b>	<i>S. saprophyticus</i>	0.205	<b>53</b>	<i>S. aureus</i>	0.400
<b>23</b>	<i>S. sciuri</i>	0.322	<b>54</b>	<i>S. aureus</i>	0.337
<b>24</b>	<i>S. sciuri</i>	0.330	<b>ATCC 976</b>	<i>S. aureus</i>	0.247
<b>25</b>	<i>S. aureus</i>	0.406	<b>ATCC 977</b>	<i>S. aureus</i>	0.349
<b>26</b>	<i>S. xylosum</i>	0.321	<b>ATCC 1026</b>	<i>S. aureus</i>	0.375
<b>27</b>	<i>S. chromogenes</i>	0.457	<b>ATCC 29213</b>	<i>S. aureus</i>	0.665
<b>28</b>	<i>S. hyicus</i>	0.205	<b>Mimi</b>	<i>S. aureus</i>	0.758
<b>29</b>	<i>S. xylosum</i>	0.357	<b>Prague</b>	SCN	0.663
<b>30</b>	<i>S. intermedius</i>	0.462	<b>Control negativo</b>		<b>0.095*</b>

\*El promedio de absorbancia del control negativo es menor al del resto de las cepas.

## Susceptibilidad antimicrobiana

**Método Kirby Bauer:** En el Cuadro 8 se observan a detalle los porcentajes de resistencia de las cepas aisladas de *S. aureus* y SCN a diferentes antimicrobianos (Figura 12). La resistencia a ampicilina es la que más se presenta, ya que el 100% (22/22) y 93.75% (30/32) de las cepas de *S. aureus* y SCN respectivamente resultaron resistentes a este antimicrobiano. La resistencia a dicloxacilina y penicilina se presentó en un porcentaje de resistencia similar, los *S. aureus* resultaron resistentes en un 77.27% (17/22) y 72.72% (16/22) respectivamente, mientras que los SCN resultaron con porcentajes de resistencia a la dicloxacilina de 68.5% (22/32) y a penicilina de 56.25% (18/32). Por otro lado, el antimicrobiano al que se presentó menor resistencia fue vancomicina, ya que las 22 cepas de *S. aureus* y 31 cepas identificadas como SCN resultaron sensibles a este antimicrobiano. En el Cuadro 8 se describe la resistencia presentada por cada una de las cepas de *S. aureus* ATCC y la Cowan.



**Figura 12 Susceptibilidad a antimicrobianos, método Kirby Bauer.**

**Oxacilina:** En la Figura 13 se observa la resistencia a oxacilina en la prueba de difusión de disco. Se evaluaron todas cepas aisladas. El 100% de las cepas de *S. aureus* resultaron resistentes, en el caso de los SCN el 96.87% resultó resistente; sólo una cepa identificada como *S. epidermidis* resultó sensible. Las cepas de *S. aureus* Cowan, ATCC 976, ATCC 997 y ATCC 1026 resultaron resistentes a la oxacilina.

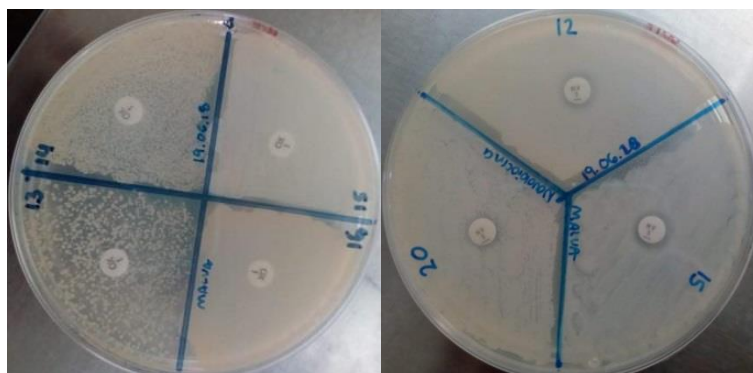
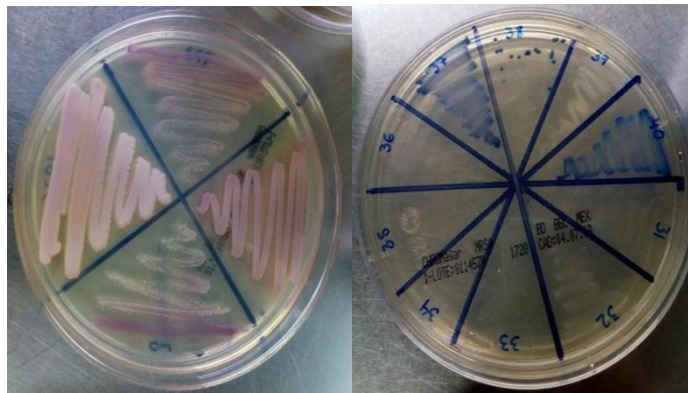


Figura 13 *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina.

Cuadro 8 Porcentaje de resistencia de *S. aureus* y SCN a diferentes antimicrobianos.

Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> 22 cepas	SCN 32 cepas	ATCC Cowan	ATCC 976	ATCC 977	ATCC 1026
Tetraciclina	18.18%	37.5%				
Ampicilina	<b>100%</b>	<b>93.75%</b>	R	R	R	R
Cefalotina	9.09%	18.75%				R
Cefotaxima	36.36%	34.37%		R		R
Dicloxacilina	77.27%	68.75%		R	R	R
Ciprofloxacina	9.09%	9.38%				R
Clindamicina	13.63%	31.25%				R
Eritromicina	9.09%	18.75%		R	R	R
Gentamicina	4.54%	15.62%				R
Vancomicina	0%	3.12%				
Penicilina	72.72%	56.25%		R	R	R
Trimetoprim/Sulfametoxazol	9.09%	9.38%				R
Oxacilina	<b>100%</b>	<b>96.87%</b>	R	R	R	R

**Resistencia a meticilina en cromoagar:** De las 54 cepas que se evaluaron, en el 30% (16/54) se pudo observar una coloración rosa o azul (Figura 14), indicando que son resistentes a la meticilina. De las 16 cepas que presentaron esta coloración, se identificaron 4 cepas de *S. aureus*, 3 de *S. sciuri*, 3 de *S. xylosus*, 2 de *S. intermedius*, 2 de *S. epidermidis*, 1 *S. saprophyticus* y 1 *S. capitis*. Las cepas de *S. aureus* Cowan, ATCC 976, ATCC 997 y ATCC 1026 presentaron una coloración rosa indicativa de resistencia a meticilina.



**Figura 14** Agar cromogénico para evaluar resistencia a meticilina. Cepas de *S. aureus* y SCN con coloración rosa y azul indicativos de resistencia a meticilina.

## **Análisis estadístico**

A pesar de que en la prueba de adherencia en tubo se pudo observar que la mayoría de las cepas fueron productoras de biopelícula. El análisis de varianza y la prueba de comparación de Tukey demuestran que únicamente en 39 cepas, los valores de absorbancia obtenidos son significativamente diferentes al obtenido para el control negativo. Las cepas ATCC 977 y ATCC 29213 fueron significativamente diferentes al control negativo. En el Cuadro 9 se observan marcadas con un asterisco las cepas cuya diferencia fue significativa en comparación al control negativo con una significancia del 0.05.

En el Cuadro 10 se muestra que existe una correlación entre la prueba de adherencia en placa y la prueba de adherencia en tubo ya que el valor de Rho de Spearman es de 0.65 con un nivel de significancia del 0.01.

Para evaluar si los factores de virulencia que se presentaron en las cepas que resultaron significativamente diferentes al control negativo en la prueba de adherencia en placa, se realizó la prueba de Chi cuadrada, esta mostró que hay una diferencia significativa entre las cepas que producen la enzima lecitinasa y las cepas productoras de biopelícula, sin embargo, para el resto de los factores no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 11).

**Cuadro 9 Análisis de varianza y Tukey de adherencia en placa**

ID	Media	D.E	ID	Media	D.E
<b>Cowan</b>	0.56133*	0.142114	<b>31</b>	0.32467*	0.032
<b>1</b>	0.29433	0.140628	<b>32</b>	0.33867*	0.048
<b>2</b>	0.66900*	0.090813	<b>33</b>	0.36533*	0.022
<b>3</b>	0.52200*	0.020224	<b>34</b>	0.07033	0.023
<b>4</b>	0.65433*	0.197216	<b>35</b>	0.13233	0.01
<b>5</b>	0.41300*	0.076269	<b>36</b>	0.138	0.024
<b>6</b>	0.60633*	0.061232	<b>37</b>	0.136	0.039
<b>7</b>	0.339	0.044034	<b>38</b>	0.159	0.026
<b>8</b>	0.35533	0.046361	<b>39</b>	0.13667	0.022
<b>9</b>	0.78100*	0.06691	<b>40</b>	0.169	0.013
<b>10</b>	1.12800*	0.32212	<b>41</b>	0.19733	0.025
<b>11</b>	0.55967*	0.039004	<b>42</b>	0.24233*	0.03
<b>12</b>	0.74267*	0.022234	<b>43</b>	0.28133*	0.086
<b>13</b>	0.61667*	0.088081	<b>44</b>	0.22567	0.041
<b>14</b>	0.58467*	0.081445	<b>45</b>	0.67333*	0.016
<b>15</b>	0.66433*	0.024583	<b>46</b>	0.64700*	0.03
<b>16</b>	0.156	0.030512	<b>47</b>	0.27800*	0.011
<b>17</b>	0.61133*	0.070939	<b>48</b>	0.94733*	0.169
<b>18</b>	0.57433*	0.074895	<b>49</b>	0.52367*	0.054
<b>19</b>	0.38233*	0.02203	<b>50</b>	0.60567*	0.025
<b>20</b>	0.93333*	0.07684	<b>51</b>	0.26667*	0.012
<b>21</b>	0.36733*	0.053144	<b>52</b>	0.50967*	0.022
<b>22</b>	0.28733	0.071675	<b>53</b>	0.55267*	0.018
<b>23</b>	0.38933*	0.010017	<b>54</b>	0.33000*	0.036
<b>24</b>	0.38833*	0.007095	<b>ATCC 976</b>	0.14367	0.033
<b>25</b>	0.33533	0.032146	<b>ATCC 977</b>	0.40667*	0.073
<b>26</b>	0.34067*	0.037	<b>ATCC 1026</b>	0.14067	0.035
<b>27</b>	0.55333*	0.031	<b>ATCC 29213</b>	0.74433*	0.038
<b>28</b>	0.30700*	0.022	<b>Mimi</b>	0.56500*	0.025
<b>29</b>	0.41833*	0.166	<b>Prague</b>	0.44867*	0.032
<b>30</b>	0.43400*	0.05	<b>Control Negativo</b>	0.05567	0.005

<b>Cuadro 10 Correlación entre las pruebas de adherencia de tubo y placa.</b>				
			<b>Placa</b>	<b>Tubo</b>
<b>Rho de Spearman</b>	<b>Placa</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	<b>1</b>	<b>0.658*</b>
		<b>Sig. (bilateral)</b>	<b>.</b>	<b>0.004</b>
		<b>N</b>	<b>336</b>	<b>336</b>
	<b>Tubo</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	<b>0.658*</b>	<b>1</b>
		<b>Sig. (bilateral)</b>	<b>0.004</b>	<b>.</b>
		<b>N</b>	<b>336</b>	<b>336</b>
<b>* Nivel de significancia de 0.01</b>				
<b>* Nivel de significancia de 0.05</b>				

**Cuadro 11 Asociación de producción de biopelícula y factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus aureus* y SCN**

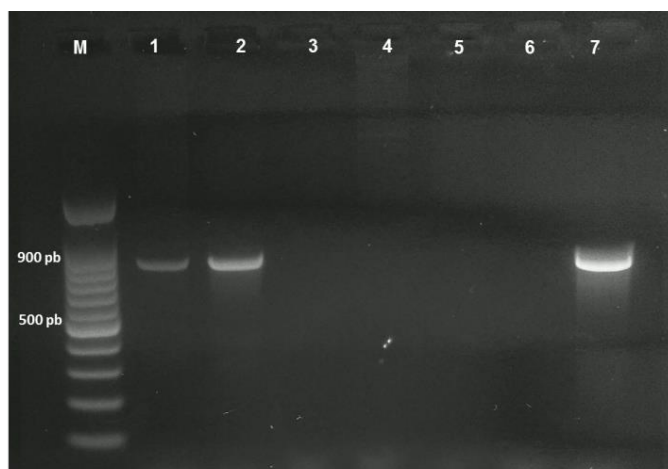
	<b>Formación de biopelícula</b>			
	<b>No Significante</b>		<b>Significancia</b>	
	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
Lipasa	14	5	31	9
Lecitinasa	9	10	4	<b>36*</b>
Caseinasa	16	3	31	9
Gelatinasa	18	1	39	1
Ureasa	5	14	13	27
Fosfatasa	7	12	22	18
DNAsa	15	4	27	13
<b>* Nivel de significancia de 0.05 prueba de Chi Cuadrada</b>				



**Detección de serotipos capsulares, genes de producción de biopelícula y genes de resistencia a antimicrobianos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Serotipos capsulares (*cap5* y *cap8*)

El 23.2% (13/56) de las cepas de *Staphylococcus* aisladas presentaron el gen *cap5* (Figura 15). De las cepas identificadas como *S. aureus* el 45.5% (10/22) fueron positivas a la presencia de *cap5*, por otra parte, sólo el 9.4% (3/32) de los SCN aislados presentaron el gen, estas tres cepas se identificaron como *S. intermedius*, *S. haemolyticus* y *S. simulans* (Cuadro 12).

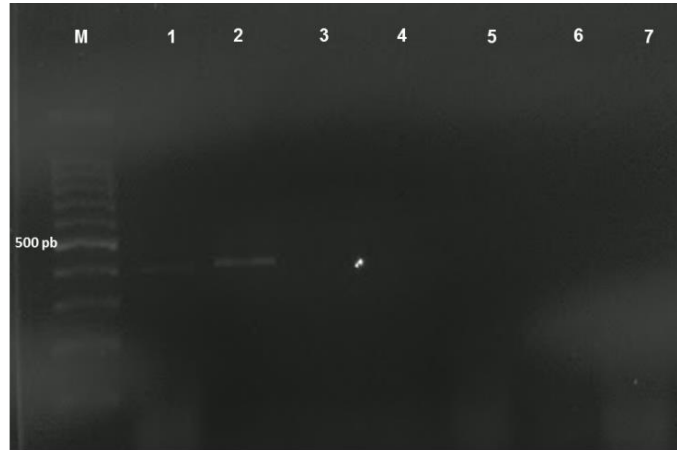


Carril M: marcador peso molecular, carril 1: control positivo *S. aureus* Cowan, carril 2: *S. aureus*, carriles 3 a 6 cepas de *Staphylococcus* spp., carril 7: *S. intermedius*

**Figura 15 Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con Red Gel que muestra los productos de PCR para detección del gen *cap5*.**

En el caso del gen *cap8*, no se obtuvieron bandas del peso especificado por Sutter *et al.*, 2011, sin embargo, en múltiples repeticiones las cepas de *S. aureus* ATCC 977 y ATCC 25923 presentaron una banda de un peso molecular de 400 pb aproximadamente (Figura 16), tomando en cuenta esto se realizó el PCR con las cepas aisladas a partir de los casos de mastitis bovina esperando que llegaran a

presentar la misma banda y poder enviar a secuenciar el producto de PCR. Ninguna de las cepas aisladas presentó alguna banda.

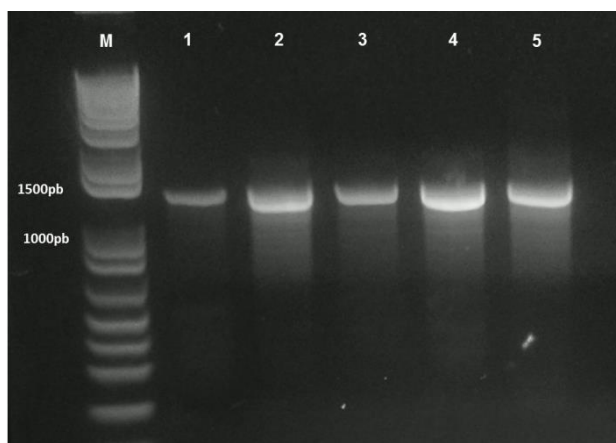


Carril M: marcador peso molecular, carril 1: control positivo *S. aureus* ATCC 977, carril 2: control positivo *S. aureus* ATCC 25923, carriles 3 a7 cepas de *Staphylococcus* spp.

**Figura 16 Fotografía del gel de agarosa al 2% teñido con Red Gel que muestra los productos de PCR para detección de gen *cap8*.**

### Gen *icaA*

Del total de las cepas de *Staphylococcus* spp. 28.6% (16/54) presentaron el gen *icaA* (Figura 17). Respecto a las cepas de *S. aureus* aisladas, 63.6% (14/22) resultaron positivas a la presencia del gen *icaA*, mientras que el 6.25% (2/32) de los SCN lo presentaron (Cuadro 12). Las dos cepas de SCN que contaron con este gen se identificaron como *S. intermedius* y *S. simulans*. En 4 cepas de *S. aureus* se observó la presencia del gen *icaA* junto al gen *icaD*, ninguna de las cepas de SCN que presentaron el gen *icaA* contaron con la presencia del gen *icaD*.



Carril M: marcador peso molecular, carril 1: control positivo *S. aureus* Cowan, carril 2 a 5 *S. aureus* de campo.

**Figura 17** Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñido con Red Gel que muestra los productos de PCR gen *icaA* en *S. aureus*.

### Genes *icaB*, *icaC*, *icaR*, *atlE* y *bap*

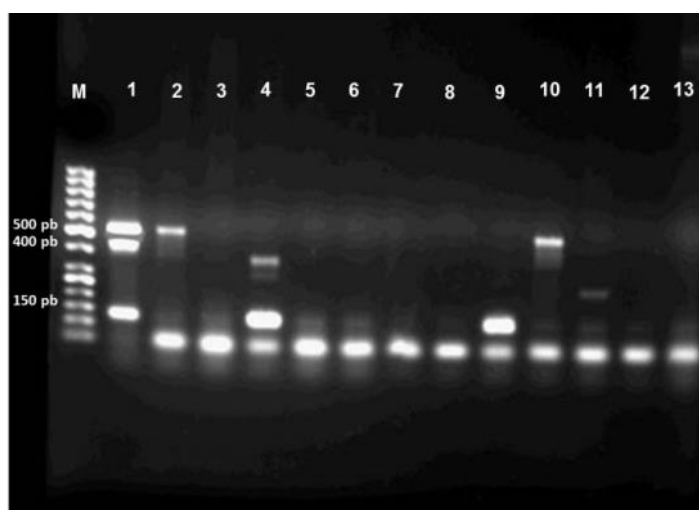
En las pruebas realizadas con estos genes no se obtuvieron resultados favorables a pesar de haber diversificado las condiciones de PCR, las concentraciones de los reactivos y volumen de los mismos, así como del ADN obtenido de las cepas aisladas a partir de casos de mastitis bovina. Hubo resultados variados entre bandas de pesos diferentes a los que se encontraron en la literatura, así como amplificación de múltiples bandas en una sola cepa. Se planteó la secuenciación de las bandas que se obtuvieran con regularidad, sin embargo, para este trabajo no fue posible realizarlo.

**Cuadro 12** Resultados PCR punto final por especies de *Staphylococcus* aislados de mastitis bovina.

	Gen <i>icaD</i>	Gen <i>icaA</i>	Gen <i>icaAD</i>	Gen <i>cap5</i>
<b><i>S. aureus</i> n=22</b>	6	14	4	10
<b><i>S. sciuri</i> n=8</b>	1	-	-	-
<b><i>S. intermedius</i> n=4</b>	1	1	-	1
<b><i>S. simulans</i> n=2</b>	-	1	-	1
<b><i>S. haemolyticus</i> n=1</b>	-	-	-	1

## PCR múltiplex

En el Cuadro 13 se observa que de las 22 cepas aisladas de *S. aureus* únicamente el 9% presentó el gen *mecA* indicativo de la resistencia a meticilina, sin embargo el 81% presentó el gen *femA* indicando la capacidad de expresar la resistencia a meticilina y por último el 27.2% resultó positivo al gen *icaD* mostrando tener la capacidad de producir biopelícula mediante el mecanismo regulado por el operón *ica*. En el caso de los SCN, el 9% de las cepas presentaron el gen *mecA*, el 28% el gen *femA* y el 6% presentó el gen *icaD* (Figura 18).



Carril M: marcador peso molecular, carril 1: control positivo *S. aureus* ATCC 976, carriles 2 a 13 cepas de *Staphylococcus* spp.

**Figura 18** Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de PCR múltiplex para detección de genes *mecA*, *femA* e *icaD*.

**Cuadro 13** Resultados de PCR multiplex en *S. aureus* y SCN aislados de mastitis bovina.

	Gen <i>mecA</i>	Gen <i>femA</i>	Gen <i>icaD</i>
<b><i>S. aureus</i> (n= 22)</b>	2 (9%)	18 (81%)	6 (27.2%)
<b>SCN (n=32)</b>	3 (9%)	9 (28%)	2 (6%)

## DISCUSIÓN

El reporte de aislamiento de SCN a partir de casos de mastitis bovina, principalmente en la presentación subclínica, ha ido en aumento en los últimos años. Pyörälä y Taponen (2009) reportaron el aislamiento de SCN a partir de mastitis bovina, siendo las especies más comunes: *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*. En otros estudios se reporta el aislamiento de otras especies de SCN, como Hosseinzadeh *et al.*, (2014) reportan haber aislado *S. cohnii*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis* y *S. xylosum*; Xu y colaboradores en 2015 reportaron el aislamiento de 13 especies de SCN, siendo *S. arlettae*, *S. sciuri*, *S. xylosum* y *S. chromogenes* las predominantes. Por otra parte, Kim *et al.*, (2019) reportaron el aislamiento de 14 especies, las especies más comunes fueron *S. chromogenes*, *S. simulans* y *S. epidermidis*, además también se reportó el aislamiento de *S. saprophyticus*. En el presente estudio se aislaron 13 especies de SCN, las especies más frecuentes fueron *S. sciuri*, *S. intermedius*, y *S. xylosum*; la mayoría de las especies identificadas en este estudio han sido previamente reportadas en casos de mastitis bovina en hatos de diferentes países.

### Factores de virulencia

Gemmelle y Lang (2015) reportan que el 27% (32/118) de los SCN producen la enzima fosfatasa, por otra parte, en el presente estudio se observó que el 53.12% (17/32) tuvieron la capacidad de producir fosfatasa. Markey *et al.*, (2013), reporta que en *S. aureus* la enzima fosfatasa se presenta en más del 90% de las cepas, sin embargo, en el presente estudio sólo el 36% (8/22) de los *S. aureus* identificados presentaron esta enzima.

En el caso de la enzima ureasa Markey *et al.*, (2013) indica que los *S. aureus* presentan esta enzima en un rango de 11 a 89%, en este estudio se encontró que el 86% (19/32) de los *S. aureus* aislados presentan la enzima ureasa. Mientras que, en el caso de los SCN, depende de la especie la presentación de esta enzima. De las cepas de SCN 17/32 (53.12%) que resultaron positivas a la enzima ureasa, las especies que se identificaron fueron *S. intermedius* (23.5%); *S.*

*epidermidis* y *S. chromogenes* (17.6%); *S. simulans*, *S. saprophyticus* y *S. xylosus* (11.8%) y *S. hyicus* (5.9%).

La enzima lecitinasa se presentó en el 68.75% (22/32) de los SCN, esto representa un porcentaje mayor a lo reportado por Fariña *et al.*, (2013), quienes reportan la presencia de la enzima en un 40.8% (20/49) de los SCN aislados a partir de infecciones en humanos. En el caso de los *S. aureus*, en este estudio, la lecitinasa se presentó en el 86.36% (19/22) de las cepas. Boynukara *et al.* (2008), reporta que el 70.8% (75/106) de los *S. aureus* que aislaron de casos de mastitis bovina presentaron la enzima lecitinasa; por otra parte, Hamid *et al.*, (2017) reportan que el 82.5% de los *S. aureus* aislados a partir de mastitis bovina presentaron la enzima lecitinasa.

En este estudio se identificó la presencia de la enzima gelatinasa en una cepa de *S. aureus* y una cepa de *S. chromogenes*, ambas presentaron la capacidad de producir biopelícula. Estos resultados difieren a los referidos por Gemmell y Lang, (2015), en donde se reporta que el 43.4% (50/118) de los SCN que estudiaron, productores de la enzima gelatinasa.

Boynukara *et al.*, (2008) reportan que 93.4% (99/106) de los *S. aureus* aislados a partir de mastitis bovina, produjeron la enzima caseinasa. Marqués *et al.*, (2013) reportan que 68.4% (26/38) de los *S. aureus* aislados a partir de casos de mastitis bovina producen esta enzima. En este estudio el porcentaje de *S. aureus* que producen caseinasa fue de 18.2% (4/22), este porcentaje es considerablemente bajo comparado a los reportados por Boynukara y Marqués. En el mismo estudio, Márques, aislaron 145 SCN de los cuales el 66.9% resultaron positivos a la producción de caseinasa, mientras que en este estudio se encontró que sólo el 21.88% de los SCN aislados son capaces de producir la enzima caseinasa. En su estudio Marqués identifica la producción de caseinasa y la producción de biopelícula como los factores de virulencia más frecuentes, sin embargo, en este estudio no se encontró la producción de caseinasa como uno de los factores más frecuentes y tampoco se pudo asociar a la producción de biopelícula.

En cuanto a la producción de lipasa Gemmelle y Lang (2015), describen que el 48.5% de los SCN analizados cuentan con la enzima lipasa. En el presente estudio sólo en una cepa de *S. saprophyticus* y una cepa de *S. hyicus* se observó la capacidad de producir la enzima lipasa, estas representan el 6.25% del total de los SCN aislados. Ribeiro de Souza da Cunha *et al.*, (2006) y Fariña *et al.*, (2013) observaron que las especies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* y *S. simulans* producen lipasa, sin embargo, en el presente estudio estas especies no llegaron a producirla. El 36.36% de los *S. aureus* aislados en este estudio presentaron la enzima lipasa, coincidiendo a lo reportado por Parth *et al.*, (2016) quienes reportan que el 54.7% (29/53) de los *S. aureus* aislados a partir de casos de mastitis bovina presentaron la enzima lipasa. Brady *et al.*, (2006) mencionan que en infecciones por *S. aureus* no se ha podido relacionar la producción de la lipasa con la producción de biopelícula. En este estudio la prueba de Chi cuadrada no asocio la producción de la enzima lipasa con la producción de biopelícula.

En este estudio se encontró que el 37.5% de los SCN mostraron la capacidad de producir la enzima DNAsa, Marqués reporta que el 16.7% de los SCN que aislaron presentaron la enzima DNAsa; Fariña reporta que el 100% (23/23) de los de SCN produjeron DNAsa, por otro lado, Ribeira de Souza da Cunha, reporta la capacidad de producir DNAsa en *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* y *S. simulans*. En el presente trabajo se identificaron como productoras de DNAsa las especies *S. epidermidis* y *S. simulans*. En el caso de *S. aureus*, Boynukara *et al.*, (2008) reporta que el 100% cepas que aislaron produjeron DNAsa; Marqués reporta que el 36.8% de los *S. aureus* resultaron positivos a DNAsa. Por otra parte, Hamid y Parth, (2017), reportan la producción de DNAsa en 75% (72/96) de los *S. aureus* aislados. En este estudio se observó que sólo el 22.7% de los *S. aureus* aislados tuvo la capacidad de producir la enzima DNAsa, un porcentaje mucho menor a los reportado previamente.

La producción de diferentes factores de virulencia cobra importancia respecto a la patogenicidad de *S. aureus* y sobre todo de los SCN. Por lo que se debe prestar más atención a estos últimos como agentes patógenos y dejar de considerarlos

como oportunistas, así como la importancia de la identificación de especie. La prueba de Chi<sup>2</sup> nos indica que existe una asociación entre la producción de lecitinasa y la producción de biopelícula.

#### Pruebas de adherencia en placa y tubo

Pereyra *et al.*, (2016), reportan que el 50% (10/20) de los *S. aureus* aislados a partir de mastitis bovina resultaron altas productoras de biopelícula, el 40% (8/20) medianas productoras de biopelícula y 10% (2/20) bajas productoras de biopelícula, resultados que coinciden con los obtenidos en las pruebas realizadas para este estudio, ya que en la prueba de adherencia en placa el 100% (22/22) de los *S. aureus* son productores de biopelícula al tener un promedio de absorbancia mayor al control negativo, sin embargo, sólo el 81.8% (18/22) presentaron diferencia significativa al control negativo. En la tercera repetición de la prueba de adherencia en tubo, también resultaron productoras de biopelícula todas las cepas de *S. aureus*.

Por otra parte, Majumder *et al.*, (2014) analizaron 160 *S. aureus* y 80 SCN aislados a partir de casos clínicos de infección en humanos con la prueba de adherencia en placa, contrario a lo que se demostró en este estudio, reportan que el 75.9% (123/162) de las cepas de *S. aureus* resultaron no productoras de biopelícula. De igual manera, en los resultados que reportan respecto a los SCN se puede observar que el 98.7% (79/80) resultaron no productoras de biopelícula.

Tremblay *et al.*, (2013) aislaron 255 SCN en producciones lecheras de Canadá. Reportan que 23.1% (59/255) resultaron altas, 25.5% (65/255) medianas, 36.5% (93/255) bajas y 14.9% (38/255) no productoras de biopelícula. Estos porcentajes son menores a los observados en este estudio. Cabe señalar que la mayoría de las productoras de biopelícula se clasificaron como bajas productoras, cuando en el presente estudio las de mayor porcentaje son las altas y medianas productoras.

También se observó la correlación entre las pruebas de adherencia en tubo y adherencia en placa permitiendo comparar los resultados cualesquiera de las dos pruebas. En ambas pruebas el 100% de los *Staphylococcus* aislados en este



estudio mostraron la capacidad de producción de biopelícula. La producción de biopelícula es un factor de virulencia que otorga muchas ventajas al microorganismo, y representa una gran problemática en la industria de la leche ya que en este estudio se demostró que diferentes especies de *Staphylococcus* pueden producirla.

### Susceptibilidad antimicrobiana

En este estudio el 100% (22/22) de las cepas de *S. aureus* y el 96.87% (31/32) de los SCN resultaron resistentes a la oxacilina. Frey *et al.*, (2012) reportan en Suiza, de 417 SCN aislados, el 47% (196/417) fueron resistentes a oxacilina. Por otra parte, Fariña *et al.*, (2013) a partir de muestras clínicas de humanos reporta una resistencia de SCN, de 64 cepas aisladas el 45.3% (29/64) mostraron resistencia a oxacilina. Figueira *et al.*, (2017) en Brasil reportaron 20 cepas de *S. aureus* de casos de mastitis bovina sensibles a la oxacilina. Por otro lado, en Turquía, Aslantaş y Demir, (2016) aislaron 112 cepas de *S. aureus* de casos de mastitis bovina, sólo el 4.5% (5/112) resultaron resistentes a oxacilina. Khodadadi *et al.*, (2016) reportan de 43 *S. aureus* aislados de tanques de leches que el 34.88% (15/43) resultaron resistentes a la oxacilina. La comparación de la resistencia a oxacilina reportada en los diversos estudios y este es alarmante, ya que los porcentajes de resistencia a oxacilina, en el presente estudio fueron mucho mayores; 100% de los *S. aureus* y 96.87% de los SCN.

En *S. aureus*; Aslantaş y Demir reportan resistencia a penicilina en un 45.5%, ampicilina en 39.3%, tetraciclina en 33%, eritromicina en 26.8% y sulfametoxazol y trimetoprim en 5.4%; Figueira, reporta resistencia a penicilina de 100%, ampicilina 0%, eritromicina 10% y ciprofloxacina 25%; Khodadadi reporta resistencia a penicilina 76.7%, tetraciclina 23.3%, eritromicina 13.95%, gentamicina 16.3%, y 0% en vancomicina. Xu *et al.*, (2015) reportan resistencia en *S. aureus* (n=28) a penicilina 82.1%, tetraciclina 10.7%, eritromicina 14.3%, gentamicina 32.1%, clindamicina 3.6%. En el presente estudio la resistencia de *S. aureus* a penicilina fue de 72.72%, a ampicilina 100%, a tetraciclina 40%, eritromicina 20% y

sulfametoxazol y trimetoprim 10% gentamicina 4.5%, vancomicina 0%, clindamicina 13.63% y ciprofloxacina 9.1%.

En el presente estudio la resistencia a ampicilina y eritromicina fue mayor que lo reportado por Figueira. La resistencia observada a clindamicina fue mayor que lo reportado por Xu. Resalta que la resistencia a vancomicina fue inexistente tanto en lo reportado por Khodadadi y lo observado en el presente trabajo.

En el caso de los SCN Ruiz *et al.*, (2001), en Colombia, reportan que de 6 cepas aisladas, el 66.7% resultó resistente a la ampicilina y tetraciclina y 16.6% a la eritromicina. Sánchez y Gutiérrez (2015) de 36 cepas aisladas, el 58% y 61% resultaron resistentes a la tetraciclina y penicilina G respectivamente. Por otra parte, Saidi *et al.*, (2019) aislaron 35 cepas de casos de mastitis bovina, y reportan resistencia a penicilina 71.4%, cefalotina 31.4%, tetraciclina 34.28%, eritromicina 54.3% y vancomicina 51.4%. En el presente estudio se observa que el 93%, 56.25% y 36.6% de las cepas de SCN son resistentes a ampicilina, penicilina G y tetraciclina respectivamente; mientras que en el caso de la eritromicina se observó que el 16.6% de las cepas de SCN resultaron resistentes. La resistencia a ampicilina en el presente estudio se observó mayor a lo reportado por Sánchez y Gutiérrez y Saidi. Cabe señalar que en el caso de la resistencia a eritromicina y vancomicina de los SCN fue menor en este estudio a lo reportado por Saidi. Resalta que en el presente estudio se observó que los SCN presentaron resistencia a vancomicina, aunque sea menor (3.12%), con esto se observó que los SCN resultaron con resistencia a todos los antibióticos que se analizaron en este trabajo. Esto demuestra que estos patógenos emergentes deben ser tomados con mayor seriedad ya que se observa una mayor capacidad de desarrollar resistencia.

El panorama de la resistencia en México contra lo que se ha reportado en diversas partes del mundo es alarmante, ya que los niveles de resistencia observados en este estudio son mayores a otros reportes. Esto significa que en México el manejo y uso de antibióticos se lleva de manera incorrecta lo que va generando un problema que será difícil de corregir. Se deben comenzar a buscar alternativas en

el tratamiento de la mastitis y es importante que se realicen pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos antes de comenzar los tratamientos, así como evitar el uso indiscriminado de estos.

Detección de serotipos capsulares, genes de producción de biopelícula y genes de resistencia a antimicrobianos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Sayed *et al.*, (2006) en México, analizaron cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovina, encontraron que el 83.3% (20/24) y el 81.3% (13/16) de las cepas de mastitis clínica y subclínica contaban con el gen *cap5*; y que el 16.7% (4/24) y 18.8% (3/16) contaban con el gen *cap8*. Por otro lado, Sutter *et al.*, (2011) analizaron 91 cepas de *S. aureus* obtenidas a partir de casos clínicos pediátricos en Estados Unidos, de estas el 56% (51/91) presentaron el gen *cap5*; el 44% (40/91) presentó el gen *cap8*. Acosta *et al.*, (2018) en Brasil, reportan cepas de *S. aureus* aisladas a partir de casos de mastitis bovina, de las cuales el 81.3% (100/123) presentaron el gen *cap5* y el 6.5% (8/123) presentó el gen *cap8*. En China, Xu *et al.*, (2015) encontraron el gen *cap5* en el 46.4% (13/28) de las cepas de *S. aureus*, mientras que, en el caso de los SCN no encontraron cepas que presentaran *cap5*, contrario a lo observado en este estudio. En el caso del gen *cap8*, Xu reporta que se encontró en el 39.3% (11/28) y el 1.3% (1/76) en *S. aureus* y SCN respectivamente. En el presente estudio el 45.5% (10/22) de los *S. aureus* presentaron el gen *cap5*, resultados similares a los reportados por Xu, sin embargo, el porcentaje es menor al reportado por Sayed, Sutter y Acosta. En el caso de *cap8*, en el presente estudio no se pudo determinar la presencia de este gen en ninguna cepa de campo. Sutter *et al.*, 2011, señala que las cepas de *S. aureus* que presentan cualquiera de los dos serotipos capsulares, se encuentran con menor frecuencia en infecciones recurrentes, considerando que la capacidad de formar biopelícula de las cepas aisladas en este estudio puede ayudar a la recurrencia y persistencia de la infección de la glándula mamaria se podrían comprender los bajos porcentajes de presentación de los genes que codifican estos serotipos. Lo recomendable sería realizar confirmación de que el producto

inespecífico obtenido en el caso con los iniciadores para *cap8* corresponda realmente al gen.

Seixas *et al.*, (2013), Khoramian *et al.*, (2015) Khoramrooz *et al.*, (2016) y Figueira *et al.*, (2017) reportan la presencia de *icaA* junto a *icaD* en 56.25% (45/80), 30% (6/20), 91.1% (82/90) y 52.6% (10/19) respectivamente en cepas aisladas de mastitis bovina. Seixas en cepas de SCN mientras que los últimos tres en cepas de *S. aureus*. En el presente estudio sólo se presentaron los genes en conjunto en el caso de *S. aureus* en 18.2% (4/22), porcentaje mayor que el reportado por Figueira, pero menor al reportado por Khoramrooz y Khoramian.

Tremblay *et al.*, (2013), reporta la presencia de *icaA* en el 52.54% (134/255) de los SCN que se aislaron, principalmente en *S. simulans*, mientras que en el presente estudio sólo dos cepas (6.25%) de SCN un *S. simulans* y un *S. intermedius*. En el estudio de Xu *et al.*, (2015) no observaron la presencia *icaA* en ninguna de las cepas de SCN (n=76). Budri *et al.*, 2015, reporta que el 85.9% (55/64) de las cepas de *S. aureus* aisladas a partir de mastitis subclínica presentaron el gen *icaA*, mientras que Xu al igual que con los SCN, ninguna cepa de *S. aureus* presentó el gen *icaA* (n=28). Khoramian reporta que en 85.7% (107/125) de las cepas de *S. aureus* aisladas a partir de muestras clínicas de humanos se presentó el gen *icaA*. En el presente estudio se encontró el gen *icaA* en 63.6% (14/22) de los *S. aureus* aislados. Se observan diferencias notables entre los resultados reportados, esto se puede deber a que se realizaron los estudios en diferentes regiones, Khoramrooz y Khoramian realizaron sus estudios en Irán, Figueira y Budri en Brasil, Seixas en Portugal, Tremblay en Canadá y Xu en China; o se puede deber al origen de las cepas. Es claro que la presentación de uno o ambos genes no determina la capacidad de producción de biopelícula, esta puede deberse a la presencia de otros genes como *atlE* o *bap*.

Majumder *et al.*, (2014) realizaron un PCR múltiple para los mismos genes, en cepas del género *Staphylococcus* aisladas a partir de infecciones clínicas en humanos. De los *S. aureus* que aislaron el 79% (128/162) y 100% (162/162) presentaron el gen *mecA* y *femA* respectivamente, mientras que en el 40% se

identificaron los tres genes. En el caso de los SCN de 80 cepas aisladas, el 80% presentó el gen *mecA*, el 3.3% presentaron los genes *mecA* e *icaD*; y ninguna cepa de SCN presentó el gen *femA*. En el presente estudio, el porcentaje de presentación del gen *mecA* en *S. aureus* y SCN es menor a lo reportado por Majumder, cabe resaltar que reportan la presencia del gen *femA* únicamente en cepas de *S. aureus* indicando que es específico de especie; por otra parte Salimena *et al.*, (2016), identificaron cepas de *S. aureus* amplificando el gen *femA*, Khodadadi *et al.*,( 2016), aislaron 43 *S. aureus* a partir de muestras de tanques de leche en Irán y todas presentaron el gen *femA*., sin embargo, en el presente estudio se demuestra que el gen *femA* se puede encontrar tanto en *S. aureus* como en los SCN.

Frey *et al.*, (2013) reportan que el 10.55% de los SCN (44/417) presentaron el gen *mecA*; López *et al.*, (2015) reportan que el 9% (4/85) de las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de bovino presentaron el gen *mecA*; Fariña reporta que de los 41 SCN aislados, 22 cepas (45%) presentaron el gen *mecA*. Lo observado en el presente estudio se asemeja a lo reportado por López y Fariña. Por otra parte, Budri reporta que el 84% de *S. aureus* (54/64) presentaron el gen *icaD*; Khoramian, reporta que el 91.1% de las cepas de *S. aureus* aisladas a partir de bovinos presentaron el gen *icaD*, ambos porcentajes son mayores a lo observado en el presente estudio. Xu, reporta que el gen *icaD* se presentó en el 71.4% (20/28) de los *S. aureus* mientras que en el presente estudio sólo se presentó en el 27.7% (6/22) de los *S. aureus* aislados; mientras que en el caso de los SCN Xu reporta ninguna cepa presentó el gen *icaD*, en este estudio solamente una cepa de *S. intermedius* y una cepa de *S. sciuri* presentaron el gen *icaD*.

## CONCLUSIONES

Todas las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas a partir de casos de mastitis bovina mostraron capacidad de producir biopelícula en diferentes grados, sin embargo, sólo 39 cepas muestran una diferencia significativa.

Las pruebas de adherencia en tubo y en placa pueden correlacionarse. Se debe considerar la producción de biopelícula como un factor de riesgo en mastitis causada por *Staphylococcus* spp.

La producción de la enzima lecitinasa puede asociarse a la capacidad de producción de biopelícula.

El gen del serotipo capsular 8 no siempre será encontrado junto al gen del serotipo capsular 5, la confirmación con secuenciación del serotipo capsular 8 sería de utilidad.

La presentación del gen *icaA* en cepas aisladas específicamente de casos de mastitis bovina en México difiere a lo reportado en diferentes países.

La estandarización del PCR múltiplex permite detectar cepas de *S. aureus* y SCN productoras de biopelícula y resistentes a metilina.

En México existe un nivel de resistencia alto a los betalactámicos mucho mayor a lo reportado a nivel mundial. La resistencia observada a oxacilina y metilina muestran que se debe dar prioridad a la búsqueda de alternativas para el tratamiento de mastitis y, la administración de antibioterapia debe tomarse con mayor seriedad.

## **ANEXO 1 Extracción DNA con CTAB**

1. Tomar 3 colonias de bacterias, agregar 500µl de PBS, homogeneizar y centrifugar a 12,000 g durante 5 minutos y decantar el sobrenadante.
2. Agregar 400µl de buffer TE más 50 µl de lisozima (10mg/ml). Agitar en vórtex e incubar al menos 1 hora (puede ser toda la noche) a 37°C. Cuando se usa PCR coa, agregar 10 µl de lisostafina (100 µl/ml).
3. Adicionar 75 µl de SDS al 10% y 6 µl de proteinasa K (10mg/ml), agitar en vórtex e incubar durante 10 min a 65°C.
4. Adicionar 100 µl de NaCl 5M. Adicionar 100 µl de una solución CTAB/NaCl (precalentada a 65°C), agitar en vórtex hasta que la mezcla tome un aspecto lechoso. Incubar a 65°C durante 10 min.
5. Adicionar 750 µl de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitar en vórtex durante 10 seg y centrifugar 5 min a 12,000g.
6. Transferir el sobrenadante en volúmenes de 200 µl a un microtubo limpio y estéril (aproximadamente 600 µl).
7. Al volumen transferido agregar alcohol isopropílico en una cantidad que represente el 60%. Dejar reposar la muestra a -20°C durante 30 min (se puede dejar toda la noche).
8. Centrifugar a 12,000g durante 15 min. Descartar el sobrenadante dejando aproximadamente 20 µl sobre el precipitado.
9. Adicionar 500 µl alcohol etílico al 70%, invertir suavemente el tubo con la mano 10 veces. Centrifugar 5 min a 12,000 g. Descartar el sobrenadante dejando 20µl sobre el precipitado.
10. Centrifugar a 12,000 g durante 1 min, descartar con pipeta el sobrenadante. Observar que no queden rastros de etanol.

11. Permitir secar el ADN a temperatura ambiente durante 45 min. Se puede secar en termoblock de 5 a 10 min a 56°C.
12. Resuspender el ADN en agua inyectable (30-50  $\mu$ l) dependiendo del tamaño de la pastilla. Cepas 80  $\mu$ l.
13. Colocar los tubos en baño María entre 55-60°C por 5 min. Almacenar en refrigeración o congelación hasta su uso.



## REFERENCIAS

1. Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. 2016. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research* 12:270.
2. Acosta AC, Oliveira PRF, Albuquerque L, Silva IF, Medeiros ES, Costa MM, Pinheiro Junior JW, Mota RA. 2018. Frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes in milk cows and goats with mastitis. *Pesq. Vet. Bras.* 38(11). 2029- 2036.
3. Aslantaş O, Demir C. 2016. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *J. Dairy Sci* 99: 8607-8613.
4. Ávila AJ, Mena STR. 2015. *Bienestar Bovino, Buenas prácticas sanitarias y manejo integral de producción*. Fenómena Editores. pp 122-130.
5. Barberis LI, Pájaro CM, Godino SD, Pascual L, Daniele DM. 2001. Antimicrobial sensitivity and adherence study in strains of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 43:109-113.
6. Barzani KK, Turkey AM, Abed JJJ. 2017, Comparison study of *mecA* gene-based PCR with phenotypic methods for detecting biofilm forming methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates and comparison of *mecA* with *femA*, *femB* and *mecC* genes. *J. of University of Anbar for pure science*. Vol 11: No.1: 2017.
7. Becerra G, Plascencia A, Luévanos A, Domínguez M, Hernández I. 2009. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf Inf Microbiol.* 29 (2): 70-76.
8. Bedolla CC, Ponce de León MER. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *REDVET*. Vol. IX No. 4,1695-7504.
9. Boynukara B, Gulhan T, Alisarli M, Gurturk K, Solmaz H. 2008. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 125.
10. Brady RA, Leid JG, Camper AK, Costerton JW, Shirliff ME. 2006. Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 6.
11. Budri PE, Silva NCC, Bonsaglia ECR, Fernandes JA, Araújo JJP, Doyama JT, Gonçalves JL, Santos MV, Fitzgerald-Hughes D, Ral VLM. 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with masitits. *J. Dairy Sci.* 98: 5899-5904.
12. Büttner H, Mack D, Rohde H. 2015. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers en cellular and infection microbiology* 5, 14.
13. Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, Campanile F, Amicosante G, Perilli MG, Selan L, Artini M, Nicoletti G, Stefani S. 2004. Presence of the *ica* operon in

- clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm formation. *Clin Microbiol Infectio* 10: 1081-1088.
14. Cervantes- García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y medicina de laboratorio* 61 (1): 28-40.
  15. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard. Third Edition. CLSI v. 28. n. 8. M31. A13.
  16. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. 2001. Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 2888-2896.
  17. Cucarella C, Tormo MA, Úbeda C, Trotonda MP, Monzón M, Perisz C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. 2004. Role in biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 4. 2177-2185.
  18. Ducoing WAM. 2016. *Estadística para veterinarios y zootecnistas*. Newton Edición y Tecnología Educativo. México. Pp 357.
  19. Fariña N, Carpinelli L, Samudio M, Guillén R, Laspina F, Sanabria R, Abente S, Rodas L, González P, M. de Kaspar H. 2013. *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulencia. *Microbiología*. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Asunción, Paraguay. 30 (5): 480-488.
  20. Figueira MV. Couto MC. Da Silva SB. Araújo DM. De Mattos OCS. Da Silva Cl. Santos BH. Moreira SSM. 2017. Biofilm production and beta – lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology* 48: 118-124.
  21. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews: Microbiology* 14:563.
  22. Foster JT, Geoghegan AJ, Ganesh VK, Höök M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews: Microbiology* 12:49.
  23. Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF. 2000. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J.Clin Microbiol* 38 (2): 877-880.
  24. Frey Y, Peña RJ, Thomann A, Schwendener S, Perreten V. 2013. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. *J. Dairy. Sci.* 96: 2247-2257.
  25. Gemmell CG y Lang S. *Coagulase- Negative Staphylococci and their role in infection*. En: Tang Yi-Wei y Sails A. (eds.). 2015. *Molecular Medical Microbiology*, Segunda edición, Academic Press, pp. 793-810.
  26. Hamid S, Bhat AM, Mir AI, Taku A, Badroo AG, Nazki S, Malik A. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.
  27. Hosseinzadeh S y Saei DH. 2014. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative

- staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2, 27- 34.
28. Kamaruzzaman NF, Chong SQY, Edmondson-Brown KM, Ntow-Boahene W, Bardiau M, Good L. 2017. Bactericidal and Anti-biofilm effects of polyhexamethylene biguanide in models of intracellular biofilm of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, art. 1518.
  29. Khodadadi P, Bijanzadeh M, Najafi A, Zarinpour V, Moshfe A, Ansari H. 2016. Antibiotic resistance and detection of *femA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. *Medical Laboratory Journal*, v. 10 n. 4.
  30. Khoramian B, Jabalameli F, Niasari NA, Taherikalani M, Emaneini M. 2015. Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microbial Pathogenesis* 88: 73-77.
  31. Khoramrooz SS, Mansouri F, Marashifard M, Hosseini MAAS, Chenarestane-Olia A, Ganavehei B, Gharibpour F, Shahbazi A, Mirzaii M, Darban-Sarokhalil D. 2016. Detection of biofilm related genes, classical enterotoxin genes and agr typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microbial Pathogenesis* 97: 45-51.
  32. Kim S-J, Moon CD, Park S-C, Kang YH, Na HS. 2019. Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea. *J. Dairy Sc*, v. 102, n.12.
  33. Lizama P. Boccardo G. Díaz I. García C. León M. Ruiz F. Torres F. 2014. PDF. Guía de asociación entre variables (Pearson y Spearman en SPSS). Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Sociales. Departamento de Sociología en: [https://www.u-cursos.cl/facso/2014/2/SO01007/1/material\\_docente/bajar?id\\_material=994690](https://www.u-cursos.cl/facso/2014/2/SO01007/1/material_docente/bajar?id_material=994690)
  34. López-Vázquez M. Martínez-Castañeda JS. Talavera-Rojas M. Valdez-Alarcón JJ. Velázquez Ordóñez V. 2015. Detección de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México. *Arch Med Vet* 47. 245-249.
  35. MacFaddin JF. 1999. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Tercera edición. Lippincott Williams & Wilkins. United States of America. Pp 171-174, 273-275, 286-292.
  36. MacFaddin JF. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, p. 160- 170.
  37. Majumder S. Wolffs PFG. Hoebe CJP. Rahmatullah M. 2015. Rapid detection of methicillin resistance and biofilm formation in *Staphylococcal* species. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6(10): 148-154.
  38. Markey B. Leonard F. Archambault M. Cullinane A. Maguire D. 2013. Chapter 7 *Staphylococcus* species en: *Clinical Veterinary Microbiology*. Segunda edición. Mosby Elsevier. pp. 105- 119.

39. Marques VF, MS de Souza M, CL de Medonça E, Abreu de Alencar T, Pribul BR, Coelho S, Lasagno M, Reinoso EB. 2013. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 33 (2).
40. Márquez L JL, Nevárez MG, Sánchez BAD, Rivera CBE, González RO. 2008. Efecto de la formación de biopelículas en la resistencia de bacterias aisladas de especímenes clínicos. *Synthesis*. n. 48. Octubre- Diciembre. [http://www.uach.mx/extension\\_y\\_difusion/synthesis/2009/04/27/Efecto\\_de\\_la\\_formacion\\_de\\_biopeliculas\\_en\\_la\\_resistencia\\_de%20bacterias.pdf](http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2009/04/27/Efecto_de_la_formacion_de_biopeliculas_en_la_resistencia_de%20bacterias.pdf)
41. Mera AR, Muñoz EM, Artieda RJ, Ortiz TP, González SR, Vega FV. 2017. Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *REDVET. Revista Electrónica Veterinaria*. Vol. 18 No, 11. 1-16.
42. Muñoz SJ, Hernández AL, Arrieta BE, Camacho DLM, Hernández VD. 2012. Aislamiento bacteriano en bovinos doble propósito con mastitis subclínica, en la costa de Guerrero, México. *REDVET. Revista Electrónica Veterinaria*. Vol. 13 No, 7 1695-7504.
43. National Mastitis Council (NMC). 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. National Mastitis Council, Inc., Arlington, VA, USA.
44. Nazar CJ. 2007. Biopelículas bacterianas. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 67: 61-72.
45. National Center for Biotechnology Information. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Bethesda MD, USA. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
46. NOM 210 SSA1 2014. "Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos".
47. Parth FM, Chauhan HC, Bhagat AG, Chandel BS, Patel MV, Dadawala AI, Kher HN. 2016. Detection of virulence associated factors from *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Buffalo Bulletin*, v. 35, n. 4.
48. Pellegrino MS, Frola ID, Bogni CI. 2011. Mastitis bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. *Rev. electron. vet.* Vol. 12. No.7.
49. Pereyra EAL, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreati CS, Russi R, Calvino LF, Diez C, Dallard BE. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 183 96-97.
50. Pyörälä S y Taponen S. 2009. Coagulase- negative staphylococci- Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v. 134, 3-8.
51. Ribeiro de Souza da Cunha ML, Suppo de Souza Rugolo LM, Alberto de Magalhães Lopes C. 2006. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101 (6): 661-668.
52. Ruiz JD, Ramírez NF, Arroyave O. 2001. Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de

- glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros Antioquia. *Rev Col Cienc Pec.* Vol 14:2. 143-154.
53. Sahab AS, Nor SM, Sekawi Z, Thian LTL, Awang HR, Karunanidhi A, Mateg AA, Ghaznavi-Rad E, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Chong SJS, Jeevajothi NJ, Pei PC. 2012. Prevalence of adhesión and regulation of biofilm- related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, art ID. 976972.
  54. Saidi R, Mimoune N, Baazizi R, Hocine BM, Khelef D, Kaidi R. 2019. Antibiotic susceptibility of Staphylococci isolated from bovine mastitis in Algeria. *Journal of advanced veterinary and animal research*, v. 6, n.2, p. 231-235.
  55. Salimena APS, Lange CC, Camussone C, Signorini M, Calvino LF, Brito MAVP, BorgesCAV, Guimarães AS, Ribeiro JB, Mendonça L, Piccoli RH. 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. *Vet Res Commun*, 40: 97-106.
  56. Sánchez BMP, Gutiérrez MNP. 2015. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana del estafilococo coagulasa negativo aislado de mastitis bovina en fincas lecheras de Tolima, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. 30: 83-93
  57. Sauer K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology* 4:219
  58. Sayed EA, Alber J, Lämmle C, Jäger S, Wolter W, Castañeda VH. 2006. Estudio comparativo de las características genóticas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. *Vet Mex* 37:2:165-168
  59. Schönborn S, Krömker V. 2016. Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. *Veterinary Microbiology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.023>
  60. Seija V. 2008. Género *Staphylococcus*. En sección III. Etiopatogenia microbiológica <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>
  61. Seixas R, Santos JP, Bexiga R, Vilela CL, Oliveira M. 2014. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin- resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal. *J. Dairy Sci.* 97: 340-344.
  62. Sutter DE, Summers AM, Keys CR, Taylor KL, Frasch CE, Braun LE, Fattom AI, Bash MC. 2011. Capsular serotype of *Staphylococcus aureus* in the era of community-acquired MRSA. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 63: 16-24.
  63. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology*, 115: 199-207.
  64. Taponen S, Pyörälä S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*. 134. 29-36

65. Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M. 2013. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilm. *J. Dairy Sci.* 96:234-246
66. USDA. 2016. "Dairy 2014, Milk Quality, Milking Procedures, and Mastitis in the United States, 2014".
67. Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx RR, Rijnders BJA, Van Eldere J. 2002. Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin Microbiol Infect* 9: 114-119.
68. Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. 2014, Invited review: Effect, persistence and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science* 97: 5275-5293.
69. Xu J, Tan X, Zhang X, Xia X, Sun H. 2015. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microbial Pathogenesis*.
70. Zendejas MGS, Avalos FH, Soto PMY. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed* 25: 129-143