



UBA
Universidad de Buenos Aires



Facultad de Ciencias
VETERINARIAS
Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

TESIS DOCTORAL

**“Mastitis Bovina:
Estudios Moleculares, Fenotípicos y Biológicos
de Estafilococos Coagulasa Negativos.”**

*Doctorando: **SREDNIK Mariela Elizabeth***

*Directora: **GENTILINI Elida Raquel***

*UNIDAD ACADÉMICA: Cátedra de Microbiología, Facultad de Cs. Veterinarias,
Universidad de Buenos Aires*

Marzo 2017

Tesis de Doctorado de

Mariela Elizabeth Srednik

Para optar al grado de Doctora

De la Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2017.

El presente trabajo de Tesis Doctoral **titulado “Mastitis Bovina: Estudios Moleculares, Fenotípicos y Biológicos de Estafilococos Coagulasa Negativos”**, fue realizado en el Laboratorio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, bajo la dirección de la Dra. Elida Raquel Gentilini, y una parte en el Laboratorio del Departamento de Patología y Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Montreal, bajo la supervisión del Dr. Mario Jacques. Fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires mediante el Proyecto UBACyT Mastitis Bovina W766 y el actual 313BA.

AGRADECIMIENTOS

A La Dra. Elida Gentilini por dirigirme, confiar en mí, permitirme descubrir el mundo de la investigación, brindarme los conocimientos para el desarrollo de esta Tesis, aconsejarme y guiarme durante todo este camino permitiéndome crecer profesionalmente y como persona.

Al Dr. Mario Jacques y la Dra. Marie Archambault por permitirme realizar parte de mis experimentos en sus laboratorios de la Universidad de Montreal, brindándome todo su apoyo y recursos disponibles.

A la Dra. Adriana Bentancor por iniciarme en el mundo de la biología molecular y brindarme los conocimientos para implementar técnicas nuevas.

A la Dra. Claudia Buongiorno por ayudarme en el desarrollo del análisis estadístico.

A la Universidad de Buenos Aires y la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme la posibilidad de realizar esta Tesis.

A las J.T.P. Patricia Llorente y Graciela Denamiel por brindarme conocimientos sobre técnicas de laboratorio aplicadas a mi estudio, y darme la posibilidad de participar como docente de las clases de Microbiología en mis horarios disponibles.

A mis compañeros de la Cátedra de Microbiología por compartir muchos días de trabajo, cubrirme durante mis períodos de ausencia y permitirme de alguna u otra manera concretar este estudio.

Al personal no docente de la Cátedra de Microbiología Ariel, Joaquín y Marcela, por estar siempre presente, ayudarme en mis tareas y acompañarme durante mis mañanas de trabajo.

A mis adorados amigos y compañeros de la Facultad de Medicina Veterinaria de Montreal por incentivar me todos los días, ayudarme en el laboratorio, acompañarme en los almuerzos y hacerme conocer lo importante que es ser un buen compañero.

A mis amigos de la vida, por estar siempre en los buenos momentos, como así también en los difíciles y/o en mis ausencias.

A mis padres, mi hermana Romina y mi cuñado Maxi por apoyarme incondicionalmente en mi trabajo y ayudarme para llevar a cabo mis estudios en el exterior.

A mi novio Mariano por amarme, apoyarme en mi formación profesional, estar siempre a mi lado y comprender los tiempos del mundo de la Ciencia.

ÍNDICE TEMÁTICO	<i>página</i>
I. ABREVIATURAS	7
II. RESUMEN	10
III. ABSTRACT	13
1. INTRODUCCION	15
1.1 Mastitis bovina	15
1.2 Mastitis en la explotación lechera	15
1.3 El contenido celular de la leche en las infecciones mamarias	16
1.4 Estrategias de detección	17
1.5 Lechería nacional	20
1.6 El componente microbiano en las mastitis bovinas	22
1.7 Los estafilococos. Características generales	23
1.7.i. Estafilococos coagulasa negativos y su participación en las mastitis	41
1.7.ii. Identificación de los ECN	43
1.8 Antimicrobianos en las mastitis	46
1.9 Factores de virulencia de ECN en las mastitis	51
1.10 Biopelículas en los ECN	52
2. HIPOTESIS	55
3. OBJETIVOS	56
3.1 Objetivo general	56
3.2 Objetivos Específicos	56
4. CAPÍTULO I	58
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS	58
4.1.i Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo	58

4.1.ii Extracción de ADN	59
4.1.iii Identificación de los ECN	59
4.1.iv Perfil fenotípico de Resistencia a Antimicrobianos	60
4.1.v Perfil genotípico de Resistencia a Antimicrobianos	61
4.1.vi Identificación de tipos y subtipos del casete SCCmec	63
4.1.vii Determinación del Origen Clonal	64
4.2 RESULTADOS	67
4.2.i Objetivo I	67
4.2.ii Objetivos II y III	67
4.2.iii Objetivos IV y V	77
4.3 DISCUSIÓN	79
4.3.i Objetivo I	79
4.3.ii Objetivos II, III, IV y V	80
4.4 CONCLUSIÓN	88
5. CAPÍTULO II	89
5.1 MATERIALES y MÉTODOS	89
5.1.i Habilidad de formación de Biofilm	89
5.1.ii Dispersión de Biopelículas con tratamiento enzimático	90
5.1.iii Formación de Biopelículas con el agregado de ADN extracelular	91
5.1.iv Perfil genotípico de Proteínas Asociadas al Biofilm	92
5.1.v Perfil fenotípico de Marcadores de Virulencia	94
5.1.vi Actividad hemolítica	95
5.1.vii Análisis estadístico I: digestiones enzimáticas y biofilm	96
5.1.viii Análisis estadístico II: asociación de los factores de virulencia	96
5.2 RESULTADOS	97

5.2.i Objetivo I	97
5.2.ii Objetivo II	101
5.3 DISCUSIÓN	112
5.3.i Objetivo I	112
5.3.ii Objetivo II	114
5.3.iii Asociación de los factores de virulencia	116
5.4 CONCLUSIÓN	118
6. CONCLUSIONES	119
7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	120
8. ANEXOS	140
8.1 Asociación entre los factores de virulencia	140
8.2 PUBLICACIONES	161
8.2.i Artículos publicados	161
8.2.ii Artículos en revisión	161
8.3 PRESENTACIONES A CONGRESOS	162
8.3.i Presentaciones en Argentina	162
8.3.ii Presentaciones en el exterior	163
8.4 CURSOS REALIZADOS	166
8.4.i Cursos realizados con créditos para el Doctorado	166
8.4.ii Cursos realizados pertenecientes a la Maestría en biotecnología	167
8.5 OTROS ELEMENTOS DE JUICIO PERTINENTES	169
8.5.i Pasantías en el exterior	169

I. ABREVIATURAS

A:	Absorbancia.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ADNe:	Ácido desoxirribonucleico extracelular.
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal.
ATCC:	Del Inglés: “American Type Culture Collection”: Cultivos de colección de referencia americanos.
ATB:	Antibiótico.
ATM:	Antimicrobiano.
ATP:	Adenosina tri-fosfato.
Bap:	Del Inglés: “Biofilm-associated protein”: Proteína asociada al Biofilm.
BL:	β -lactámicos.
CCC:	Caldo Cerebro Corazón.
CIM:	Concentración Inhibitoria Mínima.
CLI:	Clindamicina.
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute.
CTS:	Caldo Tripteína Soja.
dNTPs:	desoxinucleótidos Trifosfato.
EDTA:	Del Inglés: “Ethylenediaminetetraacetic acid”: Ácido etilendiaminotetraacético.
ECN:	Estafilococos Coagulasa Negativos.
ERI:	Eritromicina.
FOX:	Cefoxitina.
GM:	Glándula mamaria

IIM:	Infecciones intramamarias.
LMP:	Del Inglés: “Low Melting Point”: Bajo punto de fusión.
μl:	microlitros.
MLS:	Macrólidos-lincosamidas-streptograminas.
mM:	milimoles.
μM:	micromolar.
MR:	Meticilino resistencia.
MRSA:	Del Inglés: “Meticillin-resistant <i>S. aureus</i> ”: <i>S. aureus</i> meticilino resistente.
nm:	nanómetro.
OXA:	Oxacilina.
pb:	Pares de bases.
PBP:	Del Inglés: “Penicillin-binding Protein”: Proteínas de unión a penicilina.
PCR:	Del Inglés: “Polymerase Chain Reaction”: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PEN:	Penicilina.
PFGE:	Del Inglés: “Pulsed-Field Gel Electroforesis”: Electroforesis en gel de campo pulsado.
pmol:	picomol.
R:	Resistencia.
REB:	Del Inglés: “Restriction Enzyme Buffer”: Tampón de enzima de restricción.
RCS:	Recuento de Células Somáticas
RFLP:	Del Inglés: “Restriction Fragment Length Polymorphism”:

Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción.

SCC*mec*: Del Inglés: “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*”: Casete Cromosómico estafilocócico *mec*.

Taq: *Thermus aquaticus*.

TBE: Tris-borato-EDTA.

TMC: Test Mastitis California.

U: Unidades.

UV: Ultravioleta.

II. RESUMEN

Mastitis Bovina: Estudios Moleculares, Fenotípicos y Biológicos de Estafilococos Coagulasa Negativos”

La mastitis bovina es considerada una de las principales causas de pérdidas económicas en el sector lechero. Si bien es causada por numerosos agentes microbianos, en los últimos años la frecuencia de aislamientos de estafilococos coagulasa-negativos (ECN) se ha incrementado mundialmente, considerándose un patógeno emergente. Estudios recientes demuestran que determinadas especies que integran el grupo de los ECN presentan la habilidad para formar biofilm y así podrían persistir en la glándula mamaria. Además, es importante destacar las implicancias en salud pública, por ser los ECN reservorios de genes de resistencia a antimicrobianos y por la posibilidad de transferencia de resistencia. El objetivo de este estudio fue identificar las especies de ECN, determinar la susceptibilidad y portación de genes de resistencia a antibióticos de uso habitual en la terapéutica antimastítica. Además, detectar formación de biofilm, su dispersión enzimática, y la portación de genes de virulencia, en especies de ECN aislados de mastitis bovina de diferentes tambos de Argentina. Por el análisis del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen *gap*, se identificaron 138 aislamientos a nivel de especie. Los resultados arrojaron que, las especies de ECN más prevalentes resultaron: *Staphylococcus chromogenes* (n=59, 42,8%), *Staphylococcus epidermidis* (n=19, 13,8%) y *Staphylococcus devriesei* (n=12, 8,7%).

En distintas especies fueron detectados genes responsables de la resistencia a β -lactámicos (n=26; 18,8%), como el gen *blaZ* (n=28; 20,3%), *mecA* (n=4; 2,9%) y *mecC* (n=1; 0,7%). Con respecto a la resistencia a macrólidos y lincosamidas (n=14; 10,1%) fue atribuible a los genes *ermC* (n=9; 6,5%), *ermB* (n=6; 4,3%), *mphC* (n=5; 3,6%) y *msrA* (n=3; 2,2%), estando solos o en combinaciones.

La mayoría (93,5%) de los aislamientos analizados presentaron habilidad para formar biofilm. De este total, el 37,2%, 11,6% y 51,2% resultaron fuertes, moderados y débiles formadores de biofilm, respectivamente. La capacidad de formación de biofilm mostró variaciones en las distintas especies. *Staphylococcus haemolyticus* y *S. devriesei* resultaron los mayores productores de biofilm. Los resultados de los tratamientos enzimáticos sugieren que las proteínas y el ADN extracelular desempeñarían un papel más importante en la matriz del biofilm de los ECN.

Los genes asociados a biofilm se detectaron sólo en algunos aislamientos, siendo para *icaA* (n=9; 6,5%), *bap* (n=5; 3,6%) y *aap* (n=5; 3,5%), mientras que los genes *atlE* (n=38; 27,5%), *embP* (n=35; 25,4%) y *fbe* (n=20; 14,4%) se detectaron en mayor cantidad de aislamientos, y el gen *eno* (n=122; 88,4%) en casi todas las especies. Los resultados obtenidos demuestran que la resistencia de los ECN frente a los antibióticos de uso habitual en las mastitis, en general es baja comparada con otros países. Es importante que se encontraron aislamientos meticilino-resistentes portadores de los genes *mecA/C*, por las implicancias que esto tiene en salud pública, al ser los ECN reservorios de genes de resistencia. Además, se observó que los ECN son

productores de biofilm y, que existen diferencias en la capacidad de formación en las distintas especies y además variaciones intraespecies.

Este estudio aporta información sobre las distintas especies de ECN involucradas en mastitis bovina, factores de patogenicidad y datos sobre frecuencia, emergencia y mecanismos de resistencia antimicrobiana, permitiendo al profesional diseñar estrategias eficaces para el control de las mastitis bovina.

Estudios futuros deberían llevarse a cabo para examinar la asociación de la formación de biofilm con el fracaso de los tratamientos y la aparición de infecciones intramamarias persistentes por las distintas especies de ECN en bovinos.

Palabras claves: ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVOS, MASTITIS BOVINA, RESISTENCIA ANTIMICROBIANA, BIOFILM.

III. ABSTRACT

“Bovine Mastitis: Molecular, Phenotypic and Biological studies on Coagulase-negative Staphylococci.”

Bovine mastitis is considered one of the main causes of economic losses in dairy cows. Although it is caused by several etiological agents, in recent years the prevalence of coagulase-negative staphylococci (CNS) has increased worldwide, being considered an emerging pathogen. Recent studies show that microorganisms among the CNS group have the ability to form biofilm and because of that, they could persist in the mammary gland. It is important to highlight the implications to public health, since CNS are reservoirs of resistance genes. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility and the presence of resistance genes to antimicrobial agents commonly used in bovine mastitis therapeutics. Furthermore, to evaluate biofilm formation, enzymatic treatments of biofilms formed by CNS, and the presence of virulence genes in CNS isolates from bovine mastitis from different dairy herds in Argentina. 138 CNS isolates were identified at the species level by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the *gap* gene. The most prevalent CNS species were *Staphylococcus chromogenes* (n=59, 42.8%), *Staphylococcus epidermidis* (n=19, 13.8%) and *Staphylococcus devriesei* (n=12, 8.7%).

Genes encoding resistance to β -lactams (n=26; 28.8%) were detected among the isolates: *blaZ* (n=28, 20.3%), *mecA* (n=4, 2.9%) and *mecC* (n=1, 0.7%). Resistance to macrolides and lincosamides (n=14, 10.1%) was attributable to

ermC (n=9, 6.5), *ermB* (n=6, 4.3), *mphC* (n=5, 6%) and *mrsA* (n=3, 2.2%), alone or in a combination of those genes.

The majority (93.5%) of isolates was able to form biofilms. Among the biofilm-positive isolates, 37.2%, 11.6% and 51.2% were strong, moderate and weak biofilm formers, respectively. The ability to form biofilms varied among CNS species. *S. haemolyticus* and *S. devriesei* isolates formed significantly more biofilms than other species. Enzymatic treatment results suggest that proteins and eDNA play a larger role in the structural integrity of CNS biofilms. *icaA* (n=9, 6.5%), *bap* (n=5, 3.6%) and *aap* (n=5, 3.6%) were detected in a few isolates, while *atfE* (n=38, 27.5%), *embP* (n=35, 25.4%) and *fbe* (n=20, 14.4%) were detected in a considerable number of CNS. The *eno* gene (n=122, 88.4%) was present in the majority of isolates.

The results obtained show differences in the ability of biofilm formation among CNS species and there are intra-species variations. Although antimicrobial resistance to common antibiotics is low, it is important to highlight the presence of methicillin-resistant CNS carrying the *mecA/C* genes, important for the public health implications, since CNS are reservoirs of resistance genes. In this study, we identified CNS species involved in mastitis and provide information about pathogenicity and antimicrobial resistance, which is essential to design efficient strategies to control mastitis caused by CNS.

Future studies should be carried out to examine the association of biofilm formation with treatment failure and the occurrence of persistent intramammary infections by different CNS species in cattle.

Keywords: COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI, BOVINE MASTITIS, BIOFILM, ANTIMICROBIAL RESISTANCE

1. INTRODUCCION

1.1 Mastitis bovina

La mastitis bovina es una enfermedad de distribución mundial que afecta la salud de los animales con la consecuente disminución de la producción, calidad de leche y subproductos, repercutiendo negativamente en la industria lechera.

La implementación de programas de control de mastitis durante los últimos 30 años condujo a una reducción de la incidencia general de la mastitis clínica en la mayoría de los tambos (Philpot y Nickelson, 1993; Gutman y col. 2003; Chaves, 2010).

1.2 Mastitis en la explotación lechera

La mastitis subclínica, cursa sin signos inflamatorios externos. La enfermedad se detecta por examen del contenido celular de muestras de leche y el aislamiento de los microorganismos causales de la infección.

La mastitis clínica se caracteriza por la existencia de signos externos de la inflamación, hinchazón, endurecimiento y dolor a la palpación en uno o más cuartos. Se observa también alteración de las características macroscópicas de la leche (floculaciones, grumos, presencia de pus, sangre, trozos de tejidos), de los caracteres propios de la secreción, disminución y hasta la pérdida de la producción, afectando inclusive el estado general del animal. En cuanto a la duración de la infección las mismas pueden ser agudas o crónicas. Las agudas aparecen repentinamente y manifiestan los clásicos signos de la inflamación: tumor, dolor, calor, rubor y disfunción del o los cuartos afectados. Las infecciones crónicas son de desarrollo progresivo pudiendo ser clínicas o subclínicas (Philpot y Nickelson, 1993; Fox, 2009).

1.3 El contenido celular de la leche en las infecciones mamarias

La leche presenta un contenido celular normal determinado por: a) células de la glándula mamaria (epitelio alveolar, conductos lactíferos, cisternas, canal del pezón) que están en un proceso constante de regeneramiento debido al envejecimiento normal, y b) células de la serie blanca, procedentes de la sangre, principalmente neutrófilos, macrófagos y linfocitos, las células macrófagas cumplen una función de defensa por medio de la fagocitosis, y los linfocitos regulan las funciones inmunes de la ubre (Philpot y Nickelson, 1993).

En las mastitis se produce un aumento del número de células en leche, como consecuencia de gran cantidad de células defensivas, principalmente leucocitos. Este aumento de células en la leche se relaciona con la gravedad del daño sobre el tejido mamario, por lo que el monitoreo del contenido celular es un importante indicador del estado sanitario de la glándula mamaria en lactación (Philpot y Nickelson, 1993; Fox, 2009).

La leche de cuartos individuales de animales sanos contiene bajos niveles de células somáticas y aunque existen variaciones individuales, en general oscila entre 100.000 a 200.000 células/ml, representadas por un 12% de leucocitos polimorfonucleares, alrededor de un 60% por macrófagos, y un 28 % por linfocitos del total de células. Las células epiteliales pueden representar entre un 5 y un 15% del total de las células somáticas de la leche. La cuenta de ambos tipos celulares, se expresa como el número de células somáticas/ml de leche. La proporción de los diferentes tipos de células en leche varía según se determine en leche de vacas o en las secreciones de las vaquillonas de primera lactancia (Philpot y Nickelson, 1993).

En la mastitis, se produce un incremento de leucocitos que oscila entre un 45 y un 95% de las células somáticas. Valores elevados del contenido celular, indican enfermedad de la glándula mamaria (GM) y por lo tanto una menor producción de leche, alteración de su composición y las lógicas pérdidas económicas asociadas (Philpot y Nickerson, 1993).

1.4 Estrategias de detección de mastitis

La detección de mastitis puede realizarse por (Philpot y Nickerson, 1993):

a) *Examen físico*: el objetivo es detectar alteraciones en los cuartos: endurecimiento, cuartos hinchados, calientes, cuartos atrofiados o deformes y/o con cicatrices, resultantes de mastitis agudas. Estos exámenes tienen mejor resultado luego del ordeño, cuando la glándula está vacía.

b) *Despunte*: es la extracción de los primeros chorros de leche de cada pezón. Uno de los objetivos de esta maniobra es observar sobre un fondo oscuro alguna alteración visible de la leche, entre otras, grumos, decoloración, sangre, permitiendo hacer un diagnóstico precoz de mastitis clínica.

c) *Métodos para el recuento de células somáticas (RCS)*:

1. *Prueba Mastitis California (TMC) o “de la paleta”*: estima el contenido de células somáticas en leche. La prueba se realiza antes del ordeño, luego de estimular al animal en la descarga de los primeros chorros de leche. Permite detectar infecciones subclínicas que de otra manera pasarían inadvertidas. Se realiza por el tambero al lado de la vaca. Esta prueba permite detectar precozmente un aumento del contenido celular antes de que aparezcan los síntomas de la inflamación. Los resultados se relacionan con el número de células somáticas en leche.

2. *Recuento directo de células en microscopio óptico*, mediante la técnica de Prescott y Breed (1910), por conteo con aparatos de medición automática como el Coulter Milk Cell Counter, que cuenta partículas de un diámetro determinado a medida que se desplazan en un campo eléctrico y el Fossomatic que determina el valor midiendo la fluorescencia emitida por la tinción del material nuclear con un colorante fluorescente.

Estos métodos pueden aplicarse sobre:

- a. Muestras de leche de tanque, que si bien no individualiza al animal problema, alerta al productor sobre la existencia de mastitis subclínica. El RCS en la leche total del tanque monitoreado periódicamente es un indicador de la presencia o no de mastitis en el establecimiento. El objetivo a lograr es de 200.000 células/ml o menos en leche de tanque. El número de células somáticas en leche total del tambo se correlaciona con el porcentaje de cuartos infectados y el porcentaje de la pérdida de producción láctea.
- b. Leche mezcla de los cuatro cuartos de una misma vaca, permite identificar a las vacas problemas. Es importante en la interpretación del conteo celular, considerar el efecto de la dilución de la leche de los cuartos normales sobre recuentos celulares elevados de cuartos infectados.
- c. Leche individual de cuarto mamario, permite conocer la unidad secretora funcional afectada.
- d) También pueden utilizarse contadores de células electrónicos computarizados de células de todas las vacas en ordeño.

e) *Conductividad eléctrica de la leche*: es otra forma de evaluar indirectamente la presencia de mastitis subclínica. En la inflamación hay un mayor pasaje de cloruros y de sodio de la sangre a la leche y disminuyen los iones calcio y la lactosa. El aumento de la concentración de sal, aumenta la conductividad eléctrica. La detección de mastitis se basa en los diferentes niveles de concentración de sal que ocurre entre los cuartos enfermos y sanos del animal.

f) *Determinación de N-acetil-β-D-glucosaminidasa o NAGasa*: enzima indicadora de daño celular. En la inflamación aumenta la actividad de esta enzima y los neutrófilos son las principales células que la liberan.

g) *Determinación de niveles de lactosa y caseína en la leche*: existe una disminución en la capacidad de síntesis del epitelio mamario de estos componentes.

Si bien no sólo la mastitis aumenta la concentración de células en la leche y la conductividad eléctrica, estas pruebas y el registro de los resultados constituyen un aporte más a la información necesaria para llevar adelante un plan de control de mastitis.

Se confirma una infección intramamaria, cuando se aísla e identifica a partir de la leche a un microorganismo que puede estar asociado en forma subclínica o a un síndrome con francas manifestaciones de mastitis clínica.

Es necesario conocer que existen variaciones del contenido celular relacionadas con la fase de lactancia, como en el posparto, secado, vacas viejas, celo, estrés, temperatura y humedad ambiental elevada, que determinan aumentos en los niveles de células somáticas, sin que ello necesariamente signifique infecciones mamarias en el rodeo. No obstante, el registro de los

resultados constituye un aporte más a la información necesaria para evaluar la tendencia.

En todos los casos la confirmación de infección cuando la reacción es positiva, se realiza por el estudio bacteriológico.

1.5 Lechería nacional

Argentina tiene la cuenca lechera más importante de Latinoamérica e invierte en desarrollo tecnológico aplicado a la producción para cumplir con el rol que el mundo demanda: producir más alimentos. Incrementar la productividad del complejo lácteo-bovino es una de las metas del Plan Estratégico Agroalimentario y Agroindustrial (PEA), que se propone aumentar un 76% la producción de lácteos en los próximos 10 años y llegar a los 18,3 miles de millones de litros.

Argentina es el tercer productor de leche mundial. En la última década, en el país, la industria láctea registró transformaciones tecnológicas que le permitieron mejorar su producción y llegar a los consumidores con productos de alta calidad. La modernización fue encarada inicialmente por las firmas líderes, pero se extendió rápidamente en el resto de las empresas, incluidas muchas Pymes.

Las estrategias de diferenciación permanente y el lanzamiento de nuevos productos adaptados a las demandas cada vez más específicas del consumidor se sustentan en fuertes inversiones en investigación y desarrollo.

El sector industrial lechero argentino cuenta con sistemas implementados de gestión ambiental, incorporados a las estructuras productivas de manera de producir el mínimo impacto sobre el medio ambiente. En función de ello las

plantas cuentan con sistemas de tratamiento para los efluentes líquidos, sistemas de gestión de residuos sólidos y semisólidos a fin de facilitar su adecuado tratamiento y/o disposición final, y sistemas de control y monitoreo de los efluentes gaseosos. La gestión ambiental está centrada no sólo en el cumplimiento de las reglamentaciones vigentes, sino también en un mayor y mejor aprovechamiento de los recursos hídricos y energéticos.

En otro orden, la industria nacional de vanguardia logró, como resultado de fuertes inversiones en los últimos años, una calidad de producto a la altura de los más exigentes estándares internacionales. Muchas de las plantas de las firmas líderes operan hoy bajo certificaciones de BMP, ISO o HACCP (fuente: diario Tiempo Argentino, 2/10/2011).

Figura 1. Tambo típico Holando Argentino, Provincia de Santa Fe.



La cadena láctea conforma uno de los complejos agroalimentarios más importantes y dinámicos, motor para las economías regionales. Hay muy pocos países que sean productores lácteos autosuficientes. Los principales países que cuentan con mayor excedente de leche son Argentina, Australia, Nueva Zelanda, EE.UU., Uruguay, la Unión Europea y Europa oriental. La producción

láctea argentina se centra en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires, principalmente y en menor medida La Pampa y Entre Ríos.

Junto con Córdoba, Santa Fe produce el 69% de la producción de leche del país. Mientras que usinas ubicadas en la provincia de Buenos Aires destinan la materia prima a productos que se consumen en el mercado interno, Santa Fe industrializa el 45% de los productos lácteos que Argentina exporta al mundo. Córdoba, por su parte, con gran experiencia en Pymes en su territorio, se especializa en quesos.

Respecto de la composición de las exportaciones por origen, el 45% de los productos tienen origen en Santa Fe con un valor de 675 millones de dólares. En participación en el comercio exterior, sigue Córdoba con el 32%, Buenos Aires con el 15% y Entre Ríos con el 7% (fuente: diario El Litoral, 21/12/2013).

1.6 El componente microbiano en las mastitis bovinas

Según las publicaciones nacionales (Gentilini y col., 1995; Denamiel y col., 2006; Srednik y col., 2015a), los agentes productores de mastitis subclínica y clínica de mayor prevalencia en las distintas cuencas lecheras del país son: a) - los cocos catalasa positiva pertenecientes al Género *Staphylococcus*, siendo el patógeno principal dentro del grupo de los estafilococos coagulasa positivo *Staphylococcus aureus* y más de 30 especies dentro del grupo de los estafilococos coagulasa negativo; b) -los cocos catalasa negativa pertenecientes al Género *Streptococcus*, siendo las especies más frecuentes: *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*.

Otros gérmenes que pueden causar la inflamación de la ubre, aunque con menor frecuencia, son los bacilos coliformes, pasteurelas, microorganismos

oportunistas como pseudomonas; bacilos grampositivos como listerias y corinebacterias; clostridias; micoplasmas; actinomicetales como las nocardias; levaduras y hongos. También *Prototheca zopfii*, (alga aclorófila) está involucrada en la etiología de las infecciones intramamarias (IIM), en Argentina fue aislada por primera vez por Gentilini E y col. (1996).

En la actualidad, el grupo de estafilococos incapaces de producir coagulasa, (ECN) está adquiriendo particular importancia por su relación con las mastitis (Demo y col., 1995; Gentilini, 2002a), por la aparición de aislamientos resistentes frente a antimicrobianos según lo informado por Frigerio y col.(1995); Gentilini y col. (2002b); Denamiel y col. (2006).

No existen referencias nacionales sobre aislamientos de leptospiras de leches mastíticas.

1.7 Los estafilococos. Características generales

Los estafilococos se caracterizan por ser cocos, inmóviles, no esporulados y crecen formando grupos irregulares de células como racimos de uvas. Son aerobios o anaerobios facultativos, no exigentes, catalasa positivos, capaces de fermentar la glucosa en anaerobiosis, ser sensibles a la lisostafina y poseer ácidos teicoicos en su pared. El hábitat natural primario es la piel y mucosa orofaríngea del hombre y animales.

En el año 2009, el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^{da} edición, volumen 3, por estudios de taxonomía molecular, clasifica al género *Staphylococcus* perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*, orden *Bacillales*, clase *Bacilli*, filo *Firmicutes*.

Algunos estafilococos forman parte de la microbiota normal de piel y de mucosas de los mamíferos y aves. *S. aureus* tanto en el hombre como en los animales, es el patógeno más importante. Produce infecciones superficiales como procesos supurativos en piel, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía, infecciones de tejidos blandos, genitourinarias, septicemias. Es responsable de infecciones de heridas quirúrgicas, prótesis. Además, por la producción de potentes exotoxinas, *S. aureus* puede causar intoxicaciones alimentarias y otros cuadros tóxicos como síndrome de piel escaldada y choque tóxico. Algunas especies de estafilococos coagulasa negativos también son causa de infecciones superficiales, profundas y septicemias.

El género *Staphylococcus*, comprende más de 52 especies y 28 subespecies (www.bacterio.net). En 1957, el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7^{ma} edición señala la prueba de coagulasa fundamental para separar a los estafilococos en dos grupos: estafilococos coagulasa positivos (ECP) y estafilococos coagulasa negativos (ECN).

Hábitat

Son comensales de la piel y mucosas, en especial digestivas y rinofaringe. Es el microorganismo más extendido que existe y su difusión en la naturaleza es extraordinaria (Gentilini, 2007a).

Morfología

Los estafilococos son bacterias esféricas de 0,8 a 1 micra de diámetro y grampositivos. En las tinciones directas de las muestras clínicas, se observan

aislados, en pares o formando pequeñas cadenas. Cuando provienen de un cultivo en agar nutritivo, se disponen en agrupaciones que recuerdan racimos de uvas. No forman esporas. No presentan flagelos, pueden presentar cápsula, polisacáridos extracelulares como el *slime* y formar biofilm (Gentilini, 2007a).

Características culturales

Estas bacterias no tienen exigencias nutritivas. En medio líquido, luego de 24 horas de incubación a 37°C, desarrolla produciendo turbidez homogénea con abundante depósito en el fondo del tubo y a menudo, aparece un crecimiento en forma de anillo en la superficie del medio que se adhiere a las paredes del tubo. En medios sólidos, forman colonias redondas de 1 a 2 mm de diámetro, convexas, de contornos netos y superficie lisa, opaca o mucoide. Según las especies, las colonias pueden ser de color blanco y al tomar contacto con el aire o la luz, pueden ser pigmentadas. *S. aureus* produce colonias doradas, debido a pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Estos pigmentos no difunden al medio y en medios líquidos y en anaerobiosis no lo producen. Las condiciones óptimas para su producción: medios enriquecidos (agar sangre) en aerobiosis incubando los cultivos por 24 a 48 horas adicionales a temperatura ambiente. Existen medios selectivos diferenciales para el cultivo, como el Chapman, con NaCl al 7,5%, manitol y rojo fenol como indicador de pH, o el medio Baird-Parker, con emulsión de yema de huevo y telurito de potasio, utilizado para el aislamiento de estafilococos a partir de alimentos. En este último medio, las colonias de *S. aureus* aparecen negras, brillantes y convexas rodeadas de un halo claro. El

poder hemolítico de algunos estafilococos se puede poner en evidencia en medios de cultivo con el agregado del 5% de sangre desfibrinada ovina, equina o humana (Gentilini, 2007a).

Características metabólicas

Los estafilococos son catalasa positivos. Utilizan los hidratos de carbono tanto por oxidación como por fermentación. La temperatura óptima de crecimiento es 37 °C y el pH óptimo es 7 a 7,5. Son aerobios o anaerobios facultativos (Gentilini, 2007a).

Resistencia

Dentro de las bacterias no esporuladas, es el microorganismo más resistente. Soportan la desecación sobre todo en los exudados durante semanas; se mantienen vivos a -30°C en medios líquidos y a 60°C, durante 30 minutos. Toleran fluctuaciones de pH, entre pH 4 y pH 9, concentraciones de sal del 7,5 % propiedad que se aprovecha en medios de cultivo selectivo-diferenciales (medio Chapman), para el aislamiento. Los estafilococos son inhibidos por sales biliares, colorantes bacteriostáticos, como el cristal violeta y por la mayoría de desinfectantes y antiséptico en pocos minutos (Gentilini, 2007a). Tanto los ECP como los ECN, presentan diferentes mecanismos de resistencia (R) frente a las familias de antimicrobianos de uso habitual en la clínica (Gentilini y col. 2000; Gentilini y col. 2001, Gentilini y col. 2002c).

Resistencia a los β -lactámicos: la R a penicilina es universal y puede darse por producción de β -lactamasas (Gentilini, 2007b). El fenotipo de R a penicilina mediada por β -lactamasas se debe extrapolar a todas las penicilinas

(ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, piperacilina) exceptuando a las isoxazolilpenicilinas: oxacilina, meticilina, cloxacilina y nafcilina, son sensibles a las combinaciones de β -lactámico con inhibidor de β -lactamasa (ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam), a las cefalosporinas y carbapenemes.

La R a meticilina es más frecuente en los ECN siendo además, considerados reservorios de genes de R (Sampimon y col. 2011). Los estafilococos pueden adquirir el gen *mecA* o su homólogo *mecC* que codifican una proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a que posee baja afinidad por todos los β -lactámicos y es lo que se conoce como meticilino resistencia (MR) (Cuny y col. 2011).

La R a la meticilina en *Staphylococcus* se puede detectar en el laboratorio mediante la técnica de difusión con discos de cefoxitina (30 μ g) o por dilución en caldo por determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM de oxacilina) (CLSI, 2013). Las pruebas moleculares permiten detectar genes que codifican para la producción de β -lactamasas: *blaZ* y genes que codifican MR: *mecA* y *mecC* en *S. aureus* y en ECN (Srednik y col., 2014; Cuny y col. 2011; Loncaric y col. 2013).

Resistencia a los macrólidos y a la clindamicina: en los estafilococos los fenotipos de R que se pueden detectar son: 1) fenotipo cMLS_B -R constitutiva a la eritromicina (y demás macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono), a la clindamicina y a las estreptograminas B, por modificación de la diana ARNr 23S, por la acción de metilasas codificadas por los genes *ermA*, *ermB* y *ermC*, con R cruzada a todos los antibióticos del grupo MLS; 2) fenotipo iMLS_B -R inducible a eritromicina y sensibilidad a clindamicina y estreptograminas B) y 3) fenotipo MS_B -R a eritromicina y a otros macrólidos de 14 y 15 átomos de

carbono, a las estreptograminas B pero con sensibilidad a la clindamicina, mediada por una bomba de expulsión activa codificada por genes plasmídicos *mrsA*. 4) fenotipo L⁻R a clindamicina con sensibilidad a eritromicina, por acción enzimática codificadas por los genes *Inu*. (Gentilini, 2007b).

Resistencia a los aminoglucósidos: la R es frecuentemente por acción de enzimas inactivadoras de aminoglucósidos. La R a gentamicina debe asociarse con R a todos los aminoglucósidos de uso clínico (con la excepción de la estreptomina), debido a la acción de la enzima bifuncional AAC(6′)-APH(2″). La situación opuesta no existe esto es, la sensibilidad a gentamicina implica sensibilidad al resto de aminoglucósidos (Gentilini, 2007b).

En la Argentina, Gentilini y col. en el año 2000 informan el aislamiento de *S. carnosus* MR codificada por el gen *mecA*, a partir de leche proveniente de una mastitis bovina. De piodermias y otitis de perros, se han aislado cepas de *S. aureus* y ECN MR (Denamiel y col., 2009; Más y col. 2000). En el año 2015 Srednik y col. detecta en un aislamiento de ECN proveniente de una vaca con mastitis, el gen *mecC*. Esta detección es la primera en Latinoamérica (Srednik y col. 2015b).

Factores de virulencia

Los estafilococos pueden presentar diferentes factores de virulencia:

Cápsula

La cápsula está constituida por polisacáridos unidos laxamente a la pared celular y protege a los estafilococos de la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares (PMN), determinando mayor poder invasivo a la bacteria. Facilita la unión a catéteres, sondas, prótesis u otro material sintético. Si bien

inicialmente se reportaron 11 serotipos capsulares en *S. aureus*, en la actualidad se reconoce la existencia de sólo 4 serotipos (1, 2, 5 y 8) (Cocchiari y col. 2006). En la Argentina, la mayor parte de los aislamientos responsables de mastitis bovina, se asocian con los serotipos 5 y 8 (Sordelli y col. 2000).

Pared celular

La pared celular está formada por una gruesa capa de peptidoglicano a la que están unidas moléculas de proteínas y otros componentes. Es un polímero polisacárido básico y cadenas tetrapeptídicas que se unen formando una red o trama, cuya función es mantener su rigidez y su resistencia osmótica. En *S. aureus* las uniones entre las cadenas tetrapeptídicas están formadas por puentes de pentaglicina que le dan sensibilidad a la lisostafina, característica del género *Staphylococcus*.

El peptidoglicano es importante en la patogenia de la infección. Participaría en el desencadenamiento de la inflamación por activación del complemento (Gentilini, 2007a).

Clumping factor

La superficie externa contiene una proteína anclada en pared celular, denominada factor de agregación o coagulasa de unión presente en *S. aureus*. Esta proteína, se une al fibrinógeno por una reacción no enzimática y lo convierte en fibrina insoluble, haciendo que los estafilococos se agreguen o formen grupos, haciéndolos más resistentes a la opsonización y fagocitosis. La detección *in vitro* del *clumping factor* se realiza en un portaobjetos, mezclando una gota de una suspensión densa de un cultivo de estafilococos con una gota de plasma de conejo, dando una reacción parecida a la aglutinación (Gentilini, 2007a).

Proteínas de superficie

Existen otras proteínas de superficie relacionadas con la adherencia a los tejidos del hospedador, son las proteínas de unión al colágeno, a la elastina y a la fibronectina.

Los estafilococos que poseen un considerable número de proteínas de unión a la fibronectina parecen poseer mayor afinidad para adherirse y ser más invasivos (Gentilini, 2007a).

Proteína A

La superficie de muchas cepas patógenas de *S. aureus* está cubierta de manera uniforme con la proteína A. Se une al fragmento Fc de las moléculas IgG (excepto IgG3) de manera inespecífica. Favorecería la diseminación interfiriendo con la opsonización y la ingestión de los estafilococos por los PMN. Tiene propiedades inflamatorias. Cada molécula de proteína A, tiene cuatro sitios de unión al Fc. La proteína A puede actuar como factor de colonización al adherirse a proteínas involucradas en el proceso de hemostasis. Es inmunogénica y se detectan anticuerpos contra ella en sujetos con infecciones graves por *S. aureus* (Gentilini, 2007a).

Ácidos teicoicos

Los polisacáridos más importantes son los ácidos teicoicos ligados al peptidoglicano. Estos ácidos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato. En *S. aureus* son polímeros de ribitol fosfato. En los ECN son polímeros de glicerol fosfato. Unidos al peptidoglicano poseen actividad inmunogénica. Siendo además el sitio de fijación del bacteriófago. En los enfermos con endocarditis activa por *S. aureus* suelen encontrarse anticuerpos antiteicoicos. Los ácidos teicoicos por sus uniones específicas a la fibronectina median en la

colonización de los estafilococos a las superficies mucosas del hospedador. Cuando están unidos a la membrana citoplasmática se los denomina ácidos lipoteicoicos (Gentilini, 2007a).

Productos Extracelulares

Los estafilococos excretan varias proteínas con actividad biológica como enzimas y toxinas relacionados con la patogenicidad:

Coagulasa

Se considera que la presencia de coagulasa es indicador de patógeno potencialmente invasor. La coagulasa soluble o libre, es una proteína similar a una enzima que coagula el plasma oxalatado o citratado del hombre o conejo, por activación de una sustancia parecida a la protrombina (una globulina, factor de reacción con la coagulasa).

La coagulasa puede depositar fibrina sobre la superficie de los estafilococos, alterando la capacidad fagocítica de los macrófagos o su destrucción en el interior de los mismos.

La determinación de la coagulasa libre, se realiza colocando en un tubo de hemólisis 0,5 ml de un cultivo de 24 horas en caldo, de estafilococos y 0,5 ml de plasma citratado de conejo. La mezcla se incuba a 37°C. Si la cepa es productora, el medio se coagula en algunos minutos o en horas. La lectura de la prueba se realiza a las 4 y a las 24 horas (Gentilini, 2007^a; Mc Faddin, 1993a)

Catalasa

Los estafilococos producen catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno tóxico en agua y oxígeno. El peróxido se puede acumular durante el

metabolismo de la bacteria o después de la fagocitosis, provocando su muerte (Gentilini, 2007^a; Mc Faddin, 1993b).

Hialuronidasa

La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico (mucopolisacárido presente en la sustancia intercelular del tejido conectivo) facilitando la diseminación de la infección (Gentilini, 2007a).

Lipasas

Estas enzimas hidrolizan los lípidos. Su acción incide sobre la supervivencia de los estafilococos, explicando la colonización de estas bacterias en áreas sebáceas de gran actividad. Las cepas de *S. aureus* productoras de forunculosis crónica son potentes productoras de lipasas (Gentilini, 2007a).

Nucleasa

El papel en la patogenia de la infección no se conoce con exactitud, pero se considera que la termonucleasa o DNAsa, contribuye a la capacidad invasiva de los estafilococos (Gentilini, 2007a).

Fibrinolisisina

También denominada estafiloquinasa, es un activador del plasminógeno, disuelve las redes de fibrina, aumentando la capacidad de invasión del microorganismo (Gentilini, 2007a).

β -lactamasas

Enzimas codificadas por plásmidos transmisibles por mecanismos de transducción y probablemente conjugación. Las bacterias productoras de β -lactamasas, presentan R frente a antibióticos β -lactámicos (penicilina G, ampicilina, ticarcilina, piperacilina y otros β -lactámicos relacionados) (Gentilini, 2007a).

Supervivencia intracelular

Algunos estafilococos pueden sobrevivir en el interior de los fagocitos, aunque la división es muy lenta, perdurando más tiempo que la célula fagocítica y continuar la multiplicación cuando son liberados (Gentilini, 2007a).

Exotoxinas

Las exotoxinas producidas por *S. aureus* pueden dividirse en dos grupos: toxinas con actividad sobre membranas y toxinas con actividad de superantígenos (Gentilini, 2007a).

Hemolisinas: las hemolisinas en general, son toxinas con acción nociva sobre las membranas celulares llevando a la muerte y lisis de las células.

Las toxinas hemolíticas se presentan en forma aislada, en combinación o no se presentan (Gentilini, 2007a).

Toxina-alfa: es la mejor estudiada, actúa sobre una amplia variedad de membranas celulares, como por ejemplo: eritrocitos, leucocitos, plaquetas, fibroblastos y células Hela. Posee triple acción: es citolítica *in vitro*, dermonecrótica en conejo y letal en ratón. La alfa toxina contribuye de manera significativa a la patogenicidad al producir daño en los tejidos después del establecimiento de un foco infeccioso. La mayoría de las cepas humanas y alrededor del 50% de las cepas de origen bovino aisladas de mastitis, la producen (Gentilini, 2007a).

Toxina-beta: es una fosfolipasa de acción esfingomielinasa. Actúa sobre diferentes células: leucocitos, eritrocitos, fibroblastos. La presencia es más común en los estafilococos de origen animal.

Esta toxina tiene la capacidad para producir la hemólisis caliente-fría, esto significa que, existe un incremento de la actividad hemolítica si luego de la

incubación de los eritrocitos sensibles con la toxina a 37 °C, se enfrían durante un tiempo a 4 °C o a temperatura ambiente. La toxina es una enzima con especificidad de sustrato por la esfingomielina. La degradación de la esfingomielina es la lesión de la membrana que conduce a la hemólisis cuando las células son enfriadas.

La sensibilidad de los eritrocitos a la toxina β , depende del contenido de esfingomielina. Los más sensibles son los eritrocitos bovinos, ovinos y caprinos (Gentilini, 2007a).

Toxina-delta: actúa sobre las membranas biológicas por una acción similar a la de los detergentes. Es una toxina tensioactiva relativamente termoestable. Lesiona eritrocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos y plaquetas. No tiene especificidad pronunciada para las células de una especie en particular (Gentilini, 2007a).

Toxina-gamma y leucocidina de Panton Valentine (PVL): son toxinas polipeptídicas, formadas por dos componentes. El componente S (proteínas de elución lenta) y el componente F (proteínas de elución rápida), que actúan sinérgicamente para dañar la membrana de las células. La toxina gamma tiene mayor efecto sobre eritrocitos y la PVL destruye neutrófilos por formación de poros en su membrana. La presencia de la PVL es un marcador epidemiológico de infecciones por *S. aureus* resistentes a meticilina en pacientes de la comunidad (Gentilini, 2007a).

Toxinas con actividad de superantígenos: las enterotoxinas, las toxinas exfoliativas y las toxinas del choque tóxico I, poseen actividad de superantígenos. Estas toxinas se unen como moléculas enteras al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y son capaces de inducir la activación

inespecífica de los macrófagos y de las células T con liberación de citoquinas y aumenta la susceptibilidad a los lipopolisacáridos bacterianos (Gentilini, 2007a).

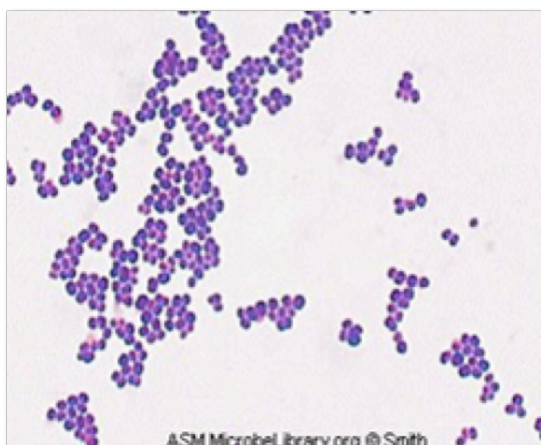
Enterotoxinas: raramente las producen cepas de origen animal. Son causantes de intoxicación alimentaria en el hombre. Su producción está codificada en plásmidos, en el cromosoma o en fagos. Existen por lo menos nueve tipos de enterotoxinas (A-E; G-J). Son proteínas termoestables y resistentes a la hidrólisis de las enzimas gástricas y duodenales (Gentilini, 2007a)

Toxinas exfoliativas A y B: causan el Síndrome de piel escaldada. Producen la separación intraepidermal con formación de ampollas y exfoliación posterior. Su acción en los animales no ha sido bien analizada, aunque se ha descrito en lesiones del estrato granuloso de la epidermis en perros y en las epidermitis exudativas de los lechones.

Son dos proteínas antigénicamente distintas: una termoestable o exfoliatina A y la otra termolábil o exfoliatina B. Sólo la producen algunos de los estafilococos del fagotipo II. En la patogénesis del síndrome de piel escaldada parece existir una acción sinérgica entre esta toxina y la alfa toxina (Gentilini, 2007a).

Toxina-1 del síndrome del choque tóxico: la toxina-1 del síndrome del choque tóxico (TSST-1) es una toxina termoestable y resistente a la proteólisis. Actúa como un superantígeno. Es capaz de producir un choque sin bacteriemia por difusión a partir un foco de infección. El síndrome de choque tóxico en las mujeres atribuible a *S. aureus* productores de TSST-1, se asocia con la menstruación y el uso de tampones (Gentilini, 2007a).

Figura 2. Estafilococos teñidos con la tinción de Gram.



Estafilococos coagulasa negativos

Los ECN son productores de infecciones tanto en medicina humana como en medicina animal. Las especies de ECN pueden diferir en la expresión de factores de patogenicidad, susceptibilidad a los antibióticos, respuesta del huésped a la infección. Algunos aislamientos producen *slime* o polisacárido extracelular, unido laxamente a la bacteria. Esta sustancia tiene capacidad de adherencia, facilitando la colonización y su diseminación en el hospedador.

Algunas especies de ECN pueden poseer el operón *ica* que codifica para la producción del polisacárido intercelular adhesina (PIA), responsable de la formación de biofilm. Este actúa como barrera mecánica, impidiendo la llegada de los antibióticos a los microorganismos y la fagocitosis y además se produce una reducción de actividad metabólica de las bacterias que se encuentran en la matriz del biofilm (Rumi y col. 2013).

Los ECN están considerados ser reservorios de genes de R a los antibióticos y que podría existir una transferencia de genes a *Staphylococcus aureus*.

Recientes estudios han demostrado que humanos y bovinos comparten *S. epidermidis*, aunque es difícil demostrar la dirección de la transmisión

interespecie. La correcta identificación es necesaria para predecir el potencial patógeno de los aislamientos, la comprensión de estudios epidemiológicos y para decidir el tratamiento antimicrobiano apropiado (Sampimon y col. 2011).

La identificación convencional de las especies de los ECN basado en pruebas metabólicas y bioquímicas se realiza según en método de Kloos y Schleifer. Entre otras: prueba de oxidasa, sensibilidad frente a novobiocina, detección de β -galactosidasa y determinaciones como utilización de azúcares, ureasa, fosfatasa alcalina, entre otras. Es una identificación engorrosa y onerosa.

Otros métodos de identificación son los sistemas comerciales muy utilizados por su practicidad. API ID32 Staph, Staph-Zym y otros. Estos métodos, no identifican todas las especies de ECN aislados de origen animal, pues la selección de las reacciones metabólicas se basa en la frecuencia relativa de los aislamientos asociados a infecciones en humanos generando resultados incorrectos. Existen métodos moleculares para la identificación de las especies utilizando genes diana como como por ejemplo *gap*, *rpoB*, *sodA*, *tuf* y *hsp60*.

La identificación correcta de las especies de los ECN no es sencilla, requiere complementar pruebas bioquímicas, moleculares y en algunos casos la secuenciación (Srednik y col. 2015a).

Clasificación serológica, bacteriofágica o lisotipo

Los estafilococos pueden tipificarse por los antígenos presentes en su pared celular y capsular. También presentan bacteriófagos que sirven para tipificarlos por su sensibilidad a ser lisados. Este método de tipificación se utiliza para cepas de *S. aureus* de origen humano, bovino y aviar. Estas clasificaciones se

practican sólo en laboratorios de referencia para estudios epidemiológicos (Gentilini, 2007a).

Modo de infección y transmisión

Las infecciones pueden ser endógenas o exógenas, por inhalación, por contacto directo o por ingestión. Portadores sanos e infectados actúan como reservorio (Gentilini, 2007a).

Importancia del estudio de los estafilococos en veterinaria

Participan en general en los procesos purulentos como: osteomielitis, artritis, abscesos, otitis, conjuntivitis, piómetra, infecciones urinarias, flemones. Son responsables de enfermedades específicas, constituyendo *S. aureus*, el principal agente etiológico de la mastitis bovina y también de la botriomicosis equina (infección granulomatosa con abscesos fistulosos del cordón espermático). *S. intermedius* en perros y en gatos causa diferentes infecciones como: abscesos, piodermias, otitis, conjuntivitis, mastitis e infecta heridas.

S. hyicus produce la epidermitis exudativa y poliartritis en cerdos.

En los animales los ECN están evolucionando en la inducción de producción de patologías y se encuentran involucrados con las mastitis clínicas y subclínicas de los bovinos, siendo las especies más frecuentes aisladas: *S. chromogenes*, *S. devriesei*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. cohnii subsp. urealyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, entre otras. En cabras, *S. caprae*, *S. chromogenes* y *S. epidermidis* (Gentilini, 2007a).

Diagnóstico de laboratorio

Muestras

Las muestras según la patología pueden ser: frotis superficiales, pus, sangre, material aspirado de tráquea, líquido cefalorraquídeo, orina, leche.

Pruebas para la caracterización del género

Una vez determinada la morfología, agrupación celular que presentan microscópicamente los cocos grampositivos desarrollados en medio de cultivo, se determina:

1) la enzima catalasa que separa a los cocos que pueden estar presentes en una muestra clínica. Catalasa positivos: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, y catalasa negativos: *Streptococcus*, *Enterococcus*.

2) Los criterios para diferenciar los géneros positivos a la catalasa: tétradas, fermentación anaeróbica de glucosa, crecimiento en agar con furazolidona, R a la lisostafina, prueba de oxidasa y bencidina, ácido teicoico.

Una vez identificado el género, las especies se caracterizan mediante las pruebas: coagulasa, ácido de manita, ácido de maltosa, ácido de trehalosa, Voges Proskauer, proteína A.

Los criterios básicos para la identificación de los ECN se realizan por: incapacidad de producir coagulasa, morfología de la colonia, pigmentación, determinación de R a novobiocina, prueba de oxidasa, Voges Proskauer, producción de fosfatasa, ureasa, beta-galactosidasa y producción de ácido a partir de azúcares (Gentilini, 2007a).

Epidemiología

Todos los mamíferos poseen ECN en la piel, siendo frecuente la colonización transitoria con *S. aureus* en los pliegues cutáneos húmedos.

Muchas infecciones pueden tener un origen endógeno (heridas, infecciones urinarias, piodermias), otras se transmiten por contacto directo, o por fomites (ropas, utensilios, pezoneras contaminadas). En las mastitis bovina, los estafilococos penetran a la glándula a través del canal del pezón. El manejo adecuado del rodeo lechero (equipo de ordeño que funcione correctamente, desinfección de pezones antes y después de cada ordeño, tratamiento de todos los cuartos mamarios de las vacas al secado, tratamiento con un antibiótico específico durante la lactancia ante la detección de mastitis y registro de éstos, descarte de vacas que no responden satisfactoriamente al tratamiento). La supervivencia en el medio ambiente de estos microorganismos, favorece la transmisión indirecta (Gentilini, 2007a).

Tratamiento

Los estafilococos son ubicuos en la piel y en las mucosas y es frecuente su introducción a través de las soluciones de continuidad de la piel. Una prolija limpieza de la herida con jabón germicida y la aplicación de un antiséptico (solución iodada, hexaclorofenol al 3%, clorhexidina), previenen la infección.

Los abscesos cerrados y lesiones supuradas se tratan mediante drenaje y terapéutica antiséptica o antimicrobiana. Si el estafilococo no es productor de betalactamasas, la penicilina G es el antibiótico de elección, aunque el porcentaje de cepas sensibles es muy bajo. Las piodermias graves y extensas, así como los procesos profundos como en las osteomielitis, requieren un

tratamiento sistémico prolongado con penicilinas resistentes a betalactamasas (metilina nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, oxacilina), eritromicina, cefalosporinas, tetraciclinas y vancomicina, quinolonas).

Es difícil erradicar los estafilococos patógenos de animales infectados, debido a que presentan la capacidad de desarrollar R a la mayoría de los antimicrobianos. La vancomicina es el antibiótico útil para tratar estafilococos MR, no obstante se han hallado en algunos países ECN resistentes a vancomicina y *S. aureus* con sensibilidad disminuida a dicho antibiótico (Gentilini, 2007a).

1.7.i Estafilococos coagulasa negativos (ECN) y su participación en las mastitis

Este grupo de bacterias incluye más de 45 especies y 24 subespecies (www.bacterio.net), siendo *Staphylococcus chromogenes*, *S. haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *S. xylosus* y *Staphylococcus simulans*, las especies de mayor frecuencia de aislamientos. Diversos estudios demuestran que existen diferencias en la patogenicidad entre las especies (Zadoks y Schukken, 2006; Taponem y col., 2009).

Los ECN, tradicionalmente fueron considerados patógenos menores comparándolos con *S. aureus*, y su participación en las mastitis era debatida. Se los denomina oportunistas de la microbiota de la piel y mucosas porque pueden ser aislados, entre otros sitios, de la piel del pezón, el canal del pezón, la vagina, pelos.

Al habitar la piel de pezones y ubres de vacas clínicamente sanas, los estafilococos se encuentran en una ubicación estratégica para infectar y

colonizar oportunamente el interior del canal del pezón (Saran, 2000, Taponen y Pyörälä, 2009), y desde allí profundizar la infección hacia los tejidos nobles de la glándula mamaria.

Actualmente se sabe que las infecciones por ECN pueden ser leves o de tipo subclínico, o pueden causar procesos más graves y persistentes con aumento en el recuento de células somáticas (RCS). Además, producen disminución en la calidad y producción de la leche debido al daño causado al tejido mamario (Taponem y col., 2006; Gillespie y col., 2009, Aarestrup y Jensen, 1997; Thorberg y Brändström, 2000).

En mastitis bovina los ECN constituyen un grupo bacteriano con alta frecuencia de aislamientos y son importantes por la habilidad de adquirir R a los antimicrobianos (ATM) de uso habitual en la terapéutica antimastítica. Responden mejor al tratamiento antibiótico que *S. aureus*, aunque la R en los ECN es más común que en *S. aureus* (Taponen y Pyörälä, 2009).

Es sabido que los ECN son reservorios de genes de R a ATM (Kloos y Bannerman, 1994; Persson, 2011). Recientes estudios han demostrado que humanos y ganado bovino comparten *S. epidermidis*. Aunque es difícil demostrar la dirección de la transmisión de R interespecie, sugieren que sería desde el humano al ganado. (Sampimom, 2011).

En nuestro laboratorio se realiza un seguimiento constante de la susceptibilidad de ECN aislados de leche de bovinos con mastitis.

La identificación bacteriana, la detección de factores de patogenicidad y la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos, nos permite inferir sobre la virulencia del aislamiento, la elección de la antibióticoterapia adecuada y el pronóstico de la enfermedad.

1.7.ii Identificación de los ECN

La precisa identificación en el laboratorio a nivel de especies es laboriosa.

Para la identificación fenotípica de los ECN se utilizan una variedad de métodos incluyendo tests comerciales como API STAPH, Staph-Zym, Vitek system, entre otros (Varaldo y col., 1980; Thorberg y Brändström, 2000) y el esquema convencional de Kloos y Schleifer (Kloos y Schleifer, 1975, Kloos y Bannerman, 1994). Estos métodos, basados en reacciones fenotípicas, muchas veces dan resultados contrapuestos (Sampimon y col., 2009). Sin embargo, todavía tiene sentido poner a prueba los criterios básicos para la identificación de los ECN (Becker y col., 2014): gram positivos, catalasa positivos, oxidasa negativos (hay excepciones), coagulasa negativos y anaerobios facultativos, presentados principalmente en forma de clusters. En cuanto a las colonias, éstas varían según la especie. La mayoría de las especies de ECN muestran colonias no pigmentadas, lisas, enteras, relucientes y opacas. Los productores fuertes de slime pueden mostrar una apariencia de colonias mucoides. Después de 2 días de incubación, el diámetro de las colonias alcanzan 3 a 6 mm. Algunas especies pueden mostrar colonias pigmentadas grisáceas, anaranjadas o amarillentas, y algunas además, pueden mostrar una zona de hemólisis alrededor de las colonias (Figura 3).

En los últimos años se han desarrollado métodos moleculares para la identificación (Ghebremedhin y col., 2008; Layer y col., 2006, 2007; Yugueros y col., 2001). El uso de genes diana, con su alta sensibilidad y especificidad nos da una técnica alternativa para la precisa identificación de especies de estafilococos. Estos métodos moleculares basados en ácidos nucleicos se han convertido en estándar, en particular para la verificación de resultados de

identificación ambiguos (Becker y col., 2014). A parte del gen 16S rRNA, se han usado otras secuencias genéticas en muchos estudios: el gen *fem*, el gen *sodA*, el gen *tuf*, el gen *rpoB*, el gen *gap* (Ghebremedhin y col., 2008). El gen 16S rRNA es el gen frecuentemente elegido por ser un gen constitutivo universal y tener una amplia base de datos. A pesar de ello, la amplificación seguida por digestión del gen 16S rRNA no diferencia entre varias especies ECN como por ejemplo entre *S. lentus* y *S. sciuri* (Ghebremedhin y col., 2008) o *S. capitis* y *S. caprae* (Takahashi y col., 1999). De acuerdo con estos datos, se necesita un gen diana más discriminatorio con el fin de poder diferenciar especies de ECN estrechamente relacionadas (Onni y col., 2010).

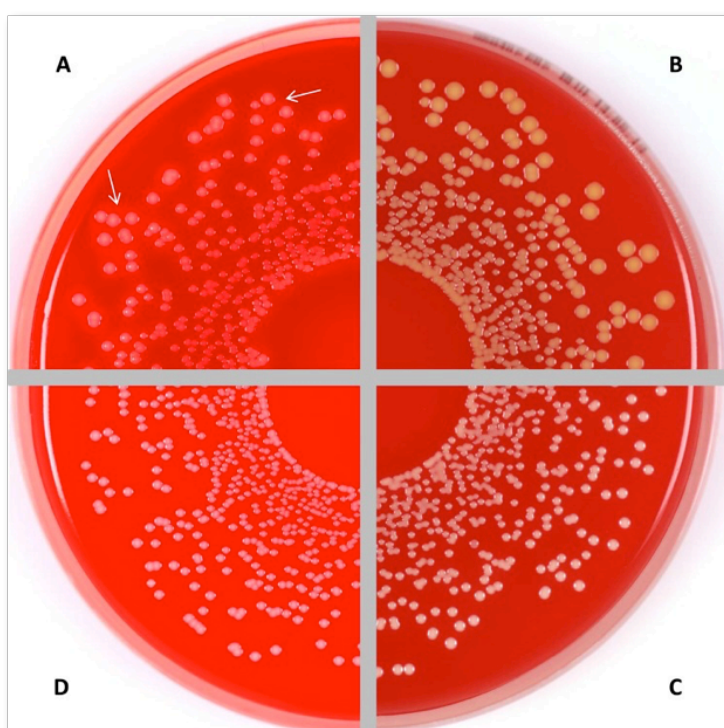
Recientemente, Ghebremedhim y col. (2008) compararon el análisis filogenético de especies de estafilococos basado en secuencias parciales de diferentes genes. Como el gen diana más tradicional para filogenia y taxonomía bacteriana (16S RNAr) no tiene suficiente poder de discriminación dentro del género *Staphylococcus*, estos autores sugieren al gen glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gap*) adecuado como diana para el análisis taxonómico de especies de *Staphylococcus*, comparado con el análisis de las secuencias de los genes *hsp60*, *soda*, *rpoB* y *tuf*. El gen *gap* codifica en 42-kDa una –proteína unión de la transferrina (Tnp) localizada en pared celular de los estafilococos y que es expresada *in vivo* durante la infección (Yugueros, 2000). Se considera un gen constitutivo conservado.

Utilizando enzimas de restricción se pueden obtener perfiles propios de cada una de las especies para poder identificarlas y diferenciarlas entre sí. Con el uso de la enzima *AluI* se obtuvieron buenos resultados (Yugueros y col., 2001) pero según Park y col. (2010), se necesitan las enzimas *RsaI* y *TaqI* para poder

discriminar determinadas especies que presentan patrones similares. En un fragmento de 931 bp de este gen se dispersarían las regiones variables y se podrían discriminar las diferentes especies. Dada la complejidad en la identificación de las especies de ECN es posible que deba aplicarse una combinación de técnicas fenotípicas y moleculares para arribar a un resultado (Onni, 2010).

En la actualidad, en el diagnóstico de rutina de patógenos, se utiliza el método espectroscópico MALDI-TOF MS. Este método, en un futuro cercano, será utilizado en los laboratorios de diagnóstico para la identificación universal de microorganismos (Becker y col., 2014).

Figura 3. Agar sangre mostrando colonias grisáceas y hemolíticas de *S. haemolyticus* (A), colonias naranjas no hemolíticas de *S. chromogenes* (B), colonias cemosas no hemolíticas de *S. lugdunensis* (C), y colonias blanquecinas no hemolíticas de *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* (D).



1.8. Antimicrobianos en las mastitis

La R a ATM constituye un problema sanitario de relevancia mundial tanto en salud humana como en salud animal. Es una realidad que en el marco de los procedimientos veterinarios, el uso habitual en la clínica de ATM para los tratamientos de infecciones, favoreció el desarrollo de R tanto en bacilos gramnegativos como en cocos grampositivos. Esta situación se refleja por el surgimiento de aislamientos multirresistentes que pueden llevar a la falla terapéutica. Si nos planteásemos las probables causas de esta situación, podemos inferir que se trata de un suceso multifactorial, aunque la presión antibiótica ejercida por tratamientos sucesivos ocupa un lugar referencial para generar R.

El impacto económico de esta enfermedad hace que sea necesario aplicar diferentes estrategias para su control, siendo los ATM la principal herramienta.

Al momento de instaurar un tratamiento, debemos tener en cuenta los diferentes mecanismos de R que presentan las bacterias y que se refieren casi en mayor medida a estreptococos y estafilococos entre los patógenos implicados con mayor frecuencia en nuestro medio en los procesos infecciosos de mastitis bovina.

La identificación bacteriana, la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos y el conocimiento de los mecanismos de resistencia, contribuirían al uso responsable y prudente, incluyendo su correcta prescripción y administración por parte del profesional.

El objetivo del uso de antibióticos es lograr con rapidez una concentración efectiva de la droga en el sitio de infección durante el tiempo suficiente y luego mantenerla para permitir que las defensas específicas e inespecíficas del

huésped erradiquen al patógeno (Gentilini y col., 2002b; Giguere y col., 2006). Una bacteria es resistente cuando no es inhibida por las concentraciones séricas de un antibiótico que normalmente se alcanzan a dosis habituales y/o esa concentración de droga pueda caer en el rango donde son comunes ciertos mecanismos específicos de R microbiana para esa droga, como por ejemplo la presencia de β -lactamasas.

Los estafilococos poseen diferentes mecanismos de R: 1) modificación del sitio blanco ribosomal (ARNr 23S), 2) codificación de una bomba de eflujo, 3) codificación de enzimas inactivantes, 4) impermeabilidad, 5) protección ribosomal y 6) biopelícula (Figura 4).

La R a un ATM se manifiesta porque las bacterias presentan un valor en su concentración inhibitoria mínima (CIM) superior al de la población bacteriana. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) proponen ATM considerados como de primera elección como son los β -lactámicos (BL) y el grupo macrólidos - lincosamidas -streptograminas (MLS). Con respecto a los BL, la formación de una proteína de baja afinidad a penicilina (penicillin binding protein PBP2a) codificada por el gen *mecA* es de suma importancia ya que, los microorganismos que son capaces de expresar estas proteínas, son resistentes a meticilina y oxacilina. El gen *mecA* se encuentra en el casete cromosomal estafilocócico (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*), un elemento genético móvil grande, varios tipos de SCC*mec* han sido informados tanto en *S. aureus* meticilino resistente (meticillin-resistant *S. aureus*, MRSA) como en ECN meticilino-resistente (ECN-MR) (Hanssen y Sollid, 2005). La tipificación de SCC*mec* es esencial para la comprensión de la epidemiología molecular de estafilococos resistentes a meticilina. Los elementos SCC*mec* se

clasifican actualmente en los tipos I a V, sobre la base de la naturaleza de los complejos genéticos *mec* y *ccr*, y se clasifican además en subtipos de acuerdo con los segmentos de las regiones adyacentes (junkyard región DNA segments) (Zhang y col, 2005).

Los estafilococos resistentes a la meticilina, son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos porque la actividad de las proteínas inhibidoras de la penicilina inhibidas por los antibióticos (PBPs) se sustituye por la función de una PBP adquirida con baja afinidad (García-Álvarez col., 2011). Estas proteínas de baja afinidad están codificadas por los genes *mecA* o *mecC* (un homólogo *mecA*) localizados en elementos genéticos móviles llamados casetes cromosómicos estafilocócicos (SCC*mec*) (García-Álvarez y col., 2011). Los casetes SCC*mec* son muy diversos en su organización estructural y el contenido genético, y por lo tanto, se han clasificado en tipos y subtipos. Hasta hace poco, se han descrito en estafilococos 10 tipos diferentes de casetes SCC*mec* que portan el gen *mecA* (tipos I-X), así como numerosos subtipos (<http://www.staphylococcus.net>). Más recientemente, se identificó un nuevo alelo de *mecA* (*mecA*_{LGA251}) en MRSA de seres humanos y una gama de especies animales en toda Europa (García-Garrote y col., 2013). Este nuevo alelo ha sido renombrado por el “International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements” como “*mecC*” (en SCC*mec* XI) porque comparte identidad de nucleótidos del 70% con *mecA* (Shore y col., 2011). Más recientemente, se han descrito dos nuevos alotipos *mecC1* y *mecC2* (Loncaric y col., 2013, Harrison y col., 2013). Se ha demostrado que el nuevo alotipo *mecC1* de la cepa S04009 de *Staphylococcus xylosus* y el nuevo alotipo *mecC2* de la cepa 201 de *Staphylococcus*

saprophyticus comparten una identidad de 93,5% y 92,9%, respectivamente, con la secuencia *mecC* de la cepa LGA251 de *S. aureus*.

Los macrólidos, las lincosamidas y las estreptograminas de tipo B (antibióticos MLS_B) son antibióticos químicamente distintos pero que muestran un mecanismo de acción similar, inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias al unirse al sitio P en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano y se usan habitualmente en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas (Merino Díaz y col., 2007).

La resistencia de los estafilococos a estos antibióticos, se debe principalmente a dos mecanismos: bombas de expulsión activa del antibiótico y modificación del sitio de unión del antibiótico por metilación. En el caso de las bombas de expulsión, existen dos tipos (ABC y MSF) localizadas en la superficie citosólica de la membrana, el sistema de expulsión es específico para macrólidos de 14-15 átomos y estreptograminas tipo B. La clindamicina no es sustrato de la expulsión por estas bombas. Las cepas con este mecanismo presentarían bajos niveles de resistencia a eritromicina y estreptogramina del tipo B pero no a clindamicina. Este es el llamado fenotipo MS_B y está codificado por el gen *msrA*.

La modificación ribosómica, también llamada resistencia MLS_B, se debe a la acción de una enzima metilasa codificada por una variedad de genes *erm*, siendo éste el mecanismo de resistencia más común y que además puede conducir a resistencia cruzada a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B. La resistencia MLS_B puede ser constitutiva, cMLS_B, con alto nivel de resistencia cruzada a todos estos agentes, o inducible, iMLS_B, con resistencia a los macrólidos de 14 y 15 átomos (p. ej., eritromicina) y sensibilidad *in vitro* a

macrólidos de 16 átomos, lincosamidas y estreptograminas tipo B, pero in vivo el uso de clindamicina como tratamiento puede seleccionar mutantes con resistencia constitutiva (Merino Díaz y col., 2007).

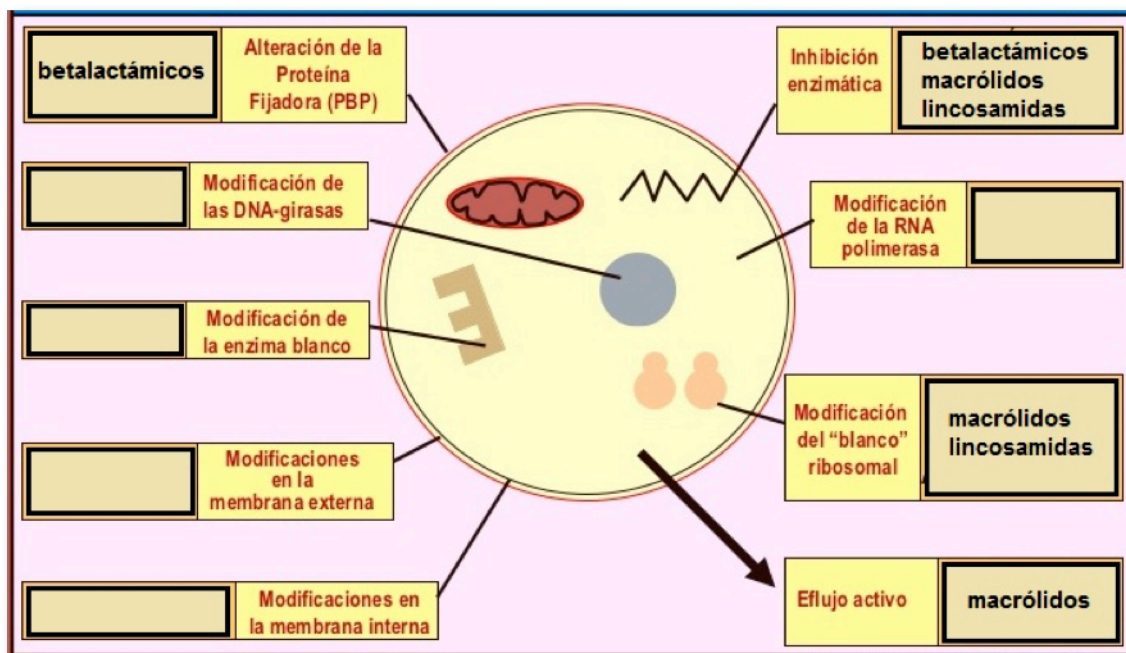
En la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica la sensibilidad a los antibióticos está semiautomatizada basándose en métodos de microdilución en caldo que no permiten detectar la resistencia inducible a clindamicina. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda el método de difusión con doble disco para la detección de la resistencia inducible a clindamicina en *Staphylococcus* spp, debido a que la utilización de clindamicina en pacientes con infección por estafilococos con este tipo de resistencia podría conducir a un posible fracaso terapéutico por la aparición de resistencia a clindamicina durante el tratamiento.

Dentro del género *Staphylococcus* spp, se han encontrado tres genes (*ermA*, *ermB*, y *ermC*) que codifican una metil transferasa responsable de la R a MLS por modificación del sitio blanco ribosomal. El gen *msrA* muestra otro mecanismo de R a macrólidos y estreptograminas luego de la inducción con eritromicina por codificación de una bomba de eflujo ATP-dependiente y el gen *mphC* por codificación de enzimas inactivantes. Por otro lado, el eflujo de macrólidos es efectuado por una proteína de membrana codificada por el gen *mefA*. El gen *InuA* confiere R a lincosamidas solamente (Lina y col. 1999).

Según el tipo de R, el tratamiento ATM será diferente. El control de las mastitis producidas por los estafilococos responderá a las mejores prácticas de manejo en la rutina de ordeño y con el uso racional y selectivo de los ATM.

Además de ser los ECN reservorios de genes de R, algunas especies pueden persistir en la glándula mamaria.

Figura 4. Mecanismos de acción y resistencia a los antimicrobianos de uso habitual en la mastitis bovina.



1.9. Factores de virulencia de ECN en las mastitis.

Los ECN son portadores de genes de virulencia, y existen diferencias entre las especies de ECN que se investigan por técnicas moleculares (Zadoks y Schukken, 2006). Según Taponem y col. (2009) hay especies con diferente susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia aislados de mastitis bovina (Taponem y col, 2009).

Los factores de virulencia de los estafilococos se han estudiado más extensivamente en *S. aureus*. Las toxinas secretadas por esta especie juegan un papel muy importante en su patogenia. Se ha demostrado que cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina expresan las toxinas alfa, beta, gamma y delta, leucocidinas, enterotoxinas y coagulasa. Los ECN también producen varias toxinas y enzimas que podrían contribuir a la virulencia, como hemolisina, leucocidina, lipasa, proteasas y termonucleasa. (Zhang y Maddox,

2000). La termonucleasa ha sido utilizada para la identificación de *S. aureus* como una característica clave (Sasaki, 2007). Recientemente, Becker y col (2005) demostraron la presencia del gen que codifica la termonucleasa (*nuc*) en especies ECN.

Las toxinas secretadas por ECN juegan un papel importante en la patogénesis de infecciones bacterianas (Zhang y Maddox, 2000).

Muchos ECN aislados de muestras de mastitis tuvieron mayor actividad de proteasa, termonucleasa y lecitinasa que aquellos ECN provenientes de vacas normales. Sin embargo el papel de estas enzimas en la patogénesis de los ECN es incierto (Zhang y Maddox, 2000).

La detección de genes de virulencia en los estafilococos es necesaria para poder conocer la patogenia de cada una de las especies involucradas en infecciones intramamarias. La correcta identificación nos permite concluir sobre la virulencia del aislamiento y sustentar la toma de decisiones apropiadas en el manejo de los animales para el control de la enfermedad.

1.10 Biopelículas en los ECN

La prevalencia de los ECN como causa de mastitis bovina se ha incrementado a nivel mundial, considerándose un patógeno emergente. El microentorno que rodea a la bacteria in vivo, tiene un papel importante en la protección de las bacterias tanto frente a la acción del sistema inmune como de los agentes antimicrobianos. Este microentorno puede conseguirse por la formación de una biopelícula microbiana de exopolisacáridos, conocida como “**biofilm**”, de desarrollo propio y adherente a superficies vivas o inertes. Estudios recientes muestran que microorganismos del grupo ECN presentan la habilidad para

formar biofilm (Tremblay y col., 2013) y de esta forma podrían persistir en la glándula mamaria. La capacidad de formación de biofilm proporciona la adherencia de las células a una superficie y la acumulación de capas múltiples para formar grupos de células. Estos agregados no son susceptibles a la fagocitosis y son resistentes a ciertos antibióticos, un factor muy importante para la persistencia de la infección y reacción inflamatoria.

La implicación de biofilm en las infecciones crónicas ha activado un interés creciente en la caracterización de los genes involucrados en su formación.

Existen diversos genes (*aap*, *atlE*, *bap*, *embP*, *eno*, *fbe*, *icaA*) que codifican la síntesis de adhesinas, proteínas de unión a moléculas de la matriz o proteínas asociadas al biofilm (Simojoki y col, 2012). Estas proteínas de superficie son:

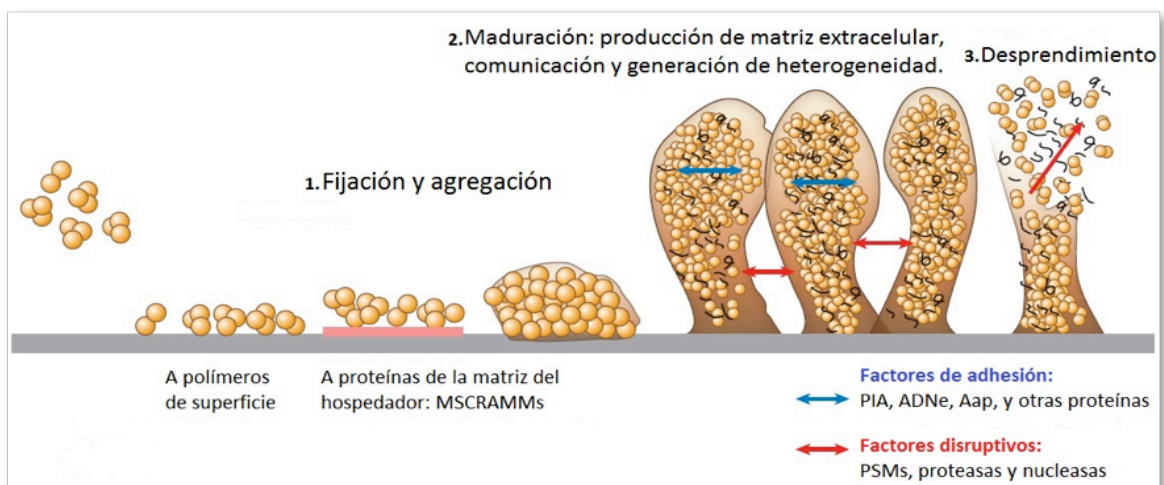
- ✓ Proteína asociada a biofilm **Bap** que participa en el proceso de unión y colonización a un gran número de superficies
- ✓ Proteína asociadas a la acumulación **Aap**
- ✓ Proteínas que favorecen la unión a los componentes de la matriz extracelular
 - ✓ proteínas de adhesión a fibronectina **EmbP**
 - ✓ proteínas de adhesión a laminina **Eno**
 - ✓ proteínas de adhesión al fibrinógeno **Fbe**
- ✓ Proteína con función de adhesina/autolisina **AltE**
- ✓ Operón *ica* (**icaA**) que codifica para la maquinaria que sintetiza el polisacárido de adhesión intercelular (PIA).

La biosíntesis de biofilm es regulada por el operón *ica*. La expresión del gen *ica* está modulada por diversas condiciones ambientales y puede activarse o desactivarse por secuencias de inserción. La capacidad de formación de biofilm

proporciona al menos dos propiedades: la adherencia de las células a una superficie y la acumulación de capas múltiples para formar grupos de células. Estos agregados no son susceptibles a la fagocitosis del macrófago y son resistentes a ciertos antibióticos (Götz, 2002).

La formación de biofilm puede dividirse en 3 pasos (Figura 5). En el primer lugar, las bacterias se adhieren rápidamente a la superficie biótica (a proteínas de la matriz del hospedador) o abiótica (a polímeros de superficie). Después de la unión/ fijación, las bacterias se multiplican y se acumulan en agregados de células de capas múltiples, un proceso que requiere la adhesión intercelular. Este biofilm crece y madura en una capa gruesa y estructurada, un biofilm maduro contiene canales que están llenos de líquido para asegurar el pasaje de oxígeno y nutrientes a las células bacterianas localizadas en las capas más profundas del biofilm. Por último, las células individuales o aglomerados de células se pueden disociar del biofilm y difundir a través de la corriente sanguínea para iniciar la colonización y la formación de biofilm en un sitio diferente (Becker y col., 2014).

Figura 5. Formación de un Biofilm y sus 3 fases.



2. HIPOTESIS

La hipótesis básica es que los ECN están evolucionando en su capacidad de inducir patogenicidad. Existe una diversidad genética dentro de los ECN. Los fenotipos que han adquirido capacidad de producción de enzimas, toxinas, proteasas, variación en la producción de derivados polisacáridos han aumentado su capacidad de inducir patogenicidad y son capaces de transferir estas características a bacterias receptoras. La correcta identificación bacteriana, monitoreo de la R, conocimiento de los mecanismos de R y diferentes factores de virulencia de los estafilococos contribuirían en el control de la salud de la GM en los rodeos lecheros.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo general*

Determinar molecularmente y fenotípicamente los diferentes factores de virulencia y resistencia a antimicrobianos de especies de ECN. Evaluar la asociación entre la portación de marcadores de virulencia y/o resistencia y las especies implicadas.

3.2 *Objetivos Específicos*

Capítulo I

- Objetivo I. Identificar fenotípicamente y molecularmente por PRC-RFLP n=138 aislamientos de ECN provenientes de leche de vacas con mastitis.
- Objetivo II. Determinar la susceptibilidad a los ATM por el método de Kirby-Bauer, difusión con discos.
- Objetivo III. Determinar por PCR los genes que codifican R a ATM (*blaZ*, *mecA*, *mecC*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *InuA*, *mefA*, *mphC*, *msrA*)
- Objetivo IV. Determinar por PCR los tipos y subtipos del casete SCC*mec* en las especies ECN-MR.
- Objetivo V. Analizar la relación clonal de los ECN-MR mediante PFGE.

Capítulo II

- Objetivo I. Evaluar la habilidad para formar biofilm por distintas especies de ECN.
- Objetivo II. Determinar por PCR los genes que codifican factores de patogenicidad: proteínas de adhesión y proteínas asociadas al biofilm (*aap*, *atlE*, *bap*, *clfA*, *embP*, *eno*, *fbe*, *icaA*), genes que codifican hemolisinas (*hla*,

hlb), gen que codifica la enzima coagulasa (*coa*), y el gen que codifica el factor de agregación “clumping factor” (*clfA*). Determinar fenotípicamente la actividad hemolítica.

4. CAPÍTULO I

Objetivo I. Identificar fenotípica y molecularmente por PCR-RFLP n=138 aislamientos de ECN provenientes de leche de vacas con mastitis.

4.1 MATERIALES y METODOS

4.1.i Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo

Se procesaron 530 muestras provenientes de leches de vacas con mastitis de 21 cuencas lecheras de Argentina (Santa Fé, Buenos Aires, La Pampa, Córdoba y Entre Ríos) durante 2013-2015.

Cultivo, aislamiento e identificación: brevemente, se realizó en placas de agar sangre, sembrando 10 µl de las muestras de leche e incubando a 37°C durante 48 horas en aerobiosis, según el National Mastitis Council (1999). El género se identificó con tinción de Gram y pruebas de: catalasa, óxido-fermentación de la glucosa, y susceptibilidad a 0,04 U de bacitracina. La identificación de los ECN, se efectuó mediante pruebas metabólicas y bioquímicas, entre otras: coagulasa, hemólisis, sensibilidad a 5µg de novobiocina, oxidasa, β-galactosidasa (Laboratorio Britania. Argentina). Todas las cepas fueron conservadas en caldo tripteína soja (CTS) con 20% de glicerina a -20°C hasta el momento del uso. La recuperación se realizó en CTS a 37°C durante 18 a 24 hs. Se usaron cepas de referencia pertenecientes al American Type Culture Collection (ATCC) cedidas por la Dra. Silvia Pedrari (Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina), incluyendo las siguientes: *S. capitis* ATCC 35661, *S. conhii* subsp *conhii* ATCC 35662, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *S.*

saprophyticus ATCC 15305, *S. sciuri* subsp *sciuri* ATCC 29060, *S. simulans* ATCC 27851, *S. warneri* ATCC 49954, *S. xylosus* ATCC 29972.

Se seleccionaron n=138 ECN aleatoriamente.

4.1.ii Extracción de ADN

La extracción de ADN en todos los estafilococos se realizó con el equipo Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los extractos se conservaron a -20°C hasta su utilización. Se utilizó 5 µl de cada extracto para análisis por PCR.

4.1.iii Identificación de los ECN

Se amplificó por PCR un fragmento de ~933 pb correspondiente al gen gap (Srednik y col., 2015; Yugueros y col., 2000) (Tabla I). La amplificación por PCR se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf). Se utilizó una *Taq* polimerasa (Promega) y la mezcla para la reacción de PCR consistió en: 3 µl del extracto de ADN de los aislamientos, 5 µl de buffer con 1,5 mM Cl₂Mg, 0,2 mM de dNTPs, 0,1 mM de cada cebador, 0,5 mM de cloruro de magnesio, 0,5 U de polimerasa y agua destilada hasta un volumen final de 25 µl. El ADN se desnaturalizó a 94°C durante 5 min. Luego del ciclo final, las reacciones se terminaron con un período de extensión adicional de 72°C por 5 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% (Promega) en Tris-borato-EDTA (TBE) buffer, tinción con bromuro de etidio 1% y observación con un transiluminador UV.

Los diferentes amplicones del gen gap obtenidos por PCR fueron digeridos con *AluI*, *Clal*, *RsaI*, *TaqI* (Fermentas). Todos los productos fueron primeramente

digeridos con 1 U de *AluI* e incubados a 37° durante toda la noche. Según el perfil de compatibilidad de la especie identificada, se utilizó 1 U de *RsaI* o *ClaI* incubando a 37°C o *TaqI* incubando a 65°C toda la noche, para poder identificar aquellas especies que mostraron idéntico patrón de digestión.

Tabla I. Cebadores y condiciones de PCR para la identificación de especies de ECN.

Gen	Producto	Secuencia (5'-3')	Tamaño Amplicon (pb)	No. of PCR ciclos (condiciones)	Referencia
<i>gap</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA GACATTTTCGTTATCATACCAACGTG	933	40 (20" a 94°C; 30" a 60 °C; 40" a 72°C)	Yugueros y col. (2000)

4.1.iv Perfil fenotípico de Resistencia a Antimicrobianos

Objetivo II. Determinar la susceptibilidad a los ATM por el método de Kirby-Bauer, difusión con discos.

La susceptibilidad a los diferentes ATM analizados se determinó con monodiscos (BBL) de antibióticos: clindamicina CLI (2 µg), eritromicina ERI (15 µg), cefoxitina FOX (30 µg) y penicilina PEN (10U) por el método de difusión. Los puntos de corte (CLSI, 2013) para interpretar al microorganismo como resistente (R) fue: CLI ≤ 14 mm, ERI ≤ 13 mm, FOX ≤ 23 mm y PEN ≤ 28 mm. La CIM de OXA (256-0,016 µg/ml) se determinó con tiras E-test® (AB BIODISK, Solna, Sweden). El punto de corte para interpretar al microorganismo como R fue OXA ≥ 0,5 µg/ml.

4.1.v Perfil genotípico de Resistencia a Antimicrobianos

Objetivo III. Determinar por PCR los genes que codifican R a ATM (*blaZ*, *mecA*, *mecC*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *InuA*, *mefA*, *mphC*, *msrA*)

Para identificar el genotipo de resistencia, se evaluó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de los genes *blaZ*, *mecA* y *mecC* involucrados en la resistencia a BL y los genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *InuA*, *mefA*, *mphC* y *msrA* involucrados en la resistencia a MLS.

Para la detección de los genes de resistencia a ATM se realizaron 10 PCR.

La mezcla para la reacción consistió en: 200 ng de ADN, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 μM de cada uno de los cebadores, 5 μl de buffer 10X, 1,25 U de Taq DNA polimerasa (BioLabs) y agua destilada hasta un volumen final de 25 μl. Para los distintos genes, se utilizaron diferentes ciclos y condiciones (Tabla II). El ADN se desnaturalizó a 94°C durante 6 min, y luego del ciclo final, las reacciones se terminaron con un período de extensión adicional de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% (Biodynamics) en Tris-borato-EDTA (TBE) buffer, tinción con bromuro de etidio 1% y observación con un transiluminador.

Se utilizaron cepas controles: para el gen *mecA* y *ermA*, la cepa MRSA 97, para el gen *ermC* la cepa MRSA 154N y para el gen *mefA* la cepa SCN-3 (Laboratoire Dre Marie Archambault, Université de Montréal, Québec); para el gen *mecC*, la cepa *S. aureus* LGA251 (García-Álvarez y col., 2011), para el gen *blaZ*, la cepa ATCC *S. aureus* 29213, para el gen *ermB*, la cepa CCRI-1317, para el gen *mrsA*, la cepa CCRI-9330, para el gen *mphC*, la cepa CCRI-8926 (Centre de Recherche en Infectologie de l'Université de Laval, Québec); para el gen *InuA*, la cepa M979-11 (MAPAQ Diagnostic laboratory).

Se secuenciarán los productos de PCR positivos al gen *mecC*.

Tabla II. Cebadores y condiciones de PCR utilizados para detectar los genes de resistencia a ATM en ECN de mastitis bovina.

Gen	Proteína codificada	Secuencia de cebadores	pb	Condiciones de PCR	Referencia
<i>mecA</i>	PBP2a	GTG AAG ATA TAC CAA GTG ATT ATG CGC TAT AGA TTG AAA GGA T	147	30 (30 s a 94°C; 30 s a 57°C; 1 min a 72°C)	(Zhang y col., 2005)
<i>mecC</i>	PBP2a	GCT CCT AAT GCT AAT GCA TAA GCA ATA ATG ACT ACC	304	30 (30 s a 94°C; 30 s a 52°C; 30 s a 72°C)	(Cuny y col., 2011)
<i>blaZ</i>	β-lactamasa	ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC GA CCA CTT TTA TCA GCA ACC	173	30 (30 s a 94°C; 30 s a 55°C; 30 s a 72°C)	(Martineau y col., 2000)
<i>ermA</i>	Enzima metiltransferasa	CTT CGA TAG TTT ATT AAT ATT AGT TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA	645	30 (1 min a 94°C; 1 min a 54°C; 2 min a 72°C)	(Chung y col., 1999)
<i>ermB</i>	Enzima metiltransferasa	AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA	639	35 (1 min a 94°C; 1 min a 50°C; 1 min a 72°C)	Idem <i>ermA</i>
<i>ermC</i>	Enzima metiltransferasa	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA	642	Idem <i>ermA</i>	Idem <i>ermA</i>
<i>InuA</i>	Enzima inactivante	GGT GGC TGG GGG GTA GAT GTA TTA ACT GG GCT TCT TTT GAA ATA CAT GGT ATT TTT CGA	323	30 (30 s a 94°C; 30 s a 57°C; 1 min a 72°C)	(Lina y col., 1999)
<i>mefA</i>	Bomba de eflujo	ATG CAG ACC AAA AGC GCG AT CGG TAT CTG TTC TGG TAG CG	253	35 (1 min a 94°C; 1 min a 37°C; 2 min a 72°C)	(Luna y col., 2000)
<i>msrA</i>	Bomba de eflujo	GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT	940	25 (1 min a 94°C; 1 min a 50°C; 1 m 30 s a 72°C)	Idem <i>InuA</i>
<i>mphC</i>	Enzima fosfotransferasa	GAG ACT ACC AAG AAG ACC TGA CG CAT ACG CCG ATT CTC CTG AT	772	35 (1 min a 94°C; 1 min a 59°C; 2 min a 72°C)	(Lüthje & Schwarz, 2006)

4.1.vi Identificación de tipos y subtipos del casete SCCmec

Objetivo IV. Determinar por PCR los tipos y subtipos del casete SCCmec en las especies ECN-MR.

Se determinó por PCR los tipos y subtipos del casete SCCmec en las especies ECN-MR (**Tabla III**).

Se realizó la detección de los tipos (I a V) y subtipos (IV) del casete SCCmec, para ello se realizaron 8 PCR según Zhang y col. (2005).

La mezcla para la reacción consistió en: 200 ng de ADN, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 μM de cada uno de los cebadores, 5 μl de buffer 10X, 1,25 U de Taq DNA polimerasa (BioLabs) y agua destilada hasta un volumen final de 25 μl. Para los distintos genes, se utilizaron los mismos ciclos y condiciones: el ADN se desnaturalizó a 94°C durante 5 min, se realizaron 10 ciclos (94°C 45 seg; 65°C 45 seg y 72°C 90 seg) y 25 ciclos (94°C 45 seg, 55°C 45 seg y 72°C 90 seg), las reacciones se terminaron con un período de extensión adicional de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% (Biodinamics) en Tris-borato-EDTA (TBE) buffer, tinción con bromuro de etidio 1% y observación con un transiluminador.

Se utilizaron cepas controles: para el gen SCCmecI, la cepa MRSA-COL, para el gen SCCmecII la cepa CCRI-9214, para el gen SCCmecIII la cepa CCRI-1317, para el gen SCCmec IVa, la cepa CCRI-220, para el gen SCCmecIVb la cepa MRSA-241, para el gen SCCmecIVc la cepa CCRI-9598, para el gen SCCmecIVd la cepa CCRI-9593 y para el gen SCCmecV la cepa MRSA 97 (Laboratoire Dre Marie Archambault, Université de Montréal y Centre de Recherche en Infectologie de l'Université de Laval, Québec);

Tabla III. Tipos del casete SCCmec y subtipos del tipo IV.

Gen	Complejo <i>mec</i>	Complejo <i>ccr</i>	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)
SCCmec I	Clase B	Tipo 1	GCTTTAAAGAGTGTCTGTTACAGG GTTCTCTCATAGTATGACGTCC	613
SCCmec II	Clase A	Tipo 2	CGTTGAAGATGATGAAGCG CGAAATCAATGGTTAATGGACC	398
SCCmec III	Clase A	Tipo 3	CCATATTGTGTACGATGCG CCTTAGTTGTCGTAACAGATCG	280
SCCmec IVa	Clase B	Tipo 2	GCCTTATTCGAAGAAACCG CTACTCTTCTGAAAAGCGTCC	776
SCCmec IVb	Clase B	Tipo 2	TCTGGAATTACTTCAGCTGC AAACAATATTGCTCTCCCTC	493
SCCmec IVc	Clase B	Tipo 2	ACAATATTTGTATTATCGGAGAGC TTGGTATGAGGTATTGCTGG	200
SCCmec IVd	Clase B	Tipo 2	CTCAAATACGGACCCCAATACA TGCTCCAGTAATTGCTAAAG	881
SCCmec V	Clase C	Tipo 5	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325

4.1.vii Determinación del Origen Clonal

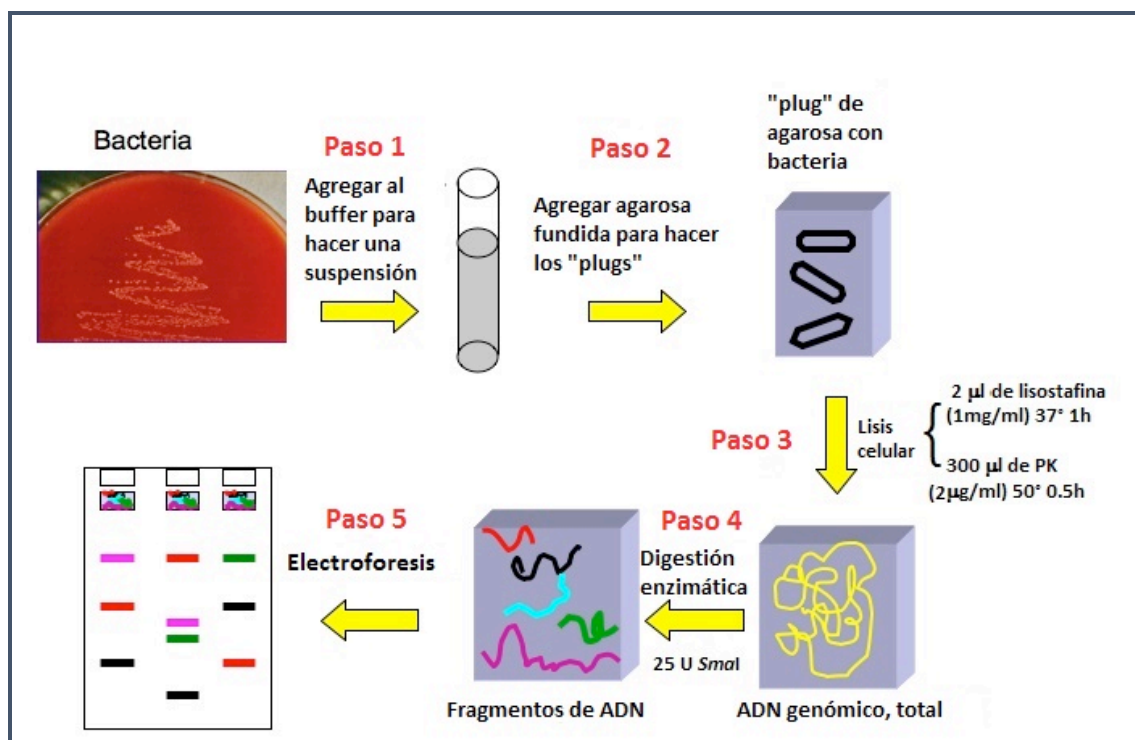
Objetivo V. Analizar la relación conal de los ECN-MR mediante PFGE.

Se determinó el origen clonal de las especies *S. epidermidis* meticilino resistentes mediante Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) siguiendo el protocolo de Mulvey y col. (2001). Como indica el **esquema I**, se tomó con un ansa una colonia aislada de las cepa a tipificar y se sembró en caldo cerebro corazón (CCC); se incubó en agitación durante 16-18 hs. Se colocó 150 µl del cultivo en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 18.000xg durante 1 min y luego se resuspendió el sedimento celular en 150 µl de *cell suspension buffer*. Se hicieron 2 “plugs” para cada muestra. Se preparó agarosa de bajo punto de fusión (LMP) en agua destilada y se incubó en un baño de María a 50°C hasta

su uso. A cada muestra se agregó 2 µl de enzima lisostafina (1 mg/ml) por tubo y se mezcló. Se agregó 150 µl de agarosa 2% LPM mezclando con la pipeta varias veces. Se llenaron 2 moldes de “plugs” (100 µl por plug) y se dejaron solidificar durante 15 min a temperatura ambiente. Se traspasaron los plugs a nuevos tubos y se agregó 500 µl de *lysis buffer* a cada tubo. Los tubos se incubaron a 37°C durante 4 horas. Luego se aspiró el buffer con una pipeta y se colocó 500 µl de enzima proteinasa K - PK buffer (50 µg/ml) a cada tubo. Se incubaron los tubos a 50°C durante media hora y se hicieron 3 los lavados con 1,4 ml de *wash buffer* dejándolo en los tubos 30 min a temperatura ambiente. Se colocaron los tubos con los plugs con *wash buffer* a 4°C hasta su digestión. Se cortó 1/3 de cada plug y se colocó en un nuevo tubo de microcentrífuga y se agregó 300 µl de *restriction enzyme buffer* (REB) y se dejó durante 10 min a temperatura ambiente. Se digirió el ADN total de las cepas con la enzima **SmaI** con una incubación de 4 horas a 37°C: se agregó 150 µl de REB con 25 U de *SmaI* a cada tubo y se incubó. Se hizo la corrida en un gel de agarosa al 1%. Se aspiró la solución enzima-buffer de cada tubo y se fundieron los plugs a 65-70°C durante 10-15 min. Se colocó un marcador de peso molecular lambda (NO340, New England Biolabs, Ontario, Canada) y se cargó 30 µl de los plugs fundidos en las calles del gel. Se colocó el gel con todas las muestras cargadas y solidificadas en la cama de buffer. Se corrió por electroforesis con un equipo CHEF DR-III (Bio-rad) utilizando tiempos de conexión de 5.3 a 34.9 por 18 horas a 6.0 V/cm y 14°C en 0,5X TBE. Se tiñó el gel durante 20 min con 0,5 mg de bromuro de etidio por litro y se lavó con agua destilada durante 30 min con 3 cambios de agua. Las muestras se visualizaron con transiluminador de luz UV.

Las bandas patrones resultantes se analizaron utilizando Bionumerics software versión 6.6 (Applied Maths, Belgium).

Esquema I. PFGE para determinar el origen clonal de las cepas *S. epidermidis*-MR.



4.2 RESULTADOS

4.2.i Objetivo I.

Identificación fenotípica y molecular por PCR-RFLP.

Fenotípicamente, se identificaron n=138 ECN.

Con la metodología descrita de PCR-RFLP se identificaron 16 especies ECN. Estas especies presentaron igual patrón que las cepas de referencia y los patrones *RFLP in silico*. La especie más prevalente resultó ser *S. chromogenes* (n=59; 42,8%), seguida de *S. epidermidis* (n=19; 13,8%), y en tercer lugar *S. devriesei* (n=12; 8,7%). El total de las especies identificadas pueden observarse en la **Tabla I**.

4.2.ii Objetivos II y III.

Determinación de susceptibilidad a los ATM por el método de difusión con discos y genes de R por PCR.

En las siguientes tablas (**Tabla II, III, IV, V**) se presentan los resultados de los estudios de susceptibilidad a ATM, y los genes de R encontrados en los aislamientos estudiados.

En la **Tabla VI** se observan las especies de ECN identificados por PCR-RFLP, su perfil de resistencia a antimicrobianos y genes de resistencia detectados.

En la **Tabla VII** se observan las frecuencias de genes encontradas en las diferentes especies de ECN.

En los **Gráficos I, II, III, IV y V** se ilustran algunos de los resultados presentados en las tablas.

En la **Figura I** se observa el análisis de la secuenciación de la cepa *S. saprophyticus* V131.

Tabla I. Especies de ECN identificados por PCR-RFLP.

especies	n (%)
<i>S. chromogenes</i>	59 (42,8)
<i>S. epidermidis</i>	19 (13,8)
<i>S. devriesei</i>	12 (8,7)
<i>S. haemolyticus</i>	8 (5,8)
<i>S. xylosus</i>	8 (5,8)
<i>S. cohnii</i>	5 (3,6)
<i>S. hyicus</i>	5 (3,6)
<i>S. saprophyticus</i>	6 (4,3)
<i>S. warneri</i>	5 (3,6)
<i>S. caprae</i>	3 (2,2)
<i>S. simulans</i>	3 (2,2)
<i>S. sciuri</i>	1 (0,7)
<i>S. capitis</i>	1 (0,7)
<i>S. gallinarum</i>	1 (0,7)
<i>S. hominis</i>	1 (0,7)
<i>S. carnosus</i>	1 (0,7)
TOTAL	138

Tabla II. Porcentaje de resistencia a BL y ML en los ECN

Antibióticos	% de Resistencia
PEN	18,8 (26/138)
FOX	1,5 (2/138)
OXA (CIM)	3,6 (5/138)
ERI	10,1 (14/138)
CLI	6,5 (9/138)

*PEN: penicilina; FOX: cefoxitina; OXA: oxacilina;
ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; BL: betalactámicos
CIM: concentración inhibitoria mínima*

Tabla III. Porcentaje de ECN portadores de genes de resistencia a BL

% de Resistencia	Genes de R a BL
20,3 (28/138)	<i>blaZ</i>
2,9 (4/138)	<i>mecA</i>
0,7 (1/138)	<i>mecC</i>

ECN: estafilococos coagulasa-negativos;
R: resistencia; BL: betalactámicos

Tabla VI. Porcentaje de ECN portadores de genes de resistencia a macrólidos-lincosamidas (ML)

% de ECN	Genes de R a ML
6,5 (9/138)	<i>ermC</i>
4,3 (6/138)	<i>ermB</i>
3,6 (5/138)	<i>mphC</i>
2,2 (3/138)	<i>msrA</i>

R: resistencia
ECN; estafilococos coagulasa-negativos
ML: macrólidos-lincosamidas

Tabla V. Combinaciones de genes de R a ML por *n* aislamientos de ECN

Combinaciones	<i>n</i> de ECN
<i>ermB + ermC</i>	5
<i>ermC</i>	3
<i>ermB + mphC</i>	2
<i>msrC + mphC</i>	2
<i>ermC + mphC</i>	1
<i>mrsA</i>	1

ECN: estafilococos coagulasa-negativos

Tabla VI. Especies de ECN identificados por PCR-RFLP, su perfil de resistencia a antimicrobianos y genes de resistencia detectados.

especies	Gen <i>blaZ</i>	R PEN (≤28 mm)	Gen <i>mecA</i>	Gen <i>mecC</i>	R FOX (≤24 mm)	CIM OXA (≥0,5 µg/ml)	Gen <i>ermB</i>	Gen <i>ermC</i>	Gen <i>msrA</i>	Gen <i>mphC</i>	R ERI (≤13 mm)	R CLI (≤14 mm)
<i>S. chromogenes</i>	59	10	12	1		1	4	5	1	2	6	5
<i>S. epidermidis</i>	19	7	5	3	1	3	2	2	2	2	5	2
<i>S. devriesei</i>	12											
<i>S. haemolyticus</i>	8	1	1									
<i>S. xylosus</i>	8	1	1		1					1	1	
<i>S. cohnii</i>	5											
<i>S. hyicus</i>	5	1										
<i>S. saprophyticus</i>	6	1	1	1		1						
<i>S. warneri</i>	5	3	1									
<i>S. caprae</i>	3							2			2	2
<i>S. simulans</i>	3	2	1									
<i>S. sciuri</i>	1											
<i>S. capitis</i>	1	1	1									
<i>S. gallinarum</i>	1											
<i>S. hominis</i>	1	1	1									
<i>S. carnosus</i>	1	1	1									
TOTAL	138	28	26	4	1	2	6	9	3	5	14	9

CIM: concentración inhibitoria mínima; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; FOX: cefoxiltina; OXA: oxacilina; PEN: penicilina.

Tabla VII. Porcentaje de resistencia a BL y ML entre las especies más frecuentes.

Genes	Especies de ECN
<i>blaZ</i>	66,7% (2/3) <i>S. simulans</i> 60% (3/5) <i>S. warneri</i> 36% (7/19) <i>S. epidermidis</i> 17% (10/50) <i>S. chromogenes</i>
<i>mecA</i>	75% (3/4) <i>S. epidermidis</i> 25% (1/4) <i>S. chomogenes</i>
<i>mecC</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>ermB</i>	66,7% (4/6) <i>S. chomogenes</i> 33,3% (2/6) <i>S. epidermidis</i>
<i>ermC</i>	55,6% (5/9) <i>S. chomogenes</i> 22,2% (2/9) <i>S. epidermidis</i> 22,2% (2/9) <i>S. caprae</i>
<i>mrsA</i>	66,7% (2/3) <i>S. epidermidis</i> 33,3% (1/3) <i>S. chomogenes</i>
<i>mphC</i>	40% (2/5) <i>S. chomogenes</i> 40% (2/5) <i>S. epidermidis</i> 20% (1/5) <i>S. xylosus</i>

ECN: estafilococos coagulasa-negativos

Gráfico I. Prueba de susceptibilidad por el método de difusión con monodiscos de cefoxitina (FOX 30 μ g) y penicilina (P 10 U).



Gráfico II. Prueba de susceptibilidad por el método de difusión con monodiscos de eritromicina (E 15 μ g) y clindamicina (DA 2 μ g).

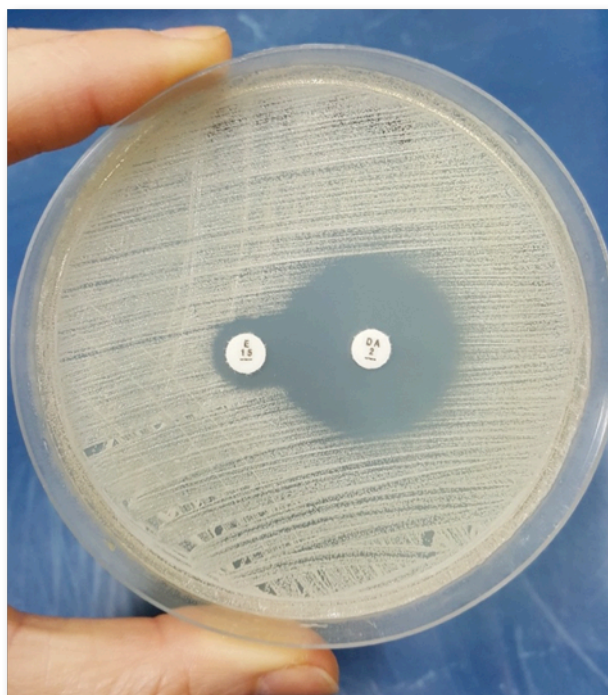


Gráfico III. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima de oxacilina con tiras E-test® (OX 256-0,016 µg/ml).

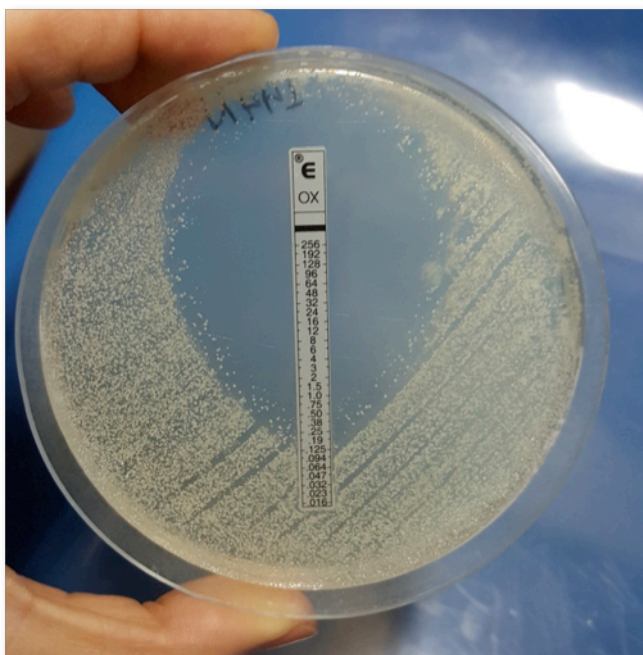


Gráfico IV. Amplicones del gen *mecA*, *mecC* y *blaZ* por PCR. Electroforesis en gel de agarosa 2%. 1= aislamiento positivo al gen *mecA* (147 pb). 2 = aislamiento positivo al gen *mecC* (304 pb). 3= aislamientos positivos al gen *blaZ* (173 pb). M= marcador de peso molecular (100 pb).

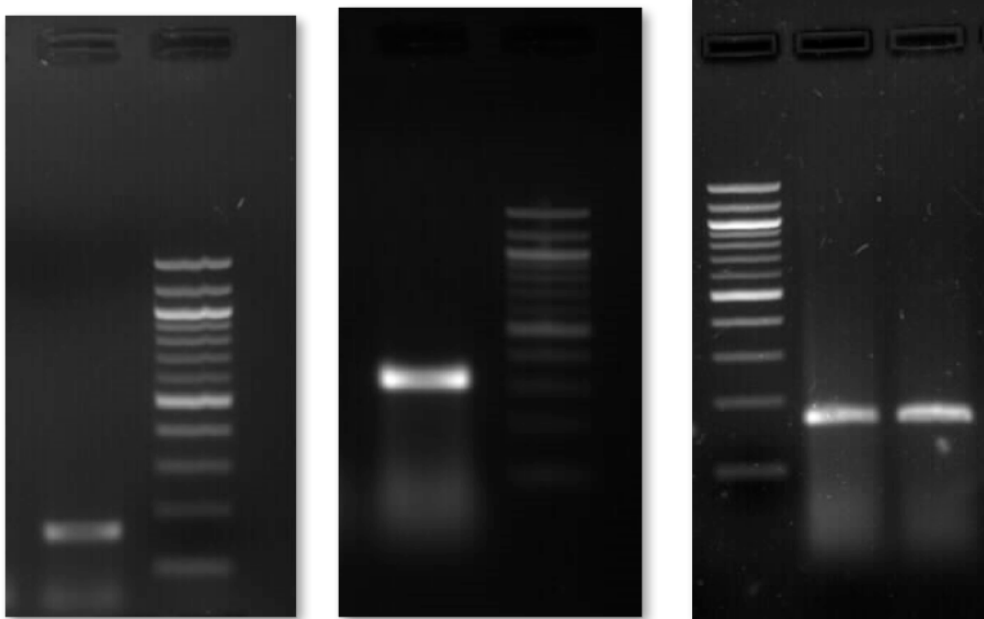


Gráfico V. Amplicones del gen *ermB*, *ermC*, *mrsA* y *mphC* por PCR. Electroforesis en gel de agarosa 2%. 1= aislamiento positivo al gen *ermB* (639 pb). 2 = aislamiento positivo al gen *ermC* (642 pb). 3 = aislamiento positivo al gen *mrsA* (940 pb). 4 = aislamiento positivo al gen *mphC* (772 pb). M= marcador de peso molecular (100 pb).

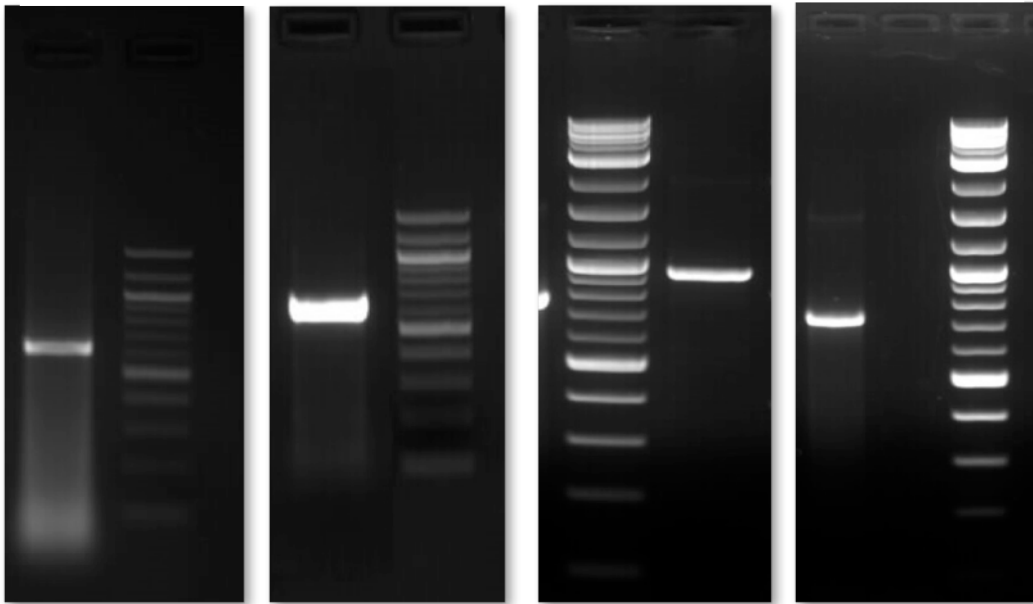
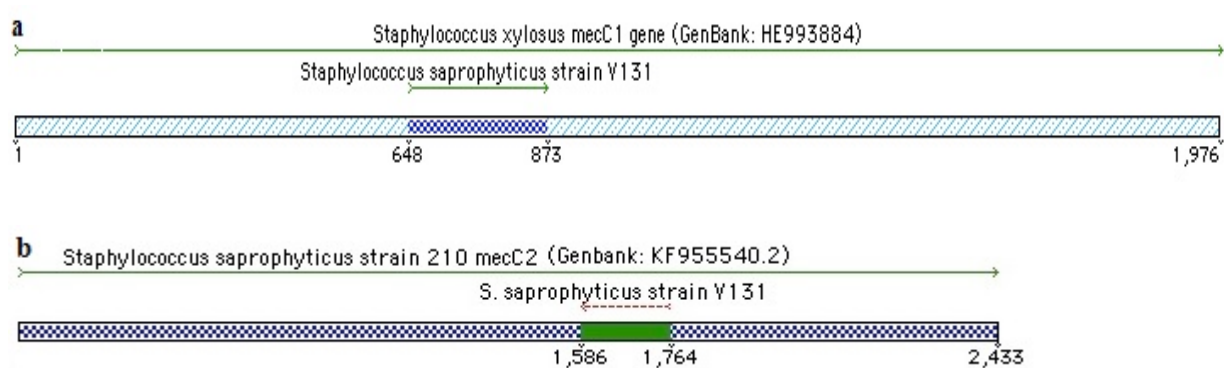


Figura I. Análisis de la secuenciación de la cepa *S. saprophyticus* V131. A) Comparando con el producto de PCR de la cepa *S. xylosus* S04009 (GenBank: HE993884), 225 pb del producto tiene 100% de identidad de secuencia de nucleótidos. B) Comparando con el producto de PCR de la cepa *S. saprophyticus* 210 (GenBank: 955540.2), 178 pb del producto tiene 97.7% de identidad de secuencia de nucleótidos.



4.2.iii Objetivos IV y V.

Determinación de los tipos y subtipos del casete SCCmec en los ECN-MR y la relación clonal mediante PFGE.

Se pudieron clasificar 4 de los 5 ECN-MR.

Dos de los aislamientos analizados se clasificaron como casete SCCmec tipo II y otros dos aislamientos se clasificaron como casete SCCmec tipo IVa.

No se encontró relación clonal en los 3 ECN-MR identificados como *S. epidermidis*.

En los **Gráficos VI y VII** se muestran los resultados de tipificación y análisis de relación clonal.

Gráfico VI. Resultados de PCR para tipificación del casete SCCmec. **a.** Casete SCCmec II 398 bp (cepa ECN-MR F1b y cepa ECN-MR N144) **b.** Casete SCCmec IVa 776 pb (cepa ECN-MR D33 y cepa ECN-MR K46).

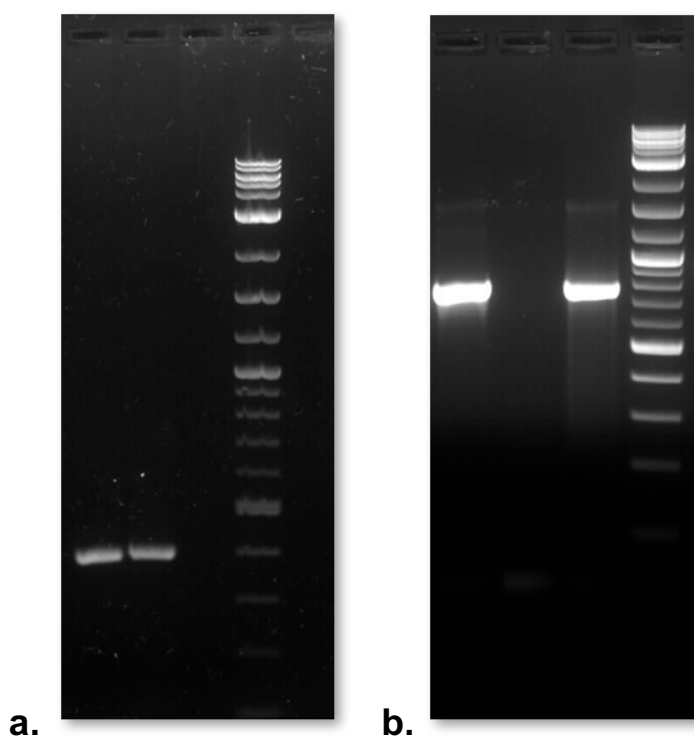
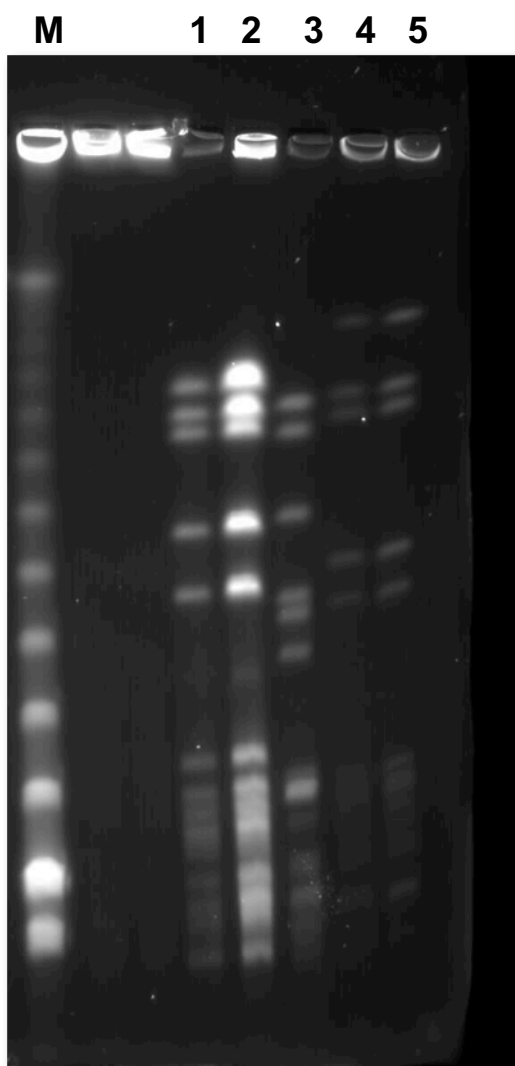


Gráfico VII. PFGE de las 3 cepas de *S. epidermidis*-MR. Calles 1-2= cepa D33; 3= cepas K46 y 4-5= cepa N144; M=marcador molecular.



4.3 DISCUSION

4.3.i Identificación fenotípica y molecular por PCR-RFLP (Objetivo I).

La mastitis bovina es causada por numerosos agentes etiológicos, pero en los últimos años la frecuencia de aislamientos de ECN se ha incrementado a nivel mundial, considerándose un patógeno emergente (Bradley y col., 2007; Gentilini y col., 2002b; Salmon y col., 1998; Sampimon y col., 2009). En este estudio, la especie de ECN más frecuentemente hallada a partir de muestras de mastitis bovina fue *S. chromogenes* (59/138; 42,8%). Este resultado concuerda con estudios realizados en otros países, como por ejemplo en Bélgica (46.4%; Supré y col., 2011), Estados Unidos (36.3%, Sawant y col., 2009) y Países Bajos (36%; Sampimon y col., 2011). No obstante, según lo informado por Thorberg y col. (52%; 2009), *S. epidermidis* fue la especie más frecuentemente aislada en establecimientos lecheros en Suecia, *S. xylosus* lo fue en Suiza según lo informado por Frey y col. (36%, 2013), en Polonia según Kot y col. (52,6%, 2012) y en Brasil de acuerdo a un estudio de Soares y col. (70%; 2012).

Luego de *S. chromogenes*, la segunda especie más hallada fue *S. epidermidis* (19/138; 13,8%), seguida de *S. devriesei* (12/138; 8,7%). Para estas especies, en cuanto a la frecuencia de especies identificadas, no existe coincidencia, variando las especies y proporciones encontradas en cada país. Comparando con resultados en otras regiones de Argentina, Raspanti y col. (2016) informaron a *S. chromogenes* (46,6%) como la especie más prevalente, coincidiendo con nuestros resultados, pero la segunda especie más hallada resultó *S. haemolyticus* (32%), sin hallazgos de la especie *S. devriesei* que nosotros pudimos detectar.

Con la técnica de RFLP-PCR del gen *gap* se pudieron identificar todas las especies y subespecies ECN estudiadas, contrariamente con lo que sucede con los métodos fenotípicos basados en pruebas metabólicas y bioquímicas, que muchas veces sólo se logra llegar hasta la identificación de grupo.

Actualmente, en los laboratorios de centros de diagnóstico importantes, se están implementando otros métodos de identificación automáticos más sofisticados como el MALDI-TOF MS, que promete ser una técnica más rápida y precisa (Becker y col., 2014), pero hoy en día no está al alcance de todos los laboratorios de rutina.

4.3.ii Determinación de susceptibilidad a BL y ML por el método de difusión con discos y genes de R por PCR. Determinación de los tipos y subtipos del casete SCCmec en los ECN-MR y la relación clonal mediante PFGE (Objetivos II, III, IV y V).

Los β -lactámicos son los ATB más frecuentemente utilizados para el tratamiento de las mastitis en todo el mundo (Saran y Shaffer, 2000). La resistencia a β -lactámicos se ha informado para ECN, *S. aureus* y otros ECP (Gentilini y col., 2002b; De Oliveira y col., 2000; Luthje y col., 2006).

Del estudio de susceptibilidad de los ECN frente a los ATM, resultó que el porcentaje de resistencia a β -lactámicos coincide con lo informado por otros autores. La resistencia a PEN, detectada por la presencia del gen *blaZ* entre aislamientos ECN en el presente estudio fue comparable con lo informado por Frey y col. en Suiza (23,3%; 2013), por Sawant y col. en Estados Unidos (17,3%; 2009), lo informado por Soares y col. en Brasil (16%; 2012) y más baja que lo informado por Sampimon y col. en Países Bajos (80%; 2011). Moon y

col. en Korea (2007) informaron un 60,2% de resistencia a PEN, detectada en este caso, sólo por el método de difusión con monodisco de PEN.

La diferencia en el porcentaje de resistencia entre países es multifactorial, pero podría estar relacionada con las condiciones de manejo de los animales y la terapéutica de las mastitis en los distintos establecimientos lecheros.

En nuestro estudio, la mayoría de los aislamientos que resultaron positivos al gen *blaZ*, fueron susceptibles a PEN. La no expresión de resistencia a PEN en 4 de los aislamientos portadores del gen *blaZ* analizados en este estudio, podría ser debido a la falta de inducción y por consecuencia la expresión del gen, tal como lo manifiestan De Oliveira y col. (2000) para *S. aureus*, donde destacan que la presencia de genes de resistencia no necesariamente se correlaciona con la resistencia fenotípica, y viceversa.

En esta investigación, un aislamiento resistente a PEN y OXA por difusión utilizando monodisco y resistente a OXA por la determinación de la CIM de OXA, resultó negativo a la presencia de los genes *blaZ* y *mecA*, se detectó la presencia del *mecC*.

Con respecto a la detección del gen *mecA*, se ha encontrado en varias especies de estafilococos (Febler y col., 2010; Frey y col., 2013; Kot y col., 2012; Sampimon y col., 2011; Sawant y col., 2009).

El porcentaje de ECN-MR positivos al gen *mecA* determinado en este estudio, coincide según lo informado por Sawant y col. en EE.UU. (2009), con un 6,5% en *S. epidermidis* portadores del gen *mecA*. Moser y col. en Suecia (2013) informaron 6% de ECN-MR realizando el estudio con pruebas de difusión con monodiscos, Soares y col. en Brasil (2012) detectaron 4% de MR en *S. xylosus*. En otros países, el porcentaje de MR es más elevado. Sampimon y

col. en los Países Bajos (2011) detectaron un 14% de MR, Febler y col. en Alemania (2010) un 12,4%, Seixas y col. en Portugal (2014) un 9,3%. En otros países el porcentaje es más bajo, en Polonia Kot y col. (2012) informaron 2,3% ECN-MR; en Suecia, según Bengtsson y col. (2009) un 1,8%; en Korea, un estudio de Moon y col. (2007) informó un 1,6%; y en Turquía Bal y col. (2010) un 1,22% de ECN portadores del gen *mecA*.

En este estudio, 4 de los 5 ECN-MR detectados por PCR, portaron el gen *mecA*, pero en 3 de ellos no se correlacionó la presencia del gen con la expresión de la resistencia con el disco de FOX, pero sí con la CIM de OXA. Según el estudio realizado por Sampimon y col. (2011) esta situación podría ser debida a la falta de inducción y en consecuencia la expresión del gen, o a la falta de funcionalidad del mismo.

En muchos de los estudios, las pruebas de difusión con monodiscos o las CIMs realizadas no se correlacionaron con la presencia del gen *mecA*. La mayoría de los resultados en muchas investigaciones, muestran que el porcentaje de las pruebas fenotípicas es mucho mayor que el porcentaje de detección del gen *mecA* (Bal y col., 2010; Bengtsson y col. 2009; Frey y col. 2013; Kot y col. 2012; Moon y col. 2007; Sampimon y col., 2011; Soares y col., 2012).

La expresión fenotípica de la resistencia mediada por el gen *mecA* es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados.

Una explicación podría ser porque se pueden diferenciar dos tipos de cepas ECN resistentes a la meticilina, unas con resistencia homogénea y otras con resistencia heterogénea. En las cepas que presentan resistencia homogénea o

de alto nivel a la oxacilina, la mayor parte de la población expresa la resistencia. Sin embargo, la expresión fenotípica de la resistencia a la meticilina generalmente es heterogénea (CIM de OXA 1-16mg/ml). Las cepas con expresión heterogénea se caracterizan porque sólo una pequeña proporción de la población (<0,1%) sobrevive con concentraciones de OXA superiores a 10 mg/ml, mientras que la mayor parte de la población no es viable con bajas concentraciones de antimicrobiano (1-5 mg/ml) (Chamers, 1997; Torres y Cercenado, 2010). Otra explicación posible es la presencia del gen homólogo *mecC*, por lo que, habría que realizar la detección de ambos genes en caso de que se presenten aislamientos resistentes a OXA/FOX por pruebas de difusión o CIM y negativos al gen *mecA*.

En este estudio, el aislamiento de ECN que resultó ser resistente a PEN, *mecA* negativo pero *mecC* positivo, fue identificado como *Staphylococcus saprophyticus* por RLFP-PCR. El análisis de secuencias del gen *mecC*, mostró que este producto de PCR tenía identidad de secuencia de nucleótidos del 100% con el alotipo *mecC1* de *S. xylosus* S04009 y 97,7% con el alotipo *mecC2* de la cepa de *S. saprophyticus* 210.

El gen *mecC* recientemente descrito y sus alotipos han sido detectados por PCR en sólo cuatro SNC de origen animal: *Staphylococcus stepanovicii* de un lince europeo salvaje en Austria (Loncaric y col., 2013), *S. xylosus* de leche bovina en Francia (Harrison y col., 2013), *Staphylococcus sciuri* de heridas por incisión por cesárea en bovinos Blue Belga (Harrison y col., 2014) y *S. saprophyticus* de un pequeño mamífero salvaje en Polonia (Malyszco y col., 2014). En cuanto al manejo de los establecimientos lecheros, Gentilini y col.

(2002) recomiendan que los animales portadores de ECN-MR (que presentan el gen y no lo expresan), deberían ser apartados del tambo.

Varios estudios han identificado reservorios de ECN (Pate y col., 2011). *S. epidermidis* también se encuentra en humanos (Getermann y col., 2007). Los humanos y el ganado vacuno pueden compartir cepas de *S. epidermidis*, lo que implica que MRSE de bovinos podrían ser patógenos zoonóticos (Sampimon y col., 2011).

S. epidermidis está asociado a infecciones nosocomiales por el uso de catéteres en medicina humana (Rupp y Archer, 1994). Esto indica que los bovinos y los humanos podrían compartir cepas de *S. epidermidis*. Este hecho es muy importante en salud pública por la posible transferencia que pudiera existir de genes de resistencia entre estas especies hacia el humano (Thorberg y col., 2006). La transferencia de genes entre especies y especies y humano no está aún muy comprendida, siendo motivo de actuales y futuros estudios. Lo más importante de este hecho es que, entre los resultados de este estudio, se identificaron 2 especies *S. epidermidis*-MR y éstas no exhibieron resistencia por el test de difusión con discos. La presencia del gen *mecA* en ausencia de resistencia fenotípica a OXA se informó anteriormente para *S. sciuri*, especie descrita como fuente de origen del gen *mecA* (Couto y col., 1996; Chambers, 1997). En cuanto a *S. aureus*-MR, hay estudios que sugieren que *S. aureus* haya adquirido el gen *mecA* y sus genes reguladores de los ECN (Deurenberg y col., 2007) y por ello ECN positivos al gen *mecA* son reservorios potenciales de estos elementos (Hanssen y Kjeldsen, 2004) para la transferencia horizontal de genes de resistencia a ATM.

Entre las diferentes especies de ECN se encontró diversidad en cuanto a la portación de genes de R y la expresión fenotípica de los mismos.

La correlación entre portación de genes de resistencia y la expresión de los mismos no siempre ocurre (Sampimon y col., 2011). Se informaron algunas ventajas en los métodos de detección genéticos de la resistencia en comparación con los métodos convencionales de susceptibilidad (Asfour & Darwish, 2011). Además, el CLSI recomienda la detección por PCR de la presencia del gen *mecA* como método más fiable para la detección de MR (CLSI, 2013). De acuerdo con Sampimon y col. (2011), el uso de PCR para determinar el perfil de resistencia en estafilococos aislados de mastitis bovina, debe ser abordado con precaución ya que la presencia de genes de resistencia no es necesariamente indicativa de resistencia fenotípica y viceversa.

Con respecto al estudio sobre el tipo y subtipo de casete de los aislamientos MR, 2 de los 3 aislamientos pertenecientes a la especie *S. epidermidis* pertenecieron al subtipo SCC*mec* IVa y el otro aislamiento *S. epidermidis* al tipo SCC*mec* II, al igual que el aislamiento *S. xylosus*; mientras que el aislamiento de la especie *S. saprophyticus* no se pudo tipificar. Los 2 aislamientos tipificados como clase II son portadores de genes de resistencia a β -lactámicos y ML, y los aislamientos clasificados como clase IVa son portadores sólo de genes de resistencia a β -lactámicos. Algunos de los resultados obtenidos coinciden con estudios realizados en otros países, en Brasil y col. (2014) informaron ECN pertenecientes al subtipo IVa y algunos no tipificables, En Finlandia Gidonis y col. (2013) informaron aislamientos pertenecientes a los tipos SCC*mec* IV, V y algunos no tipificables. En

Alemania, Febler y col. (2010) informaron aislamientos de ECN pertenecientes a los tipos III, IV, V y algunos no tipificables.

La tipificación del casete *SCCmec* es una importante herramienta para entender la epidemiología y relación clonal de *S. aureus*-MR (MRSA), los cuales pueden estar clasificados en: hospital asociado (HA-MRSA), comunidad adquirido MRSA (CA-MRSA) y asociado al ganado (LA-MRSA). Existen diferencias substanciales entre estos tipos en términos de distribución de toxinas, factores de riesgo y susceptibilidad antimicrobiana (Vandenesch y col., 2003). Los tipos de casete *SCCmec* IV y V están asociados frecuentemente con CA-MRSA, los cuales portan un casete pequeño que confiere resistencia sólo a antibióticos β -lactámicos. Por otro lado, los HA-MRSA portan frecuentemente los tipos I, II y III y son generalmente multirresistentes (Vandenesch y col., 2003).

La detección de perfiles de resistencia a ML entre los ECN aislados de mastitis bovina es importante porque la mayoría de los genes ML son de origen plasmídico y por ello, está presente el potencial de propagación o diseminación clonal de resistencia entre patógenos (Sampimon y col., 2011).

La R encontrada a ML en los ECN fue del 10,1%, con aislamientos positivos a los genes *ermC*, *ermB*, *msrA* y *mphC*, siendo el gen *ermC* el más dominante, confiriendo resistencia cruzada al grupo MLS. Estos 4 genes se encontraron distribuidos con mayor frecuencia en las especies *S. chromogenes* y *S. epidermidis*.

El porcentaje de R es bajo comparado con otros países. En Polonia, Kot y col. (2012) hallaron 15,6% de resistencia a ML y el gen *ermC* resultó ser el

dominante entre los aislamientos (55,5%). En los Países Bajos la resistencia a ML (24,1%) se asoció con el gen *InuA* en un 20% y sólo se detectó el gen *ermC* en un 3% (Sampimon y col., 2011). En Turquía, Aslantas y col. (2011) detectaron 19,4% de R a ML en donde todos los aislamientos fueron positivos para *msrA*. Observaciones similares informaron Lina y col. (1999) en Francia, donde el 44% de los aislamientos con R a ML resultaron positivos para *ermC* en muestras clínicas de humanos. En Alemania, Lüthje & Schwarz (2006) observaron 10,4% de resistencia a ML asociada con los genes *InuA* (41,9%), *msrA* (32,3%) y *mphC* (32,3%). En España, en humanos, el gen *ermA* resultó el más prevalente, aunque también se detectó el gen *ermB* y *ermC* (Torres y col., 2010).

4.4 CONCLUSIÓN

- **S. chromogenes* es la especie de ECN más frecuentemente aislada.
- *Los mecanismos de resistencia emergentes, como el gen *mecC* que codifica MR, hallado en *S. saprophyticus*, requieren la detección temprana y confirmación de la resistencia, a fin de administrar la terapia adecuada.
- *Nuevas guías de diagnóstico veterinario para la detección de MRSA y MR-ECN deberían considerar la inclusión de una prueba de PCR para el gen *mecC* debido al riesgo potencial de transferencia lateral de genes de resistencia entre especies estafilocócicas.
- *Los aislamientos de *S. epidermidis*MR por presencia del gen *mecA*, pertenecieron a clones diferentes, no relacionados con clones epidémicos.
- *Existe un espectro considerable de portación de genes de R de los ECN frente a ML, distribuidos en su mayoría en *S. chromogenes* y *S. epidermidis*.
- *Los aportes del presente estudio, permiten conocer sobre la presencia local de genes de resistencia en diferentes especies de ECN, frente a BL y ML en bovinos productores de leche.
- *El uso de ATM para el tratamiento de mastitis bovina promueve por presión antibiótica, la emergencia de R en los estafilococos y otros cocos en el ganado lechero.
- *La correcta identificación de las diferentes especies, la susceptibilidad frente a los antibióticos en los ECN son conocimientos necesarios para conocer la patogenia de las infecciones intramamarias y según el mecanismo de resistencia poder predecir su evolución y establecer estrategias terapéuticas para el control de las mastitis.

5. CAPÍTULO II

5.1 MATERIALES y METODOS

Objetivo I. Evaluar la habilidad para formar biofilm por distintas especies de ECN.

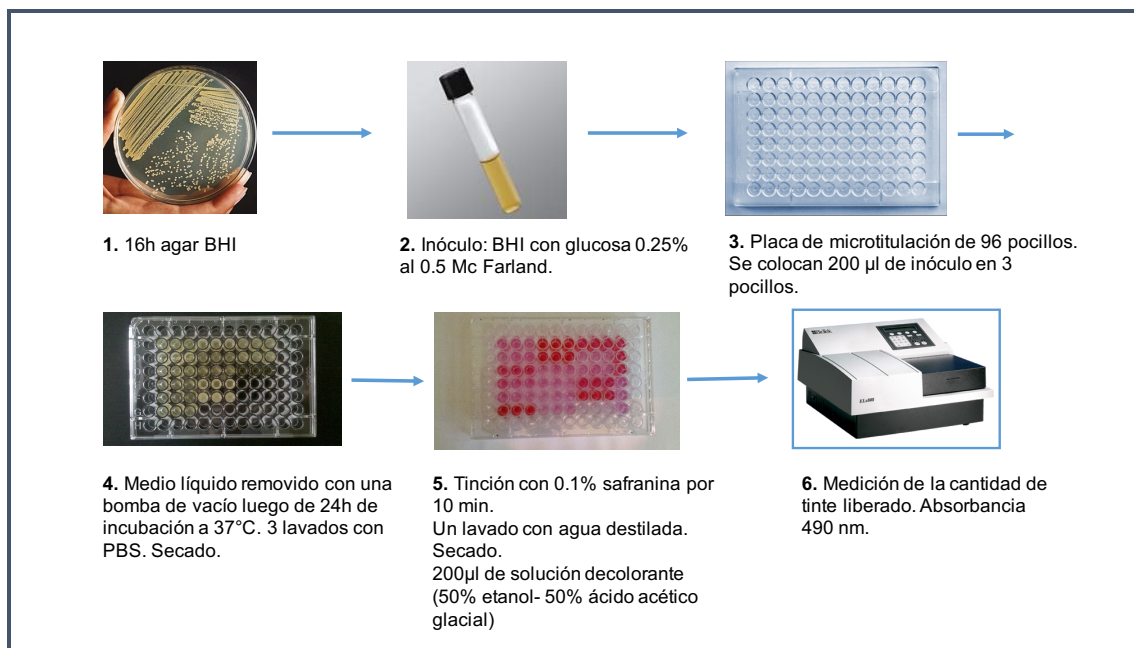
5.1.i Habilidad de formación de Biofilm

Se analizó y cuantificó la habilidad de formación de biofilm de los ECN en placas de microtitulación. Las biopelículas se cultivaron en placas de microtitulación de 96 pocillos como lo describe Tremblay y col. (2013). Se suspendieron en caldo cerebro corazón suplementado con glucosa (0,25%) colonias (16 horas de incubación en agar cerebro corazón) con una turbidez del tubo 0,5 Mc Farland. Un volumen (200 μ l) de este inóculo se transfirió a 3 pocillos, y la placa de microtitulación se incubó a 37°C. Después de una incubación de 24 horas, se retiró el medio haciendo vacío, y las células planctónicas se eliminaron por 3 lavados de los pocillos con PBS. Las biopelículas se secaron al aire y después se tiñeron con safranina 0,1% durante 10 min. Se hizo un lavado con agua destilada y luego se secaron a 37°C durante 15 min. La tinción se reveló con 200 μ l de solución decolorante (50% etanol-50% ácido acético glacial) y la cantidad de tinción liberada se cuantificó midiendo la absorbancia a 490 nm con un lector de microplacas (Esquema I).

Se hicieron 3 pruebas con cada cepa en 3 días independientes.

La habilidad de formar biofilm de un ECN se clasificó como: **negativo** ($A_{490} < 0.110$), **débil** ($0.110 < A_{490} < 0.500$), **moderada** ($0.500 < A_{490} < 1.500$) o **fuerte** ($A_{490} > 1.500$). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando los programas Excel y Gradpad.

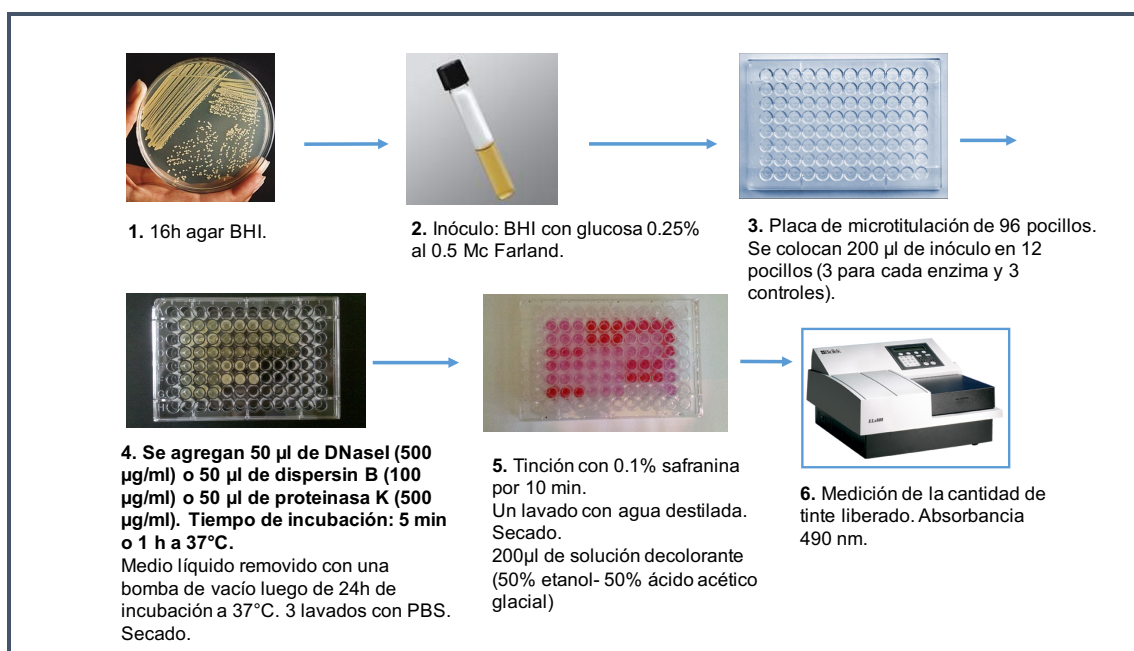
Esquema I. Ensayo para la habilidad de formación de biopelículas.



5.1.ii **Dispersión de Biopelículas con tratamiento enzimático**

Se seleccionó un total de 10 productores de biofilm fuertes, representando las especies más frecuentemente aisladas. Las biopelículas se cultivaron como se describió en el punto anterior y se trataron como lo informó Tremblay y *col.* (2013). Después de la incubación de 24 horas, se agregó directamente a los pocillos con biofilm (3 para cada enzima): 50 μ l de ADNasal (500 μ g/ml en 150 nM NaCl, 1 nM CaCl₂), 50 μ l de dispersina B (100 μ l/ml en PBS) ó 50 μ l de proteinasa K (500 μ g/ml en 50 nM tris-HCl pH 7,5; 1 mM CaCl₂). Los pocillos controles (3 pocillos) se trataron con 50 μ l solución tampón sin enzima. Los pocillos tratados con dispersina B se incubaron durante 5 min a 37°C, y los tratados con proteinasa K o ADNasal se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de los tratamientos, las biopelículas se lavaron y tiñeron como se describió anteriormente.

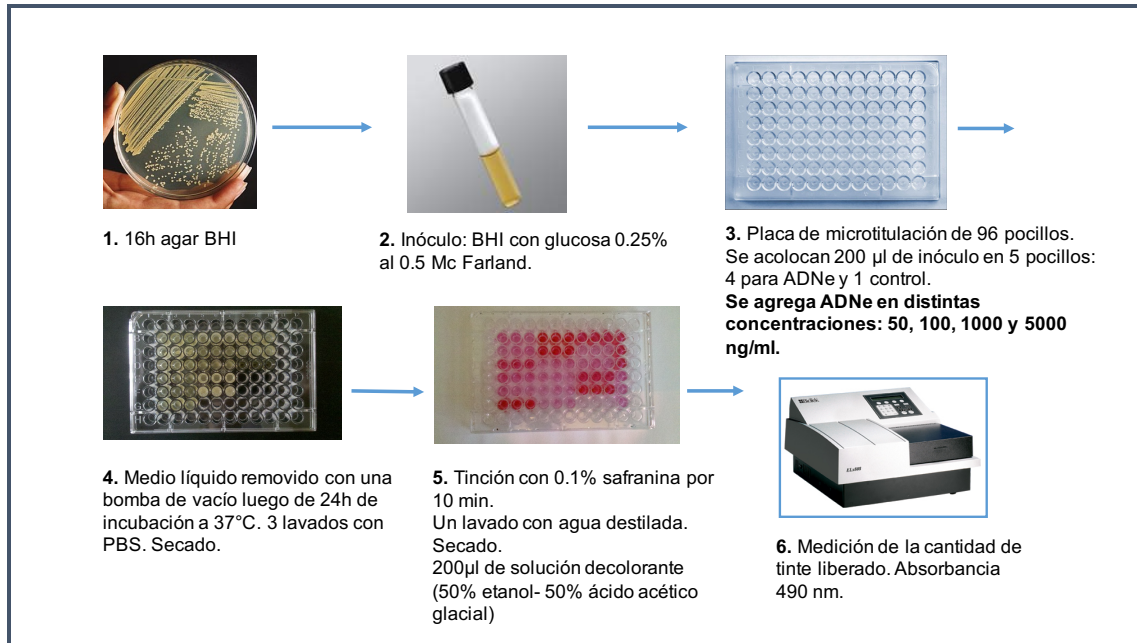
Esquema II. Ensayo para la dispersión de biopelículas con tratamientos enzimáticos.



5.1.iii Formación de Biopelículas con el agregado de ADN extracelular

Se seleccionaron 5 cepas de ECN: 3 *S. chromogenes* débiles productores de biofilm, 1 cepa *S. devriesei* productor débil de biofilm, y 1 cepa *S. chromogenes* productor de biofilm fuerte. Las biopelículas se cultivaron como se describió en el punto anterior y se siguió un protocolo modificado según lo descrito por Carrolo y col. (2010). Se colocaron 200 μ l de cada inóculo en 5 pocillos y a cada pocillo se le agregó: 50, 100, 1000 y 5000 ng/ml de ADN purificado extraído de cepas ECN. Los pocillos controles se trataron con solución tampón sin ADN. Después de una incubación de 24 horas, las biopelículas se lavaron y tiñeron como se describió anteriormente.

Esquema III. Ensayo para la habilidad de formación de biopelículas con el agregado de ADN extracelular (ADNe).



5.1.iv Perfil genotípico de Proteínas Asociadas al Biofilm

Objetivo II. Determinar por PCR los genes que codifican factores de patogenicidad: proteínas de adhesión y proteínas asociadas al biofilm (*aap*, *atlE*, *bap*, *clfA*, *embP*, *eno*, *fbe*, *icaA*).

Para determinar la presencia de proteínas asociadas al biofilm, se evaluaron por PCR los genes *aap*, *atlE*, *bap*, *clfA*, *embP*, *eno*, *fbe* e *icaA*.

La mezcla para la reacción consistió en: 200 ng de ADN, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada uno de los cebadores, 5 µl de buffer 10X, 1,25 U de Taq DNA polimerasa (BioLabs) y agua destilada hasta un volumen final de 25 µl. Para los distintos genes, se utilizaron diferentes ciclos y condiciones (**Tabla I**). El ADN se desnaturalizó a 94°C durante 6 min, y luego del ciclo final, las reacciones se terminaron con un período de extensión adicional de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel

de agarosa 2% (Biodinamics) en Tris-borato-EDTA (TBE) buffer, tinción con bromuro de etidio 1% y observación con un transiluminador.

Las cepas controles utilizadas fueron: para el gen *bap*, la cepa *S. aureus* V329 (Cucarella y col., 2001), para los genes *icaA*, *aap*, *fbe*, *atlE* y *embP* la cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 y para el gen *eno* la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Tabla I. Cebadores y condiciones de PCR de genes asociados a la formación de biofilm en ECN aislados de mastitis bovina.

Gen	Producto	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
<i>bap</i>	Proteínas asociada al biofilm	ACT TAY TRC CHT ATA TCG AAR TAG GCT GTT GAA GTT AAT ACT GTA CCT GC	900	30 (30 s a 94°C; 30 s a 57°C; 30 s a 72°C)	Tremblay y col. (2013)
<i>icaA</i>	Proteína de adhesión intracelular	CTG TTT CAT GGA AAC TCC TCG ATG CGA TTT GTT CAA ACA	200	30 (30 s a 94°C; 30 s a 57°C; 30 s a 72°C)	Idem <i>bap</i>
<i>aap</i>	Proteína asociada a la acumulación	GAA GCA CCG AAT GTT CCA ACT ATC AGT TGG CGG TAT ATC TAT TGT A	289	30 (30 s a 94°C; 30 s a 52°C; 30 s a 72°C)	Idem <i>bap</i>
<i>fbe</i>	Adhesina a fibrinógeno	CTA CAA GTT CAG GTC AAG GAC AAG G GCG TCG GCG TAT ATC CTT CAG	273	30 (30 s a 94°C; 30 s a 45°C; 30 s a 72°C)	Idem <i>bap</i>
<i>atlE</i>	Adhesina y autolisina	CAA CTG CTC AAC CGA GAA CA TTT GTA GAT GTT GTG CCC CA	682	30 (30 s a 94°C; 30 s a 45°C; 30 s a 72°C)	Idem <i>bap</i>
<i>embP</i>	Adhesina a fibronectina	AGC GGT ACA AAT GTC AAT AGA AGT GCT CTA GCA TCA TCC	455	30 (30 s a 94°C; 30 s a 47°C; 30 s a 72°C)	Idem <i>bap</i>
<i>eno</i>	Proteína de unión a laminina	ACG TGC AGC AGC TGA CT CAA CAG CAT CTT CAG TAC CTT C	302	25 (1 min a 94°C; 1 min a 57°C; 1 min a 72°C)	Simojoki y col. (2012)

5.1.v Perfil genotípico de Marcadores de Virulencia

Objetivo II: Determinar por PCR los genes que codifican hemolisinas (*hla*, *hlb*), gen que codifica la enzima coagulasa (*coa*), y el gen que codifica el factor de agregación “clumping factor” (*clfA*).

Para identificar el genotipo de virulencia, se evaluó por PCR la presencia de los genes *hla*, *hlb* que codifican las hemolisinas α y β , el gen *coa* que codifica para la enzima coagulasa, y el gen *clfA* que codifica el “clumping factor”.

En cada mezcla de reacción se utilizó 2,5 μ l del extracto de ADN de los aislamientos, 10X de buffer de reacción con 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de mezcla de dNTPs (Promega), 10 pmol de cada primer (Ruralex), 2 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega) y agua destilada hasta un volumen final de 30 μ l. Para los distintos genes, se utilizaron diferentes ciclos y condiciones (**Tabla II**).

Luego de cada ciclo final, las reacciones se terminaron con un ciclo extra a 72°C por 7 min. Todas las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf). Los productos de PCR serán analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% (Biodynamics) en 0,5% de Tris-borato-EDTA (TBE) buffer, tinción con bromuro de etidio 1% y observación con un transiluminador.

Las cepas controles fueron: cepa interna *S. aureus* 65.

Tabla II. Cebadores y condiciones de PCR para la detección de los genes de que codifican factores de virulencia en ECN.

Gen	Producto	Cebadores	Condiciones de PCR	Referencias
<i>hla</i>	hemolisina alfa	CTG ATT ACTATC CAA GAA ATT CGA TTG CTT TCC AGC CTA CTA CTT TTT TAT CAG	30 (30 s a 94°C, 30 s a 53°C y 1 min a 72°C)	Adhikari y col. (2002)
<i>hlb</i>	hemolisina beta	GTG CAC TTA CTG ACA ATA GTG C GTT GAT GAG TAG CTA CCT TCA GT	Idem <i>hla</i>	Idem <i>hla</i>
<i>coa</i>	coagulasa	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	30 (94°C por 30 s, 58°C por 30 s y 72°C por 1 min)	Karan y col. (2007)
<i>clfA</i>	clumping factor	GGC TTC AGT GCT TGT AGG TTT TCA GGG TCA ATA TAA GC	Idem <i>coa</i>	Stephan y col. (2000)

5.1.vi Actividad hemolítica

Objetivo II. Determinar fenotípicamente la actividad hemolítica.

Se evaluó la presencia de hemolisinas. La actividad hemolítica se determinó en agar sangre (agar cerebro corazón suplementado con sangre ovina al 5%) luego de una incubación a 37°C por 24 hs. y otras 24 hs. a temperatura ambiente siguiendo las indicaciones descriptas por Feney y col. (1999).

La presencia de β -toxina se evaluó realizando una prueba con el microorganismo *Rhodococcus equi* que posee el factor equi, cuyo fundamento es la interacción de este factor con la β -toxina de *S. aureus*, aumentando la hemólisis en esta cepa. La prueba se realiza en una placa de agar sangre donde se siembra verticalmente una estría de la cepa R. Equi y perpendicular a ésta, otra de *S. aureus* (control positivo) y los ECN en estudio. Luego de 16 a 18 hs a 35°C se observa el aumento o no de hemólisis (Camponovo y col., 2006).

5.1.vii *Análisis estadístico I: digestión enzimática y biofilm*

Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis con una prueba de comparación múltiple de Dunn utilizando GraphPad Prism, versión 6.0 (GraphPad software, san Diego, CA, USA) para comparar la formación de biopelículas entre las especies de ECN y las digestiones enzimáticas.

5.1.viii *Análisis estadístico II: asociación entre los factores de virulencia*

Se realizaron 12 pruebas de hipótesis sobre los datos obtenidos en la investigación. Para ello se utilizó el Programa Estadístico “R” (www.r-project.org). Para cada prueba se utilizó el Test de Independencia de Chi cuadrado, de Pearson. Para ello se confecciona la tabla de contingencia con los valores por conteo de los 2 eventos a probar.

5.2 RESULTADOS

5.2.i Objetivo I.

Habilidad para formar biofilm y ensayo de dispersión.

La mayoría (93,5%) de los aislamientos analizados presentaron la habilidad para formar biofilm, mientras que una minoría fueron considerados aislamientos negativos para la formación de biofilm (6,5%). A partir del valor de DO a 490nm obtenida, los aislamientos se clasificaron en fuertes, moderados y débiles formadores de biofilm. Del total de los aislamientos positivos para la formación de biofilm, el 37,2%, 11,6% y 51,2% resultaron fuertes, moderados y débiles formadores de biofilm, respectivamente. La capacidad de formación de biofilm mostró variaciones en las distintas especies. De las especies más prevalentes, *S. haemolyticus* y *S. devriesei* resultaron significativamente ($p < 0,05$) los mayores productores de biofilm que la especie más frecuentemente aislada *S. chromogenes*. Teniendo en cuenta la habilidad de producción de biofilm (fuerte y moderada), la especie mayor productora de biofilm resultó ser *S. haemolyticus* (75%; 6/8), seguida de *S. devriesei* (66,7%; 8/12), *S. epidermidis* (57,9%; 11/19), *S. xylosus* (37,5%; 3/8) y *S. chromogenes* (32,2%; 19/59).

Los resultados obtenidos demuestran que existe diferencia en la capacidad de formación de biofilm de las distintas especies de ECN.

En la **Tabla I** se presentan los resultados de los ensayos de habilidad para formar biofilm obtenidos con los aislamientos identificados. En el **Gráfico I** se ilustran los resultados presentados en las tablas.

No se observó modificación en la habilidad de formación de biopelículas con el agregado de ADNe en los aislamientos seleccionados.

Del ensayo de dispersión sobre 10 aislamientos seleccionados (especies más frecuentemente aisladas y formadoras fuertes de biofilm), ninguno de los aislamientos fueron susceptibles al tratamiento con dispersina B, 7 de los 10 aislamientos resultaron susceptibles al tratamiento con proteinasa K y 7 de los 10 aislamientos resultaron susceptibles al tratamiento con DNasa I (**Gráfico II**).

Tabla I. Habilidad de producción de biofilm en las especies de ECN identificados por PCR-RFLP.

Especies		Negativo	Débil	Moderado	Fuerte
<i>S. chromogenes</i>	59	2	38	7	12
<i>S. epidermidis</i>	19	1	7	3	8
<i>S. devriesei</i>	12	2	2	1	7
<i>S. haemolyticus</i>	8		1	3	4
<i>S. xylosus</i>	8	1	4		3
<i>S. cohnii</i>	5		1	1	3
<i>S. hyicus</i>	5		4		1
<i>S. saprophyticus</i>	6		1		5
<i>S. warneri</i>	5	2	3		
<i>S. caprae</i>	3		2		1
<i>S. simulans</i>	3	1	1		1
<i>S. sciuri</i>	1		1		
<i>S. capitis</i>	1				1
<i>S. gallinarum</i>	1				1
<i>S. hominis</i>	1		1		
<i>S. carnosus</i>	1				1
TOTAL	138	9	66	15	48

Gráfico I. Habilidad para formar biofilm en las especies ECN estudiadas *S. chromogenes* (n=59), *S. epidermidis* (n=19), *S. devriesei* (n=12), *S. haemolyticus* (n=8), *S. xylosus* (n=8).

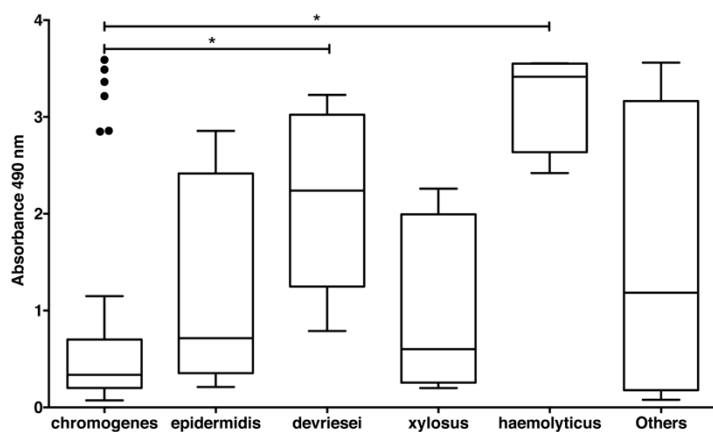
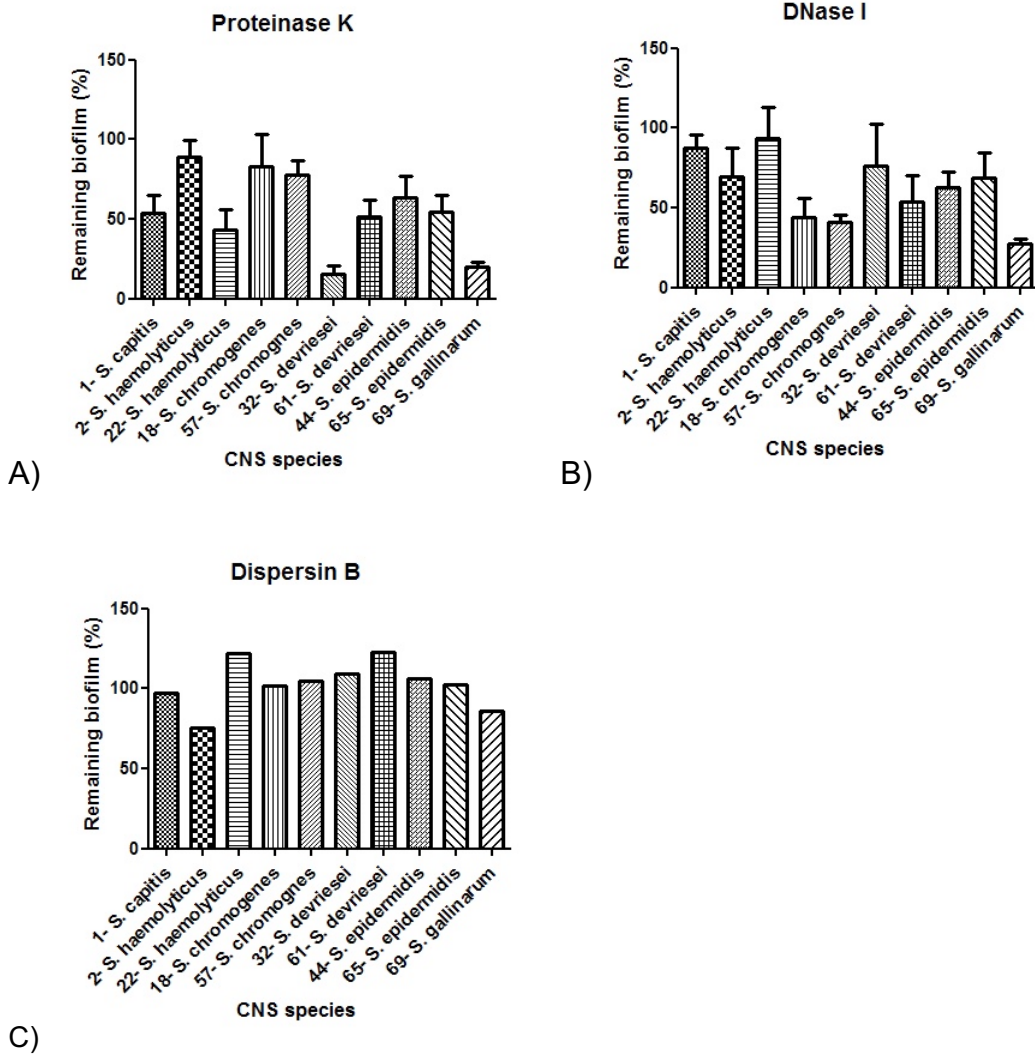


Gráfico II. Ensayo de dispersión con: A) Proteinasa K, B) ADNasa I y C) Dispersina B, de las especies más frecuentemente aisladas y formadoras de biofilm fuertes.



CNS: ECN: estafilococos coagulasa-negativos;
species: especies

5.2.ii Objetivo II.

Determinación de genes que codifican factores de patogenicidad por PCR (proteínas de adhesión, proteínas asociados al biofilm, hemolisinas).

Se detectaron aislamientos de ECN que portan genes relacionados a la producción de biofilm en diferente proporción. La mayoría de los aislamientos resultaron positivos al menos a uno de los 7 genes analizados, sólo 16 aislamientos resultados negativos a los 7 genes. En la **Tabla II**, **Tabla III** y **Gráfico III** se presentan los resultados de los estudios moleculares obtenidos.

Las diferentes combinaciones encontradas de los genes biofilm-asociados se presentan en la **Tabla IV**.

Los genes *hla*, *hlb*, *coa*, *clfA* y *spa* resultaron negativos en todos los aislamientos.

Determinación fenotípica de la actividad hemolítica.

Algunos aislamientos 14,5% (20/138) resultaron hemolíticos sobre agar sangre (**Tabla IV**, **Gráfico IV**), pero en ninguno se observó hemólisis sinérgica al sembrarlos junto al microorganismo *Rhodococcus equi* (**Gráfico V**).

Las especies más hemolíticas fueron *S. chormogenes* 4,3 % (6/138), *S. epidermidis* 3,6% (5/138) y *S. devriesei* 2,2% (3/138) (**Tabla V**). Dentro de cada grupo de especie, 26,3% (5/19) de los *S. epidermidis* fueron hemolíticos, un 25% (3/12) de las especies *S. devresei* presentaron hemólisis y, dentro de las especies *S. chomogenes* un 10,2% (6/59) produjeron hemólisis.

Tabla II. Perfil de genotípico de proteínas formadoras de biofilm en las especies de ECN identificados por PCR-RFLP.

Especies		Gen <i>icaA</i>	Gen <i>bap</i>	Gen <i>aap</i>	Gen <i>fbe</i>	Gen <i>altE</i>	Gen <i>embP</i>	Gen <i>eno</i>
<i>S. chromogenes</i>	59	1			2	24	23	57
<i>S. epidermidis</i>	19	1	2	5	10	9	8	16
<i>S. devriesei</i>	12	2			2			6
<i>S. haemolyticus</i>	8	1			6	1	1	7
<i>S. xylosus</i>	8	1	2				1	7
<i>S. cohnii</i>	5					1		5
<i>S. hyicus</i>	5							2
<i>S. saprophyticus</i>	6	2				1	1	6
<i>S. warneri</i>	5							5
<i>S. caprae</i>	3							3
<i>S. simulans</i>	3					1	1	3
<i>S. sciuri</i>	1							1
<i>S. capitis</i>	1	1						1
<i>S. gallinarum</i>	1		1					1
<i>S. hominis</i>	1							1
<i>S. carnosus</i>	1							1
TOTAL	138	9	5	5	20	38	35	122

Tabla III. Porcentaje de especies de ECN según su perfil genotípico de proteínas formadoras de biofilm.

Genes	positivos	%	especies de ECN
icaA	9	6.5	<i>S. devriesei</i> (22,2%), <i>S. saprophyticus</i> (22,2%), <i>S. chromogenes</i> (11,1%), <i>S. epidermidis</i> (11,1%), <i>S. haemolyticus</i> (11,1%), <i>S. xylosus</i> (11,1%), <i>S. capitis</i> (11,1%)
bap	5	3.6	<i>S. epidermidis</i> (40%), <i>S. xylosus</i> (40%), <i>S. gallinarum</i> (20%)
app	5	3.6	<i>S. epidermidis</i> (100%)
fbe	20	14.4	<i>S. epidermidis</i> (50%), <i>S. haemolyticus</i> (30%), <i>S. devriesei</i> (10%), <i>S. chromogenes</i> (10%)
atlE	38	27.5	<i>S. chromogenes</i> (63,2%), <i>S. epidermidis</i> (23,7%), <i>S. saprophyticus</i> (5,3%), <i>S. haemolyticus</i> (2,6%), <i>S. cohnii</i> (2,6%), <i>S. simulans</i> (2,6%)
embP	35	25.4	<i>S. chromogenes</i> (65,7%), <i>S. epidermidis</i> (22,9%), <i>S. haemolyticus</i> (2,9%), <i>S. xylosus</i> (2,9%), <i>S. saprophyticus</i> (2,9%), <i>S. simulans</i> (2,9%)
eno	122	88.4	En todas las especies

Tabla IV. Perfiles genotípicos asociados a la formación de biofilm.

Combinación de genes biofilm-asociados	Nº de aislamientos (%)
<i>icaA</i>	1 (0,8%)
<i>icaA - eno</i>	5 (4%)
<i>icaA – embP - eno</i>	1 (0,8%)
<i>icaA – altE – fbe – embP - eno</i>	2 (1,6%)
<i>bap - embP</i>	1 (0,8%)
<i>bap - eno</i>	2 (1,6%)
<i>bap – fbe - eno</i>	1 (0,8%)
<i>bap – altE – fbe – embP - eno</i>	1 (0,8%)
<i>aap – altE – fbe – embP - eno</i>	5 (4,0%)
<i>altE – fbe – embP - eno</i>	3 (2,4%)
<i>altE – embP - eno</i>	12 (9,7%)
<i>altE - eno</i>	15 (12,1%)
<i>fbe - eno</i>	10 (8,1%)
<i>embP - eno</i>	9 (7,3%)
<i>eno</i>	56 (45,2%)
Total ECN positivos a algún gen	124 (89,9%)
Negativos a algún gen	14 (11,3%)
Total de ECN estudiados	138 (100%)

Gráfico III. Amplicones de los genes genes *icaA*, *bap*, *aap*, *fbe*, *atlE*, *embP* y *eno* por PCR. Electroforesis en gel de agarosa 2%. 1= aislamiento positivo al gen *bap* (900 pb). 2= aislamiento positivo al gen *aap* (289 pb). 3= aislamiento positivo al gen *fbe* (273 pb). 4= aislamiento positivo al gen *atlE* (682 pb). 5= aislamiento positivo al gen *embP* (455 pb). 6= aislamiento positivo al gen *eno* (302 pb).

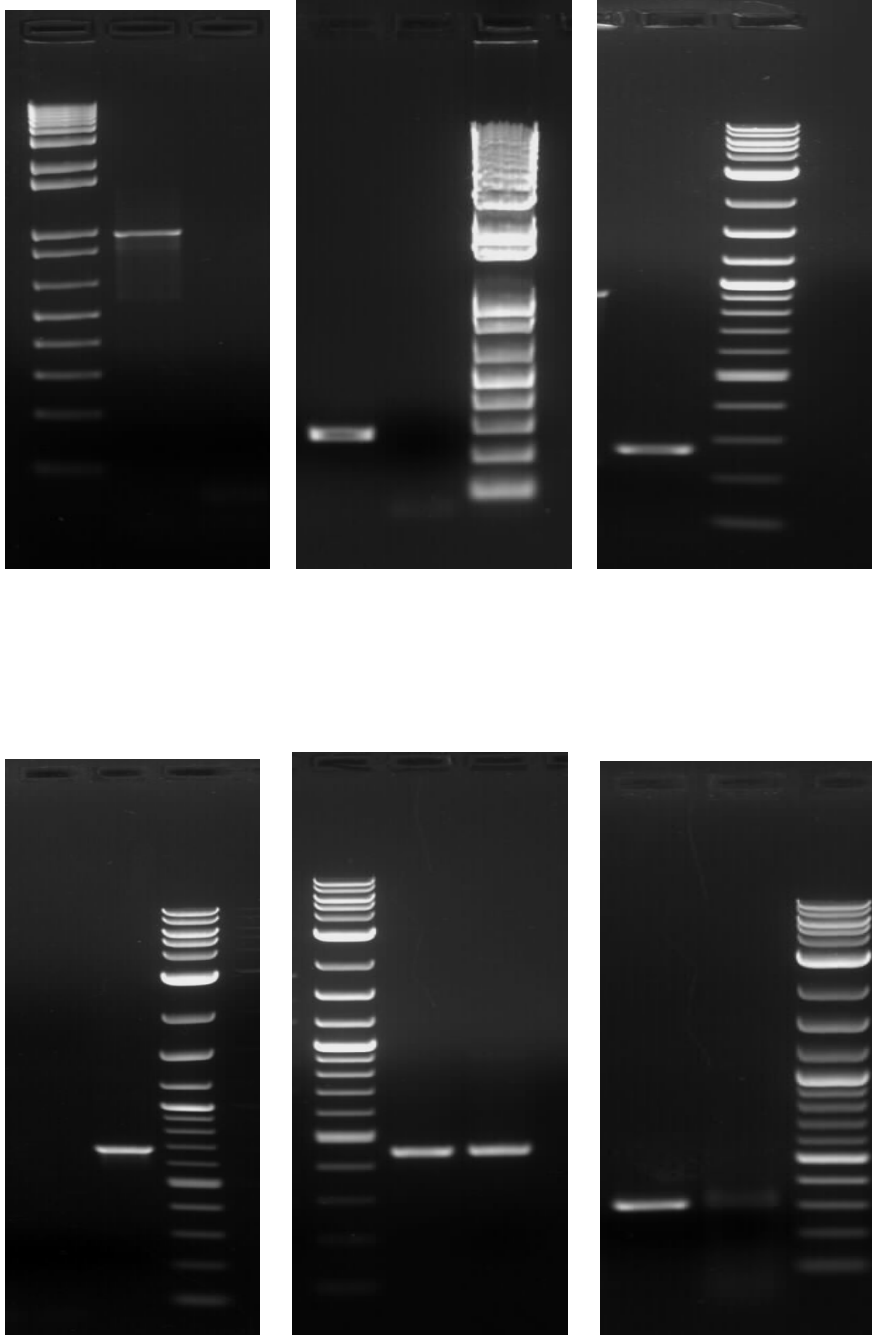


Tabla V. Resultados de la habilidad de formación de biofilm, portación de genes asociados a la formación de biofilm y genes de resistencia a antimicrobianos en las especies mayormente aisladas.

	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. devriesei</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	Otras	Total (%)
n	59	19	12	8	8	32	138 (100)
Habilidad para formar Biofilm							
Negativo	2	1	2	1		3	9 (6.5)
Débil	38	7	2	4	1	14	66 (47.8)
Moderado	7	3	1		3	1	15 (10.9)
Fuerte	12	8	7	3	4	14	48 (34.8)
Genes formación de biofilm							
<i>icaA</i>	1	1	2	1	1	3	9 (6.5)
<i>bap</i>		2		2		1	5 (3.6)
<i>aap</i>		5					5 (3.6)
<i>fbe</i>	2	10	2		6		20 (14.4)
<i>atIE</i>	24	9			1	4	38 (27.5)
<i>embP</i>	23	8		1	1	2	35 (25.4)
<i>eno</i>	57	16	6	7	7	29	122 (88.4)
Genes de resistencia a ATB							
<i>mecA</i>		3		1			4 (2.9)
<i>mecC</i>						1	1 (0.7)
<i>blaZ</i>	10	7		1	1	9	28 (20.3)
<i>ermB</i>	4	2					6 (4.3)
<i>ermC</i>	5	2				2	9 (6.5)
<i>mrsA</i>	1	2					3 (2.2)
<i>mphC</i>	2	2		1			5 (3.6)

Gráfico IV. Presencia de hemolisinas por producción de hemólisis en agar sangre. Se pueden observar 2 aislamientos de *S. chromogenes* productores de hemólisis.

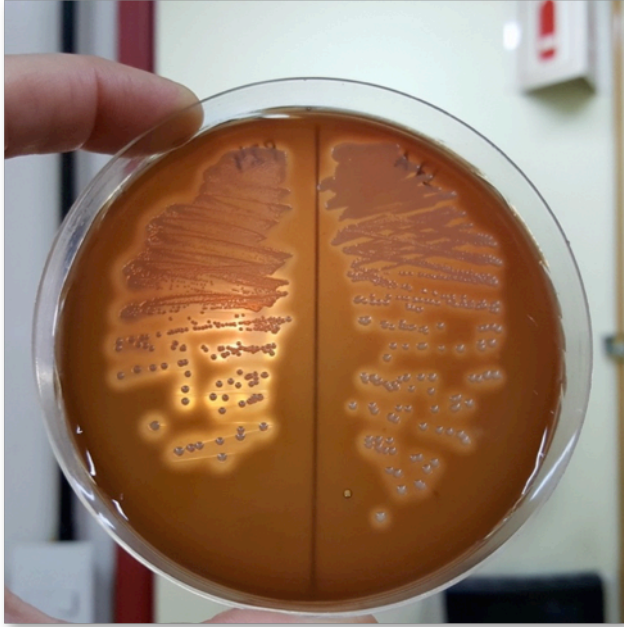


Gráfico V. Prueba de hemólisis sinérgica para evidenciar la β -hemolisina en los ECN, utilizando el microorganismo *Rhodococcus equi*.



Tabla VII. Producción de hemólisis en especies de ECN.

especies		Producción de Hemólisis (%)
<i>S. chromogenes</i>	59	6 (4,3)
<i>S. epidermidis</i>	19	5 (3,6)
<i>S. devriesei</i>	12	3 (2,2)
<i>S. haemolyticus</i>	8	1 (0,7)
<i>S. xylosus</i>	8	1 (0,7)
<i>S. cohnii</i>	5	
<i>S. hyicus</i>	5	1 (0,7)
<i>S. saprophyticus</i>	6	1 (0,7)
<i>S. warneri</i>	5	
<i>S. caprae</i>	2	1 (0,7)
<i>S. simulans</i>	2	
<i>S. sciuri</i>	2	
<i>S. capitis</i>	1	
<i>S. gallinarum</i>	1	
<i>S. hominis</i>	1	
<i>S. carnosus</i>	1	1 (0,7)
TOTAL	138	20 (14,5)

Asociación de los diferentes factores de virulencia

(Análisis estadístico para cada una de las asociaciones en ANEXO)

1. Gen *icaA* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- al gen *icaA*, tienen relación en la producción de biofilm con un nivel de significación inferior al 1%.

2. Gen *bap* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- a la formación de biofilm NO tienen relación con la presencia del gen *bap* con un nivel de significación superior al 1%.

3. Gen *aap* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- a la formación de biofilm tienen relación con la presencia del gen *aap* con un nivel de significación inferior al 1%.

4. Gen *altE* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- a la formación de biofilm tienen relación con la presencia del gen *altE* con un nivel de significación menor al 5%.

5. Gen *fbe* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- a la formación de biofilm tienen relación con la presencia del gen *fbe* con un nivel de significación inferior al 1%.

6. Gen *embP* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- a la formación de biofilm NO tienen relación con la presencia del gen *embP* con un nivel de significación superior al 5%.

7. Gen *fbe* / gen *blaZ*

Los aislamientos +/- al gen *fbe* (biofilm-asociado) NO tienen relación con la presencia / ausencia del gen *blaZ* (resistencia) con un nivel de significación mayor al 5%.

8. Gen *embP* / *blaZ*

Los aislamientos +/- al gen *embP* (biofilm-asociado) tienen relación con la presencia / ausencia del gen *blaZ* (resistencia) con un nivel de significación menor al 5%.

9. Gen *altE* / *blaZ*

Los aislamientos +/- al gen *altE* (biofilm-asociado) tienen relación con la presencia / ausencia del gen *blaZ* (resistencia) con un nivel de significación menor al 5%.

10. Gen *icaA* / *blaZ*

Los aislamientos +/- al gen *icaA* (biofilm-asociado) NO tienen relación con la presencia / ausencia del gen *blaZ* (resistencia) con un nivel de significación mayor al 5%.

11. Producción de biofilm / hemólisis

Los aislamientos +/- a la producción de biofilm NO tienen relación con la producción de hemólisis con un nivel de significación superior al 5%.

12. Gen *icaA* / hemólisis

Los aislamientos +/- al gen *icaA* (biofilm-asociado) tienen relación con la presencia / ausencia de producción de hemólisis con un nivel de significación menor al 1%.

13. Genes de resistencia / producción de biofilm

Los aislamientos +/- a uno o algunos genes de resistencia tienen relación con la presencia / ausencia de producción de biofilm con un nivel de significación inferior al 5%.

14. Genes de R a ML /producción de biofilm

Los aislamientos +/- a uno o varios genes de R a ML NO tienen relación con la presencia / ausencia de la producción de biofilm con un nivel de significación inferior al 5%.

15. Gen *mecA/mecC* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- a los genes *mecA/mecC* NO tienen relación con la presencia / ausencia de producción de biofilm con un nivel de significación inferior al 5%.

16. Gen *blaZ* / producción de biofilm

Los aislamientos +/- al gen *blaZ* (resistencia) NO tienen relación con la presencia / ausencia de la producción de biofilm con un nivel de significación inferior al 5%.

17. Genes biofilm-asociados / genes *mecA/mecC*

Los aislamientos +/- a uno o varios genes biofilm-asociados tienen relación con la presencia / ausencia de los genes de MR (*mecA/mecC*) con un nivel de significación menor al 1%.

5.3 DISCUSIÓN

5.3.i *Habilidad para formar biofilm especies de ECN* (Objetivo I).

La formación de biofilm juega un papel importante en la virulencia de los estafilococos (Tormo y col., 2005). Existen pocos estudios sobre la formación de biofilm y los genes asociados con su formación en ECN que causan mastitis bovina (Tormo y col., 2005; Piessens y col., 2012; Somojoki y col., 2012 y Tremblay y col., 2013; da Costa Krewer y col., 2015; Osman y col., 2015).

Como lo informó Tremblay y col. (2013), utilizando un ensayo similar, la mayoría los aislamientos estudiados presentaron habilidad para formar biofilm (93,5% vs 85,1%). Por otro lado, Somojoki y col. (2012) observaron que la mayoría de los ECN no eran formadores de biofilm (68,7%) y una minoría de aislamientos resultaban ser positivos (31,3%). Esto puede atribuirse al uso del caldo tripticasa soja utilizado por Somojoki y col. (2012), en comparación al uso del caldo cerebro corazón utilizado en este estudio y por Tremblay y col. (2013) para el cultivo de microorganismos.

En este estudio encontramos que los aislamientos *S. haemolyticus* presentó la mayor capacidad para formar biofilm mientras que Tremblay y col. (2013) encontraron que *S. xylosus* tenía la mayor habilidad, seguida de *S. haemolyticus*. En otros estudios a partir de aislamientos de ECN de humanos, se informaron a *S. haemolyticus* y *S. xylosus* como fuertes formadores de biofilm (Plachan y col., 2006; Fredheim y col., 2009).

Bochniarz y col. (2014) demostraron que un 95,5% de ECN-MR tenían alguna capacidad de producción de biofilm, y que el 40,9% de ellos estaban implicados en la forma clínica de mastitis.

Recientemente, Oliveira y col. (2015) describieron a *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. equorum* de origen humano, como especies formadoras de biofilm fuerte. En este estudio, los aislamientos identificados como *S. chromogenes* tuvieron la menor capacidad para formar biofilms, mientras que en aislados canadienses, los aislamientos de *S. epidermidis* tuvieron la menor capacidad para formar biofilms. Los diferentes resultados pueden explicarse por diferencias en la distribución de las especies de ECN en diferentes países. Además las variaciones intraespecies no son infrecuentes y se han observado para *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* (Oliveira y col., 2015; Tremblay y col., 2013). Además, un estudio reciente identificó tres genotipos distintos dentro de *S. chromogenes* (Ajitkumar y col., 2013), que también pueden proporcionar una explicación de la variación intraespecies en la formación de biofilm.

Los resultados de los ensayos enzimáticos de dispersión sugieren que las proteínas y el ADNe desempeñan un papel más importante que la poli-N-acetil glucosamina (PNAG) en la integridad estructural de los biofilms en los ECN. Se considera que PNAG o el polisacárido de adherencia intercelular (PIA) es necesario para la formación de biofilm en especies de estafilococos (Mack y col., 1996). Estos datos respaldan observaciones recientes (Tremblay y col., 2013) que los ECN de origen bovino forman biofilms basados en proteínas y que no dependen del PNAG. Un estudio utilizando cepas de estafilococos de origen humano, también mostró que las proteínas y el ADNe son componentes importantes de la matriz extracelular (Oliveira y col., 2015). Además, el

agregado de ADN no modificó la habilidad de formación de biofilm en aislamientos seleccionados para dicho ensayo.

5.3.ii Determinación de genes que codifican factores de patogenicidad: proteínas de adhesión y proteínas asociadas al biofilm (*aap*, *atlE*, *bap*, *clfA*, *embP*, *eno*, *fbe*, *icaA*), genes que codifican hemolisinas (*hla*, *hly*), gen que codifica la enzima coagulasa (*coa*), y el gen que codifica el factor de agregación “clumping factor” (*clfA*) (Objetivo II).

Se detectaron aislamientos de ECN que portan genes relacionados a la producción de biofilm en diferente proporción. Se relacionan varios genes con la formación de biofilm por especie de estafilococos (Simojoki y col., 2012; Tremblay y col., 2013). Los genes *fbe*, *atlE* y *embP* fueron los que se encontraron en mayor frecuencia, a diferencia de los genes *icaA* y *bap* que son los genes que comunmente se encuentran en microorganismos productores de biofilm. Esto es importante ya que la formación de biofilm no está dado sólomente por diferentes factores externos, sino también por variaciones a nivel genético. Se encontró que el gen *eno* estaba ampliamente distribuído, independientemente de la especie y la capacidad de formación de biofilm.

Se encontraron 15 combinaciones diferentes de los genes biofilm asociados, descartando el gen *eno* que se encontró en la mayoría de los aislamientos, las combinaciones más frecuentes resultaron ser *atlE* - *eno* (12,1%), *atlE* - *embP* - *eno* (9,7%) y *fbe* - *eno* (8%).

El gen *eno* no sería de relevancia en la formación de biofilm ya que se encontró en casi todos los aislamientos.

Muy pocos aislamientos resultaron positivos para *icaA*, *bap* o *aap*. Además el gen *aap* se encontró exclusivamente en *S. epidermidis* y siempre en la misma

combinación: *aap* – *altE* – *fbe* – *embP* – *eno*. El porcentaje de aislamientos positivos al gen *icaA* fue similar al encontrado por Simojoki y col. (2012). Sin embargo, nuestro porcentaje de aislamiento productores de biofilm *icaA* negativos (87%) resultó ser más alto que los observados por Osman y col. (2015). El gen *bap* se detectó en pocos aislamientos, apoyando las observaciones donde mencionan que el gen *bap* raramente se encuentra fuera de la especie *S. xylosus*. (Piessen y col., 2012; Tremblay y col., 2013). Otros genes se encontraron en menos del 30% de los aislamientos y se encontraron exclusivamente en las especies *S. chromogenes* y *S. epidermidis*. De acuerdo con nuestras observaciones y la literatura, el número de aislamientos positivos parece depender de la distribución de especies aisladas en las muestras de leche y su región geográfica. Hay poca evidencia que los marcadores específicos usualmente atribuidos a la formación de biofilm en *S. aureus* y *S. epidermidis* aislados de humanos, son aplicables a otros aislamientos de ECN asociados a mastitis bovina. Existe la necesidad de identificar nuevos determinantes para la formación de biofilm en especies de ECN.

En cuanto a los genes *hla*, *hlb*, *coa* y *clfA*, éstos resultaron negativos en todos los aislamientos, coincidiendo con lo informado sobre ECN aislados de mastitis bovina en China (Xu y col., 2015).

Actividad hemolítica

El ensayo fenotípico para ver si la hémolisis producida por los ECN se debe a la β -toxina, resultó negativo para todos los ECN, ya que no se evidenció hémolisis sinérgica con el factor equi de *Rhodococcus equi*.

Estos resultados obtenidos por estudios moleculares, sugirieron que los ECN estudiados no portan los genes para las hemolisinas α y β , y tampoco se evidenció la β -toxina en los ensayos fenotípicos realizados.

5.3.iv. Asociación de los factores de virulencia.

Como resultados de las pruebas estadísticas, encontramos que los genes *icaA*, *aap*, *altE* y *fbe* están asociados a la producción de biofilm, sin embargo con los genes *bap* y *embP* no se encontró asociación. Esto concuerda con algunos de los resultados informados por Tremblay y col. (2013) donde el gen *icaA* o la combinación de algunos de los genes asociados al biofilm, están asociadas con la habilidad de producción de biofilm, pero donde la presencia del gen *embP* tuvo un efecto negativo en la formación de biofilm.

El gen *icaA* fue el único gen biofilm-asociado que se encontró asociado con la producción de hemólisis.

Se sabe que el biofilm puede aumentar la resistencia a los antibióticos y desinfectantes, hay pocos estudios que relacionan la formación de biofilm con la resistencia a antibióticos en estafilococos aislados de mastitis bovina (Melchior y col., 2006, 2007; Tremblay y col., 2014), en estos estudios se observa la relación entre la formación de biofilm y la susceptibilidad a antimicrobianos mediante la CIM. La susceptibilidad a antimicrobianos se ve reducida en ECN fuertes formadores de biofilm (Tremblay y col., 2014).

No hay mucha información en cuanto a la relación entre la formación de biofilm y/o portación de genes biofilm-asociados, y la portación de genes de resistencia a antimicrobianos de uso habitual en las mastitis.

La formación de biofilm es un factor clave de virulencia de *S. epidermidis* y otros ECN (tremblay y col., 2013), y no hay duda de que la resistencia a antimicrobianos, incluyendo la MR, puede estar influenciada por la capacidad de los ECN para producir biofilm.

5.4 CONCLUSIÓN

*El estudio de la habilidad de formación de biofilm y la detección factores de virulencia, son importantes para comprender la participación de los ECN en las infecciones intramamarias.

*Se asocia la formación de biofilm con el fracaso de los tratamientos y la aparición de infecciones intramamarias persistentes por las distintas especies de ECN en bovinos.

*El gen *icaA* se encontró asociado con la producción de hemólisis.

*La presencia de biofilm se encontró asociada con ECN portadores de genes de R.

*La mutación genética y la variación genética se favorecen en la capa más profunda del biofilm donde el ambiente es estresante. Por lo tanto, no hay duda de que la resistencia a los antimicrobianos está influenciada por la capacidad de los ECN para producir biofilm.

6. CONCLUSIONES

*Los ECN son un grupo heterogéneo en el cual cada especie varía su perfil de resistencia a antimicrobianos y su perfil de virulencia.

**S. chromogenes* es la especie de ECN más frecuentemente aislada.

*Los ECN son reservorios de genes de resistencia, algunas especies son portadoras de genes de virulencia pero no lo expresan, no obstante presentan un potencial riesgo para la salud pública por la capacidad de transferencia de genes.

*Los aislamientos de ECN-MR pertenecieron a clones diferentes no relacionados con clones epidémicos.

*La formación de biofilm en especies ECN es improbable que ocurra debido a un solo componente y/o proceso.

*Algunas especies de ECN pueden persistir en la glándula mamaria debido a la producción de biofilm y producir mastitis persistentes.

*El conocimiento de las diferentes especies, de la susceptibilidad frente a los antibióticos y de los factores de virulencia en los ECN, permitiría al profesional obtener un buen diagnóstico de la infección y adoptar la terapéutica antimicrobiana apropiada, con uso prudente y correcta prescripción, para controlar las mastitis.

*Optimizar la elección de ATM con fines terapéuticos y el uso responsable de los mismos con el propósito de evitar la emergencia y propagación y de resistencia antimicrobiana.

*La salud animal tiene un fuerte correlato con la salud humana, por lo que la visión debe ser integral, bajo el concepto de una salud.

7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Aarestrup, F. M.; Jensen, N. E. (1997) Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *J Dairy Sci.* 80: 307-12.
2. Adhikari, R. P.; Cook, G. M.; Lamont, I.; Lang, S.; Heffernan, H.; Smith, J. M. (2002) Phenotypic and molecular characterization of community occurring, Western Samoan phage pattern methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 50: 825-831.
3. Ajitkumar, P.; Barkema, H. W.; Zadoks, R. N.; Morck, D. W.; van der Meer, F. J.; De Buck, J. (2013) High-resolution melt analysis for species identification of coagulase-negative staphylococci derived from bovine milk. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 75: 227-234.
4. Asfour, H. A. E.; Darwish, S. F. (2011) Phenotypic and genotypic detection of both *mecA* and *blaZ* genes mediated β -lactam resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis. *Global Vet.* 6: 39-50.
5. Aslantas, O.; Öztürk, F.; Ceylan, A. (2011) Prevalence and molecular mechanism of macrolide and lincosamide resistance in staphylococci isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *J Vet Med Sci.* 73:1645-8.
6. Bal, E. B.; Bayar, S.; Bal, M. A. (2010) Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. *J Microbiol.* 48: 267-274.

7. Becker, K.; C. von Eiff; Keller, B.; Bruck, M.; Etienne, J.; Peters, G. (2005) Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 51: 237-244.
8. Becker, K.; Hellman, C.; Peters, G. (2014) Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 27: 870-926.
9. Bengtsson, B.; Ericsson Unnerstad, H; Ekman, T.; Artursson, K.; Nilsson-Öst, M.; Persson Waller, K. (2009) Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol.* 136:142-149.
10. Bergey's manual of determinative bacteriology. Breed, R.; Murray, K.; Smith, N. (1957) 7th Edition. Williams & Wilkins. Maryland, USA.
11. Bergey's manual of determinative bacteriology. Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Stanley, J; Williams, S. (1994) 9th Edition. Williams & Wilkins. Maryland, USA.
12. Bergey's manual of systematic bacteriology. Garrity, G; Bell, J; Lilburn, T. (2009) 2nd Edition, Vol 3. Springer New York, USA.
13. Bochniarz, M.; Wawron, W; Szczubial, M. (2014) Production of slime by coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from clinical and subclinical mastitis in cows. *Pol J Vet Sci.* 17: 447-452.
14. Bradley, A. J.; Leach, K. A.; Breen, J. E.; Green, L. E.; Green, M. J. (2007) Survey of the incidence and etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec.* 160: 253-257.

15. Camponovo, R. y García, P. (2006) *Rhodococcus equi*. Rev Chi Infect. 23: 155-156.
16. Chambers, H. F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 10: 781-91.
17. Carrolo, M.; Frías M. J.; Rodríguez Pinto, F.; Melo-cristino, J.; Ramirez M. (2010) Prophage Spontaneous Activation Promotes DNA release Enhancing Biofilm Formation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS ONE. 5:e15678.
18. Centorbi, O. N. P.; Cuadrado, A. M. A.; Alcaráz, L. E.; *et al.* (1992) Prevalencia de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis subclínica bovina en tambos de la cuenca lechera de la ciudad de San Luis. Rev Arg Microbiol. 24: 73-80.
19. Chaves, j. (2010) Mastitis Bovina: control y prevención [Online] <http://www.aprocal.com.ar>.
20. Chung, W. O.; Werckenthin, C.; Schwarz, S.; Roberts, M. C. (1999) Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. J Antimicrob Chemother. 43: 5-14.
21. Couto, I.; de Lencastre, H.; Severina, E.; Kloos, W.; Webster, J. A.; Hubner, R. J.; Sanches, I. S. Tomasz, A. (1996) Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. Microb Drug Resist. 2: 377-391.

22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard Fourth Edition and supplement VET01-A4 and VET01-S2 (replaces M31 A3). Clinical Laboratory Standard Institute. Wayne, PA.
23. Cocchiaro, J. L.; Gomez, M. I.; Risley, A.; Solinga, R.; Sordelli, D. O.; Lee, J. C. (2006) Molecular characterization of the capsule locus from nontypeable *Staphylococcus aureus*. *Molec Microbiol.* 59: 948-960.
24. Cucarella, C.; Tormo, M. A.; Ubeda, C. y col. (2004) Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72: 2177-2185.
25. Cuny, C.; Layer, F.; Strommenger, B.; Witte, W. (2011) Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany. *PLoS One.* 6:e24360, doi:1371/journal.pone.002436.
26. da Costa Krewer, C.; Santos Amanso, E.; Veneroni Gouveia, G.; de Lima Souza, R.; da Costa, M. M.; Aparecido Mota, R. (2015) Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Trop Anim Health Prod* 47: 511-8.
27. Denamiel, G.; Carloni, G.; Llorente, P.; Gentilini, E. (2006) Mastitis Bovina: Prevalencia microbiana y perfil de resistencia en los cocos Gram positivos. *Medicina Veterinaria.* 87: 233-235. ISSN 0325-6391.

28. Denamiel, G.; Puigdevall, T.; Albarells, G.A.; Gentilini, E. (2009) Prevalencia y perfil de resistencia a betalactámicos en estafilococos de perros y gatos. *InVet* 11:117-122.
29. Demo, M.; Quiñones, J. (1995) Caracterización de especies de estafilococos aisladas de leche bovina: Producción de citolisinas. Sinergismo hemolítico y “Slime”. *Fac. Cs. Exacta Fis-Quim. Y Nat.; Fac. Agron. Y Vet. U.N.C.R. En actas del VII Congreso Argentino de Microbiología. Centro Cultural General San Martín. Bs. As.*
30. Deurenberg, R. H.; Vink, C.; Kalenic, S.; Friedrich, A. W.; Bruggeman, C. A.; Stobberingh, E. E. (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 13: 222-235.
31. De Olivera, A. P.; Watts, J. L.; Salmon, S. A.; Aarestrup, F. M. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* 83: 855-862.
32. Febler, A.; Billerbeck, C.; Kadlec, K.; Schwarz, S. (2010) Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J Antimicrob Chemother.* 65(8): 1576-1582.
33. Fenev, J.; Kloos, W. E.; Hajek, V.; Webster, J. A.; Bes, M.; Brun, Y.; Vernozy-Rozand, C. (1999) Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 49: 489-502.

34. Frey, Y.; Rodriguez, J. P.; Thomann, A.; Schwendener, S.; Perreten, V. (2013) Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase negative staphylococci from bovine mastitis milk. *J Dairy Sci.* 96: 2247-57.
35. Frigerio, C.; Bettera, S.; Scalise, I; Giraudo, J.; Calzolari, A. (1995) Resistencia a antibióticos de cepas de estafilococos aisladas en tres tambos de Córdoba, Argentina. *Rev Med Vet.* 76: 288-292.
36. Fredheim, E. G. A.; Klingenberg, C.; Rodhe, H. y col. (2009) Biofilm formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 47: 1172-1180.
37. García-Álvarez, L.; Holden, M.T.; Lindsay H. y col. (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine population in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11: 595-603.
38. García-Garrote F, Cercenado E, Marín M. Y col. (2014) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteriemia. *J Antimicrob Chemother.* 69: 45-50.
39. Gatermann, S. G.; Koschinski, T.; Friedrich, S. (2007) Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect.* 13: 777-781.
40. Gentilini, E.; Denamiel, G.; Godaly, M.S. (1995): Mastitis Bovina: Tipificación del género *Staphylococcus*. *Veterinaria Argentina.* 12: 384-386.

41. Gentilini, E.; Llorente, P.; Cervera, G; Callieri, C. (1996) Mastitis bovina: *Prototheca zopfii* Primer aislamiento en el país. Veterinaria Argentina. XIV: 324-328.
42. Gentilini, E.; Denamiel, G.; Llorente, P.; Godaly, S.; Rebuelto, M.; De Gregorio, O. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from bovine mastitis in Argentina. J Dairy Sci. 83: 1224-1227.
43. Gentilini, E.; Denamiel, G., Betancor, A.; Rebuelto, G.; Rodriguez Fermepin, M.; de Torres, R. A. (2001) Coagulase-negative staphylococci and mastitis. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci Isolated from bovine mastitis in Argentina. J Dairy Sci. 83: 1224-1227.
44. Gentilini, E. R. (2002a): Importancia de la evaluación de los *Staphylococcus* coagulasa negativos en la presentación de la mastitis bovina. Tesis Doctoral, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA.
45. Gentilini, E. y col. (2002b) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 85: 1913-17.
46. Gentilini, E.; Denamiel, G.; Rumi, M. V.; Blanco, C.; de Torres, R. A. (2002c) Evolución de la resistencia de estafilococos coagulasa negativos frente a antimicrobianos de uso habitual en el tratamiento de la mastitis bovina y los mecanismos de resistencia involucrados. InVet. 4: 69-75.
47. Gentilini, E. R. (2007a) Estafilococos. En Stanchi, O. N. (Ed.) Microbiología Veterinaria. Capítulo 22 (pp. 190-194) Buenos Aires, Argentina: Inter-médica.

48. Gentilini, E. R. (2007b) Antimicrobianos. En Stanchi, O. N. (Ed.) Microbiología Veterinaria. Capítulo 19 (pp. 162-175) Buenos Aires, Argentina: Inter-médica.
49. Ghebremedhin, B.; Layer, F.; König, W.; König, B. (2008) Genetic Clasification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different Partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* Gene Sequences. J. Clin. Microbiol., 46: 1019-25.
50. Giguere, S.; Prescott, J. F.; Baggot, J. D.; Walker, R. D.; Dowling, P. M. (2006) Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th Edition, Blackwell Publishing, Ames, U. S. A.
51. Gillespie, B. E.; Headrick, S. I.; Boonyayatra, S.; Oliver, S. P. (2009) Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. Vet. Microbiol. 134: 65-72.
52. Gindonis, V.; Taponem, S.; Myllyniemi, A.; Pyörälä, S.; Nykäsenoja S.; Salmenlinna, S.; Lindholm, L.; Rantala, M. (2013) Ocurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samplesin Finland. Acta Vet Scand. 55: 61.
53. Götz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol. 43: 1367-78.
54. Gutman, G.; Guiguet, E.; Rebolini, J. (2003) Los ciclos en el complejo lácteo argentine. Análisis de políticas lecheras en países seleccionados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Programa Calidad de los Alimentos Argentinos.

55. Hanssen, A.; Sollid, J. (2005) SCCmec in staphylococci: genes on the move. Immunol Med Microbiol 46: 8-20.
56. Harrison, E. M.; Paterson, G. K.; Holden, M. T. y col. (2013) A *Staphylococcus xylosus* isolated with a new mecC allotype. Antimicrob Agents Chemother 57: 1524-1528.
57. Harrison, E. M.; Paterson, G. K.; Holden, M.T.; Ba, X.; Rolo, J.; Morgan, F. J.; Pichon, B.; Kearns, A.; Zadoks, R. N.; Peacock, S. J.; Parkhill, J.; Holmes, M. A. (2014) A novel hybrid SCCmec-mecC region in *Staphylococcus sciuri*. J. Antimicrob. Chemother. 69: 911-918.
58. Kloos, W. E.; Schleifer, K. H. (1975) Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus aureus* species. J. Clin. Microbiol. 1: 82-88.
59. Kloos, W. E.; Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. Rev. 7: 117-140.
60. Kot, B.; Piechote, M.; Wolska, K. M. y col. (2012) Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of staphylococci from bovine milk. Pol J Vet Sci 15: 677-83.
61. Layer, F.; Ghebremedhin, B.; Moder, K. A.; König, W.; König, B. (2006) Comparative Study Using Various Methods for Identification of *Staphylococcus* Species in Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 44: 2824-30.
62. Layer, F.; Ghebremedhin, B.; König, W.; König, B. (2007). Differentiation of *Staphylococcus* spp. by terminal-restriction fragment length polymorphism

- analysis of glyceraldehydes-3-phosphate-encoding gene. J Microbiol Methods. 70: 542-549.
63. Lina, G.; Quaglia, A.; Reverdy, M. E.; Leclercq, R.; Vandenesch, F.; Etienne, J. (1999) Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among *Staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother. 43: 1062-1066.
64. Loncaric I, Kübber-Hiss A, Pasautz et al. (2013) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. J Antimicrob Chemother. 14: 2222-2225.
65. Luna, V.A.; Cousin, S.; Whittington, W.; Roberts, M. (2000) Identification of the conjugative *mef* gene in clinical *Acinetobacter junii* and *Neisseria gonorrhoeae* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 44: 2503-2506.
66. Lüthje, P. & Schwarz, S. (2006) Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. J Antimicrob Chemother. 57: 966-969.
67. Mack, D.; Fischer, W.; Krokotsch, A.; Leopold, K.; Hartmann, R.; Egge, H.; Laufs, R. (1996) The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J Bacteriol. 178: 175-183.
68. Martineau, F.; Picard, F.J.; Grenier, L.; Roy, P.H.; Ouellette, M.; Bergeron, M. G. (2000) Multiplex PCR assay for the detection of clinically relevant antibiotic

- resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. J Antimicrob Chemother. 46: 527-34.
69. Mas J, Denamiel G, Bentancor A., Rodríguez Fermepín, M, Gentilini E. (2000) Relación de la expresión fenotípica de la meticilino resistencia de un estafilococo coagulasa negativo de origen canino con la presencia del gen *mecA*. InVet. 2: 7-11.
70. Mc Faddin, J. F. (Ed.) (1993a) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. Capítulo 7 (pp. 50-60). Montevideo, Uruguay. Editorial Médica Panamericana.
71. Mc Faddin, J. F. (Ed.) (1993b) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. Capítulo 5 (pp. 39-44). Montevideo, Uruguay: Editorial Médica Panamericana, 1993.
72. Melchior, M. B.; Fink-Gremmels, J.; Gaastra, W. (2007) Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. Vet. Microbiol. 125: 141–149.
73. Melchior, M.B.; Fink-Gremmels, J.; Gaastra, W. (2006) Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 53: 326–332.
74. Merino-Díaz, L.; Cantos de la Casa, A.; Torres-Sánchez, M. J.; Aznar-Martín, J. (2007) Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. Enf Inf Microb

- Clin. 25, doi: 10.1157/13098567.
75. Moon, J. S.; Lee, A. R.; Kang, H. M.; Lee, E. S.; KIM, M. N.; Paik, Y. H.; Park, Y. H.; Joo, Y. S.; Koo, H. C. (2007) Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci.* 90: 1176-1185.
76. Moser, A.; Stephan, R.; Ziegler, D.; Johler, S. (2013) Species distribution and resistance profiles of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 155: 333-8.
77. Mulvey, M.R.; Chui, L.; Ismail, J.; Louie, C.; Chang, N.; Alfa, M.; Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods. (2001) Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 39: 3481-5.
78. National Mastitis Council (NMC) (1999) Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI. National Mastitis Council. P. 222.
79. Oliveira, F.; Lima, C. A.; Brás, S.; França, Â.; Cerca, N. (2015) Evidence for inter- and intraspecies biofilm formation variability among a small group of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol Lett* 362, doi: 10.1093/femsle/fnv175.
80. Onni, T.; Sanna, G.; Cubeddu, G. P.; Maronga, G.; Lollai, S.; Leori, G.; Tola, S. (2010) Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine

- milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and *gap* genes. *Vet. Microbiol.* 144: 347-352.
81. Osman, K. M.; Abd El-Razik, K. A.; Marie, H. S. H.; Arafa, A. (2015) Relevance of biofilm formation and virulence of different species of coagulase-negative staphylococci to public health. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34: 2009-16.
82. Park, Y. J.; Fox, L. K.; Seo, K. S.; McGuire, M. A.; Park, Y. H; Rurangirwa, F. R.; Sischo, W. M.; Bohach, G. A. (2010) Comparison of phenotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from intramammary infections.
83. Pate M, Zdovc I, Avbersek J, Ocepek M, Pengov A & Podpecan O (2011) Coagulase-negative staphylococci from non-mastitic bovine mammary gland: characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus haemolyticus* by antimicrobial susceptibility testing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Dairy Res.* 79: 129-134.
84. Paterson, G., Harrison, E. M., Holmes, M. A., 2014. The emergence of *mecC* methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22: 42-47.
85. Raspanti, C. G.; Bonetto, C. C.; Vissio, C.; Pellegrino, M. S.; Reinoso, E. B.; Dieser, S. A.; Bogni, C. I.; Larriestra, A. J.; Odierno, L. M. (2016) Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Ev Arg Microbiol.* 48: 50-56.

86. Salmon, S. A., Watts, J. L., Aerestrup, F. M., Pankey, J. W., Yancey Jr, R. J., 1998. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J. Dairy Sci.* 81: 570-578.
87. Persson, W.; Aspán, A.; Nyman, A.; Persson, Y.; Grönlund Andersson, U. (2011) CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 152:112-6.
88. Philpot, W. N.; Nickerson, S. (1993) *Mastitis: El contraataque surge.* International Babson Bros. Ed. III, USA.
89. Piessens, V.; Van Coillie, E.; Verbist, B.; Supré, K.; Braem, G.; Van Nuffel, A.; De Vuyst, L.; Heyndrickx, M.; De Vliegher, S. (2011) Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from dairy cows' milk and environment differs between herds. *J. Dairy Sci.* 94: 2933-2944.
90. Piessens, V.; de Vliegher, S.; Verbist, B. y col. (2012) Characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *J Dairy Sci.* 95: 7027–7038.
91. Planchon, S.; Gaillard-Martinie, B.; Dordet-Frisoni, E. y col. (2006) Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Int J Food Microbiol.* 109: 88-96.
92. Prescott, S. C.; Breed, R. S. (1910) The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *Am J Public Hygiene.* 20: 663-4.

93. Pyörälä, S.; Taponen, S. (2009) Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 134: 3-8.
94. Rumi, M. V.; Huguet, m. J; Bentancor, A. B.; Gentilini E. R. (2013) The *icaA* gene in staphylococci from bovine mastitis. *J Infect Dev Ctries.* 15: 556-60.
95. Rupp, M. E.; Archer, G. L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis.* 19: 231–245.
96. Salmon, S. A.; Watts, J. L.; Aerestrup, F. M.; Pankey, J. W.; Yancey Jr, R. J. (1998) Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *J Dairy Sci.* 81: 570-578.
97. Sampimon, O. C.; Zadoks, R. N.; De Vlieger, S.; Supré, K.; Haesebrouck, F; Barkema, H. W.; Sol, J.; Lam, T. J. G. M. (2009) Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol.* 136: 300-305.
98. Sampimon, O. C.; Lam, T. J. G. M.; Mevius, D. J.; Schukken, Y. H.; Zadoks, R. N. (2011) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol.* 150: 173-179.
99. Saran, A.; Chaffer, M. (2000) Mastitis y calidad de leche. Intermédica. ISBN 950-555-225-4.

100. Sasaki, T.; Kikuchi, K.; Tanaka, Y.; Takahashi, N.; Kamata, S.; Hiramatsu, K. (2007) Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. J Clin Microbiol. 45: 2770-2778.
101. Sawant, A. A.; Gillespie, B. E.; Oliver, S. P. (2009) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci species isolated from bovine milk. Vet Microbiol. 134: 73-81.
102. Seixas, R.; Santos, J. P.; Bexiga, R.; Vilela, C. L.; 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.
103. Silva, N. C.; Guimarães, F. F.; de P Manzi, M.; Gómez-Sanz, E.; Gómez, P.; Araújo-Júnior, J. P.; Langoni, H.; Rall, V. L.; Torres, C. (2014) Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek. 106: 227-33.
104. Simojoki, H.; Hyvönen, P.; Plumed Ferrer, C.; Taponen, S.; Pyöralä, S. (2012) Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? Veterinary Microbiol. 158: 344-352.
105. Soares, L. C.; Pereira, I. A.; Pribul, B. R.; Oliva, M. S.; Cohelo, S. M. O, Souza, M. M. S. (2012) Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. Pesq Vet Bras. 32: 692-696.

106. Sordelli, D. O.; Buzzola, F. R.; Gómez, M. I.; Steele-Moore, L.; Berg, D.; Gentilini, E.; Catalano, M.; Reitz, A. J.; Tollersrud, T.; Denamiel, G.; Jeric, P.; Lee, J. C. (2000) Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* Argentina: genetic and epidemiologic analyses. J Clin Microbiol. 38: 846-50.
107. Srednik, M. E.; Grieben, M. A.; Bentancor, A.; Gentilini, E. R. (2015a) Molecular identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and detection of β -lactam resistance. J Infect Dev Ctries. 9: 1022-1027.
108. Srednik, M.; Archambault, M.; Jacques, M.; Gentilini, E. (2015b) Detection of *mecC* in a *Staphylococcus saprophyticus* Strain Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. Abstract. 2015-A-1438-ASM-ICAAC.
109. Supré, K.; Haesebrouck, F.; Zadoks, R.N.; Vaneechoutte, M.; Piepers, S.; De Vliegher, S. (2011) Some coagulase-negative *Staphylococcus* species are affecting udder health more than others. J. Dairy Sci. 94: 2329-2340.
110. Takahashi, T; Satoh, I; Kikuchi, N. (1999) Phylogenetic relationship of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. 2: 725-8.
111. Taponen, S.; Simojoki, H.; Haveri, M.; Larsen, H. D.; Pyörälä, S. (2006) Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. Vet. Microbiol. 115: 199-207.

112. Taponen, S.; Pyörälä, S. (2009) Coagulase negative staphylococci as cause of bovine mastitis - not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet microbiol., 134: 29-36.
113. Thorberg, B. M.; Brändström, B. (2000) Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative Staphylococci from bovine mastitis. J Vet Med 47: 683-691.
114. Thorberg B. M.; Kuhn, I.; Aerestrup F. M.; Brandstrom, B.; Jonsson, P.; Nielsson-Tham M. L. (2006) Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. Vet Microbiology. 115: 163-172.
115. Thorberg, B. M.; Danielsson-Tham, M.L.; Emanuelson, U.; Persson Waller, K. (2009) Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. J Dairy Sci. 92: 4962-4970.
116. Tremblay, Y. D. N.; 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 biofilms. J Dairy Sci. 96: 234–246.
117. Tremblay, Y.; Caron, V.; Blondeau, A.; Messier, S.; Jacques, M. (2014) Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. Vet Microbiol. 172: 511-518.

118. Tormo, M. A.; Knecht, E.; Götz, F.; Lasa, I.; Penadés, J. R. (2005) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiol.* 151 : 2465-2475.
119. Torres, C.; Cercenado, E. (2010) Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28: 541-553.
120. Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M. C.; Lina, G.; Nimmo, G. R.; Heffernan, H.; Liassine, N.; Bes, M.; Greenland, T.; Reverdy, M. E.; Etienne J. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leucocidin genes; worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 9: 978-84.
121. Varaldo, P.; Grazi, G., Soro; O., Cisani, G.; Satta G. (1980). Simplified lyogroup system, a new method for routine identification of Staphylococci: description and comparison with three other methods. *J. Clin. Microbiol.*, 12: 63-68.
122. www.bacterio.net
123. 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. *Microbiol. Pathog.* 88: 29-38.
124. Yugueros, J.; Temprano, A.; Berzal, B.; Sanchez, M.; Hernanz, C.; Luengo, J. M.; Naharro, G. (2000) Glyceraldehyde-3-phosphatc dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 38: 4351-4355.

125. Yugueros, J.; Temprano, A.; Sánchez, M.; Luengo, J.M.; Naharro, G. (2001) Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR- restriction fragment length polymorphism of *gap* gene. J Clin Microbiol. 39: 3693-3695.
126. Zadoks, R. N.; Schukken, Y. H. (2006) Use of molecular epidemiology in veterinary practice. Vet Clin Food Anim. 22: 229-261.
127. Zhang, S.; Maddox, C. (2000) Citotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. Infect Immun. 68: 1102-1108.
128. Zhang, K.; McClure, J.; Elsayed, S.; Louie, T.; Conly, J. (2005) Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 43: 5026-33.

8. ANEXO

8.1 Asociación entre los factores de virulencia

Se realizaron 12 pruebas de hipótesis sobre los datos obtenidos en la investigación. Para ello se utilizó el Programa Estadístico “R” (www.r-project.org).

Para cada prueba se utilizó el Test de Independencia de Chi cuadrado, de Pearson. Para ello se confecciona la tabla de contingencia con los valores por conteo de los 2 eventos a probar.

Por ejemplo tabla de contingencia para Evento A con 2 categorías. Evento B con 3 categorías.

		Evento A		R _i
		Positivo	Negativo	
Evento B	Negativo – Débil	O ₁₁	O ₁₂	R ₁
	Moderado	O ₂₁	O ₂₂	R ₂
	Fuerte	O ₃₁	O ₃₂	R ₃
C _j		C ₁	C ₂	N

En general r: filas y c: columnas.

Hipótesis de la Prueba:

H₀: los eventos son independientes o sea,

H₀: P(fila i, columna j) = P(fila i) * P(columna j) para todo i,j

H₁: los eventos NO son independientes o sea,

H₁: P(fila i, columna j) ≠ P(fila i) * P(columna j) para algún i,j

La condición para poder realizar esta prueba es que los valores esperados para cada combinación fila, columna sea mayor que 0.5, esto es:

$$E_{ij} = R_i C_j / N > 0.5 \text{ con } i : \text{numero de filas } \text{ y } j : \text{numero de columnas}$$

Donde R_i : total de fila i

C_j : total de fila j

Esta condición se cumple en todas las pruebas realizadas.

El estadístico de la prueba:

$$T = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \quad \text{donde } E_{ij} = \frac{R_i C_j}{N} \quad \text{y } O_{ij} : \text{valores en las celdas}$$

PRUEBA 1:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen *icaA*** tienen relación en la **producción de biofilm**.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		Gen <i>icaA</i>		R_i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	1	74	75
	Moderado	0	15	15
	Fuerte	8	40	48
C_j		9	129	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 12.462, df = 2, p-value = 0.001968

El p valor es muy pequeño, menor que el 1%, entonces se rechaza H_0 , los datos no son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 1:

Con un nivel de significación inferior al 1%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar **los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen *icaA* tienen relación en la producción de biofilm**.

PRUEBA 2:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen *bap*** tienen relación en la **producción de biofilm**

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		bap		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	1	74	75
	Moderado	1	14	15
	Fuerte	3	45	48
	C _j	5	133	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 2.4726, df = 2, p-value = 0.2905

El p valor es grande, mayor que el 1%, entonces NO se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 2:

Con un nivel de significación superior al 1%, no existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos a la formación de biofilm tienen relación con la presencia de gen *bap*. En consecuencia **no existe relación entre presencia de gen *bap* y producción de biofilm.**

PRUEBA 3:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen aap** tienen relación en la **producción de biofilm**.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		aap		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	0	75	75
	Moderado	0	15	15
	Fuerte	5	43	48
	C _j	5	133	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 9.3333, df = 2, p-value = 0.009404

El p valor es pequeño, menor que el 1%, entonces se rechaza H₀, los datos no son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 3:

Con un nivel de significación inferior al 1%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos a la formación de biofilm tienen relación con la presencia de gen *aap*. En consecuencia **existe relación entre presencia/ausencia de el gen aap y la producción de biofilm**.

PRUEBA 4:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen *altE*** tienen relación en la **producción de biofilm**.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		AltE		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	13	62	75
	Moderado	5	10	15
	Fuerte	20	28	48
	C _j	38	100	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 8.9685, df = 2, p-value = 0.01129

El p valor es pequeño, menor que el 5%, entonces se rechaza H₀, los datos No son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 4:

Con un nivel de significación menor al 5%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos a la formación de biofilm tienen relación con la presencia de gen *altE*. En consecuencia **existe relación entre presencia/ausencia de gen *altE* y la producción de biofilm**.

PRUEBA 5:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen *fbe*** tienen relación en la **producción de biofilm**.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		fbc		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	0	75	75
	Moderado	4	11	15
	Fuerte	16	32	48
	C _j	20	118	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 28.255, df = 2, p-value = 7.32e-07

El p valor es muy pequeño, menor que el 1%, entonces se rechaza H₀, los datos No son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 5:

Con un nivel de significación inferior al 1%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos a la formación de biofilm tienen relación con la presencia/ausencia del gen *fbc*. En consecuencia **existe relación entre presencia/ausencia del gen *fbc* y la producción de biofilm**.

PRUEBA 6:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen embP** tienen relación en la **producción de biofilm**.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		embP		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	18	57	75
	Moderado	2	13	15
	Fuerte	15	33	48
	C _j	35	103	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 2.0991, df = 2, p-value = 0.3501

El p valor es grande, mayor que el 5%, entonces NO se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 6:

Con un nivel de significación superior al 5%, no existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos a la formación de biofilm tienen relación con la presencia de gen *embP*. En consecuencia **no existe relación entre presencia/ausencia del gen embP y la producción de biofilm**.

PRUEBA 7:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen *fbe*** (biofilm-asociado), tienen relación en la presencia/ausencia del **gen *blaZ*** (resistencia).

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		BlaZ (de resistencia)		R _i
		Positivo	Negativo	
Fbe (asociado)	Positivo	7	13	20
	Negativo	21	97	118
C _j		28	110	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 3.1295, df = 1, p-value = 0.07689

El p valor grande, mayor que el 5%, entonces No se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 7:

Con un nivel de significación mayor al 5%, no existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos / negativos al gen *fbe* (biofilm-asociado) tienen relación con la presencia /ausencia del gen *blaZ* (resistencia). En consecuencia **no existe relación del gen *fbe* (biofilm) con el gen *blaZ* (resistencia).**

PRUEBA 8:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos /negativos al **gen embP** (biofilm-asociado), tienen relación en la presencia / ausencia del **gen blaZ** (resistencia).

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		BlaZ (de resistencia)		R _i
		Positivo	Negativo	
embP (asociado)	Positivo	12	23	35
	Negativo	16	87	103
C _j		28	110	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 5.6796, df = 1, p-value = 0.01716

El p valor es pequeño, menor que el 5%, entonces se rechaza H₀, los datos NO son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 8:

Con un nivel de significación menor al 5%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar **los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen embp (biofim-asociado) tienen relación con la presencia / ausencia del gen blaZ (resistencia).**

PRUEBA 9:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen altE** (biofilm-asociado), tienen relación en la presencia/ausencia del **gen blaZ** (resistencia).

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		BlaZ (de resistencia)		R _i
		Positivo	Negativo	
AltE (asociado)	Positivo	13	25	38
	Negativo	15	85	100
C _j		28	110	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 6.2833, df = 1, p-value = 0.01219

El p valor pequeño, menor que el 5%, entonces se rechaza H₀, los datos NO son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 9:

Con un nivel de significación menor al 5%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar **los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen altE (biofilm-asociado) tienen relación con el gen blaZ (resistencia).**

PRUEBA 10:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al **gen icaA** (biofilm-asociado), tienen relación en la presencia/ausencia del **gen blaZ** (resistencia).

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		BlaZ (de resistencia)		R _i
		Positivo	Negativo	
IcaA (asociado)	Positivo	3	6	9
	Negativo	25	104	129
C _j		28	110	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 1.0128, df = 1, p-value = 0.3142

El p valor es grande, mayor que el 5%, entonces NO se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 10:

Con un nivel de significación mayor al 5%, **NO existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen icaA (biofilm-asociado) tienen relación con el gen blaZ (resistencia).**

PRUEBA 11:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos / negativos a la **formación de biofilm** tienen relación con la **producción de hemólisis**.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		Hemolisis		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	8	67	75
	Moderado	1	14	15
	Fuerte	11	37	48
	C _j	20	118	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 4.3759, df = 2, p-value = 0.1121

El p valor es grande, mayor que el 5%, entonces NO se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 11:

Con un nivel de significación superior al 5%, no existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos a la producción de biofilm tienen relación con la producción de hemólisis. En consecuencia **NO existe relación entre la producción de hemolisis y la producción de biofilm**.

PRUEBA 12:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos / negativos al **gen *icaA*** tienen relación con la **producción de hemólisis**.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		Hemolisis		R _i
		Positivo	Negativo	
IcaA	Positivo	4	5	9
	Negativo	16	113	129
C _j		20	118	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 6.9698, df = 1, p-value = 0.00829

El p valor es pequeño, menor que el 1%, entonces se rechaza H₀, los datos no son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 12:

Con un nivel de significación menor al 1%, **existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos / negativos al gen *icaA* tienen relación con la producción de hemólisis**.

PRUEBA 13:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos a **todos los Genes de resistencia tienen relación en la producción de Biofilm.**

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		Todos los Genes de resistencia		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	16	57	73
	Moderado	2	15	17
	Fuerte	19	29	48
C _j		37	101	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table
X-squared = 6.8424, df = 2, p-value = 0.03267

El p valor pequeño, menor que el 5%, entonces se rechaza H₀, los datos No son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 13:

Con un nivel de significación inferior al 5%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar **los aislamientos que dieron positivos/negativos a todos los genes de resistencia tienen relación con la producción de biofilm.**

PRUEBA 14:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos a **los genes de resistencia a ML tienen relación en la producción de biofilm.**

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		Genes de resistencia ML		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	6	67	73
	Moderado	1	16	17
	Fuerte	7	41	48
C _j		14	124	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table
X-squared = 1.6731, df = 2, p-value = 0.4332

El p valor es grande, mayor que el 5%, entonces NO se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 14:

Con un nivel de significación inferior al 5%, NO existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos de los genes de resistencia ML tienen relación con la producción de biofilm. En consecuencia **no existe relación entre presencia/ausencia de de los genes de resistencia ML y la producción de biofilm.**

PRUEBA 15:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen *mecA/C* tienen relación en la producción de biofilm

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		Gen <i>mecA/C</i>		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	6	67	73
	Moderado	1	16	17
	Fuerte	7	41	48
C _j		14	124	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table
X-squared = 1.6731, df = 2, p-value = 0.4332

El p valor es grande, mayor que el 5%, entonces NO se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 15:

Con un nivel de significación inferior al 5%, NO existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen *mecA/C* tienen relación con la producción de biofilm. En consecuencia **no existe relación entre presencia / ausencia de del gen *mecA/C* y la producción de biofilm.**

PRUEBA 16:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen *blaZ* tienen relación en la producción de biofilm.

A continuación se presenta la tabla con los datos agrupados en cuanto al conteo de genes:

		Gen BlaZ		R _i
		Positivo	Negativo	
Biofilm ability	Negativo – Débil	12	61	73
	Moderado	2	15	17
	Fuerte	14	34	48
C _j		28	110	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table
X-squared = 3.7721, df = 2, p-value = 0.1517

El p valor es grande, mayor que el 5%, entonces NO se rechaza H₀, los datos son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 16:

Con un nivel de significación inferior al 5%, NO existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos/negativos al gen *blaZ* tienen relación con la producción de Biofilm. En consecuencia **no existe relación entre presencia/ausencia del gen *blaZ* y la producción de biofilm.**

PRUEBA 17:

Se desea de probar si existe suficiente evidencia muestral para afirmar que los aislamientos que dieron positivos / negativos a **todos los genes asociados a biofilm (excepto eno), son: icaA, bap, aap, altE, fbe, embP)** tienen relación con presencia / ausencia de los genes de R a meticilina (*mecA* y *mecC*).

		cantidad de los 6 tipos de genes asociados (sin eno) que son Si+					
		0	1	2	3	4	
cantidad de los 2 tipos de Resistencia (sin BlaZ)	1 Si+	1	0	2	0	2	5
	0 Si+	69	42	14	2	6	133
		70	42	16	2	8	138

Esta tabla no cumple la condición para poder realizar esta prueba. Dicha condición es que los valores esperados para cada combinación fila, columna sean mayores que 0.5, esto es:

$$E_{ij} = R_i C_j / N > 0.5 \text{ con } i : \text{numero de filas } \text{ y } j : \text{numero de columnas}$$

Donde R_i : total de fila i

C_j : total de fila j

$$E_{14} = R_1 C_4 / 138 = 5 * 2 / 138 = 0.072 < 0.5 \text{ con } i : \text{numero de filas } \text{ y } j : \text{numero de columnas}$$

Por lo tanto se resume la tabla en:

		cantidad de los 6 tipos de genes asociados (sin eno) que son Si+		R_i
		[0,1]	[2,4]	
cantidad de los 2 tipos de Resistencia (sin BlaZ)	1 Si+	1	4	5
	0 Si+	111	22	133
C_j		112	26	138

Pearson's Chi-squared test

data: .Table
X-squared = 12.691, df = 1, p-value = 0.0003674

El p valor es muy pequeño, menor que el 1%, entonces se rechaza H_0 , los datos no son independientes.

CONCLUSION PRUEBA 17:

Con un nivel de significación menor al 1%, existe suficiente evidencia muestral para afirmar los aislamientos que dieron positivos / negativos a **los 6 de genes asociados a biofilm (excepto eno) tienen relación con la presencia/ ausencia de los genes de MR (*mecA/mecC*)**.

TABLA DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

PRUEBA	OBJETIVO	p valor	Decisión	Conclusión
1	Biofilm vs <i>icaA</i>	0.001968	Rechazo H ₀	Dependen
2	Biofilm vs <i>bap</i>	0.2905	No Rechazo H ₀	No dependen
3	Biofilm vs <i>aap</i>	0.009404	Rechazo H ₀	Dependen
4	Biofilm vs <i>altE</i>	0.01129	Rechazo H ₀	Dependen
5	Biofilm vs <i>fbe</i>	7.32*10 ⁻⁷	Rechazo H ₀	Dependen
6	Biofilm vs <i>embP</i>	0.3501	No Rechazo H ₀	No dependen
7	<i>fbe</i> (biofilm) vs <i>blaZ</i> (resistencia)	0.07689	No Rechazo H ₀	No dependen
8	<i>embP</i> (biofilm) vs <i>blaZ</i> (resistencia)	0.01716	Rechazo H ₀	Dependen
9	<i>altE</i> (biofilm) vs <i>blaZ</i> (resistencia)	0.01219	Rechazo H ₀	Dependen
10	<i>icaA</i> (biofilm) vs <i>blaZ</i> (resistencia)	0.3142	No Rechazo H ₀	No dependen
11	Biofilm vs hemólisis	0.1121	No Rechazo H ₀	No dependen
12	<i>icaA</i> vs hemólisis	0.00829	Rechazo H ₀	Dependen
13	Genes de resistencia vs biofilm	0.03267	Rechazo H ₀	Dependen
14	Genes de R a ML vs biofilm	0.4332	No Rechazo H ₀	No dependen
15	Gen <i>mecA/C</i> vs biofilm	0.3233	No Rechazo H ₀	No dependen
16	Gen <i>blaZ</i> vs biofilm	0.1517	No Rechazo H ₀	No dependen
17	6 genes biofilm- asociados vs genes MR (<i>mecA/C</i>)	0.0003674	Rechazo H ₀	Dependen

8.2 PUBLICACIONES

8.2.i Artículos publicados:

- **Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina”**
 - Autores: **Srednik M**, Tremblay Y, Labrie J, Archambault M, Jacques M, Gentilini E.
 - Journal: *FEMS Microbiol Lett.* 2017 (Advance Access published January 12).

- **“Susceptibilidad antibiótica de estafilococos aislados de muestras de leche provenientes de mastitis bovina”**
 - Autores: **Srednik, M.E.**; Abate, S.; Gentilini.
 - Revista: *InVet.* 2015, 9(9): 1022-7.

- **“Molecular identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and detection of β -lactam resistance”**
 - Autores: **Srednik, ME**; Grieben MA, Bentancor, A; Gentilini, ER.
 - Journal: *J Infect Dev Ctries.* 2014, 9(9): 1022-1027.

8.1.ii Artículos en revisión:

- **“Detection of a *mecC* –positive *Staphylococcus saprophyticus* from bovine mastitis in Argentina”**
 - Autores: **Mariela E Srednik**, Marie Archambault, Mario Jacques, Elida R Gentilini.
 - Journal: *JGAR* 2017 (Evaluación de árbitros: Aceptado con modificaciones)

8.3 PRESENTACIONES A CONGRESOS:

8.3.i Presentaciones en Argentina

- **Título: “Identificación genotípica de Estafilococos Coagulasa Negativos de mastitis bovina y detección de genes de resistencia a betalactámicos (C. preliminar)”**
 - Autores: **Srednik, M**; Bentancor, A; Gentilini, E.
 - Reunión: **Terceras Jornadas de Jóvenes Investigadores en Cs. Veterinarias.**
 - Institución organizadora: Fac. de Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
 - Fecha: 13 y 14 de Junio 2013.
 - Lugar: Facultad Cs. Veterinarias UBA – Bs. As., Argentina.
 - Modalidad: oral.

- **Título: “Estafilococos Coagulasa Negativos aislados de leche de vacas con mastitis: Identificación y Resistencia a betalactámicos”**
 - Autores: **Srednik, M**; Bentancor, A; Gentilini, E.
 - Reunión: **XIII Congreso Argentino de Microbiología.**
 - Institución organizadora: asociación Argentina de Microbiología.
 - Fecha: 23-26 de Septiembre de 2013.
 - Lugar: Palais Rouge – CABA, Argentina.

- **Título: “Mastitis Bovina: Estudios Moleculares y Fenotípicos de Estafilococos Coagulasa negativos (C. preliminar)”**
 - Autores: **Srednik, M**; Bentancor, A; Gentilini, E.
 - Reunión: **Cuartas Jornadas de Jóvenes Investigadores en Cs. Veterinarias.**
 - Institución organizadora: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
 - Fecha: 5 y 6 de Junio 2014.
 - Lugar: Facultad Cs. Veterinarias UBA – Bs. As., Argentina.
 - Modalidad: oral.

➤ **“Mastitis Bovina: Estudios Moleculares y Fenotípicos de Estafilococos Coagulasa Negativos (C. preliminar)”**

- Autores: **Srednik, M**; Gentilini, E.
- Reunión: **Quintas Jornadas de Jóvenes Investigadores en Cs. Veterinarias.**
- Fecha: 10 y 11 de Junio 2015.
- Institución organizadora: Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
- Lugar: Facultad Cs. Veterinarias UBA – Bs. As., Argentina.
- Modalidad: Póster.

➤ Título: **“Estudio de Resistencia a Antimicrobianos en Estafilococos Coagulasa Negativos Aislados de Mastitis Bovina”**

- Autores: **Srednik Mariela**, Gentilini Elida.
- Reunión: **9nas. Jornadas Internac. de Veterinaria Práctica.**
- Institución organizadora: Colegio de Veterinarias de la Provincia de Bs. As. (CVPBS).
- Fecha: 28 y 29 de Agosto de 2015.
- Lugar: Sheraton Hotel, Mar del Plata, Bs. As., Argentina.
- Modalidad: Póster.

8.3.ii Presentaciones en el exterior

➤ Título: **“Detection of *mecC* in a *Staphylococcus saprophyticus* Strain Isolated from Bovine Mastitis in Argentina”**

- Autores: **Srednik, M**; Archambault, M; Jacques, M; Gentilini, E.
- Reunión: Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy and Infection **“ICAAC 2015”**
- Institución organizadora: American Society for Microbiology (ASM)
- Lugar: San Diego Convention Center – California, Estados Unidos.
- Fecha: 17-21 de Septiembre de 2015.
- Modalidad: Póster

➤ Título: “**Antimicrobial Resistance of Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Argentina**”

- Reunión: “**Microbe 2016**”
- Institución organizadora: American Society for Microbiology (ASM)
- Autores: **Srednik, M**; Archambault, M; Barnech, L; M; Gentilini, E.
- Lugar: Convention and Exhibition Center. Boston, MA, USA.
- Fecha: 16-20 de Junio de 2016.
- Modalidad: Póster.

➤ Título: “**Mastitis bovina: Estafilococos y Genes de Resistencia a Macrólidos-Lincosamidas**”

- Autores: **ME Srednik**, ER Gentilini.
- Reunión: XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología “**ALAM-CAM 2016**”
- Institución organizadora: asociación Argentina de Microbiología.
- Lugar: Salón de Eventos Metropolitano, Rosario, Argentina.
- Fecha: 26-30 septiembre de 2016.
- Modalidad: Póster.

➤ Título: “**Detección del gen *mecC* de un aislamiento de *Staphylococcus saprophyticus* de origen bovino**”

- Autores: **ME Srednik**, M Archambault, M Jacques, ER gentilini.
- Reunión: XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología “**ALAM-CAM 2016**”
- Institución organizadora: asociación Argentina de Microbiología.
- Lugar: Salón de Eventos Metropolitano, Rosario, Argentina.
- Fecha: 26-30 septiembre de 2016.
- Modalidad: Póster.

- Título: **“Bovine mastitis: staphylococci and resistance genes towards β -lactams and macrolides-lincosamides antibiotics in Argentina”**
- Autores: **Mariela E. Srednik**, Marie Archambault, Elida R. Gentilini.
 - Reunión: **“6th International Conference on Clinical Microbiology and Microbial Genomics”**.
 - Institución organizadora: Conferenceseries LLC .
 - Lugar: Holiday Inn, Roma, Italia.
 - Fecha: 20-22 Octubre de 2016.
 - Modalidad: Póster.
 - Premio: **“Best Póster Award”**

8.4 CURSOS REALIZADOS

8.4.i Cursos con créditos para el doctorado:

➤ **V Curso de Manejo Informático de Secuencias de ácidos nucleicos y proteínas.**

- Fecha: 8 al 12 de Noviembre de 2010
- Lugar: Facultad de Cs. Veterinarias, UBA
- Horario: L a V de 16 a 20 hs.
- Créditos: 2,3
- Nota: 8 (ocho)

➤ **Recherche en médecine vétérinaire.**

- Fecha: 10 de Octubre al 20 de Diciembre de 2012
- Lugar: Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montreal, Canadá.
- Horario: L a V de 8 a 16 hs
- Créditos: 6
- Nota: Completo

➤ **XII Curso de Actualización en Integrones.**

- Fecha: 30 de Septiembre a 4 de Octubre de 2012
- Lugar: Facultad de Medicina, UBA.
- Horario: L a V de 9 a 18 hs.
- Créditos: 2,5
- Nota: 6 (seis)

➤ **X Curso Epidemiología Molecular en la Vigilancia de las Infecciones Bacterianas.**

- Fecha: 4 al 8 de Noviembre de 2013
- Lugar: Servicio Antimicrobianos y Enterobacterias, INEI – ANLIS. “Dr. Carlos G. Malbrán”.
- Horario: L a V de 9 a 17 hs.
- Créditos: Sólo teóricos

➤ **29° Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos “Dra. Alicia Rossi”.**

- INEI-ANLIS Instituto Malbrán.
- Fecha: 11 a 15 de Mayo de 2015
- Lugar: Auditorio Manuel Belgrano, Ministerio de Relaciones Exteriores y Culto.
- Horario: L a V de 8 a 18 hs.
- Nota: Aprobado

8.4.ii Cursos realizados pertenecientes a la Maestría en biotecnología:

➤ **Estadística y diseño de experimentos.**

- Fecha: Septiembre-Noviembre de 2010
- Lugar: Facultad de Cs. Veterinarias, UBA
- Horario: J y V de 9 a 13 hs.
- Créditos: 5
- Nota: 8 (ocho)

➤ **Herramientas informáticas para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas.**

- Fecha: 10 al 23 de Marzo de 2011
- Lugar: Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA
- Horario: L a V de 14 a 20 hs.
- Créditos: 6
- Nota 10 (diez)

➤ **Downstream processing de proteínas.**

- Fecha: 4 al 15 de Abril de 2011
- Lugar: Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
- Horario: L a V de 10:30 a 17 hs.
- Créditos: 5
- Nota: 10 (diez)

➤ **Purificación de péptidos y proteínas**

- Fecha: 30 de Mayo al 15 de Junio de 2011
- Lugar: Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
- Horario: L a V de 11 a 18 hs.
- Créditos: 5
- Nota: 9 (nueve)

➤ **Biotecnología vegetal.**

- Fecha: 21 de Junio a 1 de Julio de 2011
- Lugar: Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
- Horario: L a V de 9 a 14 hs.
- Créditos: 7
- Nota: 7 (siete)

➤ **Cultivo y purificación de virus.**

- Fecha: 4 al 15 de Julio de 2011
- Lugar: Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA
- Horario: L a V de 14 a 20:30 hs.
- Créditos: 5
- Nota: 9 (nueve)

➤ **Biotecnología de las Fermentaciones.**

- Fecha: 19 al 30 de Marzo de 2012
- Lugar: Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
- Horario: L a V de 9 a 14 hs.
- Créditos: 7
- Nota: 7 (siete)

➤ **Cultivos Celulares.**

- Fecha: 6 al 17 de Agosto de 2012
- Lugar: Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA.
- Horario: L a V de 14 a 22 hs.
- Créditos: 5
- Nota: 9 (nueve)

8.5 OTROS ELEMENTOS DE JUICIO PERTINENTES

8.5.i Pasantías en el exterior:

Desde el 7 de Julio al 29 de Octubre del año 2014, realicé una pasantía en el laboratorio de Investigación dirigido por el Dr. Mario Jacques, perteneciente al “Canadian Bovine Mastitis REsearch Network” en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Montreal, Canadá. Durante la misma, realice algunos de los ensayos relacionados con biofilm planteados entre mis objetivos del plan de Doctorado. Todo lo realizado durante mi estadía en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Montreal me permitió avanzar en el desarrollo de mi Tesis Doctoral, me permitió poder escribir dos artículos científicos para publicar, y me posibilitó poder iniciar trabajos en colaboración con el grupo del área “Canadian Bovine Mastitis Research Network”.

Desde el 15 de Julio al 5 de Noviembre del año 2015, realicé una pasantía en el laboratorio de Investigación dirigido por la Dra. Marie Archambault, perteneciente al departamento de Microbiología Veterinaria en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Montreal, Canadá. Durante la misma, realicé las determinaciones de genes de resistencia por PCR y otras determinaciones a nivel molecular.