



Detección de enterotoxinas en especies *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados de muestras de leche bovina

Agustín Conesa.

Tesis - Maestría en Salud Pública - Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Salud Pública, 2018.

Aprobada: 19 de Noviembre de 2018

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Detección de enterotoxinas en especies *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados de muestras de leche bovina por Agustín Conesa se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Médicas

Maestría en Salud Pública

**“Detección de enterotoxinas en especies
Staphylococcus coagulasa negativos
aislados de muestras de leche bovina”**

Agustín Conesa

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar
el título de Magister en Salud Pública

**“Detección de enterotoxinas en especies
Staphylococcus coagulasa negativos
aislados de muestras de leche bovina”**

Autor: CONESA, Agustín

Director: Doctora Claudia G. Raspanti

Co-director: Doctora Carina Porporatto

Tribunal de Tesis:

Mgter. Graciela Scruzzi

Mgter. Laura Lopez

Mgter. Andres Escudero

A mi mejor amiga en el mundo... Mamá.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Córdoba por haberme permitido obtener mi título de Posgrado

A la Universidad Nacional de Río Cuarto y la Universidad Nacional de Villa María, por haberme permitido desarrollar el trabajo de Tesis.

A la Dra. Claudia Raspanti por brindar su conocimiento y experiencia en mi formación científica e intelectual, su valiosa predisposición y generosidad y su cariño y compañía tan importantes en mi vida.

A la Dra. Carina Porporatto por iniciarme en el camino científico y por su permanente apoyo, estímulo y colaboración.

A Graciela Scruzzi, Laura Lopez y Andres Escudero, por haber aceptado ser tribunal de esta Tesis y por sus aportes científicos a la misma.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genética Microbiana de la UNRC y del de Ciencias Básicas de la UNVM por los momentos compartidos.

A la Dra. Claudina Vissio y Dra. Claudia Barberis, por su aporte en este trabajo de Tesis.

A mi familia por su inagotable paciencia, acompañamiento y apoyo. Mami, Papi, Ale, Naty, Jime, mis alegrías más grandes Tomy, Maite, Pauli y Mateo, y mis estrellas protectoras, Asu, Ñata, Mauri y David. Gracias por TANTO, los AMO con el Alma.

A Marisa, Juan y mi apoyo incondicional Carlos, por hacerme sentir capaz y regalarme tiempo, atención y orientación en cada momento de mi vida, siempre presentes contra tiempo, kilómetros y océanos. Los AMO.

A todos los integrantes de la familia “Veterinaria Nueva Córdoba” por su enorme apoyo y compañía, por la contención y el aliento.

A los Med. Vet. María Lía Calderón y Pablo López de veterinaria Cannes, sin su dedicación y ayuda no hubiera podido.

Amigos y personas conocidas que me alentaron con sus consejos y estímulo.

Especialmente a mi grupo villamariense, mis seres mágicos que fueron amigos, sosten, aliento, compañía y TANTO en esta etapa de mi vida, porque sin ellos no hubiera podido. Los AMO con toda sinceridad.

Eternamente Gracias.

Art. 23.- Ord. Rectoral 3/77 "La Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, no es solidaria con los conceptos vertidos por el autor"

PRÓLOGO

“La Medicina Veterinaria comparte con la Salud Pública una práctica filosófica común, basada en idénticos conceptos poblacionales. La Salud Pública es, en esencia, la práctica de la Medicina de Rebaños Humanos”...

Schwabe. 1984

En un estudio previo realizado por el grupo de investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), el relevamiento de 51 tambos en la cuenca lechera de Villa María (Córdoba, Argentina), demostró como patógenos más prevalentes (52.1%), a los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) seguido de *Staphylococcus aureus* (21.3%) [Dieser y col., 2014]. Entre las diferentes especies pertenecientes al grupo de los SCN, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus xylosus* fueron las especies aisladas con mayor frecuencia [Bonetto, 2014; Raspanti y col., 2016].

La caracterización genotípica para algunos factores de virulencia reveló la presencia de genes asociados a la resistencia a β -lactámicos *blaZ* y *mecA* en el 88,8% y 35,2% de los aislamientos, respectivamente. Por otra parte fueron detectados en un porcentaje elevado genes asociados a la formación de biofilm, *eno* (70 %) e *icaAD* (74 %) [Bonetto, 2014].

En otro estudio llevado a cabo por la Universidad Nacional de Villa María (UNVM), se demostró a partir del relevamiento de 10 establecimientos lecheros de la región de Villa María, una importante prevalencia (37,6%) de *S. aureus*, que en su totalidad mostraron la capacidad de formar biofilms [Somale y col., 2013]. Se demostró

además la presencia de genes *icaAD*, en el 67% de los aislamientos de *aureus* con capacidad de formar biofilm provenientes de mastitis subclínica y en la totalidad de aislamientos de *S. aureus* con capacidad de formar biofilm provenientes de mastitis clínica y crónica, lo que indicaría que PIA es un factor importante en la formación de biofilms [Felipe y col., 2013]. Además, todos los aislamientos de *S. aureus* ya obtenidos [Felipe y col., 2013] y algunas cepas de SCN aisladas en la misma cuenca, fueron *CifA*, *CifB* y *FnbpA* positivos, señalando una participación relevante de las proteínas de adhesión en el mecanismo de formación de biopelículas [Felipe y col 2017].

Estos resultados demuestran la presencia e incidencia elevada de cepas de *Staphylococcus* spp con habilidad para establecerse en forma de biofilms en los animales de nuestra región, lo cual podría estar contribuyendo, conjuntamente con otros factores, a la resistencia a los tratamientos.

En lo que respecta a Salud Pública, toma gran importancia otro factor de patogenicidad del género *Staphylococcus* aislados de sistemas de producción láctea que es la producción de enterotoxinas, compuestos secretados por este grupo bacteriano, que presentan a diferencia de los organismos que las generan, resistencia a altas temperaturas, y esto tendría que ver con su incidencia y riesgo para los consumidores de productos terminados.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos donde se demuestra la mayor incidencia de SCN asociado a mastitis bovina, surge la necesidad de determinar su capacidad para la producción de enterotoxinas nocivas para el consumidor y de biopelículas que dificultan su eliminación en la industria láctea con los protocolos de limpieza y sanitización, dado los riesgos potenciales que ello implica para la salud de los consumidores

En resumen, esta tesis intenta evaluar el riesgo que representan el grupo de especies SCN aisladas en leches de vaca que se dirige a

industria y consumo, debido a la producción de factores de virulencia como producción de enterotoxinas y biofilm. Para así resaltar la necesidad de asegurar durante la cadena de elaboración de alimentos las buenas prácticas de manufactura y los adecuados procedimientos operativos estandarizados de sanitización, con el fin controlar focos de posible contaminación a los fines de resguardar la salud pública.

CITAS BIBLIOGRAFICAS CORRESPONDIENTE A LAS PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS.

Presentaciones en reuniones científicas:

“*Staphylococcus aureus* en modos de vida planctónico y biofilm: interacción con células epiteliales mamarias bovinas”. Bohl LP, Lerda WE, **Conesa A**, Isaac P, Breser ML, Valle J, Tolosa de Talamoni N, Porporatto C. IX Jornada y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria (AAIV). Sede de la Sociedad de Medicina Veterinaria. Buenos Aires, 11 de noviembre de 2016.

“Formación de biofilm por distintas especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados de animales con mastitis bovina”. Autores: **Conesa A**; Raspanti, CG; Bohl, LP; Isaac, P; Felipe, V; Bonetto, CC; Bogni, CI; Morgante, CA; Odierno, L; Porporatto, C. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología XIV Congreso Argentino de Microbiología. 26 al 30 de Noviembre, 2016. Rosario.

“Actividad antibiofilm de *Staphylococcus* coagulasa-negativos comensales y su efecto inhibitorio en patógenos asociados a mastitis bovina”. Autores: Isaac, P; **Conesa A**; Rampone, A; Ferrero, M; Porporatto, C. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología XIV Congreso Argentino de Microbiología. 26 al 30 de Noviembre, 2016. Rosario.

“*Staphylococcus aureus* Induce Respuestas Diferenciales en Líneas Celulares Bovinas en Función a la Expresión de los Productos Génicos de *bap* e *ica*”. Autores: Bohl, L P; Lerda, E; **Conesa A**; Breser, M L; Valle, J; Tolosa de Talamoni, N; Porporatto, C. X Jornada de Investigación. 25 de Noviembre, 2015. Villa María.

“*Staphylococcus aureus* Induce Respuestas Diferenciales en Líneas Celulares Bovinas en Función a la Expresión de los Productos Génicos de *bap* e *ica*”. Autores: Bohl, L P; Lerda, E; **Conesa, A**; Breser, M L; Valle, J; Tolosa de Talamoni, N; Porporatto, C. II Jornada Internacional y III Jornada y Reunión Anual de la AAIV. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 25 y 26 de Noviembre, 2015. Tandil.

“Chitosan enhances the antimicrobial effect of cloxacillin against *Staphylococcus spp.* isolated from chronic bovine mastitis”. Breser ML; Felipe VE, Orellano MS, Bohl LP, **Conesa A**, Isaac P, Porporatto C. LXI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)- LXIV reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)-XLVIII reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata. Argentina. 2016

“Planktonic and biofilm lifestyles: setup and preliminary results of a methodology to study the interactions of microorganisms in a bovine mastitis in vitro model”. Bohl LP, Lerda E, **Conesa A**, Isaac P, Breser ML, Valle J, Tolosa de Talamoni N, Porporatto C. LXI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)- LXIV reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)-XLVIII reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata. Argentina. 2016.

“Biofilm formation by different species of coagulase negative *Staphylococcus* isolated from animals with bovine mastitis”. **A.Conesa**, CG Raspanti, LP Bohl, P Isaac, V Felipe, CC Bonetto, CI Bogni, CA Morgante, L Odierno, C Porporatto. 2nd seminar on coagulase-negative staphylococci. Culture and convention centre “het pand” (workshop) and novotel (seminar), **keynotes and oral**

presentation. May 18th and 19th 2017. Ghent, Belgium.

Publicaciones Científicas:

Isaac, P., Bohl, L. P., Breser, M. L., Orellano, M. S., **Conesa, A.**, Ferrero, M. A., & Porporatto, C. (2017). Commensal coagulase-negative Staphylococcus from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens. *Veterinary microbiology*, 207, 259-266.

Indice de contenidos.

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
Enfermedades transmitidas por alimentos.....	5
Generalidades	5
ETAs y la salud pública	5
Intoxicación alimentaria estafilocócica	6
Presentación en el hombre.....	8
Presentación en animales	9
Mastitis bovina	10
Generalidades	10
Impacto económico	12
Agentes etiológicos	14
Microorganismos contagiosos	14
Microorganismos ambientales.....	15
Microorganismos oportunistas.....	16
Otros microorganismos	16
Importancia de los <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos en la mastitis bovina.....	17
Factores de patogenicidad de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos.....	18
Identificación a nivel de especie de los <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos.....	23
Antecedentes en el tema	25
HIPÓTESIS DE TRABAJO	27
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Tipo de Estudio.....	28
Población:.....	28
Muestra:.....	28
Medios de cultivo:	29
Extracción de ADN cromosomal:	30

Amplificación de ADN:	30
Digestión de los productos del ADN amplificado:	31
Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa:.....	32
Tinción de Biofilm con cristal violeta:	32
Instrumentos y descartables	32
Condiciones generales de cultivo:	33
Conservación de las cepas:	33
Pruebas bioquímicas confirmatorias.....	33
Método molecular: Identificación a nivel de especie de SCN mediante la técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción del producto de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del gen conservado <i>gap</i> (PCR-RFLP del gen <i>gap</i>).....	35
Extracción de ADN cromosomal.....	35
Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa:	36
Digestión enzimática de los productos obtenidos de la PCR:....	37
Electroforesis en gel de agarosa:	37
Análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción del gen <i>gap</i> :	38
Identificación por PCR de genes que codifican para enterotoxinas clásicas: <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> y <i>see</i>	38
Aislamiento de ADN genómico para ensayos de PCR.....	38
Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa.	38
Electroforesis en gel de agarosa.	39
Análisis estadístico	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Identificación bioquímica.....	42
Siembra en BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD).....	42
Identificación a nivel de especie de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos: PCR-RFLP del gen <i>gap</i> :.....	43
Detección por PCR de genes responsables de la producción de las enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE (<i>sea- see</i>).....	48
Formación de biofilm: evaluación de la capacidad fenotípica de forma cuantitativa	53
Asociación entre la presencia de genes de enterotoxinas y el crecimiento bacteriano en biofilm.	58
CONCLUSIONES.	62

BIBLIOGRAFÍA:64

LISTA DE ABREVIATURAS

Aap	Proteína asociada a la acumulación
ADN	Ácido desexorribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
ATCC	American Type Culture Collection
Bap	Proteína asociada a la formación de biofilm
cél/ml	Células por mililitro
CifA y CifB	Factor de Aglutinación
CV	Cristal violeta
D	Débil
dNTPs	Deoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DOc	Densidad óptica de corte
ELISA	Inmunoensayo enzimático
Embp	Proteínas de unión a la matriz extracelular
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
F	Fuerte
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fbe	Proteínas de adhesión a fibrinógeno
FnbpA y FnbpB	Proteínas de unión a fibronectina
GM	Glándula mamaria
I	Intermedio
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IIM	Infecciones intramamarias
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MB	Mastitis bovina
NF	No formadora
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIA	Polisacárido de adhesión intercelular
PNAG	Poly-N-acetilglucosamina
RCS	Recuento de Células Somáticas
RFLP	Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
SaPIs	Islas de patogenicidad
SCN	Staphylococcus coagulasa negativos
SDS	Sodio dodecil sulfato
SE	Enterotoxinas estafilocócicas
SEA	Enterotoxina estafilocócica tipo A
SEB	Enterotoxina estafilocócica tipo B
SEC	Enterotoxina estafilocócica tipo C
SED	Enterotoxina estafilocócica tipo D
SEE	Enterotoxina estafilocócica tipo E
SET	EDTA-tris-cloruro de sodio
TAE	Tris-acetato-EDTA
TSA	Agar tripticasa soya
TSB	Caldo Tripticasa Soya
ufc/ml	Unidades formadoras de colonias por mililitro

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados y tamaño de amplicón	32
Tabla 2. Clasificación de la capacidad para formar biofilm según método de cultivo en placa	42
Tabla 3. Identificación de especies por MALDI-TOF MS para 114 SCN aislados a partir de leche bovina y el número de aislamientos identificados correctamente por PCR-RFLP del gen <i>groEL</i> y del gen <i>gap</i>	49
Tabla 4. Presencia de genes de enterotoxinas clásicas en especies de SCN aislados a partir de IIM	53
Tabla 5. Clasificación cuantitativa de la capacidad para formar biofilm adaptada a los valores en estudio	55
Tabla 6. Distribución de la producción de biofilm entre especies de SCN	56
Tabla 7. Presencia de genes de enterotoxinas en cepas con capacidad de formar biofilm	61
Tabla 8. Frecuencia de la detección de genes de enterotoxinas en cepas de SCN con diferente capacidad para formar biofilm	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos 12
- Figura 2.** Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra-Pampeana 14
- Figura 3.** Etapas en el proceso de formación del *biofilm* 23
- Figura 4.** a) Tinción de Gram (+), b) prueba de catalasa, c) prueba de coagulasa 44
- Figura 5.** Cepas sembradas en medio selectivo y diferencial CHROMagar Staph aureus. 1a, 1b, 2a, 2b, 4a: Crecimiento puro de SCN colores varios, uniformes y distintos al malva 3b: Crecimiento de color malva, correspondiente a *S.aureus*, 4b: Contaminación evidente, dos morfologías de colonia y colores en el mismo estriado 45
- Figura 6.** Patrón electroforético en gel de agarosa (2%) del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de PCR del gen *gap* a partir de las seis cepas de referencia, luego de la digestión con la enzima de restricción *AluI*. M: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 pb) 46
- Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes a los genes que codifican para SEA, SEB, SEC, SED y SEE en las cepas de referencia. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para cada mezcla de reacción 50

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes a los genes que codifican para SEA y SEB en cepas de SCN. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para PCR múltiple *sea* y *seb*; c (+): control (+) para PCR múltiple *sea* y *seb* 51

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes al gen que codifica para SEC en las cepas de SCN. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para PCR *sec*; c (+): control (+) para PCR *sec* 52

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes a genes que codifica para SED y SEE en las cepas de SCN. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para PCR múltiple *sed* y *see*; c (+): control (+) para PCR múltiple *sed* y *see* 52

Figura 11. Porcentaje de cepas de las principales especies de SCN según la capacidad de formar biofilm 57

Figura 12. Fuerza del biofilm para las especies más prevalentes: **ch**: *Staphylococcus chromogenes* (n=38), **x**: *Staphylococcus xylosus* (n=30), **h**: *Staphylococcus haemolyticus* (n=17) y **w**: *S. warneri* (n=11). Los puntos fuera de las cajas se consideran valores atípicos 59

“Detección de enterotoxinas en especies *Staphylococcus coagulasa* negativos aislados de muestras de leche bovina”

Palabras clave: Enfermedades de transmisión alimentaria, enterotoxinas, mastitis bovina, *Staphylococcus coagulasa* negativos, biofilm, RFLP-PCR del gen *gap*.

RESUMEN

Ante el potencial peligro que representa para la salud pública la presencia de enterotoxinas estafilocócicas termoestables en productos lácteos, surgió la necesidad de investigar la potencial habilidad de producir estas toxinas por diferentes especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) aislados en leche bovina. Estas bacterias, que están adquiriendo cada vez mayor participación en las infecciones de los rebaños, producen varios factores de virulencia, entre ellos, enterotoxinas, y crecimiento en biofilm, lo cual contribuye a su permanencia en el sector productivo por dificultar la acción de agentes sanitizantes y desinfectantes.

Dado que es esencial la correcta identificación de las especies estafilocócicas para un diagnóstico y tratamiento eficaz, este trabajo tuvo entre sus objetivos, la identificación genotípica de los aislamientos por análisis de PCR-RFLP del gen *gap*. La comparación de este método y la técnica considerada como prueba definitiva de identificación de especie basada en perfiles proteicos, MALDI-TOF MS, permitieron considerar al primero como confiable para la identificación de especie de los aislamientos de SCN con un 93,9% de coincidencia

Sobre los factores de virulencia de SCN, se investigó, presencia de genes de enterotoxinas y capacidad fenotípica de formar biofilm, para luego determinar el grado de asociación entre ambas. Se obtuvo un importante número de cepas productoras de enterotoxinas (78,1%). Entre los genes encontrados, el gen *sea* fue el más

prevalente, presente en cuarenta y siete de las 96 cepas (48,9%).

En cuanto a la capacidad fenotípica de formación de biofilm, la mayoría (92,7%), ochenta y nueve de los 96 aislamientos analizados, presentaron esta habilidad. Es interesante destacar que el 60,4%, (58/96), resultaron fuertes formadores.

La habilidad de producir biofilm por diferentes especies de SCN con presencia de genes para enterotoxinas remarca el riesgo potencial de la persistencia de estas bacterias en el ambiente de procesamiento de alimentos.

Dado que las toxinas estafilocócicas permanecen en los productos aun luego del proceso térmico, los resultados obtenidos en este estudio valorizan la importancia de contar con estrictos programas de higiene que aseguren las prácticas de ordeño y la salud animal, y de este modo se ayude a preservar la salud del consumidor.

"Enterotoxins detection in coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk samples"

Key words: Foodborne diseases, enterotoxins, bovine mastitis, coagulase negative Staphylococcus, biofilm, RFLP-PCR of the *gap* gene.

SUMMARY

Due to the potential danger to the public health posed by staphylococcal thermostable enterotoxins in dairy products, the need arose to investigate the potential ability to produce these toxins by different coagulase negative Staphylococcus species (CNS) isolated in bovine milk. These bacteria, which are becoming increasingly involved in herd infections, produce several virulence factors, including enterotoxins, and biofilm forming, which contributes to their permanence in the dairy sector by hindering the action of sanitizing agents and disinfectants.

Given that the correct identification of staphylococcal species is essential for effective diagnosis and treatment, this work had among its objectives the genotypic identification of the isolates by PCR-RFLP analysis of the *gap* gene. The comparison of this method and the technique considered as definitive proof of species identification based on protein profiles, MALDI-TOF MS, allowed the former to be considered reliable for the identification of species of CNS isolates with a 93.9% coincidence.

Regarding the virulence factors of SCN, the presence of enterotoxin genes and the phenotypic capacity to form biofilm were investigated, in order to later determine the association between both. An important number of enterotoxin-producing strains was obtained (78.1%). Among the genes found, the gene was the most prevalent, present in forty-seven of the 96 strains (48.9%).

Regarding the phenotypic capacity of biofilm formation, the majority (92.7%), eighty nine of the 96 isolates analyzed, showed this ability.

It is interesting to note that 60.4% (58/96) were strong formers.

The ability to produce biofilm by different species of SCN with the presence of enterotoxins genes, highlights the potential risk of persistence of these bacteria in the food processing environment.

Since the staphylococcal toxins remain in the products even after the thermal process, the results obtained in this study value the importance of having strict hygiene programs that ensure milking practices and animal health, and in this way help preserve consumer's health.

INTRODUCCIÓN

Enfermedades transmitidas por alimentos

Generalidades

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son enfermedades de origen alimentario, incluidas las intoxicaciones e infecciones, son patologías producidas por la ingestión accidental, incidental o intencional de alimentos o agua, contaminados en cantidades suficientes con agentes químicos o microbiológicos, debido a la deficiencia en el proceso de elaboración, manipulación, conservación, transporte, distribución o comercialización de los alimentos y agua [Benenson, 1997].

Es importante diferenciar las infecciones alimentarias de las intoxicaciones alimentarias:

Las infecciones alimentarias son aquellas en las que las bacterias se encuentran en el alimento en el momento de la ingestión, multiplicándose en el huésped y dando lugar a la enfermedad.

Las intoxicaciones alimentarias son las enfermedades que se producen cuando las bacterias proliferan en el alimento, produciendo una sustancia tóxica para el hombre y animales de sangre caliente. En este caso las bacterias proliferan en el alimento y no en el huésped, encontrándose estas sustancias nocivas ya en el alimento al momento de la ingestión [Mossel y col., 2003].

ETAs y la salud pública

Las ETAs son un problema de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político. Es un problema frecuente en los países en vías de desarrollo, las autoridades e instancias gubernamentales y otras instituciones afines deberían dirigir campañas de vigilancia y asistencia continua a fin de prevenir o

corregir situaciones que pueden ser muy peligrosas y que pueden afectar adversamente la salud de la población [FAO, 2006].

La salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad nutricional de los alimentos que consumen diariamente, la cual a su vez depende de la calidad higiénica y sanitaria a la que estos son sometidos en el transcurso de la cadena productiva, desde el campo a la mesa del consumidor [FAO, 2006].

Se hace necesario identificar los distintos factores que pueden intervenir como causas principales de generación de infecciones e intoxicaciones alimentarias o una combinación de ambas, a fin de poder determinar, controlar y prevenir a los consumidores. [FAO, 2006].

Las ETA constituyen uno de los problemas de salud pública más relevantes. Las ETA de origen infeccioso pueden estar asociadas a agentes virales, parasitarios o bacterianos. [FAO, 2006].

Intoxicación alimentaria estafilocócica

Diferentes especies del género *Staphylococcus* que colonizan la piel y mucosas del hombre y los animales están asociadas a ETAs [ICMSF, 1996]. Su presencia en los alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, debido a inadecuadas prácticas de manufactura o por la utilización de materia prima contaminada [Bean y col 1996] y pueden requerir atención hospitalaria [López y col., 2008; Brizzio, 2009; Mabfredi y col., 2010]. La intoxicación alimentaria por estafilococos es causada por la ingestión de toxinas secretadas por los microorganismos preformadas en los alimentos contaminados [Dinges y col., 2000; Le Loir y col., 2003]. Estas toxinas denominadas enterotoxinas estafilocócicas (SEs, Staphylococcal Enterotoxin), actúan sobre la mucosa intestinal produciendo la secreción masiva de líquidos a la luz del intestino y la consiguiente diarrea

Estas toxinas son proteínas simples de bajo peso molecular y termotolerantes. Hasta hace unos años se reconocían 5 enterotoxinas diferentes por inmunodifusión (SEA, SEB, SEC, SED, SEE), posteriormente se describieron 13 nuevos tipos mediante técnicas genotípicas. En la actualidad se reconocen 18 tipos diferentes de enterotoxinas (SEA-SEU), además de las variaciones de SEC (SEC1, SEC2, SEC3) [Bhatia, 2007; ICMSF, 1992]. Las SEs se producen principalmente en la fase posexponencial del crecimiento bacteriano y su expresión genética está controlada por al menos tres sistemas de regulación: *agr*, *sar* y un sistema de represión catabólica [Fueyo Mendoza, 2008]. La determinación del tipo de SE producida por una cepa dada aporta datos importantes para el estudio bacteriológico, epidemiológico, clínico, alimentario y medioambiental de un evento epidemiológico [ICMSF, 1992].

Entre las bacterias que originan estas enfermedades, *Staphylococcus aureus* ocupa un papel destacado como agente etiológico de una de las gastroenteritis más frecuentes por consumo de alimentos contaminados. Esta afección se conoce como intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) y está identificada en la Clasificación Internacional de Enfermedades como CIE 005.0 (14).

Si bien la producción de SEs es característica de *Staphylococcus aureus*, en los últimos años también se ha reportado la producción de las mismas en diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativos (SCN) que participan en una variedad de infecciones en el hombre y animales [Park y col., 2011; Unal y Cinar, 2012; Guimarães, 2013].

Presentación en el hombre

En algunos países la enfermedad constituye una importante causa de intoxicación alimentaria. La mayoría de los casos esporádicos quedan generalmente sin registrar. Principalmente se conocen y registran los brotes que afectan a varias o muchas personas.

Alrededor de 1500 millones de casos de diarrea asociados a 3 millones de muertes ocurren anualmente en el mundo en menores de 5 años. Entre el 15% y el 70% de estas diarreas son el resultado directo de la contaminación química o biológica que presentan algunos de los alimentos que se comercializan en los diferentes países. Se estima que, solo en EE.UU., cada año se presentan entre 3,3 y 12,3 millones de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), con un costo asociado de 6,5 a 34,9 millones de dólares anuales [Buzby, 1997].

En los Estados Unidos de América en el periodo de 1977 a 1981 se registraron 131 brotes, que afectaron a 7.126 personas, en los últimos 3 años de ese quinquenio, solo se incrimino la enterotoxina A. En la actualidad, la leche, que es la fuente más común de toxinas C y D y otros alimentos son la causa menos común de intoxicación en Estados Unidos [Holnberg y Blake, 1984]. En Japón, el promedio anual de brotes de intoxicación alimentaria de 1976 a 1980 fue de 827. Del total de 8.742 casos, 28,2% fueron debidos a intoxicación estafilocócica [Genigeorgis, 1989].

Se ha sugerido que los trastornos intestinales observados con frecuencia en los países en desarrollo, se deben en parte a la intoxicación estafilocócica, como lo demostraría el hecho de que los títulos de anticuerpos a las enterotoxinas son más altos en residentes de estos países que en personas en tránsito [Bergdoll, 1979].

Presentación en animales

No se conocen casos espontáneos de intoxicación aguda en animales domésticos. El mono *Macaca mulatta* es susceptible a la enterotoxina por vía digestiva y se ha usado como animal experimental para demostrar su presencia en los alimentos involucrados. También se han usado gatos para tal fin pero mediante inoculación intravenosa o intraperitoneal de la enterotoxina. Es posible que el perro sufra de una gastroenteritis similar al hombre [Smith, 1957]. En cuanto a lo que a salud pública se refiere, reviste interés la mastitis bovina (MB) por este género bacteriano, que es un grupo de patógenos común en la ubre de la vaca en los sistemas modernos de ordeño. La transmisión de estos agentes (SCN) se da a través de las maquinarias de ordeño o de las manos de los operarios, y la entrada se produce por vía ascendente por el canal del pezón o por lesiones superficiales del mismo [Gillespie y Timoney, 1981].

Las enterotoxinas A, C y D son las predominantes en muchos casos de intoxicación estafilocócica en muchos países [Kato y Kume, 1980]. Sin embargo, los tipos predominantes de enterotoxinas de cepas aisladas de leche parecen variar entre países, pero muchas veces esto podría deberse a que los estudios llevados a cabo, cotaban con un número de cepas poco representativo. En investigaciones realizadas en los últimos años en 5 países europeos y Japón se ha demostrado que una gran parte de los estafilococos que se aíslan de mastitis bovina (MB) son toxigénicos. En Europa de 174 cepas aisladas, el 41,4% producían enterotoxinas y de esas el 48,6% eran A, 5,6% B, 29,2% C y 33,3% D, solas o combinadas. En Japón, se estudiaron 1.056 cepas aisladas de MB subclínicas, de las cuales el 34,4 % resultaron toxigenicas y de estas el 31,1% eran productoras de enterotoxina A y 10,7%, 54,3%, y 27% de B, C y D respectivamente, solas o combinadas [Kato y Kume, 1980].

Mastitis bovina

Generalidades

La mastitis bovina (MB) es una inflamación de la glándula mamaria (GM) asociada al parto y la lactancia, y constituye la patología más frecuente que afecta al ganado bovino lechero [De Vlieghe y col., 2012]. La producción lechera es una de las actividades económicas más importantes del país, siendo Córdoba la provincia que mayor cantidad de leche produce, con un 37% de la producción total [Subsecretaría de Lechería de la Nación Argentina, 2012]. En los últimos años ha incrementado la demanda de leche y ha disminuido el número de tambos, esto ha llevado a una mayor explotación del rodeo y de la infraestructura del tambo con consecuencias sanitarias indeseadas. La MB es causada principalmente por microorganismos y se caracteriza por el cese en el suministro de leche, alteraciones en la calidad y en la producción láctea [Halasa y col., 2007]. De acuerdo con el recuento de células somáticas (RCS) en leche, el nivel de la infección intramamaria (IIM), el estadio de la lactancia en el que se produce la infección, la MB puede aparejar serios problemas en el ganado vacuno lechero, con grandes pérdidas económicas no solo por el descarte de la leche y de las vacas infectadas en casos severos, sino también por el costo de los tratamientos utilizados para controlar y erradicar la patología [Hogeveen y col., 2011; Larriestra y Vissio, 2012].

La enfermedad puede cursar como subclínica, que es la de mayor prevalencia en un rodeo, sin signos clínicos evidentes en el animal y apariencia normal de la leche con RCS superior a 200.000 cel. /mL, o como clínica, con alteraciones macroscópicas de la leche y síntomas palpables de la ubre [Philpot y Nickerson, 1992]. A veces en la mastitis clínica se pueden presentar signos sistémicos los cuales pueden culminar en bacteriemia, septicemia y muerte del

animal [Philpot y Nickerson, 1992; Leigh, 2002]. Clásicamente se la ha definido como una “enfermedad poli factorial”, porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para rechazarla, de la patogenicidad y cantidad de bacterias presentes en el rodeo y de las condiciones del medio ambiente, en particular del manejo del ordeño que se esté desarrollando en el establecimiento (Figura 1) [Andresen, 2001].

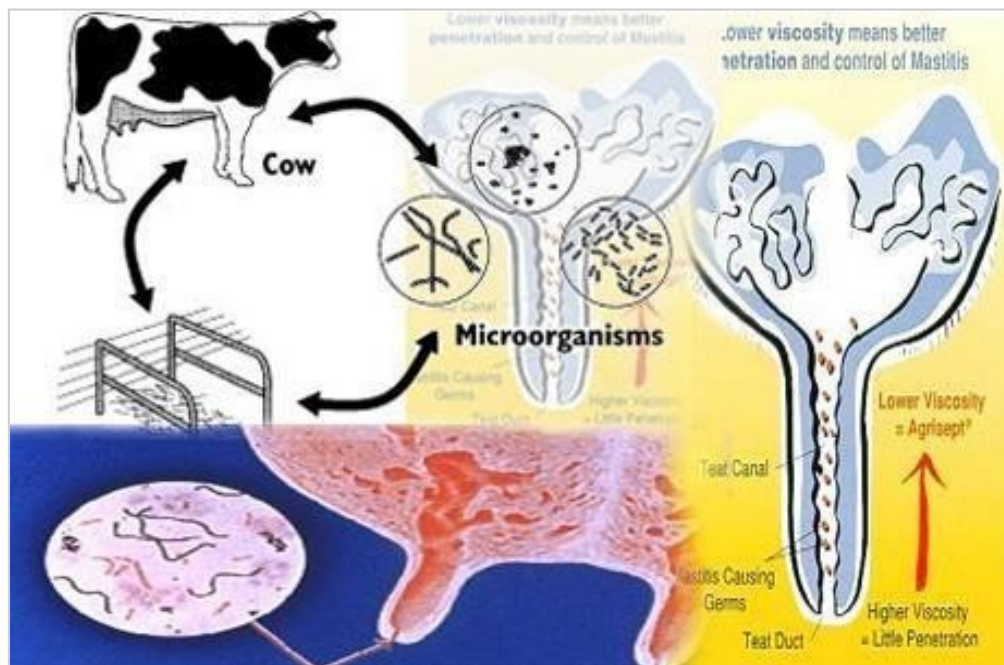


Figura 1. Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos.
[<http://www.pakissan.com/english/allabout/livestock/mastitis.monster.threat.to.dairy.industry.shtml>].

Impacto económico

A nivel mundial, las pérdidas causadas por MB son de aproximadamente 35 mil millones de pesos anuales y representa el 70% de los gastos totales para los ganaderos lecheros [Philpot y Nickerson, 1992; dos Santos y col., 2002; Wellenberg y col., 2002; De Vlieghe y col., 2012; Fabres-Klein y col., 2014]. El impacto económico directo de valores elevados de RCS difiere considerablemente entre países, y depende de la violación de límites para leche de calidad reducida o de premios pagados por leche de alta calidad. En nuestro país la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de Agroindustria estableció para la “Leche de Referencia”, en el sistema de pago de leche cruda, recuentos <400.000 cel. /mL para el mayor porcentaje de bonificación por calidad higiénico-sanitarios [SECAGYP, 2017].

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina [MAGyP, 2015]. Los valores de RCS en leche, en un total de 6.229 tambos con una producción promedio mensual de aproximadamente 557 millones de litros de leche en enero del 2015, fue de 446.400 cel/mL, teniendo en cuenta que las pérdidas económicas corresponden al 5% del total de la leche producida se puede calcular una disminución anual aproximada de 334 millones de litros.

La producción lechera en Argentina tiene lugar principalmente en la región pampeana, abarcando el noreste de la Pampa, centro oeste de la Provincia de Santa Fe, el Sudeste de la provincia de Córdoba, el Norte, Oeste y Sur de la provincia de Buenos Aires, Sur de la provincia de Santiago del Estero y centro sur de la provincia de Entre Ríos, con aproximadamente 10.000 tambos, [Lechería Argentina, Anuario 2014]. (Figura 2).

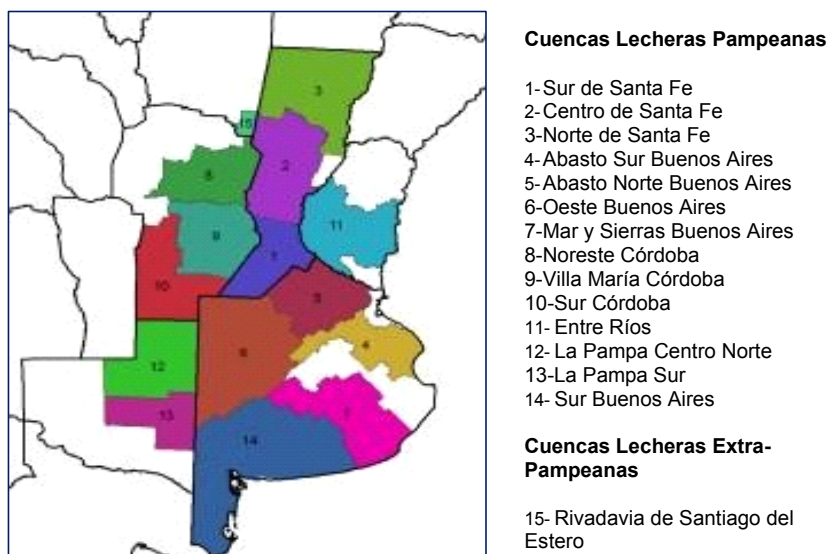


Figura 2. Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra- Pampeana [Adaptado de Marino y col., 2011]

En un estudio sobre 48 establecimientos lecheros pertenecientes a la Unidad Ejecutora Local de Villa María, Córdoba, Argentina, Vissio y col (2015) analizaron un promedio de 128 vacas en ordeño por establecimiento (rango 70-212). Los datos obtenidos mostraron que la mediana de pérdidas en producción de leche por mastitis subclínica que encontraron fue de 2,8 litros/vacas/día lo que representa un costo de US\$ 0,99/vaca/día. Por otro lado, la mediana de pérdidas en producción de leche atribuidas a mastitis clínica fue de 0,12 litros/vaca/día, lo que representó un costo de US\$ 0,04/vaca/día. El mismo grupo de investigación en estudios previos en la misma cuenca lechera [Larriesta y Vissio, 2012], encontraron una prevalencia global de mastitis subclínica del 19,4% y de mastitis clínica del 3% en un total de 2000 vacas. Estos resultados demuestran las grandes pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis clínica y subclínica.

A pesar de que existen tratamientos para la MB, el éxito de los mismos es decepcionante y depende de la vaca, el agente patógeno

y el tratamiento [Keefe, 2012]. La patogénesis y la epidemiología de la enfermedad siguen siendo en gran medida desconocidas, y otros factores de riesgo específicos de patógenos deben ser identificados para optimizar los programas de prevención actuales.

Agentes etiológicos

La MB es principalmente una enfermedad infecciosa de la GM, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón, de diferentes tipos de bacterias, hongos, y hasta algunos virus [Pereyra y col., 2014]. Las especies de los géneros bacterianos *Staphylococcus* y *Streptococcus* son las más prevalentes en infecciones clínicas y subclínicas en Argentina [González y col., 1980; Calvinho y col., 1991; Rivero y col., 1994; Gentilini y col. 2002; Calvinho y Tirante 2005; Dieser y col., 2014]. De acuerdo a su hábitat, interacción con el huésped y patogenicidad, los microorganismos pueden ser clasificados como: microorganismos contagiosos, ambientales, oportunistas y otros [Watts y Owen, 1989; Philpot y Nickerson, 1992; National Mastitis Council, 2009].

Microorganismos contagiosos

Los patógenos contagiosos viven y se multiplican sobre y dentro de la GM infectada, además se propagan entre cuartos de un mismo animal o de un animal a otro, principalmente durante procedimientos de ordeño poco higiénicos [Zadoks y col., 2001; Rossitto y col., 2002]. Si bien las especies más frecuentemente aisladas dentro de este grupo incluyen a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, también se señala a *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis* y *Streptococcus dysgalactiae* como agentes causales de MB [Philpot y Nickerson, 1992]. *Mycoplasma* puede ser

considerado un patógeno emergente de mastitis [Fox y col., 2005; Barkema y col., 2009; Passchyn y col., 2011]. Estos son patógenos difíciles de aislar e identificar, y por lo tanto la sensibilidad de la detección en muestras de leche con mastitis se reduce cuando las mismas han sido almacenadas y congeladas [Biddle y col., 2004].

Dentro del género *Staphylococcus*, la especie *S. aureus* es el agente etiológico de mastitis clínica y subclínica más difícil de controlar en vacas y ovejas [Barkema y col., 2006] y de mayor prevalencia tanto en Argentina [Calvinho y Tirante, 2005; Dieser 2014], como en otros países de gran desarrollo lechero [Zecconi y col., 2005]. Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, la forma más frecuente de presentación es la subclínica con tendencia a la cronicidad, sin alteración macroscópica de la leche, pero con recuentos elevados de células somáticas y persistencia de la bacteria en la GM [Bardiau y col., 2014].

Microorganismos ambientales.

Los patógenos ambientales se encuentran en el ambiente donde vive la vaca, pasturas, cama, excremento, entre otros, y pasan a la ubre en los períodos entre ordeño [Zadoks, 2002]. Dentro de este grupo se encuentran *S. dysgalactiae* comportándose tanto como un patógeno ambiental como contagioso [Smith y Hogan, 1993; Calvinho y Tirante, 2005], *Streptococcus uberis* causando tanto mastitis subclínica y clínica [Compton y col., 2007] y bacterias gram negativas representadas principalmente por bacterias coliformes [Smith y col., 1985; Oliver, 1988] entre ellas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, y especies de *Citrobacter*, *Serratia* y *Proteus* [Philpot y Nickerson, 1992]. Los patógenos ambientales también pueden causar problemas de mastitis en el periparto [Fox, 2009].

Microorganismos oportunistas

Los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) se encuentran normalmente colonizando la piel sana de los pezones y en las manos de los ordeñadores, y por esto se encuentran en una posición “oportunista” para colonizar el canal del pezón. En la actualidad, los SCN son la principal causa de mastitis subclínica en la mayoría de los rodeos lecheros con un adecuado manejo higiénico-sanitario que han controlado la mastitis contagiosa [Davidson y col., 1992; Pyörälä y Taponen, 2009; Bonetto, 2014].

La epidemiología y relevancia de este grupo en el desarrollo de la MB está actualmente en debate [De Vlieghe y col., 2009]. Sin embargo, los SNC se han convertido en las bacterias predominantemente encontradas en muestras de leche de vacas en todo el mundo [Makovec y Ruegg, 2003; Pitkälä y col., 2004; Piepers y col., 2007]. La descripción de la patogenicidad de este grupo bacteriano no se encuentra del todo claro, ya que puede causar mastitis clínica como subclínica e incluso algunos autores han informado acerca de un efecto benéfico de estos microorganismos a la ubre, debido a que impide la colonización de patógenos mayores [Nickerson y Boddie, 1994; De Vlieghe y col., 2003; 2004; Taponen y col., 2007; Schukken y col., 2009].

Otros microorganismos

Una gran variedad de microorganismos se pueden aislar con menor frecuencia de casos de MB e incluyen a los géneros *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Bacillus* y *Pasteurella*. Las infecciones causadas por algunos de estos microorganismos casi siempre son debidas a los inadecuados procedimientos de manejo, especialmente cuando se desarrollan las condiciones que pueden incrementar la exposición a ellos [Philpot y Nickerson, 1992].

Importancia de los *Staphylococcus* coagulasa negativos en la mastitis bovina

Si bien la MB es causada por numerosos agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* fue el patógeno más frecuentemente aislado de casos de infecciones intramamarias (IIM) en las últimas décadas, tanto en Argentina [Calvinho y Tirante, 2005; Dieser y col., 2014], como en otros países de gran desarrollo lechero [Zecconi y col., 2006]. Sin embargo, el adecuado manejo higiénico-sanitario de los rodeos lecheros, ha llevado a una reducción de la incidencia general de la mastitis contagiosa debida a patógenos mayores, y a que patógenos oportunistas, como los SCN, sean en la actualidad la causa principal de IIM en el ganado bovino a lo largo del mundo [De Vliegheer y col., 2012].

Este grupo de microorganismos presentan la habilidad para eludir el sistema inmune, persisten en la glándula por un largo periodo de tiempo [Piessens y col., 2011; Supré y col., 2011]. Esto se asocia con un incremento en el nivel de RCS y cambios en el patrón de leucocitosis indicando que los SCN causan una inflamación mamaria crónica similar a la causada por *S. aureus* [Timms y Schultz, 1987; Hogan y col., 1987; Oliver y Jayarao, 1997; Chaffer y col., 1999; Taponen y Pyörälä, 2009; Gillespie y col., 2009; Piepers y col., 2010; Paradis y col., 2010; Tomazi y col., 2015]. Por otro lado, la prevalencia de SCN que presentan genes que codifican toxinas y genes de resistencia a antimicrobianos los ubica como potenciales causantes de esta enfermedad [Zhang y Maddox, 2000; Rall y col., 2010; Oliveira Calsolari y col., 2011; Park y col., 2012]. Dado que los SCN están adquiriendo cada vez mayor participación en las infecciones de los rebaños lecheros y siendo frecuentemente los más aislados [De Vliegheer y col., 2004; Pitkälä y col., 2004; Calvinho y Tirante, 2005; Cunha y col., 2006; López Meza, y col., 2006; Tenhagen y col., 2006; Piepers y col., 2007; Taponen, 2008; Sampimon y col., 2009; Pyörälä y Taponen, 2009; Paradis y

col., 2010; Piessens y col., 2010; Waller y col., 2011; Kaliwal y col., 2011; Park y col., 2012], varios estudios han sugerido considerar en la actualidad a estos microorganismos como patógenos emergentes causantes de MB [Pyorala y Taponen, 2009; El-Jakee y col., 2013; Hosseinzadeh y Saei, 2014].

Factores de patogenicidad de *Staphylococcus coagulasa* negativos.

La patogenicidad de las especies de SCN está asociada con la presencia de distintos factores de virulencia. Estos incluyen:

Componentes de la pared celular: cápsula de polisacárido y formación de biopelículas, que permiten evadir los mecanismos de defensa del huésped como la fagocitosis.

Proteínas de superficie: reconocen moléculas adhesivas de la matriz que promueven la adhesión al tejido del huésped, y la posible internalización tal como: proteína de unión a fibrinógeno y proteína de unión a fibronectina.

Proteínas secretadas como superantígenos, como es el caso de las enterotoxinas.

Enzimas que degradan tejido del huésped: proteasas, lipasas, hialuronidasas, colagenasas que promueven la invasión y la propagación bacteriana al tejido [Haveri y col., 2007; Fournier y col., 2008]. La conjunción de los distintos factores de virulencia contribuye a que la bacteria patógena evada las defensas del huésped, facilite su adherencia a las células epiteliales mamarias y colonice el tejido favoreciendo su persistencia y supervivencia, garantizando así el éxito para instalarse y mantenerse en el tejido huésped [Mamo y col., 1988; Saa y Kruze, 1994; Almeida y Oliver, 2001; Anaya-Lopez y col., 2006; Oliveira y col., 2006; Coelho y col., 2011]. Además, la producción de varias toxinas y enzimas que contribuyen a su virulencia inducen respuestas inflamatorias o daño

tisular [Janda, 1986; Scheifele y col., 1987; Watts y Owens, 1987; Bedidi-Madani y col., 1998; Zhang y Maddox, 2000; Otto, 2004; Cunha y col., 2006; Türkyilmaz y Kaya, 2006]. Algunas especies de SCN son más capaces que otras a causar IIM persistente, la diferencia puede atribuirse a determinados factores de virulencia, a la adaptación al desarrollo en la ubre o ambos [Thorberg y col., 2009].

Producción de enterotoxinas

Las distintas especies de SCN pueden producir varias toxinas y enzimas que inducen respuestas inflamatorias o daño tisular y contribuyen a su virulencia [Watts y Owens, 1987; Valle y col., 1990; Beddi-Madani y col., 1998; Zhang y Maddox, 2000; Otto, 2004; de Cunha y col., 2006; Türkyilmaz y Kaya, 2006]. Si bien la producción de SEs es característica de *S. aureus*, recientemente también se ha encontrado esta capacidad en diferentes especies de SCN de origen bovino [Park y col. 2011b; Unal y Cinar 2012; Guimarães y col., 2013; Fijałkowski y col., 2014; Rall y col., 2014; Mahmoud y col., 2015].

Las SEs pertenecen a la familia de los superantígenos (SAGs) y tienen un efecto importante en el sistema inmune del huésped a través de la subversión de la respuesta inmune y retraso en el establecimiento de la inmunidad específica del patógeno [McCormick y col., 2001; Seo y col., 2007]. Las SEs son proteínas de cadena sencilla con pesos moleculares de 26.000 a 29.000 [Bennett, 1996]. La principal característica de estas es su estabilidad y resistencia a las enzimas proteolíticas, tales como tripsina y pepsina, lo que les permite ejercer su actividad en el tracto gastrointestinal [Podkowik y col., 2013].

Hay cinco serotipos clásicos de SEs, SEA, SEB, SEC1, 2, 3, SED y SEE y otros recientemente descrito SEG, SEH y SEI, todos presentan actividad emética [Seo y Bohach, 2007]. Los síntomas

más comunes de intoxicación alimentaria estafilocócica que generalmente comienzan 2-6 horas después de que se consumen alimentos contaminados, son náuseas, vómitos, postración aguda y calambres abdominales.

Los diferentes serotipos SE son similares en composición y actividad biológica, pero son diferentes en la antigenicidad y son identificadas serológicamente como proteínas separadas [Bennett, 1996].

Cuando estafilococos enterotoxigénicos proliferan en los alimentos, pueden producir suficiente toxina para causar intoxicación alimentaria después que la comida se ingiere. Debido a la termorresistencia de estas toxinas, aún mayor que los propios estafilococos [Bergdoll, 1983], si no hay control de las temperaturas de conservación de la leche, materia prima de la industria láctea, previo al tratamiento térmico, el desarrollo microbiano permite la suficiente producción de ESs responsables luego de la intoxicación alimentaria, como lo demuestra el hecho que en muchos de los brotes descritos no se aisló el microorganismo aunque sí se detectó la enterotoxina en las muestras [Ikeda y col., 2005].

La producción de SEs en los alimentos está condicionada no solo por la capacidad de la bacteria de producir toxinas sino además por la composición físico química del alimento, temperatura y tiempo de exposición de éste, de modo que favorezca el crecimiento del microorganismo [Cremonesi y col., 2007]. Se suma como factor de riesgo circunstancias de crecimiento que puedan incrementar la capacidad de supervivencia bacteriana como es el desarrollo de biofilm, lo que permite alcanzar niveles de contaminación que favorecen la producción de SEs en condiciones ambientales adecuadas.

Producción de biofilm

El potencial patogénico asociado con la capacidad de expresar adhesinas y formar biopelículas (biofilms) es una estrategia de supervivencia que permite a las bacterias instalarse y colonizar un ambiente particular, de modo que el estado planctónico podría reducirse al paso de una superficie a otra, esto es, a la difusión, dentro de un ambiente particular, vivo o inerte (Figura 3) [Sauer, 2003]. Los biofilms son comunidades complejas de bacterias que crecen embebidas en una matriz compuesta principalmente por polisacáridos, ADN extracelular y proteínas, que se adhieren a superficies inertes o tejido vivo [Costerton y col., 1999] y representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La formación de biofilm, permite que los bacterias se agreguen y formen macro-colonias que crecen protegidas de la acción de antimicrobianos, anticuerpos, y de otros mecanismos de defensa del hospedero, [Christensen y col., 1985; Davenport y col., 1986; Otto, 2004; Simojoki y col., 2012].

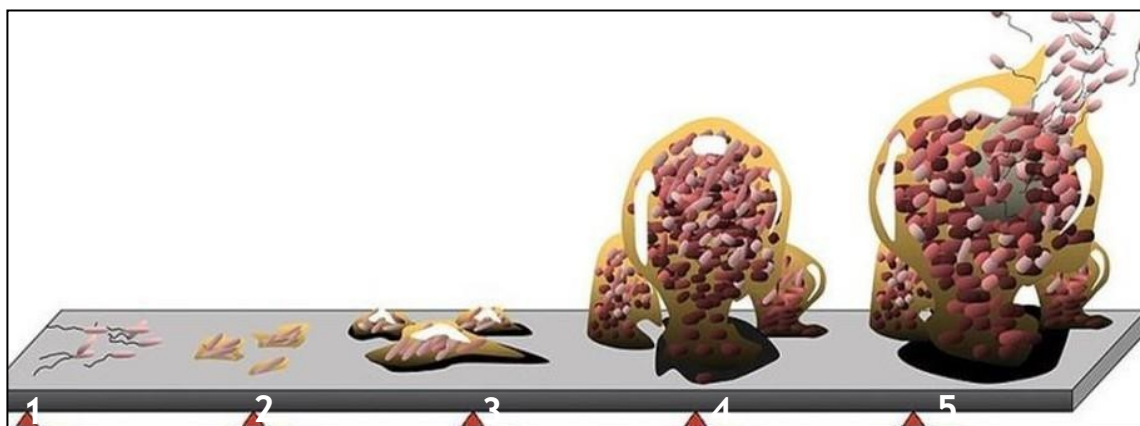


Figura 3. Etapas en el proceso de formación del *biofilm*: 1: unión reversible, 2: unión irreversible, 3: maduración inicial, 4: maduración final, 5: dispersión (Adaptado de Sauer, 2003)

El desarrollo de MB estafilocócica, su persistencia o ambas dependen de la interacción entre bacterias invasoras y sistema de

defensa del huésped, principalmente de las células inmunes de la GM infectada [Wellnitz y Bruckmaier, 2012]. Muchas especies de *Staphylococcus* presentan la habilidad de formar biopelículas y se estima que así resisten a la terapia antibiótica y a la acción del sistema inmunológico.

La formación de biofilm por especies de *Staphylococcus* spp. está asociado a la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular (PIA) que promueve la acumulación bacteriana, particularmente el poly-N-succinyl- β -1-6 glucosamina (PNAG), cuya síntesis se encuentra mediada por enzimas codificadas por el operón *icaABCD* [Gerke y col., 1998; McKenney y col., 1998]. Sin embargo, existen evidencias que estas bacterias pueden formar biofilm en ausencia de PIA/PNAG [Rohde y col., 2007]. Ciertas proteínas se asocian a la formación de biofilm o a la adhesión celular como: Aap (proteína asociada a la acumulación), Embp (proteínas de unión a la matriz extracelular), Bap (proteína asociada a la formación de biofilm), Fbe (proteínas de adhesión a fibrinógeno), ClfA y ClfB (factor de aglutinación) y FnbpA y FnbpB (proteínas de unión a fibronectina) [Cucarella y col., 2004; Tormo y col., 2005; Tremblay y col., 2013; Vanderhaeghen y col., 2014]. Varios genes que codifican factores de virulencia se encuentran localizados en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad (SaPIs), los cuales se transfieren horizontalmente entre las cepas, como es el caso del gen que codifica para la proteína Bap [Tormo, 2005]. Este movimiento horizontal de los elementos genéticos ocurre posiblemente *in vivo*, y podría determinar la presencia en los SCN de genes asociados a *S. aureus* que codifican otros factores de virulencia. La presencia de estos genes de virulencia asociados a biofilm en SCN aislados de leche podría determinar la persistencia y virulencia de este tipo de infecciones a nivel intramamario, las cuales se presentan con una prevalencia cada vez mayor [Zuniga y col., 2015]. Sin embargo la información disponible es escasa siendo necesario nuevos estudios

para caracterizar este mecanismo de virulencia en los SCN bovinos.

Identificación a nivel de especie de los *Staphylococcus* coagulasa negativos.

Dado que algunas especies de SCN afectan la salud de la GM más que otras [Persson Waller y col., 1997; Supré y col., 2011], la identificación de las distintas especies de *Staphylococcus* es importante ya que proporciona un valor predictivo sobre si el microorganismo aislado tiene importancia clínica o si se trata de un contaminante y además aumenta el conocimiento de la patogénesis de las especies estafilocócicas, información que resulta de utilidad en estudios epidemiológicos y en la toma de decisiones apropiadas para su manejo [Vanderhaeghen y col., 2014].

En la actualidad y debido a que la identificación clásica, resulta demasiado laboriosa y requiere de mucho tiempo, se han desarrollado varios sistemas comerciales entre ellos el API-Staph para la identificación de los SCN, mediante pruebas fenotípicas [Couto y col., 2001]. Sin embargo, se ha demostrado que estos métodos fenotípicos son insuficientes para la identificación de estos microorganismos aislados de bovinos, ya que siempre queda un porcentaje de cepas que están en una ubicación intermedia, debido a la variable expresión de las características fenotípicas de muchas especies de *Staphylococcus* [Bannerman y col., 1993; Couto y col., 2001; Heikens y col., 2005; Capurro y col., 2009; Sampimon y col., 2009]. Debido a esto en los últimos años se han desarrollado varios métodos genotípicos para permitir más exactitud en la identificación a nivel de especie [Supré y col., 2009; Piessens y col., 2010; Braem y col., 2011; Lange y col., 2015; Guimarães y col., 2016].

El uso de ácidos nucleicos tiene como objetivo lograr una aproximación a la identificación a nivel de especie y tener una alta

sensibilidad y especificidad [Drancourt y Raoult., 2002]. En los últimos años las técnicas basadas en reacciones de amplificación de ADN, especialmente la de PCR, han sido ampliamente utilizadas para la tipificación bacteriana. En general existen tres grupos de variantes de la PCR: 1) aquellas en las que, utilizando cebadores arbitrarios o con cierta especificidad, se amplifican regiones del genoma localizadas entre dos cebadores adyacentes separados por una distancia no superior a la que la Taq polimerasa puede amplificar. Estas variantes suelen dar patrones de amplificación constituidos por un número variable de bandas de ADN, 2) variantes en las que, previa o posterior a la amplificación génica, se somete el genoma o producto amplificado a digestión con enzimas de restricción, y 3) aquellas que amplifican regiones internas de ciertos genes y posterior secuenciación [Yugueros y col., 2001].

El uso de genes de vías universales y genes de función universal altamente conservados, pero con suficientes variaciones de secuencia que permiten una óptima identificación a nivel de especie, se está haciendo cada vez más frecuente como ADN diana para amplificación por PCR [Goh y col., 1997; Mollet y col., 1997; Martineau y col., 1998; Yugueros y col., 2001].

El gen *gap*, el cual codifica una proteína de unión a transferrina de 42 kDa localizada dentro de la pared celular de *Staphylococcus* spp., está siendo utilizado como marcador filogenético para la identificación a nivel de especie dentro del género *Staphylococcus*. El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) luego de la digestión con la enzima *AluI* del amplicón del gen *gap*, es una herramienta valiosa para la identificación de los *Staphylococcus*, independiente de la caracterización fenotípicas [Yugueros y col., 2000; Ghebremedhin y col., 2008; Park y col., 2011].

Antecedentes en el tema

En un estudio previo realizado por el grupo de investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), el relevamiento de 51 tambos en la cuenca lechera de Villa María (Córdoba, Argentina), demostró como patógenos más prevalentes a los SCN (52.1%), seguido de *S. aureus* (21.3%) [Dieser y col., 2014]. Entre las diferentes especies pertenecientes al grupo de los SCN, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. xylosus* fueron las especies aisladas con mayor frecuencia [Bonetto, 2014; Raspanti y col., 2016].

En otro estudio llevado a cabo por la Universidad Nacional de Villa María (UNVM), se demostró a partir del relevamiento de 10 establecimientos lecheros de la región de Villa María, una importante prevalencia (37,6%) de *S. aureus*, que en su totalidad mostraron la capacidad de formar biofilms [Somale y col., 2013]. Se demostró además la presencia de genes *icaAD*, en el 67% de los aislamientos de *S. aureus* con capacidad de formar biofilm provenientes de mastitis subclínica y en la totalidad de aislamientos de *S. aureus* con capacidad de formar biofilm provenientes de mastitis clínica y crónica, lo que indicaría que PIA es un factor importante en la formación de biofilms [Felipe y col., 2013]. Además, todos los aislamientos de *S. aureus* ya obtenidos [Felipe y col., 2013] y algunas cepas de SCN aisladas en la misma cuenca, fueron *clfA*, *clfB* y *fnbpA* positivos, señalando una participación relevante de las proteínas de adhesión en el mecanismo de formación de biopelículas [Felipe y col., 2017].

Debido a que la leche y los productos derivados procedentes de estos tambos se dirigen totalmente a consumo humano e industria, se planteó la importancia de evaluar factores de virulencia que presentan un riesgo incipiente y potencial para la salud pública. Dentro de estos, resulta importante la producción de enterotoxinas, por su implicancia en las intoxicaciones transmitidas por productos

lácteos. Es por ello que se plantea, como una necesidad determinar los tipos de enterotoxinas predominantes como así también evaluar posibles asociaciones entre este y otros factores de virulencia como la capacidad de crecimiento en biofilm. Estos estudios aportarán conocimientos sobre la permanencia de la bacteria y su resistencia a los tratamientos antibióticos como a los desinfectantes utilizados en la industria.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos aisladas frecuentemente de leche de vaca representan un alto riesgo para la salud pública por su capacidad de producir enterotoxinas termoestables y su crecimiento en biofilm.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de genes de enterotoxinas clásicas (A, B, C, D y E) en especies de SCN aisladas a partir de IIM bovinas y evaluar su asociación con la capacidad de producción de biofilm.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a nivel de especie mediante PCR-RFLP del gen *gap*, aislamientos de *Staphylococcus* coagulasa negativos provenientes de muestras de leche bovina.

- Detectar la producción “*in vitro*” de enterotoxinas en cepas pertenecientes a diferentes especies de SCN.

- Evaluar la capacidad fenotípica de formar biofilm *in vitro* en los aislamientos bovinos de *Staphylococcus* coagulasa negativos caracterizados en el objetivo previo.

- Determinar el grado de asociación entre la capacidad de producción de enterotoxinas y el crecimiento bacteriano en biofilm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Estudio.

Correspondió a un estudio descriptivo, transversal y de carácter experimental.

Población:

Cepas de SCN pertenecientes a los grupos de investigación (UNRC, UNVM), originalmente aisladas de muestras de leche bovina de tambos pertenecientes a la cuenca lechera de Villa María, provincia de Córdoba [Dieser y col., 2014; Raspanti y col., 2016; Felipe y col., 2017].

Muestra:

Se analizó el 20% del total de cepas de campo aisladas por los dos grupos de investigación, respetando la proporción de prevalencia de cada especie obtenida en estudios previos [Raspanti y col., 2016; Felipe y col., 2017]. Fueron incluidas además las siguientes cepas de referencia:

Como controles de perfiles electroforéticos de restricción del gen *gap* cepas pertenecientes a la colección americana de cultivos, American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus chromogenes* ATCC 43764, *Staphylococcus xylosum* (ATCC 29971), *Staphylococcus haemolyticus* (ATCC 29970), *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* (ATCC 25615), *Staphylococcus simulans* (ATCC 27848), *S. cohnii* subsp. *cohnii* (ATCC 29974), y *Staphylococcus warneri* (ATCC 27836). Como controles para la detección de genes de enterotoxinas (*sea-see*) se utilizaron las siguientes cepas: para detectar genes de enterotoxina A (*sea*) y enterotoxina D (*sed*), *Staphylococcus aureus* FRI196E y para

detectar genes de enterotoxina B (*seb*), enterotocina C (*seb*) y enterotoxina E (*see*) se utilizaron las cepas de *S. aureus* Inta 07-487, Inta 05-684 y Inta 05-543 respectivamente, aisladas de leche de tanque de tambos de la cuenca central de Argentina (provincia de Santa Fé y Buenos Aires), caracterizadas a nivel de especie mediante cinco pruebas bioquímicas: test de coagulasa, catalasa, clumping factor, crecimiento en agar P, reducción de Voges-Proskauer, y mediante el test de ELISA para su capacidad de producción de enterotoxinas. Estos aislamientos fueron cedidos gentilmente por la Msc. Verónica Neder del Grupo de investigación de Salud Animal, INTA Rafaela.

Para los ensayos de producción de biofilm se utilizaron como control (+) las cepas *S. aureus* V329 y *S. xylosus* 1007. La primera fue gentilmente provista por el Dr. Iñigo Lasa (Instituto de Agrobiotecnología, Navarra, Valencia, España) y la segunda fue aislada, identificada, y caracterizada en el grupo por la Dra. Verónica Felipe (Centro de Investigación y Transferencia Villa María-CONICET). La identificación de este aislamiento fue realizada por espectrometría de masa MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight) y confirmada por secuenciación del rRNA 16S. Como control (-) se utilizó la cepa *S. epidermidis* (ATCC 12228).

Medios de cultivo:

Los medios de cultivo (Britania) se prepararon según las recomendaciones del fabricante en cada caso.

Caldo Trypticasa Soya (TSB): 30 gr/L de tripteína soya caldo.

Agar Trypticasa Soya (TSA): A la preparación anterior se adicionó agar-agar (Britania) a razón de 15 gr/L y 6 gr/L de extracto de Levadura (Britania).

BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD): 8,2 gr/L de agua

purificada estéril.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C. Reactivos, enzimas y soluciones stock.

Las drogas utilizadas fueron de grado analítico de las marcas Promega, Invitrogen y Sigma.

Extracción de ADN cromosomal:

EDTA 0,5M (pH: 8): EDTA deshidratado 186,1 gr/L, pellets de NaOH, agua destilada: El EDTA se disolvió en 800 mL de agua destilada utilizando un agitador magnético, luego se ajustó al pH deseado utilizando los pellets de hidróxidos de sodio, se ajustó a 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

Tris 1M (pH: 8): Tris base 121,1 gr/L, HCl concentrado, agua destilada. Se disolvió el Tris base en 800 mL de agua destilada y se ajustó el pH adicionando el volumen necesario de HCl concentrado, se ajustó a 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

SDS al 20%(p/v) en Tris 50mM-EDTA 20mM pH 7,8.

Cloroformo- alcohol isoamilico (49:1 v/v)

NaAc 1M

Etanol 100%

Isopropanol frio 100%

Lisozima

Buffer SET: (EDTA 25 mM, Tris 20 mM, NaCl 75 mM).

Amplificación de ADN:

La mix de reacción fue preparada a partir de los siguientes reactivos y soluciones stock, alcanzando un volumen final de 200uL.

Cebadores para la amplificación del gen *gap*:

GAP1 (5'-ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA-3') [25µM] GAP2

(5'-GACATTTTCGTTATCATACCAAGCTG-3') [25µM] Cebadores para la amplificación de las enterotoxinas [25µM] concentración final de cada uno (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados y tamaño de amplicón

Nombre	Producto	5' a 3' Secuencias de nucleótidos	Tamaño de amplicón (pb)	Referencia
sea1 sea2	Entertoxina A	TTGGAAACGGTAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	[Mello y col., 2016]
seb1 seb2	Entertoxina B	TCGCATCAAACGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	478	[Mello y col., 2016]
sec1 sec2	Entertoxina C	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	257	[Mello y col., 2016]
sed1 sed2	Entertoxina D	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317	[Mello y col., 2016]
see1 see2	Entertoxina E	TAGATAAAGTTAAAACAAGC TAACTTACCGTGGACCCTTC	170	[Leke y col., 2017]

Solución dNTPs (Desoxirribonucleico trifosfato- dATP, dCTP, dGTP, dTTP) [25mM c/u] (Promega).

Taq DNA polimerasa [5 U/µL] (Promega)

Buffer Taq Green (pH 8,5), [5X] (Promega)

MgCl₂ [25 mM] (Promega).

Agua tridestilada libre de nucleasas (Promega).

Digestión de los productos del ADN amplificado:

Buffer B [10X]: 60mM Tris-HCl (pH7,5), 500 mM NaCl, 60mM MgCl₂, 10mM MDT (Promega).

Albúmina sérica bovina [10X]: 10 mg/mL (Promega).

Enzima de restricción *A*/ul [10U/µL] (Promega).

Agua Tridestilada libre de nucleasas (Promega)

Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa:

Agarosa D1LE (Biodynamics)

Buffer TAE [50X]. Composición por 1 Lt: 242 gr Tris base, 57,1 mL Acido Glacial Acético, 100mL EDTA 0,5M pH8, agua destilada hasta llevar a volumen final.

Buffer TBE [5X]. Composición por 1 Lt: 54 gr Tris base, 27,5 gr Ácido Bórico, 20mL EDTA 0,5M pH8, agua destilada hasta llevar a volumen final.

Bromuro de Etidio 10 mg/mL (Sigma).

Marcador 1kb: concentración [0,1 ug/uL] (Promega)

Marcador 100pb: concentración [0,13 ug/uL] (Biodynamics).

Tinción de Biofilm con cristal violeta:

Solución Fisiológica (NaCl 0,9%)

Cristal Violeta (0,1%) filtrado.

Alcohol etílico 96% (Porta).

Instrumentos y descartables

Termociclador PTC-220 (MJ Reaserch inc.)

Lector de micro placas (Labsystems Multiscan), micro placas.

Erlenmeyer, tubos de ensayo con tapa, ansas en rulo, placas de Petri, gradillas para tubos de ensayo, tubos tipo kahn, gradillas para tubos tipo kahn, tubos eppendorff, gradillas para eppendorff, pipetas con tips (p10, p100, p200, p1000, p5000) Balanza electrónica, vortex, mechero de Bunsen, Densicheck, heladera con freezer, campana de flujo laminar, baño termostatzado, estufa de cultivo, microondas, autoclave.

Condiciones generales de cultivo:

Se realizaron cultivos planctónicos en tubos con 5 mL de TSB y se incubaron a 37°C por 16 hs para obtener cultivos en fase logarítmica. Para cultivos en biofilm se inoculó, a partir de un cultivo O/N, 200µL por pocillo en una placa de micro titulación y se incubaron a 37°C por 16 hs.

Conservación de las cepas:

Una suspensión de 1 o 2 colonias, aisladas en cultivo puro, se sembró en 5 mL de TSB y se incubó 16hs en estufa de cultivo hasta fase exponencial, se suplementó con glicerol estéril a una concentración del 20% para su posterior conservación en crio tubos a -80°C.

Para su posterior uso las bacterias fueron reactivadas mediante siembra en placas de TSA e incubadas en estufa a 37°C por 24 hs

Identificación a nivel de especie de SCN.

Pruebas bioquímicas confirmatorias

Una vez descongeladas las cepas, se repitieron pruebas bioquímicas realizadas en trabajos anteriores para reconfirmar su pureza.

Tinción de Gram: Permite diferenciar especies bacterianas en dos grandes grupos, sobre la base de las propiedades físicas de sus paredes celulares.

Método: Se extendió la muestra recogida en un portaobjetos, y se dejó secar al aire. Se añadió cristal violeta, se dejó durante 1 min para teñir todas las bacterias de color púrpura, se añadió lugol sobre la preparación con restos de cristal violeta, se dejó durante 1 min.,

se lavó la muestra coloreada con agua, se decoloró con etanol durante 30 s. Después se lavó de nuevo con agua para eliminar el alcohol y se tiñó con safranina durante 1min, esta tinción de contraste permite teñir las bacterias que perdieron el cristal violeta. Luego se lavó la preparación con agua y se dejó secar para finalmente observar la muestra con objetivo de inmersión. Las bacterias de color violeta fueron clasificadas como Gram (+) y las de color rosa pálido Gram (-).

Prueba de catalasa: Determina la presencia de la enzima catalasa. La cual descompone el peróxido de hidrogeno que se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azucares en agua y oxígeno. Esta enzima está ausente en el género *Streptococcus*.

Método: Con un ansa en rulo se recogió una colonia de un cultivo puro de 24 hs, se coloca sobre un portaobjetos, se agregó una gota de H₂O₂ al 30%. La formación inmediata de burbujas (liberación de O₂), se consideró como resultado positivo.

Prueba de coagulasa: Comprende la facultad de un microorganismo de coagular el plasma.

Método: Se mezcló 0,5 mL de cultivo puro con igual cantidad de plasma de conejo. Luego de un promedio de 4 hs de incubación en baño termostatzado a 37°C, la observación de coágulos o filamentos de fibrina visibles se interpretó como un resultado positivo. La coagulación puede ser completa o parcial. La prueba se consideró negativa cuando la suspensión se mantuvo homogénea en un periodo máximo de 24 hs. Siembra en BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD)

Previo a la identificación molecular, alícuotas de los congelados de las cepas de SCN fueron sembradas por estriado en el medio cromogénico selectivo y diferencial BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD), preparado y esterilizado según las indicaciones del

fabricante. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 hs, luego se realizó identificación visual siendo clasificadas las colonias de color malva o rosado como *S. aureus* y las colonias celestes, beige o blancas como *Staphylococcus spp.*

Método molecular: Identificación a nivel de especie de SCN mediante PCR-RFLP del gen *gap*.

Extracción de ADN cromosomal

La extracción de ADN se realizó según las condiciones descriptas por Pospiech y Neumann (1995) con ligeras modificaciones. A partir de un cultivo puro por siembra en agotamiento se tomaron 3-5 colonias que fueron resuspendidas en 5mL de TSB e incubadas por 24 hs a 37°C. Una alícuota de 1,5 mL de ese cultivo se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con 500 uL de buffer SET, se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 min, se descartó sobrenadante y se agregaron 300 uL de buffer SET. La suspensión se hirvió y congeló alternadamente por periodos de 5 min, repitiendo el proceso 3 veces. Se agregaron 3uL de lisozima para lograr la ruptura de la pared celular y se incubó 1 hs a 37°C. Se agregaron 30 uL de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% para realizar la desnaturalización alcalina y lisis celular, y se incubó en baño María a 55°C por 1 hs. Para precipitar el ADN cromosomal se agregaron 120 uL de acetato de sodio (NaAc) 3M y se incubó 10 min en hielo para luego centrifugarlo a 13.000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante con el ADN a un nuevo tubo al que se adicionó 400 uL de cloroformo y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 10 min para así precipitar las proteínas de la suspensión. La fase acuosa (superior) de alrededor de 500 uL se transfirió a un nuevo tubo al que se le adicionó 500 uL de isopropanol frío y se incubó por 2 hs a -20°C. Se precipitó el ADN mediante centrifugación a 12.500 rpm y 4°C por 20

min. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 300 μL de etanol (70%v/v) y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente hasta evaporar el etanol por completo. Finalmente, se resuspendió el pellet (ADN) en 40 μL de agua libre de nucleasas (Biodynamics, Argentina) y se conservó a -20°C hasta su próximo análisis.

Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Las reacciones de amplificación del genoma bacteriano por PCR fueron optimizadas a partir de las condiciones descriptas por Jayarao y col. (1992). Inicialmente se preparó una mezcla de reacción (mix) con todos los componentes, conteniendo: 5 μL de ADN molde, 10 μL de buffer Taq 5X, 1,6 μL de cada primer, 0,8 μL de la mix de dNTPs, 0,5 μL de Taq polimerasa, 6 μL de MgCl_2 y 21,5 μL de agua libre de nucleasas en un volumen final de 50 μL . Las mezclas de reacción fueron preparadas en tubos de pared delgada tipo Eppendorff de 200 μL . En todas las reacciones se realizó un control negativo, el cual consistió en colocar todos los componentes de la mix a excepción de ADN, que se reemplazó por igual volumen de agua libre de nucleasas. La amplificación consistió en un programa constituido por un paso de desnaturalización de 95°C por 90s y 40 ciclos de amplificación (desnatulización del ADN a 95°C por 20s, annealing de primers a 55°C por 30s y extensión a 72°C por 40s) y una extensión final a 72°C por 5 min. La PCR fue llevada a cabo en un equipo termociclador T100 Thermal Cycler (Biorad, Estados Unidos). La corrida electroforética de los productos amplificados de cada muestra fue llevada a cabo durante 20 min a 75V en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El peso molecular de cada producto de PCR se determinó por comparación con un marcador de peso molecular de 1kb que se sembró en el mismo gel en una cantidad de

5 μL con 1 μL de buffer muestra 10%.

Digestión enzimática de los productos obtenidos de la PCR:

Se realizó con el empleo de los siguientes componentes para cada muestra: Buffer 10X: 2 μL , Albumina (10 mg/mL): 0,3 μL , enzima de restricción *A_lu*I (10 U/ μL): 0,35 μL , agua libre de nucleasas: 7,35 μL y ADN amplificado 10 μL . Cada muestra con volumen final de 20 μL , se incubó por un periodo de 5 hs a 37°C en baño María.

Electroforesis en gel de agarosa:

Los productos que se obtuvieron luego de las reacciones de amplificación y digestión enzimática fueron corridos en geles de agarosa. Para el caso de las amplificaciones utilizamos geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X teñidos con 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio. Alícuotas de 7,5 μL de cada muestra fueron sembrados en cada calle de los geles. Se incorporó también la siembra del marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen). Para los productos de digestión enzimática con la enzima de restricción *A_lu*I se corrieron geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer TBE 1X. Se sembraron 7,5 μL de cada uno de los productos digeridos. Se comparó el peso molecular con un marcador de 100bp. Ambas corridas se realizaron a una potencia de 75V por el tiempo necesario (50-90 min). Los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV y fotografiados con una cámara Cannon de 16,0 megapíxeles adosada a una computadora donde fueron almacenadas las imágenes en forma digital.

Análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del gen *gap* amplificado por PCR:

Las imágenes de los patrones de bandas obtenidos se registraron por inspección visual guiándonos por su marcador de peso molecular y los perfiles fueron comparados con otros de referencia obtenidos por Park y col. (2011) y Yugueros y col. (2000).

Identificación por PCR de genes que codifican para enterotoxinas clásicas: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see*

Aislamiento de ADN genómico para ensayos de PCR.

La extracción del ADN genómico para amplificación por PCR de genes que codifican para las enterotoxinas clásicas se realizó siguiendo el protocolo previamente descripto.

Amplificación del ADN por PCR.

Para la amplificación por PCR de los genes en estudio se agregó 5 µl de cada ADN problema a una mezcla de reacción (mix) con los siguientes componentes: 1X de buffer Taq polimerasa, 200 µM de dNTPs, 0,8 mM de MgCl₂, 2 U Taq polimerasa, 1 µM de los primers específicos para cada enterotoxina y finalmente agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µl. Se llevó a cabo múltiple PCR para la amplificación de los genes *sea* y *seb* y los genes *sed* y *see*.

Las mezclas de reacción fueron preparadas en tubos de pared delgada tipo Eppendorff de 200 µL. En todas las reacciones se realizó un control negativo, el cual consistió en colocar todos los componentes de la mix a excepción de ADN, que se reemplazó por igual volumen de agua libre de nucleasas.

La amplificación se llevó a cabo siguiendo los parámetros descriptos

por Johnson y col (1991) y Cunha y col., (2006) con algunas modificaciones, un paso de desnaturalización de 94°C por 4 min, fue seguido por 40 ciclos de amplificación (desnatulización del ADN a 94°C por 2 min, annealing de primers a 55°C por 90 s y extensión a 72°C por 90 s) y una extensión final a 72°C por 7 min. La PCR fue llevada a cabo en un equipo termociclador T100 Thermal Cycler (Biorad, Estados Unidos).

Electroforesis en gel de agarosa.

La corrida electroforética de los productos amplificados de cada muestra se llevó a cabo en geles de agarosa 2,5% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg/mL, durante 75 min a 70V.

Los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV y fotografiados con una cámara Cannon de 16,0 megapíxeles adosada a una computadora donde fueron almacenadas las imágenes en forma digital. Los pesos moleculares de los productos de PCR se determinaron por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

Evaluación de la capacidad de formación de biofilm (Método cuantitativo):

Existen muchos métodos en la actualidad para medir esta cualidad en SCN algunos de los más utilizados son el del agar rojo Congo desarrollado por Freeman y col. (1989) y el método en tubo de Christensen y col. (1989), ambos son de interpretación subjetiva por su naturaleza cualitativa.

En este trabajo se utilizó el método de cuantificación en placa de 96 pocillos de fondo plano según Christensen y col. (1989), con ligeras modificaciones según Stepanovic y col. (2000; 2007), que refuerzan la fiabilidad de la prueba.

Para esto a partir del caldo de cada cepa se realizaron cultivos de siembra con ansa por agotamiento en superficie en TSA durante 18 hs a 37°C, para observación de desarrollo y control de pureza. A partir de este cultivo, se inocularon 2 a 3 colonias en TSB, el caldo fue incubado a 37°C por 3 a 5 horas, hasta lograr ajuste de turbidez compatible con el estándar 0,5 de Mc Farland, utilizando para medir la densidad óptica el dispositivo DensiCheck. Inmediatamente después de ajustado el inóculo se sembraron por cuadruplicado para cada aislamiento 200 µL en placas para cultivo de células de 96 pocillos con fondo plano (Greiner Bio-One, Alemania) y se incubaron por 24 hs a 37°C. A su vez se inocularon también por cuadruplicado, 200 µL de medio TSB estéril y 200 µL de las cepas de referencia con conocida capacidad de formación de biofilm descriptas más arriba en esta misma sección, como control negativo y positivo respectivamente.

Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el contenido de los pocillos y se lavaron cuidadosamente para no desprender el biofilm formado, con el mismo volumen de solución fisiológica (NaCl 0,9%) 3 veces. Se secaron las placas en estufa a 60°C por una hora para fijar el biofilm y se añadió a cada pocillo 200 µL de cristal violeta al 0,1% (p/v) filtrado, se dejó reposar durante 15 min y se descartó, se lavó 3 veces cada pocillo con agua destilada y se dejó secar la placa invertida durante 24 hs a temperatura ambiente. Se añadió a cada pocillo 200 µL de alcohol 96% y se dejó reposar por 30 min para remover el colorante adherido, transcurrido este tiempo se pasaron a una placa limpia 100 µL de contenido de cada pocillo y se determinó la DO_{570nm} en el lector de micro placas Multiscan TM FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, Estados Unidos). En caso de obtener valores superiores a uno, se realizaron diluciones al 50% con agua destilada y luego se multiplicó cada valor.

La DO de cohorte (DO_c) se definió siguiendo la metodología de Li y col. (2012) como el valor de la media de la DO del control negativo,

más tres desviaciones estándar por encima de la misma, y se clasificaron los aislamientos de la siguiente manera según se detalla en Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de la capacidad para formar biofilm según método de cultivo en placa

Consideración DO ¹	Clasificación
$DO < DO_c$	NF
$DO_c < DO < 2DO_c$	D
$2DO_c < DO < 4DO_c$	I
$DO > 4DO_c$	F

¹: Adaptado de Li y col. (2012).

DO: densidad óptica, DO_c: densidad óptica de corte, NF: no formadora, D: débil, I: intermedio, F: fuerte.

Análisis estadístico

El estudio de las diferencias entre las especies en las capacidades de formar biofilm se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) a una vía de clasificación, seguido de la prueba de comparaciones Bonferroni. Los análisis fueron realizados en el software estadístico InfoStat versión 2014 [InfoStat (2008). *InfoStat versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina].

Se describió la frecuencia de genes asociados a las principales enterotoxinas en los SCN más frecuentes para cada categoría de capacidad de formar biofilm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación bioquímica

De las 133 cepas analizadas por pruebas bioquímica tradicionales, todas mostraron el fenotipo coincidente a resultados previos, cocos Gram (+), catalasa (+) y coagulasa (-), (Figura 4).

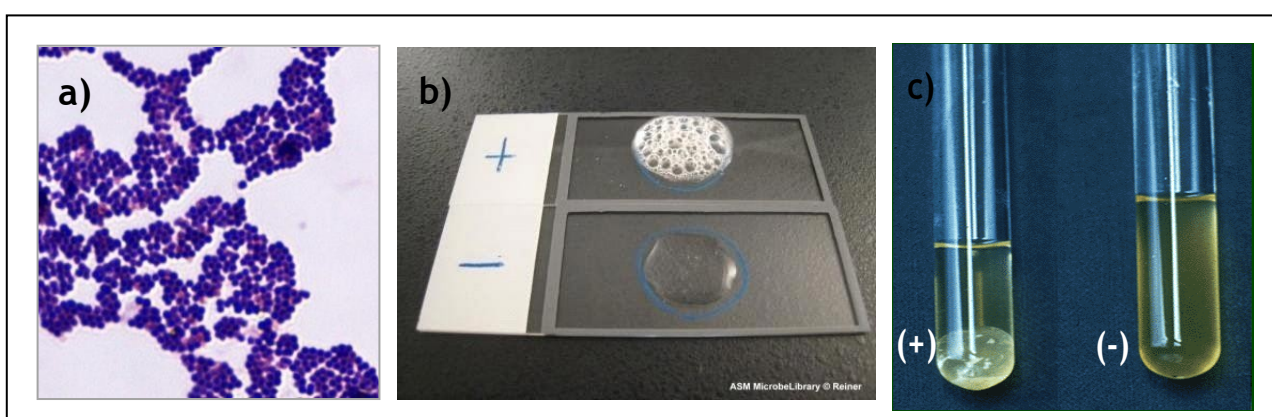


Figura 4. a) Tinción de Gram (+), b) prueba de catalasa, c) prueba de coagulasa.

Siembra en BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD)

Del total de cepas analizadas, se descartaron diez, 3 de ellas mostraron características coincidentes con *S. aureus* (colonias color malva) y otras 7 revelaron contaminación evidente (más de un color de colonia). Las 123 cepas restantes que mostraron la pureza y el color de colonia característico fueron elegidas para el posterior análisis molecular (Figura 5).

La siembra en el medio cromogénico BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD), permitió caracterizar la pureza de los aislamientos en estudio y pudo comprobarse una marcada correlación entre el color de las colonias de los cultivos puros y la especie bacteriana. *S.*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* y *S. warneri*, mostraron entre un 90-95% de

coincidencia con colonias de color naranja, celeste azuladas, blancas y blancas con halo opalescente, respectivamente.

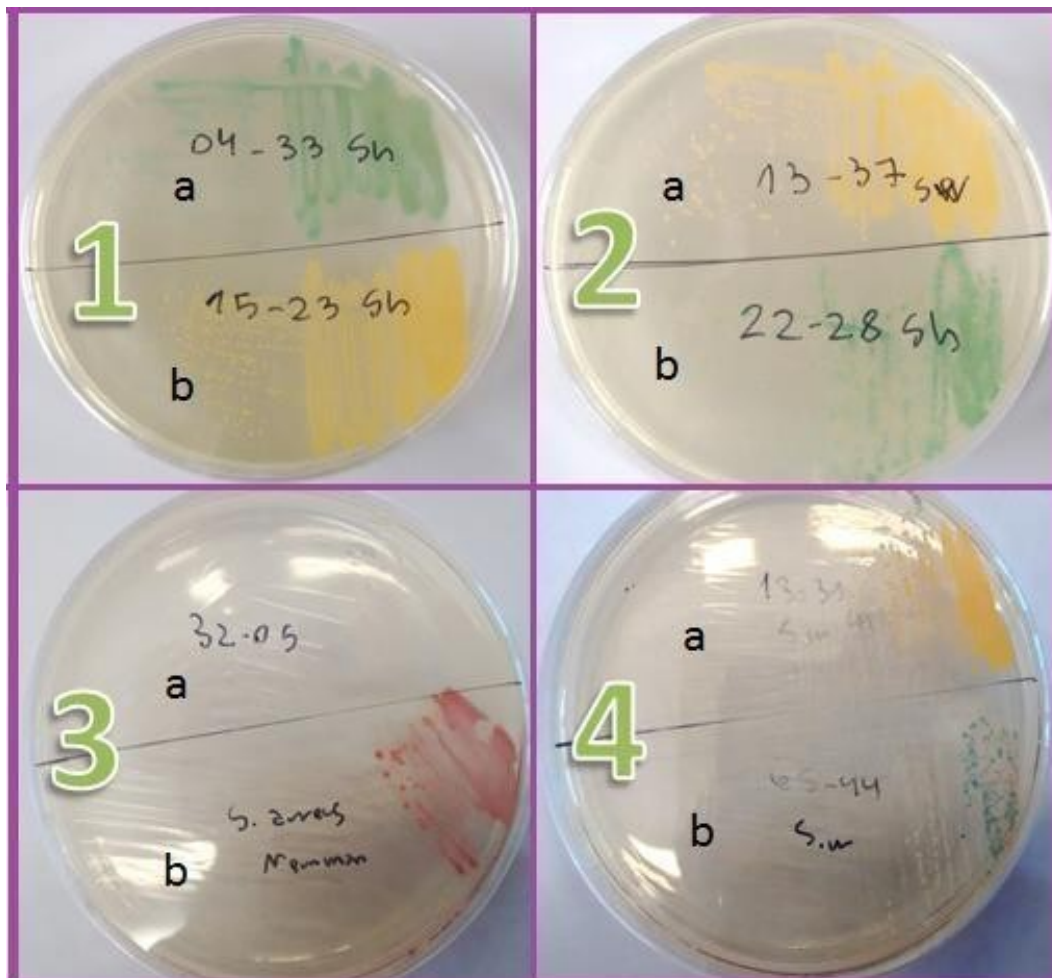


Figura 5. Cepas sembradas en medio selectivo y diferencial CHROMagar Staph aureus. 1a, 1b, 2a, 2b, 4a: Crecimiento puro de SCN colores varios, uniformes y distintos al malva 3b: Crecimiento de color malva, correspondiente a *S. aureus*, 4b: Contaminación evidente, dos morfologías de colonia y colores en el mismo estriado.

Identificación a nivel de especie de *Staphylococcus coagulasa* negativos: PCR-RFLP del gen *gap*:

Como primer paso se realizó la puesta a punto de la técnica PCR-RFLP del gen *gap* utilizando las cepas de referencia descritas en materiales y métodos. El ADN cromosomal extraído fue utilizado

como templado en la reacción de amplificación por PCR. El par de cebadores GAP1 y GAP2 permitió amplificar con éxito un fragmento de 933 pb correspondiente al gen *gap*, en las cepas de referencia. Los amplicones obtenidos para cada cepa de referencia fueron luego digeridos con la enzima de restricción *AluI* y por electroforesis en gel de agarosa al 2% se obtuvieron siete patrones distintos de fragmentos de restricción de longitud polimórfica específicos de especie (Figura 6), los cuales se correlacionaron con los obtenidos por otros autores [Yugueros y col., 2000; Park y col 2011; Hosseinzadeh y col., 2014; Srednik y col., 2015].

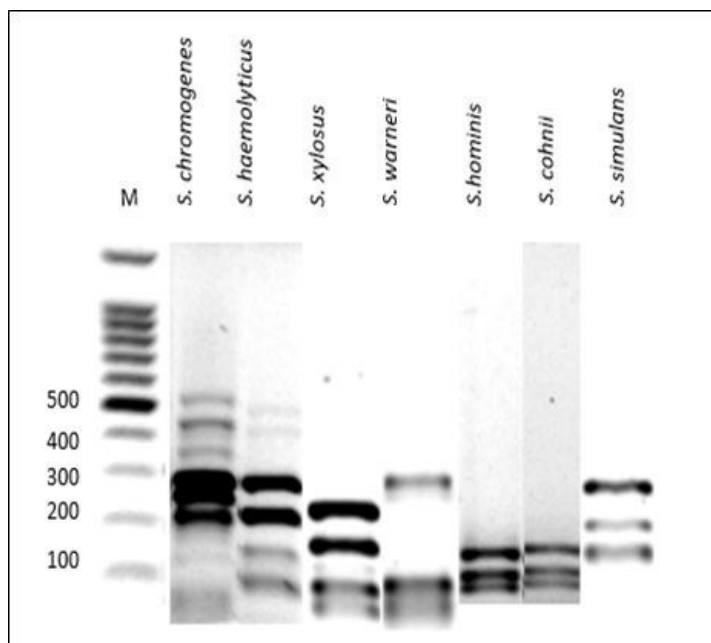


Figura 6. Patrón electroforético en gel de agarosa (2%) del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de PCR del gen *gap* a partir de las seis cepas de referencia, luego de la digestión con la enzima de restricción *AluI*. M: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 pb).

Finalizada la puesta a punto del método de identificación genotípico con las cepas de referencia se procedió a analizar los aislamientos bovinos de SCN obtenidos de leches de animales infectados. El par de cebadores GAP1 y GAP2 permitió amplificar satisfactoriamente el

fragmento esperado del gen *gap* y la digestión con la enzima de restricción *AluI* permitió identificar especie para 114 aislamientos de SCN de origen bovino, aislados como cultivo único a partir de 51 tambos de la cuenca lechera de Villa María [Dieser y col., 2014]. Nueve cepas no pudieron ser clasificadas por PCR-RFLP del gen *gap* por no presentar un patrón de bandas característico de especie de SCN (datos no mostrados).

La identificación correcta de las especies estafilocócicas es esencial para un diagnóstico preciso y un tratamiento rápido y eficaz cuando los SNC es el grupo bacteriano predominante en las granjas lecheras. Es por ello que fue necesario validar el método de identificación molecular llevado a cabo en este estudio, comparando la clasificación de especie, obtenida según el patrón electroforético de los fragmentos de restricción, de los 114 aislamientos con la obtenida por espectrometría de masas, conocida como matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Esta técnica basada en perfiles proteicos y que es considerada un método de identificación de especies de SCN fiable [Park y col., 2011; Randall et al., 2015; Pizauro y col., 2017], fue llevada a cabo en la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Buenos Aires, por gentileza de la Dra. Claudia Barberis.

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos considerando la identificación por MALDI-TOF MS como prueba definitiva de identificación de especie. Se sumó a esta tabla comparativa aquellos resultados obtenidos previamente por PCR-RFLP del gen *groEL* a partir de los mismos aislamientos [Bonetto, 2014]. Solo el 49,1% (56/114) de los resultados de identificación de especies obtenidos por PCR-RFLP del gen *groEL* coincidieron con los obtenidos por MALDI- TOF MS. La débil correspondencia entre ambos métodos puede deberse a que el método molecular de PCR-RFLP del gen *groEL* presenta la limitación de haber sido validado en comparación

solo con métodos bioquímicos de referencia [Barros y col., 2007]. Por el contrario el 93,9% (107/114) de los resultados de identificación de especies obtenidos por PCR-RFLP del gen *gap*, método validado con secuenciamiento de genes [Bergeron y col., 2011], coincidieron con los obtenidos por MALDI-TOF MS. Sólo siete cepas se identificaron erróneamente, dos cepas de *S. chromogenes* se asignaron como *S. haemolyticus*, una cepa de *S. xylosus* y dos cepas de *S. warneri* fueron asignadas como *S. chromogenes* y dos cepas de *S. haemolyticus* fueron asignadas como *S. warneri* (Tabla 3). Estos resultados permiten considerar a PCR-RFLP del gen *gap* como un método molecular confiable para la identificación de especie de los aislamientos de SCN de origen bovino.

Tabla 3. Identificación de especies por MALDI-TOF MS para 114 SCN aislados a partir de leche bovina y el número de aislamientos identificados correctamente por PCR-RFLP del gen *groEL* y del gen *gap*.

Especie	N° de cepas identificadas por MALDI-TOF MS	Correctamente identificadas por PCR-RFLP del gen <i>groEL</i>		Identificadas como		Correctamente identificadas por PCR-RFLP del gen <i>gap</i>		Identificadas como	
		SI n (%)	NO n (%)	S. <i>haemolyticus</i>	S. <i>xylosoyus</i>	S. <i>haemolyticus</i>	S. <i>xylosoyus</i>	SI n (%)	NO n (%)
<i>S. chromogenes</i>	39	25 (64,1)	14 (35,9)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. xylosoyus</i>	37 (94,9)	2 (5,1)	<i>S. haemolyticus</i>	2
				<i>S. xylosoyus</i>	<i>S. similans</i>				
				<i>S. similans</i>	<i>S. warneri</i>				
				<i>S. warneri</i>	<i>S. capitis</i>				
				<i>S. capitis</i>					
<i>S. xylosoyus</i>	37	11 (29,7)	26 (70,3)	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. haemolyticus</i>	36 (97,3)	1 (2,7)	<i>S. chromogenes</i>	1
				<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. warneri</i>				
				<i>S. warneri</i>	<i>S. epidermidis</i>				
				<i>S. epidermidis</i>	<i>S. similans</i>				
				<i>S. similans</i>	<i>S. capitis</i>				
				<i>S. capitis</i>					
<i>S. haemolyticus</i>	25	16 (64)	9 (36)	<i>S. warneri</i>	<i>S. similans</i>	23 (92)	2 (8)	<i>S. warneri</i>	2
				<i>S. warneri</i>					
				<i>S. similans</i>					
<i>S. warneri</i>	13	4 (30,8)	9 (69,2)	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. chromogenes</i>	11 (84,6)	2 (15,4)	<i>S. chromogenes</i>	2
				<i>S. chromogenes</i>	<i>S. capitis</i>				
				<i>S. capitis</i>					
TOTAL	114	56 (49,1)	58 (50,9)			107 (93,9)	7 (6,1)		

Detección por PCR de genes responsables de la producción de las enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE (sea- see)

Mediante PCR se buscó amplificar genes que codifican para cinco enterotoxinas clásicas (SEA, SEB, SEC, SED y SEE). Brevemente, a partir del ADN extraído de las cepas control y las cepas en estudio se realizó la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los fragmentos específicos para los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see*. Los cebadores específicos para amplificar dichos genes y el programa de amplificación fueron descritos en sección 2.3.2. (Tabla 1) y sección 2.7.3.2., respectivamente. La figura 7 muestra luego de la electroforesis en geles de agarosa al 2,5%, los amplicones obtenidos cuando el ADN de las cepas de referencia productoras de enterotoxinas A, B, C, D, y E fueron usados como templado para las PCR. El tamaño de los amplicones correspondientes a los genes de las diferentes enterotoxinas fueron idénticos a los tamaños predichos en las citas bibliográficas [Jonhson y col., 1991; Mello y col., 2016; Leke y col., 2017].

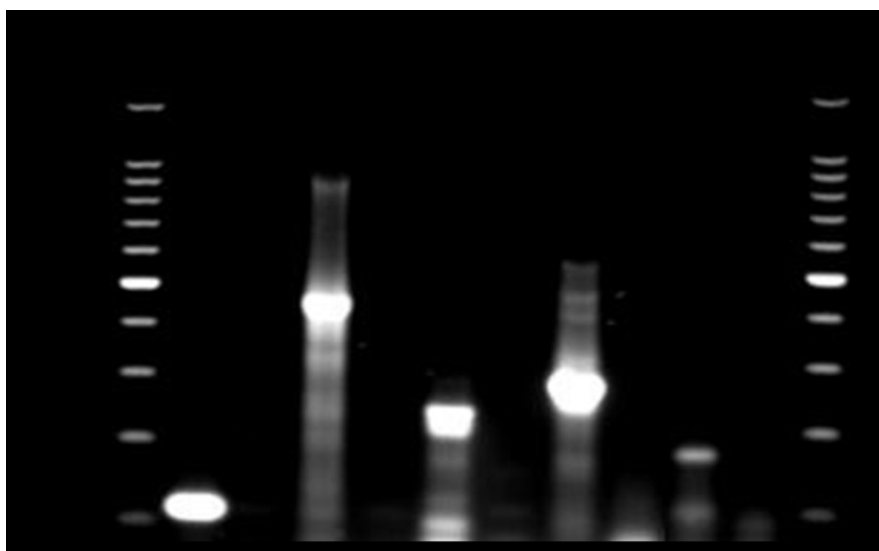


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes a los genes que codifican para SEA, SEB, SEC, SED y SEE en las cepas de referencia. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para cada mezcla de reacción.

De las 107 cepas identificadas por PCR-RFLP del gen *gap* que mostraron total coincidencia con la identificación por MALDI-TOF MS, 96 fueron analizadas para la presencia de genes de enterotoxinas clásicas. Las figuras 8-10 muestran algunos geles de agarosa al 2,5% luego de la electroforesis de los amplicones obtenidos cuando los ADN extraídos de las cepas de SCN caracterizadas, fueron usados como templado.

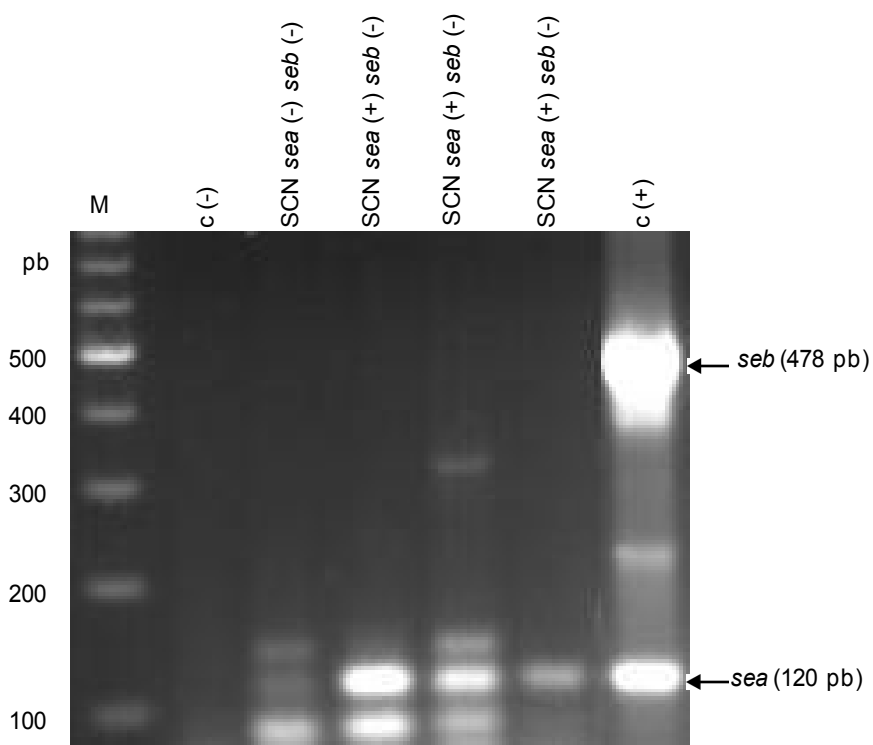


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes a los genes que codifican para SEA y SEB en cepas de SCN. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para PCR múltiple *sea* y *seb*; c (+): control (+) para PCR múltiple *sea* y *seb*

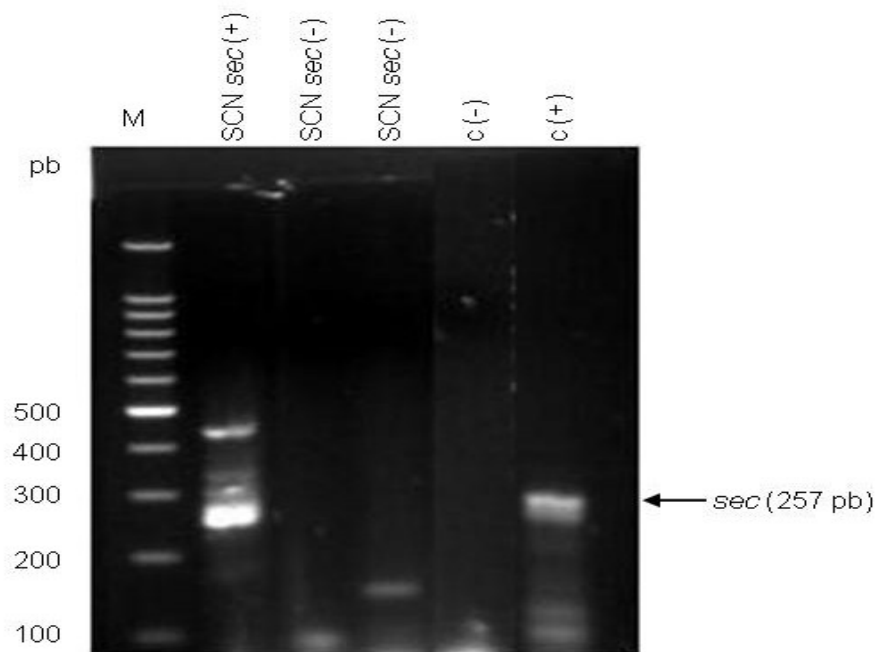


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes al gen que codifica para SEC en las cepas de SCN. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para PCR sec; c (+): control (+) para PCR sec

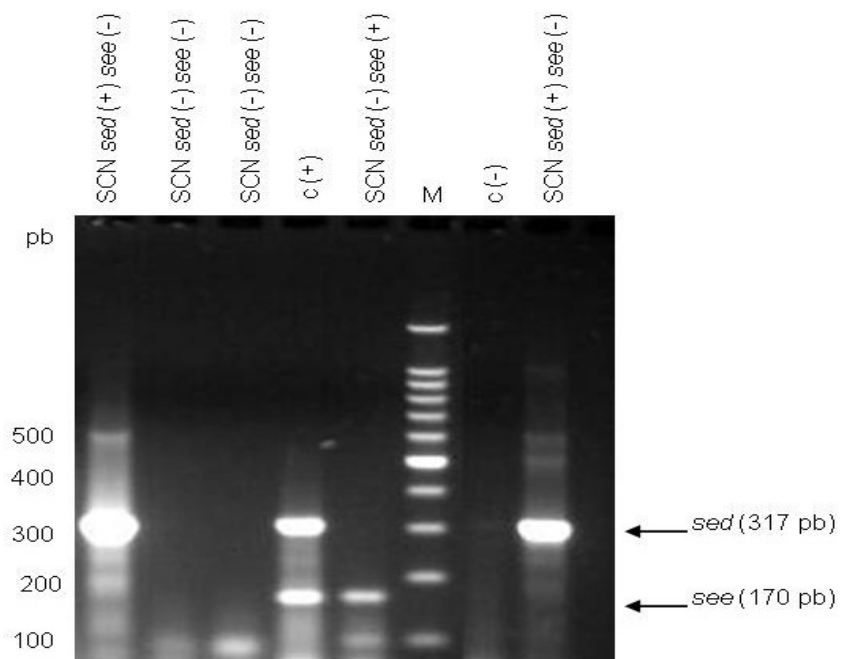


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (2,5%) de productos de PCR correspondientes a genes que codifica para SED y SEE en las cepas de SCN. M: marcador de PM (Leader 100 pb, Promega); c (-): control (-) para PCR múltiple sed y see; c (+): control (+) para PCR múltiple sed y see

Los resultados de PCR para la presencia de genes relacionados a la producción de enterotoxinas clásicas están presentados en la Tabla 4. El análisis de 96 cepas de SCN pertenecientes a las especies aisladas con mayor prevalencia de IIMs bovinas, permitió detectar la presencia de genes de enterotoxinas en 75 cepas (78,1%), de las cuales 25 llevaban más de un gen de enterotoxina (Tabla 4). Este alto porcentaje de muestras positivas para alguno de los genes en estudio coincide con lo observado mundialmente por otros investigadores en aislamientos de SCN provenientes de leche de vaca 40% [Ünal y Cinar, 2012], 58,6% [Rall y col., 2014], 66% [de Freitas Guimarães y col., 2013] y 82% [Mello y col., 2016] de oveja 62,5%, [Martins y col., 2017] y en un porcentaje menor (26,2%), pero no por ello menos importante, en leche de cabra [Rall y col., 2010].

Tabla 4. Presencia de genes de enterotoxinas clásicas en especies de SCN aislados a partir de infecciones intramamarias

Gene(s) de enterotoxinas	Especies de SCN									
	<i>S. chromogenes</i>		<i>S. xylosus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		<i>S. warneri</i>		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
<i>sea</i>	7	18,4	9	30	11	64,7	7	63,6	34	35,4
<i>seb</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>sec</i>	0	0	7	23,3	0	0	0	0	7	7,3
<i>sed</i>	9	23,7	0	0	0	0	0	0	9	9,4
<i>see</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>sea + sed</i>	5	13,2	0	0	0	0	0	0	5	5,2
<i>sea + sec</i>	0	0	6	20	0	0	2	18,2	8	8,3
<i>sec + sed</i>	8	21	0	0	0	0	2	18,2	10	10,4
<i>sed + see</i>	2	5,3	0	0	0	0	0	0	2	2,1
Positiva	31	81,6	22	73,3	11	64,7	11	100,0	75	78,1
Negativa	7	18,4	8	26,7	6	35,3	0	0	21	21,9
Total	38	100,0	30	100,0	17	100,0	11	100,0	96	100,0

Entre los genes encontrados, el gen *sea* fue el más prevalente, estando presente solo o concomitantemente con otro gen de enterotoxina en 47 cepas (48,9%). El gen *sed* presente en 26 cepas (27,1%) fue el segundo gen de toxina más encontrado, seguido de *sec* en 25 cepas (26%). Dos de estos genes *sea* y *sec* también estuvieron entre los más prevalentes 72% y 34,7%, respectivamente, en los aislamientos de SCN analizados por de Freitas Guimarães y col., (2013) y en un 50% y 13,4%, respectivamente, en el trabajo reportado por Martins y col. (2017).

La mayor prevalencia del gen *sea*, observada tanto en este estudio como en estudios llevados a cabo por otros investigadores podría ser el resultado de la fácil diseminación entre cepas de *Staphylococcus* spp de este determinante genético que es portado por un profago [Borst y Betley, 1994].

Todas las especies de SCN analizadas en este trabajo mostraron porcentajes similares y considerablemente altos de genes relacionados a enterotoxinas *S. warneri* (100,0%); *S. chromogenes* (81,6%); *S. xylosus* (73,3%) y *S. haemolyticus* (64,7%), resultados semejantes fueron informados por otros autores [de Freitas Guimarães y col., 2013; Mello y col., 2016; Martins y col 2017].

Este estudio como los que han sido reportados por otros autores han proporcionado una fuerte evidencia de la presencia de genes asociados a la producción de enterotoxinas clásicas (SEA-SEE) en las especies de SCN aisladas con mayor frecuencia de leche de diferentes mamíferos (vaca, oveja y cabra). Estos hallazgos refuerzan la importancia de estudiar el potencial toxigénico en este grupo bacteriano por su implicancia en la salud pública, dado que la termotolerancia de estas toxinas no afectaría su actividad cuando ya está presente en la leche que va a ser destinada a la elaboración de productos lácteos.

Formación de biofilm: evaluación de la capacidad fenotípica de forma cuantitativa

Se utilizó la técnica de cultivo en placa de 96 pocillos de fondo plano como se describió en materiales y métodos. Se clasificaron los aislamientos a partir de la DOc (0,026) en no formadores (NF), débiles (D), intermedios (I) y fuertes (F) según se muestra en la Tabla 5. El valor de DOc fue obtenido a partir del promedio de las mediciones del control negativo realizadas por cuadruplicado en tres ensayos, el valor obtenido fue 0,023 y a este valor se le sumo tres veces el desvío estándar que para este promedio fue 0,001. A partir de este valor de corte se establecieron los rangos para clasificar cuantitativamente la capacidad de formar biofilm (D, I, F) de las cepas pertenecientes a las distintas especies analizadas

Tabla 5. Clasificación cuantitativa de la capacidad para formar biofilm adaptada a los valores en estudio

Consideración DO ¹	Valor DO	Clasificación
DO < DOc	<0,026	NF
DOc < DO < 2DOc	0,026-0,052	D
2DOc < DO < 4DOc	0,052-0,104	I
DO > 4DOc	>0,104	F

¹: Adaptado de Li y col. (2012).

DO: densidad óptica, DOc: densidad óptica de corte, NF: no formadora, D: débil, I: intermedio, F: fuerte.

La mayoría (92,7%), 89 de los 96 aislamientos analizados, presentaron la habilidad para formar biofilm, mientras que una minoría fueron considerados aislamientos negativos para esta capacidad (7,3%), (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de la producción de biofilm entre especies de SCN.

Información	Especies de SCN				Total (%)
	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. xyloso</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. warneri</i>	
Número de aislamientos (%)	38 (39,6)	30 (31,2)	17 (17,7)	11 (11,5)	96
Biofilm, n (%)					
No Formador (A570 <0,026)	5 (13,2)	1 (3,3)	0 (0)	1 (9,1)	7 (7,3)
Débil (A570 0,026-0,052)	14 (36,8)	2 (6,7)	2 (11,8)	0 (0)	18 (18,8)
Intermedio (A570 0,052-0,104)	7 (18,4)	2 (6,7)	1 (5,9)	3 (27,3)	13 (13,5)
Fuerte (A570 >0,104)	12 (31,6)	25 (83,3)	14 (82,3)	7 (63,6)	58 (60,4)

El elevado porcentaje de cepas formadoras de biofilm hallado en este estudio coincide con los estudios de Darwish y col. (2013) en Egipto, y Srednik y col. (2017) en Argentina quienes informaron a partir de aislamientos de leches bovinas provenientes de mastitis subclínica un 94,1% y 96,7% de cepas de SCN con capacidad de formar biofilm, respectivamente,

En otros estudios se informaron porcentajes similares, aunque algo menores. Tremblay y col 2013, informaron que de 255 aislamientos de SCN obtenidos a partir de muestras de leches provenientes de tambos de Canadá, la mayoría (85.1%) de los aislados ensayados eran biofilm positivos. Da Costa Krewer y col (2015) mostró un 87% de cepas productoras de biofilm a partir de aislamientos obtenidos de vacas lactantes pertenecientes a tambos en los estados de Bahía y Pernambuco en Brasil. Algo menor fue el porcentaje informado en el trabajo de Marques y col. (2013), quienes observaron que de 145 aislamientos de SCN de muestras de leche bovina a partir de establecimientos lecheros del sur de Brasil, el 74,5% fueron formadores de biofilm.

Es interesante destacar que del total de los aislamientos positivos para la formación de biofilm descritos en este estudio, el 60,4%, (58/96), 13,5% (13/96) y 18,8% (18/96) resultaron fuertes, intermedios y débiles formadores de biofilm, respectivamente (Tabla 5). Porcentajes más bajos de cepas con fuerte habilidad para formar biofilm fueron informados en otros estudios desde 23,1% [Tremblay y col., 2013], 25,7% [da Costa Krewer y col., 2015] y 29,5% [Darwish y col., 2013] hasta 35,6% [Srednik y col., 2015].

La capacidad de formación de biofilm mostró variaciones en las distintas especies. De las cuatro especies más prevalentes, *S. xylosum* y *S. haemolyticum* resultaron los mayores productores de biofilm, con un 83,3% y 82,3% de los aislamientos fuertes formadores, mientras que solo el 31,6% de los aislamientos identificados como *S. chromogenes* presentaron esta capacidad (Tabla 6; Figura 11).

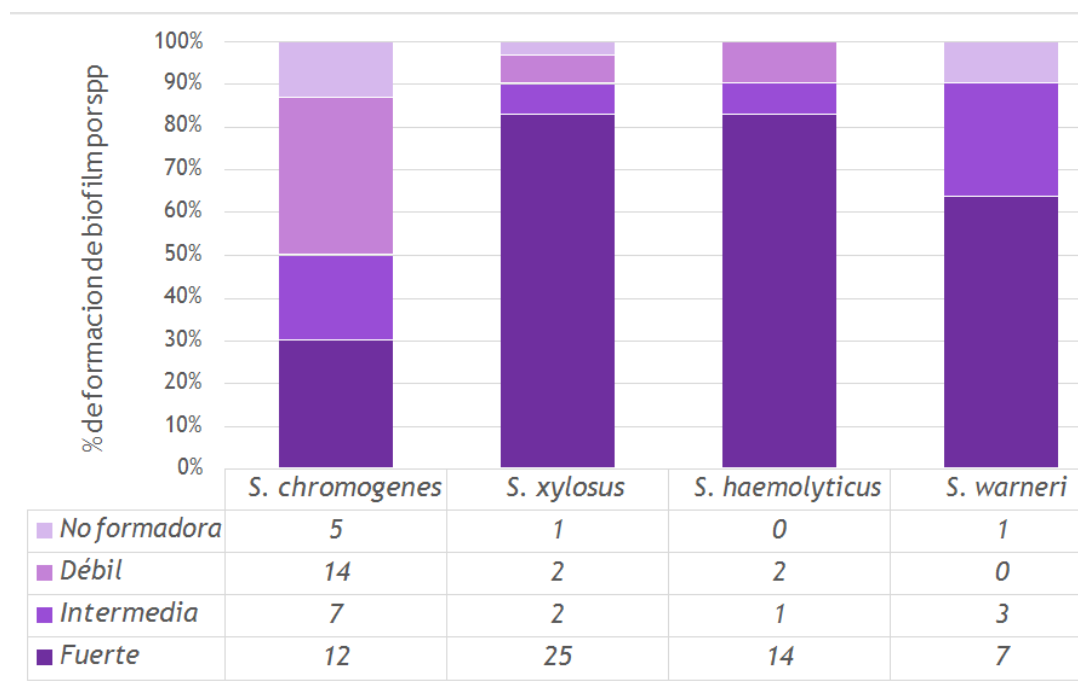


Figura 11. Porcentaje de cepas de las principales especies de SCN según la capacidad de formar biofilm

Además, los porcentajes de cepas formadoras de biofilm para las especies más prevalentes fueron muy similares, *S. chromogenes* (86,8%), *S. xyloso* (96,7%) y *S. haemolyticus* (100%), a los mostrados en el estudio de Tremblay y col., (2013), donde para las mismas especies los porcentaje fueron 84,7%, 92% y 93,3%, respectivamente.

La mayoría de las cepas de *S. xyloso* (90%; 27/30), *S. haemolyticus* (88,2%; 15/17) y *S. warneri* (90,0%; 10/11) resultaron moderados a fuertes formadores de biofilm, mientras que el 50% (19/38) de las cepas de *S. chromogenes* fueron negativas ó débiles formadoras de biofilm. Se utilizó el valor medio de todos los aislamientos de cada especie para evaluar la capacidad para formar biofilm por los SCN, donde *S. xyloso* tuvo el valor de mediana más alto para sus aislamientos y *S. haemolyticus* tuvo la segunda mediana más alta (Figura 12). Esto sugiere que tanto *S. xyloso* como *S. haemolyticus* tienen la mayor capacidad para formar biofilms. *Staphylococcus chromogenes* tuvo el valor de mediana más bajo (Figura 12), esto sugiere que *S. chromogenes* tiene la menor capacidad para formar biofilms.

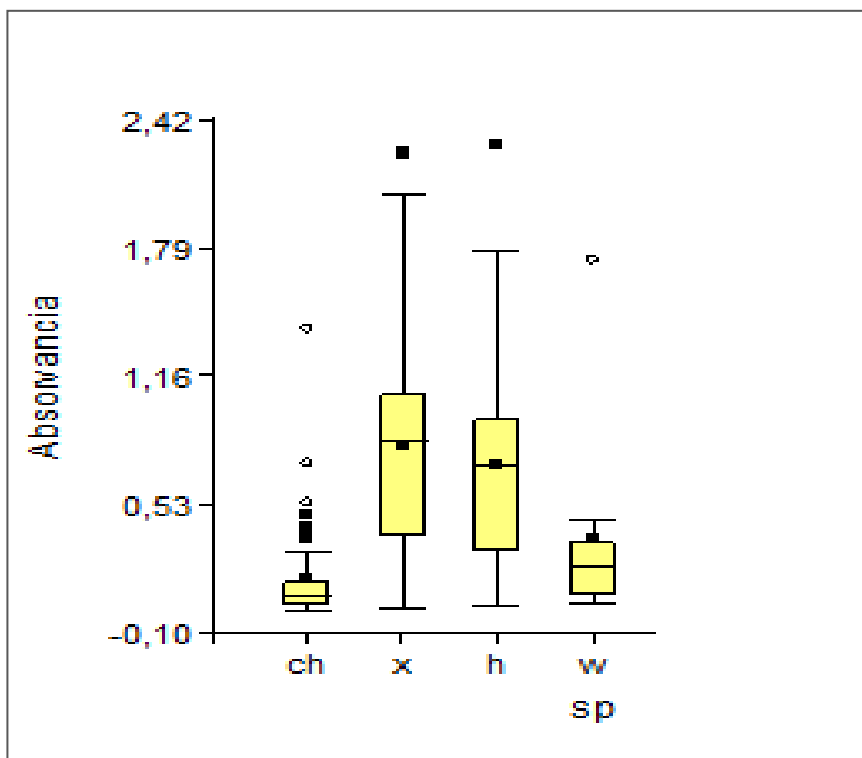


Figura 12. Fuerza del biofilm para las especies más prevalentes: **ch**: *Staphylococcus chromogenes* (n=38), **x**: *Staphylococcus xylosus* (n=30), **h**: *Staphylococcus haemolyticus* (n=17) y **w**: *S. warneri* (n=11). Los puntos fuera de las cajas se consideran valores atípicos

La presencia de cepas fuertemente productoras de biofilms también fue informada por Tremblay y col. (2013) quienes investigaron la capacidad de formar biofilm por aislamientos de SCN de origen bovino. Incluso un estudio con aislamientos de origen humano también demostró que un alto número de cepas (11/12) de *S. xylosus* fueron capaces de formar biofilm [Planchón y col. 2006]. Estos trabajos apoyan el resultado mostrado en este estudio donde *S. xylosus* tiene un fuerte potencial de formación de biofilm. Por lo tanto, al ser diferente la distribución de las especies de SCN hallada en cada estudio, probablemente influya en el porcentaje general de SCN formadores de biofilm.

El hecho de que las cepas pertenecientes a las especies de SCN aisladas con mayor frecuencia sean capaces de formar biofilm en un

porcentaje relativamente elevado, es una característica relevante considerando que esta forma de crecimiento protege a la bacteria de las altas concentraciones de antibióticos y de la fagocitosis

Es importante señalar que el alto porcentaje de cepas formadoras de biofilm, detectado en este estudio, posiblemente podría resultar importante en las especies de SCN ambientales para la supervivencia en ambientes secos y pobres en nutrientes. Además, estas cepas en los rodeos lecheros podrían desempeñar un papel en la transmisibilidad, dada la potencial formación de reservorios, por ejemplo, en cañerías de las líneas de ordeño.

Asociación entre la presencia de genes de enterotoxinas y el crecimiento bacteriano en biofilm.

Un elevado porcentaje de cepas que revelaron presencia de genes de enterotoxinas *sea* y *sec* individuales o en combinación entre ellos y con otros genes de enterotoxinas, estuvieron asociadas con una moderada y fuerte capacidad de formar biofilm: *sea* 76,5% (26/34), *sec* 100% (7/7), *sec/sed* 60% (6/10), *sea/sec* 100%. Para aquellas cepas con presencia del gen *sed* individual ó en combinación con el gen *sea*, los porcentajes asociadas con una moderada y fuerte capacidad de formar biofilm fueron del 55% y 40%, respectivamente, (Tabla 7).

Tabla 7. Presencia de genes de enterotoxinas en cepas con capacidad de formar biofilm.

Genes de enterotoxinas	<i>S. chromogenes</i> (n=38)			<i>S. xylocaus</i> (n=30)			<i>S. haemolyticus</i> (n=17)			<i>S. warneri</i> (n=11)			Total	
	Bf(-)	Bf(+)	Bf(+)	Bf(-)	Bf(+)	Bf(+)	Bf(-)	Bf(+)	Bf(+)	Bf(-)	Bf(+)	Bf(+)		
<i>sea</i>	1	5	1	0	0	0	0	2	0	0	0	2	5	34
<i>seb</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>sec</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>sed</i>	2	2	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
<i>see</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>sea/sec</i>	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>sec/sec</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8
<i>sed/sec</i>	0	3	2	3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	10
<i>see/sec</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
No detectados	0	1	4	2	1	2	2	3	0	0	1	5	0	21
Total	5	14	7	12	1	2	2	25	0	2	1	14	3	96

Bf(-): Biofilm (-), Bf(+):D: débil formadora de biofilm, Bf(+):I: intermedia formadora de biofilm, B(+):F:

En la Tabla 8 puede observarse en las cepas no formadoras de biofilm la mayor cantidad de veces 5/9 (55,5%) en que el gen *sed* pudo ser detectado en la totalidad de cepas analizadas, ya sea sólo o en combinación con otros genes. En cambio, para aquellas cepas con moderada a fuerte capacidad de formar biofilm la mayor tendencia fue para los genes de enterotoxinas *sea* 28/62 (45,2%) y *sec* 21/62 (33,9%), ya sea solos o en combinación con otros genes de enterotoxinas. Mientras que el gen *sed* sólo fue detectado en un 20,9% (13/62), para el mismo grupo de cepas.

La habilidad de producir biofilm por estos microorganismos potencialmente virulentos al igual que en otro estudio con cepas de *S. aureus* [Lee y col., 2014; Kroning, 2016], remarca el riesgo de las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* de persistir en el ambiente de procesamiento de alimentos, dado que los biofilms reducen la efectividad de los sanitizantes [Mah, 2012; Simoes, 2010].

Tabla 8. Frecuencia de la detección de genes de enterotoxinas en cepas de SCN con diferente capacidad para formar biofilm

Gen de enterotoxina	Capacidad para formar biofilm				Total
	Bf(-)	Bf(+)D	Bf(+)I	Bf(+)F	
<i>sea</i>	1	10	3	25	39
<i>seb</i>	0	0	0	0	0
<i>sec</i>	1	3	3	18	25
<i>sed</i>	5	8	3	10	26
<i>see</i>	2	0	0	0	2
Total	9	21	9	53	92

El gen *sea* (solo o asociado a otros genes) mostró una tendencia a ser más frecuentes en las categorías de capacidad de formar biofilm débil y fuerte con respecto a los no formadores de biofilm, mientras

que el gen *sec* (solo o asociado a otros genes) mostró una tendencia a ser más frecuente en la categoría de capacidad de formar biofilm fuerte con respecto a los no formadores de biofilm (sin discriminar por especie de SCN). Por otra parte en la categoría de cepas no formadoras de biofilm el gen *sed* (solo o asociado a otros genes) mostró una tendencia a ser más frecuente.

La asociación entre frecuencia de aparición de gen según la capacidad de formar biofilm por especie de SCN no pudo ser evaluada estadísticamente

Una de las mayores preocupaciones en la industria de alimentos, es garantizar la calidad microbiológica de los productos para así reducir las pérdidas por deterioro y reducir los riesgos en la salud de los consumidores [Davidson y Branen, 2005]. En este contexto, la formación de biofilms bacterianos en plantas de procesamiento, ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. Su ocurrencia en plantas de leche, está directamente relacionada a la calidad del producto crudo (leche cruda), lo cual en casos de producción aumentada, uso de equipos complejos y automatización de procesos en este tipo de industrias son la fuente principal de contaminación de la leche y productos lácteos [Bremer, 2006].

La ocurrencia de *Staphylococcus* spp. en alimentos presenta un riesgo potencial en términos de salud pública, ya que en poblaciones de alrededor de 10^5 cfu/g [Adesiyun, 1998] pueden producir enterotoxinas responsables de las intoxicaciones luego de pocas horas de la ingestión.

Fallas en el proceso de pasteurización de los materiales crudos, combinadas con falta de aplicación de las buenas prácticas de manufactura en los productos lácteos y la capacidad de formar biofilm por cepas con capacidad de producir enterotoxinas representa un riesgo para la salud del consumidor, ya que las toxinas estafilocócicas permanecen en los productos aun luego del proceso térmico [Silva, 2013].

CONCLUSIONES.

Todas las cepas analizadas por pruebas bioquímica tradicionales mostraron el fenotipo coincidente a resultados previos, cocos Gram (+), catalasa (+) y coagulasa (-). Del total de 114 cepas, se identificaron las siguientes especies por MALDI-TOF MS: *S. chromogenes* (39), *S. xylosus* (37), *S. haemolyticus* (25), y *S. warneri* (13).

En cuanto a la producción de enterotoxinas, de las 107 cepas identificadas por PCR-RFLP del gen *gap* que mostraron total coincidencia con la identificación por MALDI-TOF MS, 96 fueron analizadas para la presencia de genes de enterotoxinas clásicas; esto permitió detectar la presencia de genes de enterotoxinas en 75 cepas (78,1%), de las cuales 25 llevaban más de un gen de enterotoxina. Entre los genes encontrados, el gen *sea* fue el más prevalente, estando presente solo o concomitantemente con otro gen de enterotoxina en 47 cepas (48,9%).

Estos hallazgos refuerzan la importancia de estudiar el potencial toxigénico en este grupo bacteriano por su implicancia en la salud pública, dado que la termotolerancia de estas toxinas no afectaría su actividad cuando ya está presente en la leche que va a ser destinada a la elaboración de productos lácteos

En relación a la capacidad de producir biofilm, la mayoría (92,7%), 89 de los 96 aislamientos analizados, presentaron la habilidad para formar biofilm, mientras que una minoría fueron considerados aislamientos negativos para esta capacidad (7,3%).

La asociación entre frecuencia de aparición de gen según la capacidad de formar biofilm por especie de SCN no pudo ser evaluada estadísticamente.

El elevado porcentaje de cepas con capacidad de producir enterotoxinas entre los aislamientos de SCN provenientes de tambos de una de las principales cuencas lecheras del país sumado al crecimiento en biofilm, que favorece la permanencia de la bacteria y

su resistencia a los desinfectantes en la industria, representa un riesgo incipiente. Esta situación es una señal de alerta ya que una inadecuada manipulación de la leche cruda y las malas prácticas de ordeño en la producción primaria, así como la carencia o insuficiencia de enfriamiento de la leche cruda, podría conllevar al crecimiento microbiano en menor tiempo, poniendo en riesgo a la población que lo consume.

Los resultados obtenidos en este estudio valorizan la importancia de contar con estrictos programas de higiene que aseguren las prácticas de ordeño y la salud animal, y de este modo se ayude a preservar la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA:

- Adesiyun, A. A., Webb, L. A., & Romain, H. T. (1998). Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *Journal of Food Protection*, 61(5), 629-632.
- Almeida, R. A., & Oliver, S. P. (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 31(5), 205-212.
- Anaya-López, J. L., Contreras-Guzmán, O. E., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V. M., López-Meza, J. E., Valdez-Alarcón, J. J., & Ochoa-Zarzosa, A. (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 81(3), 358-361.
- Andresen, H. (2001). Mastitis: prevención y control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 55-64.
- Bannerman, T. L., Kleeman, K. T., & Kloos, W. E. (1993). Evaluation of the Vitek Systems gram-Positive Identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1322- 1325.
- Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J. G., & Ote, I. (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 169(1), 74-79.
- Barkema, H. W., Green, M. J., Bradley, A. J., & Zadoks, R. N. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4717-4729.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877-1895.
- Barros, E. M., Iório, N. L. P., de Freire Bastos, M. D. C., dos Santos, K.R. N., & Giambiagi-deMarval, M. (2007). Species-level

identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(3), 251-257.

-Bean N, Goulding JS, Lao C, Angulo FJ. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States (1988-1992). *MMWR CDC Surveill Summ* 1996; 45: 1-66.

-Bedidi-Madani, N., Greenland, T., & Richard, Y. (1998). Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. *Veterinary Microbiology*, 59(2), 139- 145.

-Benenson, A. Intoxicaciones alimentarias. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Decimosexta edición 1997

-Benenson, A. S. (1997). *Manual para el control de las enfermedades transmisibles* (Vol. 16). Washington^ eDC DC: OPS.

-Bennett, R. W. (2005). Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay–based methodology. *Journal of food protection*, 68(6), 1264- 1270.

-Bergdoll, M., Reiser, R., Crass, B., Robbins, R., & Davis, J. (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome Staphylococcus aureus isolates. *The Lancet*, 317(8228), 1017-1021.

-Bergdoll, M.S. Staphylococcal intoxications. En: Riemann, H., Bryan, F.L, eds. Food borne infections and intoxications. 2nd ed. New York: Academic Press 1979

-Bergeron, M., Dauwalder, O., Gouy, M., Freydiere, A. M., Bes, M., Meugnier, H., & Boisset, S. (2011). Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(3), 343-354.

-Bergeron, M., Dauwalder, O., Gouy, M., Freydiere, A. M., Bes, M., Meugnier, H., & Boisset, S. (2011). Species identification of

staphylococci by amplification and sequencing of the tuf gene compared to the gap gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(3), 343-354.

-Betley, M. J., Borst, D. W., & Regassa, L. B. (1992). Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. In *Biological Significance of Superantigens* (Vol. 55, pp. 1-35). Karger Publishers.

-Bhatia A, Zahoor S. Staphylococcus aureus enterotoxins: A review. *J Clin Diag Res* 2007; 3: 188-97.

-Biddle, M. K., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gaskins, C. T., & Evans, M. A. (2004). Effects of storage time and thawing methods on the recovery of Mycoplasma species in milk samples from cows with intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 933-936.

-Bonetto C. *Staphylococcus coagulasa negativos aislados a partir de tambos de la cuenca lechera de Villa María: prevalencia y susceptibilidad a antibióticos. Tesis de posgrado MSc. En Biotecnología.* UNRC. 2010.

-Bonetto, C. C. (2014). *Mastitis bovina causada por Staphylococcus coagulasa negativos - Tesis Doctoral.*

-Braem, G., De Vliegher, S., Supré, K., Haesebrouck, F., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2011). (GTG) 5-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. *Veterinary Microbiology*, 147(1), 67-74.

-Bremer, P. J., Fillery, S., & McQuillan, A. J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International journal of food microbiology*, 106(3), 254-262.

-Brizzio A. A. (2009) Aplicación de una PCR múltiple para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* toxigénicas. Tesis

de Maestría en Microbiología Molecular 2009. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y Universidad Nacional de San Martín.

-Buzby JC, Roberts T. Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World Health Stat Q* 1997; 50: 57-66.

-Calvinho, L. F., & Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev FAVE, Sección Ciencias Veterinarias*, 8, 1-8.

-Calvinho, L. F., Vitulich, C. A., Zurbriggen, M. A., Canavesio, V. R., & Tarabla, H. D. (1991). Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. *Therios*, 18, 188-196.

-Capurro, A., Artursson, K., Waller, K. P., Bengtsson, B., Ericsson-Unnerstad, H., & Aspán, A. (2009). Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and tuf gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134(3), 327-333.

-Chaffer, M., Leitner, G., Winkler, M., Glickman, A., Krifucks, O., Ezra, E., & Saran, A. (1999). Coagulase-negative Staphylococci and Mammary Gland Infections in Cows. *Zoonoses and Public Health*, 46(10), 707-712.

-Christensen, F. R., Kristensen, G. H., & la Cour Jansen, J. (1989). Biofilm Structure—An Important and Neglected Parameter in Waste Water Treatment. *Water Science and Technology*, 21(8- 9), 805-814.

-Christensen, G. D. (1989). Microbial and foreign body factors in the pathogenesis of medical device infections. *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, 27-59.

-Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical

- devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006.
- Coelho, S. D. M. D. O., Pereira, I. A., Soares, L. D. C., Pribul, B. R., & Souza, M. M. S. D. (2011). Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3305-3310.
- Compton, C. W. R., Heuer, C., Parker, K., & McDougall, S. (2007). Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4157-4170.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1318–1322.
- Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Sanches, I. S., & de Lencastre, H. (2001). Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3099-3103.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., & Castiglioni, B. (2007). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in applied microbiology*, 45(6), 586-591.
- Cucarella, C., Tormo, M. Á., Úbeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., & Penadés, J. R. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 72(4), 2177-2185.
- Cunha, M. D. L. R. D., Rugolo, L. M. S. D. S., & Lopes, C. A. D. M. (2006). Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(6), 661-668.
- da Costa Krewer, C., Amanso, E. S., Gouveia, G. V., de Lima Souza, R., Da Costa, M. M., & Mota, R. A. (2015). Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated

from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 47(3), 511-518.

-da Silva Santos, O. C., Barros, E. M., Brito, M. A. V. P., de Freire Bastos, M. D. C., dos Santos, K. R. N., & Giambiagi-deMarval, M. (2008). Identification of coagulase- negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the *groEL* gene. *Veterinary Microbiology*, 130(1), 134-140.

-Darwish, S. F., & Asfour, H. A. (2013). Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 2013.

-Davenport, D. S., Massanari, R. M., Pfaller, M. A., Bale, M. J., Streed, S. A., & Hierholzer Jr, W. J. (1986). Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *Journal of Infectious Diseases*, 153(2), 332-339.

-Davidson, P. M., Sofos, J. N., & Branen, A. L. (Eds.). (2005). *Antimicrobials in food*. CRC press.

-Davidson, T. J., Dohoo, I. R., Donald, A. W., Hariharan, H., & Collins, K. (1992). A cohort study of coagulase negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince Edward Island. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56(4), 275.

-de Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., de Figueiredo Pantoja, J. C., & Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of dairy science*, 96(5), 2866-2872.

-de Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., de Figueiredo Pantoja, J. C., & Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of dairy science*, 96(5), 2866-2872.

- De Vliegher, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H.W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1025–1040.
- De Vliegher, S., Laevens, H., Devriese, L. A., Opsomer, G., Leroy, J. L. M., Barkema, H. W., & de Kruif, A. (2003). Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Veterinary Microbiology*, 92(3), 245-252.
- De Vliegher, S., Opsomer, G., Vanrolleghem, A., Devriese, L. A., Sampimon, O. C., Sol, J., & de Kruif, A. (2004). In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Veterinary Microbiology*, 101(3), 215-221.
- De Vliegher, S., Zadoks, R. N., & Barkema, H. W. (2009). Heifer and CNS mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134:1-2.
- Dieser, S. A., Vissio, C., Lasagno, M. C., Bogni, C. I., & Larriestra, A. J. (2014). Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pakistan Veterinary Journal*, 34(1): 124-126.
- Dieser, S., Reinoso, E., Bello, C., Bonetto, C., Odierno, L., Bogni, C., & Raspanti, C. (2009). Genotypic and phenotypic typing methods of coagulase negative Staphylococci isolated from bovine milk. *Biocell*, 33 (2), 96.
- Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev*, 13:16–34.
- dos Santos Nascimento, J., dos Santos, K. R. N., Gentilini, E., Sordelli, D., & de Freire Bastos, M. D. C. (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 85(2), 133-144.
- Drancourt, M., & Raoult, D. (2002). *rpoB* gene sequence-based

identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1333-1338.

-Elhadidy, M., & Elsayyad, A. (2013). Uncommitted role of enterococcal surface protein, Esp, and origin of isolates on biofilm production by *Enterococcus faecalis* isolated from bovine mastitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(2), 80-84.

-El-Jakee, J. K., Aref, N. E., Gomaa, A., El-Hariri, M. D., Galal, H. M., Omar, S. A., & Samir, A. (2013). Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(2), 74-78.

-Fabres-Klein, M. H., Aguilar, A. P., Silva, M. P., Silva, D. M., & Ribon, B. (2014). Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(12), 2095.

-FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2006). Strengthening national food control systems: Guidelines to assess capacity building needs. Recuperado el 25 de julio de 2013, de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación:

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0601e/a0601e00.pdf>

-Felipe, V. (2015). “*Respuesta inmunológica e interacción microbiana en glándula mamaria bovina (bos taurus): efecto del polisacárido quitosano*” – *Tesis Doctoral*.

-Felipe, V., Morgante, C. A., Icely, P. A., Correa, S. G., & Porporatto, C. (2010). Actividad antimicrobiana de Quitosano: Efecto sobre la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales de la glándula mamaria bovina. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(1), 73.

-Felipe, V., Morgante, C. A., Somale, P. S., Varroni, F., Zingaretti, M. L., Bachetti, R. A., & Porporatto, C. (2017). Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species

isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microbial Pathogenesis*, 104, 278-286.

-Felipe, V., Somale, P., Varroni, F., Morgante, C., & Porporatto, C. (2013). Capacidad formadora de biofilm en aislamientos bovinos de *Staphylococcus aureus*. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(1), 24–25.

-Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., & Graber, H. U. (2008). Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 439- 448.

-Fox, L. K. (2009). Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134(1), 82-88.

-Fox, L. K., Kirk, J. H., & Britten, A. (2005). Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control. *Zoonoses and Public Health*, 52(4), 153-160.

-Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 872-874.

-Fueyo Mendoza, JM. Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: tipos y relaciones. 2008. Editorial Univ Oviedo <http://www.ebrary.com/lib/unsam>.

-Genigeorgis, C.A. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int J Food Microbiol* 9:327-360.

-Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Fermepin, M. R., & De Torres, R. A. (2002). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 85(8), 1913-1917.

-Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., & Götz, F. (1998). Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18586-18593.

- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., & König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1019-1025.
- Goh, S. H., Santucci, Z., Kloos, W. E., Faltyn, M., George, C. G., Driedger, D., & Hemmingsen, S. M. (1997). Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3116- 3121.
- Gonzalez, R. N., Giraudó, J. A., & Busso, J. J. (1980). Investigación de mastitis subclínicas: II Agentes etiológicos bacterianos. *Revista Medicina Veterinaria (Bs. As.)*, 61, 225-234.
- Guimarães F.F., Joaquim S.F., Manzi M.P., Silva R.C., Bruder-Nascimento A.C.M.O., Costa E.O. & Langoni H. 2016. Comparison phenotypic and genotypic identification of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(12):1160-1164
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *The Veterinary Quarterly*, 29(1), 18–31.
- Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., & Pyörälä, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 993- 1000.
- Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., & Fluit, A. C. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species- level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2286- 2290.
- Hogan, J. S., Pankey, J. W., & Smith, K. L. (1987). *Staphylococcus* species other than *Staphylococcus aureus*. In *Annual meeting- National Mastitis Council, Inc (USA)*.
- Hogeveen, H., Huijps, K., & Lam, T. J. G. M. (2011). Economic

aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1), 16–23.

-Holmberg, S.D., Blake, P.A. (1984). Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA* 251:487-489.

-Hosseinzadeh, S., & Saei, H. D. (2014). Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: emerging of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1), 27-34.

-International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF. Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration. 1982.

-International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) Microorganism in Foods 5, Microbiological Specifications of Food Pathogens. London, Blackie Academic and Professional, (1996). p. 299-333.

-Janda, J. M. (1986). Elastolytic activity among staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(6), 945-946.

-Jayarao, B. M., Dore, J. J., & Oliver, S. P. (1992). Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 2235-2240.

-Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R., & Rozee, K. R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), 426-430.

-Kaliwal, B. B., Sadashiv, S. O., Kurjogi, M. M., & Sanakal, R. D. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Veterinary World*, 4(4), 158-161.

-Kato, E., Kume, T. (1980). Enterotoxigenicity of bovine

staphylococci isolated from California mastitis test-positive milk in Japan. *JPN J Vet Res* 28:75-85.

-Keefe, G. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*.vol pag

-Kroning, I. S., Iglesias, M. A., Sehn, C. P., Gandra, T. K. V., Mata, M. M., & da Silva, W. P. (2016). Staphylococcus aureus isolated from handmade sweets: Biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food microbiology*, 58, 105-111.

-Lange, C.C., Brito, M.A., Reis, D.R., Machado, M.A., Guimarães, A.S., Azevedo, A.L., Salles, É.B., Alvim, M.C., Silva, F.S., Meurer, I.R. (2015). Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary Microbiology*, 176(3-4), 382-8.

-Larriestra, A., & Vissio, C. (2012). Mastitis: pérdidas económicas, frecuencia y variantes de la enfermedad. ¿Cuántos \$\$ se lleva la mastitis? *Producir XXI Buenos Aires*, 20(249), 28–30.

-Le Loir Y., Baron F., Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2:63–76

-Lechería Argentina, Anuario (2014),
<https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/le-cheria.pdf>

-Leigh, J. A. (2002). Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. In *Biology of the Mammary Gland* (pp. 307- 311). Springer US.

Leigh, J. A. (2002). Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. In *Biology of the Mammary Gland* (pp. 307-311). Springer US.

-Li, L., Yang, H., Liu, D., He, H., Wang, C., Zhong, J., Zeng, Y. (2012). Analysis of biofilm formation and associated gene detection in *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis. *African Journal of Biotechnology*, 11(8), 2113–2118.

-López C, Feltri A, Leotta GA, González G, Manfredi E, Gottardi G,

- Elder M, De Las Carreras S, Patri C, Guajardo F, San Martín A, Rivas M. (2008). Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Hucú, provincia de Neuquén. *Rev Argent Microbiol*, 40: 198-203.
- López Meza, J. E., Higuera Ramos, J. E., Ochoa Zarzosa, A., Chassin Noria, O., Valdez Alarcón, J. J., Bravo Patiño, A., & Baizabal Aguirre, V. M. (2006). Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Técnica Pecuaria en México*, 44(1).
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), a000398.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
- Makovec, J.A., & Ruegg, P. L. (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3466-3472.
- Mamo, W., Fröman, G., & Wadström, T. (1988). Interaction of sub-epithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 18(2), 163-176.
- Manfredi E, Leotta GA, Rivas M. (2010). PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev Argent Microbiol*, 42: 212-5.
- Marques, V.F., Souza, M., de Mendonça, E. C., Alencar, T. A. D., Pribul, B. R., Coelho, S .D. M. D. O., & Reinoso, E. B. (2013). Phenotypic and genotypic analysis of virulence in *Staphylococcus* spp. and its clonal dispersion as a contribution to the study of bovine mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(2), 161-170.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (1998). Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical*

Microbiology, 36(3), 618-623.

-Martins, R. F. S., do Prado Paim, T., de Abreu Cardoso, C., Dallago, B. S. L., de Melo, C. B., Louvandini, H., & McManus, C. (2013). Mastitis detection in sheep by infrared thermography. *Research in veterinary science*, 94(3), 722-724.

-McCormick, J. K., Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 77-104.

-McCormick, J. K., Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 77-104.

-McKenney, D., Hübner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (1998). The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infection and Immunity*, 66(10), 4711-4720.

-Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina (MAGyP, 2015). <http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss-lecheria/estadisticas/index.php>

-Mollet, C., Drancourt, M., & Raoult, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology*, 26(5), 1005-1011.

-Mossel, A.A., Moreno García, B. Struijk, C.B. (2003). Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. 2ª ed. española. Acribia., Zaragoza., 724 págs

-National Mastitis Council, 2009 <https://www.nmconline.org/>

-Nickerson, S. C., & Boddie, R. L. (1994). Effect of Naturally Occurring Coagulase- Negative Staphylococcal Infections on Experimental Challenge with Major Mastitis Pathogens¹. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2526-2536.

-Oliveira Calsolari, R. A. D., Pereira, V. C., Araujo Junior, J. P., de

Souza da Cunha, M. D., & Ribeiro, L. (2011). Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiology and Immunology*, 55(6), 394-407.

-Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., & Vilela, C. L. (2011). Invasive potential of biofilm-forming Staphylococci bovine subclinical mastitis isolates. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), 95-97.

-Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F., & Vilela, C. L. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*, 118(1), 133-140.

-Oliver, S. P. (1988). Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. *American Journal of Veterinary Research*, 49(11), 1789-1793.

-Oliver, S. P., & Jayarao, B. M. (1997). Coagulase-Negative Staphylococcal intramammary infections in cows and heifers during the nonlactating and periparturient periods. *Zoonoses and Public Health*, 44(1-10), 355-363.

-Otto, M. (2004). Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci*, 9(1), 841-863.

-Oviedo-Boyso, J., Barriga-Rivera, J. G., Valdez-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., Cáramez-Trejo, A., Cajero-Juárez, M., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2008). Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF- κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(2), 169-176.

-Paradis, M. È., Bouchard, E., Scholl, D. T., Miglior, F., & Roy, J. P. (2010). Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. *Journal of*

Dairy Science, 93(7), 2989-2997.

-Park JY, Fox LK, Seo KS, McGuire MA, Park YH, Rurangirwa FR, Sicho, WM Bohach. GA. (2011). Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology* 147, 142–148.

-Park, J. Y., Fox, L. K., Seo, K. S., McGuire, M. A., Park, Y, H., Rurangirwa, F. R., & Bohach, G. A. (2011). Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary microbiology*, 147(1), 149-154.

-Park, Y. K., Fox, L. K., Hancock, D. D., McMahan, W., & Park, Y. H. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. *Journal of Veterinary Science*, 13(1), 103-105.

-Passchyn, P., Piepers, S., & De Vliegher, S. (2011). Online mastitis survey in Flanders, Belgium: first descriptive results. In *Udder Health and Communication* (pp. 112- 112). Wageningen Academic Publishers.

-Pereyra, E. A., Dallard, B. E., & Calvino, L. F. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 363-375.

-Persson-Waller, K., Colditz, I. G., & Seow, H. F. (1997). Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Research in Veterinary Science*, 62(1), 63-66.

-Philpot, W. N., & Nickerson, S. C. (1992). *Mastitis: contra ataque, una estrategia para combatir la mastitis*. Babson Bros.

-Piepers, S., De Meulemeester, L., de Kruif, A., Opsomer, G., Barkema, H. W., & De Vliegher, S. (2007). Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows

- in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, 74(4), 478-483.
- Piepers, S., Opsomer, G., Barkema, H. W., de Kruif, A., & De Vliegher, S. (2010). Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than noninfected heifers. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 2014-2024.
- Piessens, V., Supré, K., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., De Vliegher, S., & Van Coillie, E. (2010). Validation of amplified fragment length polymorphism genotyping for species identification of bovine associated coagulase-negative staphylococci. *Journal of Microbiological Methods*, 80(3), 287-294.
- Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supré, K., Braem, G., Van Nuffel, A., & De Vliegher, S. (2011). Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2933-2944.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2433-2441.
- Pizauro, L. J., de Almeida, C. C., Soltes, G. A., Slavic, D., Rossi-Junior, O. D., de Ávila, F. A., & MacInnes, J. I. (2017). Species level identification of coagulase negative *Staphylococcus* spp. From buffalo using matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry and cydB real-time quantitative PCR. *Veterinary Microbiology*, 204, 8-14.
- Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystroń, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International journal of food microbiology*, 163(1), 34-40.
- Porporatto C, Icely P, Felipe V, Morgante C, C. S. (2011). Actividad antimicrobiana e inmunomoduladora del polisacárido Quitosano en glándula mamaria bovina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 92 (3-4).

- Porporatto, C., Bianco, I. D., & Correa, S. G. (2005). Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(1), 62–69.
- Porporatto, C., Bianco, I. D., Cabanillas, A. M., & Correa, S. G. (2004). Early events associated to the oral co-administration of type II collagen and chitosan: induction of anti-inflammatory cytokines. *International Immunology*, 16(3), 433–441.
- Porporatto, C., Bianco, I. D., Riera, C. M., & Correa, S. G. (2003). Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 266–272.
- Porporatto, C., Canali, M. M., Bianco, I. D., & Correa, S. G. (2009a). Ability of the polysaccharide chitosan to inhibit proliferation of CD4+ lymphocytes from mucosal inductive sites, in vitro and in vivo. *Cell Proliferation*, 42(6), 780–787.
- Porporatto, C., Canali, M. M., Bianco, I. D., & Correa, S. G. (2009b). The biocompatible polysaccharide chitosan enhances the oral tolerance to type II collagen. *Clinical and Experimental Immunology*, 155(1), 79–87.
- Pospiech, A., & Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*, 11(6), 217-218.
- Pyörälä, S., & Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1), 3-8.
- Qazi, S. N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C. E., Cockayne, A., Winzer, K., & Hill, P. J. (2001). *agr* Expression Precedes Escape of Internalized *Staphylococcus aureus* from the Host Endosome. *Infection and Immunity*, 69(11), 7074-7082.
- Rall, V. L. M., Sforcin, J. M., de Deus, M. F. R., de Sousa, D. C., Camargo, C. H., Godinho, N. C., & Araújo Jr, J. P. (2010). Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in

coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(9), 1121-1123.

-Rall, V. L. M., Vieira, F. P., Rall, R., Vieitis, R. L., Fernandes, A., Candeias, J. M. G., & Araujo, J. P. (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology*, 132(3), 408-413.218.

-Randall, L. P., Lemma, F., Koylass, M., Rogers, J., Ayling, R. D., Worth, D. & Muchowski, J. (2015). Evaluation of MALDI-TOF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory. *Research in Veterinary Science*, 101, 42- 49.

-Raspanti, C. G., Bonetto, C. C., Vissio, C., Pellegrino, M. S., Reinoso, E. B., Dieser, S. A., & 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. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1), 50-56.

-Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, 30(1), 23–32.

-Rivero, R., Zulbey, Ch., Farias Reyes, J., & Santoro, R. (1994). Aislamiento de gram negativos en leches crudas con antibióticos. *Revista Científica*, 4(1).

-Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., & Mack, D. (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 28(9), 1711– 1720.

-Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J. L., & Cullor, J. S. (2002). Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *Journal of Dairy Science*, 85(1), 132- 138.

- Saa, E., & Kruze, J. (1994). Virulence factors of coagulase-negative *Staphylococcus* of human and bovine origin. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 37(3), 201-208.
- Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., De Vieghe, S., Supre, K., Haesebrouck, F., Barkema, H. W., Lam, T. G. (2009). Performance of API Staph ID 32 and *Staph- zym* for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk sample. *Veterinary Microbiology*, 136, 300–305.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome biology*, 4(6), 219.
- Scheifele, D. W., Bjornson, G. L., Dyer, R. A., & Dimmick, J. E. (1987). Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*, 55(9), 2268-2273.
- Schukken, Y. H., González, R. N., Tikofsky, L. L., Schulte, H. F., Santisteban, C. G., Welcome, F. L., & Zadoks, R. N. (2009). CNS mastitis: Nothing to worry about?. *Veterinary Microbiology*, 134(1), 9-14.
- Shriver-Lake, L. C., Shubin, Y. S., & Ligler, F. S. (2003). Detection of staphylococcal enterotoxin B in spiked food samples. *Journal of food protection*, 66(10), 1851-1856.
- Simões, M., Simoes, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
- Mello, P. L., Pinheiro, L., de Almeida Martins, L., Brito, M. A. V. P., & de Souza, M. D. L. R. (2017). β -Lactam resistance and vancomycin heteroresistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 573-583.
- Smith, D. M., Simon, J. K., & Baker, J. R. (2013). Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews. Immunology*, 13(8), 592–605.
- Smith, K. L., & Hogan, J. S. (1993). Environmental mastitis.

Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 9(3), 489-498.

-Smith, K. L., Todhunter, D. A., & Schoenberger, P. S. (1985). Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention1, 2. *Journal of Dairy Science*, 68(6), 1531-1553.

-Smith, L. D. (1957). Clostridial diseases of animals. *Adv Vet Sci*, 3, 465-524.

-Somale, P., Felipe, V., Varroni, F., Morgante, C., & Porporatto, C. (2013). Formación de biofilm por *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina. *Revista Argentina de Producción Animal*, 33(1), 17–43.

-Srednik, M. E., Tremblay, Y. D., Labrie, J., Archambault, M., Jacques, M., Fernández Cirelli, A., & Gentilini, E. R. (2017). Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase- negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*, 364(8).

-Srednik, M.E., Grieben, M.A., Bentancor, A., Gentilini, E.R. (2015). Molecular identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and detection of β -lactam resistance. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9, 1022-1027.

-Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.

-Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., BONAVENTURA, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.

-Subsecretaría de Lechería de la Nación Argentina. (2012). *Estadísticas 2012*. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-la_lecheria_argentina_estado_actual_y_su_evolucion.pdf

- Supré, K., De Vliegher, S., Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., Vanechoutte, M., Baele, M., & Haesebrouck, F. (2009). Use of transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative *Staphylococcus* species originating from bovine milk and teat apices. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3204-3210.
- Supré, K., Haesebrouck, F., Zadoks, N., Vanechoutte, M., piepers, S., & De Vliegher, S. (2011). Some coagulase negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*. 94: 2329-2340.
- Taponen, S. (2008). *Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. Tesis Doctoral.*
- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134(1), 29-36.
- Taponen, S., Koort, J., Björkroth, J., Saloniemi, H., & Pyörälä, S. (2007). Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3301-3307.
- 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. *Veterinary Microbiology*, 115(1), 199-207.
- Tenhagen, B. A., Köster, G., Wallmann, J., & Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2542-2551.
- Thorberg, B. M., Danielsson-Tham, M. L., Emanuelson, U., & Waller, K. P. (2009). Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*,

92(10), 4962-4970.

-Timms, L. L., & Schultz, L. H. (1987). Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections¹. *Journal of Dairy Science*, 70(12), 2648-2657.

-Tomazi, T., Gonçalves, J. L., Barreiro, J. R., Arcari, M. A., & Dos Santos, M. V. (2015). Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3071-3078.

-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? *Microbiology*, 151(7), 2465–2475.

-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. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 234-246.

-Türkyilmaz, S., & Kaya, O. (2006). Determination of some virulence factors in *Staphylococcus* spp. isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(1), 127-132.

-Ünal, N., & Çınar, O. D. (2012). Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantón–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical animal health and production*, 44(2), 369-375.

-Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penadés, J.R., & Lasa, I. (2012). Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002843.

-Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2014). Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus*

species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science*, 1–19.

-Vissio, C., Agüero, D. A., Raspanti, C. G., Odierno, L. M., & Larriestra, A. J. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), 7-14.

-Waller, K. P., Aspán, A., Nyman, A., Persson, Y., & Andersson, U. G. (2011). CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 152(1), 112-116.

-Watts, J. L., & Owens, W. E. (1987). Synergistic hemolysis associated with coagulase- negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(11), 2037-2039.

-Watts, J. L., & Owens, W. E. (1989). Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. *Research in Veterinary Science*, 46(1), 1-4.

-Wellenberg, G. J., Van der Poel, W. H. M., & Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 27-45.

-Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal*, 192(2), 148–52.

-Yugueros, J., Temprano, A., Berzal, B., Sánchez, M., Hernanz, C. Luengo, J. M., & Naharro, G. (2000). Glyceraldehyde-3- Phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4351-4355.

-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. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3693- 3695.

- Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Wellenberg, G. J., Gröhn, Y. T., & Schukken, Y. H. (2001). Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, *84*(12), 2649-2663.
- Zadoks, R. N., Van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Van Belkum, A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(11), 3894-3902.
- Zecconi, A., Binda, E., Borromeo, V., & Piccinini, R. (2005). Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. *Journal of Dairy Research*, *72*(2), 203-208.
- Zecconi, A., Calvino, L. F., & Fox, L. K. (2006). Intramammary infections. *Bulletin of the International Dairy Federation*, *408*, 1– 36.
- Zhang, S., & Maddox, C. W. (2000). Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infection and Immunity*, *68*(3), 1102-1108.
- Zuniga, E., Melville, P. A., Saldenberg, A. B., Laes, M. A., Gonsales, F. F., Salaberry, S. R., & Benites, N. R. (2015). Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microbial Pathogenesis*, *89*, 1-6.