

EXPRESIÓN DE POTENCIALES FACTORES DE VIRULENCIA
DE *Staphylococcus aureus* ASOCIADOS A MASTITIS
BOVINA SUBCLÍNICA

MAGALÍ FERNÁNDEZ TRINIDAD

Orientador: Dr. Pablo Zunino

Co-orientador: Dra. Rosario de los Santos

**Departamento de Microbiología, Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, Facultad de Ciencias

Licenciatura en Ciencias Biológicas, orientación

Microbiología

Tesis de grado

Montevideo, Uruguay

2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi reconocimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han colaborado en la concreción de esta tesis y de manera especial a:

Dr. Pablo Zunino por darme la oportunidad de realizar mi trabajo en el Instituto Clemente Estable, por su presencia permanente ofreciéndome sin reparos todos sus conocimientos, por su estímulo constante y su infinita paciencia.

Dra. Rosario de los Santos no solo por su generosidad a la hora de aportar sus conocimientos y experiencia, que sin duda han enriquecido y facilitado mi trabajo, sino también agradezco la forma gentil y amistosa en que lo ha hecho.

A mis docentes de Facultad de Ciencias por la formación que me han dado, sin la cual no hubiese podido enfrentar esta tarea.

A todos mis compañeros del Instituto Clemente Estable por su ayuda.

Al Laboratorio de Bacteriología del Hospital Militar por la colaboración prestada.

A mis compañeros y amigos por apoyarme.

A mi familia porque siempre están conmigo.

A Mariel, por supuesto.

El trabajo de campo se realizó en el contexto de la Tesis de Maestría de la Dra. Rosario de los Santos (Facultad de Veterinaria, UDELAR).

El análisis bacteriológico se llevó a cabo en el marco de los trabajos de colaboración entre el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria y el Departamento de Microbiología del IIBCE.

Parte de los resultados del presente estudio se presentaron en las siguientes reuniones científicas:

26° Congreso Brasileño de Microbiología organizado por la Sociedad Brasileira de Microbiología (SBM), 2 al 6 de octubre de 2011, Foz do Iguacu, Paraná:

“Caracterización de cepas de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina”, Fernández, M., de los Santos, R., Zunino, P.

7° Jornadas Técnicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, UdelaR, 7 y 8 de noviembre de 2011, Montevideo, Uruguay:

“Susceptibilidad a los antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche de vacas con mastitis subclínica” de los Santos, R., Fernández, M., Carro, S., De Torres, E., Zunino, P.

Tabla de contenido

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
El sector lechero en Uruguay	9
Mastitis bovina	10
Mastitis clínicas y subclínicas	12
Impacto económico de la mastitis	16
Etiología de la mastitis bovina	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	22
Resistencia a antimicrobianos	29
Hipótesis	30
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Aislamiento bacteriano	32
Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Prueba de la catalasa	34
Prueba de la oxidasa	34
Prueba de la coagulasa en tubo	35
Prueba de Voges Proskauer	35
Evaluación de la habilidad para crecer en medio con alta concentración salina y capacidad de fermentar manitol	36
Producción de hemólisis	37
Test de producción de DNasa	37
Presencia de cápsula	37
Producción de limo	38
Formación de biofilms	38
Ensayo de autoagregación	39

Ensayo de hemaglutinación	40
Patrones de susceptibilidad antimicrobiana	41
Tests estadísticos	42
RESULTADOS	43
Identificación de <i>S. aureus</i>	43
Observación microscópica y tinción de Gram	43
Prueba de producción de catalasa	43
Prueba de la oxidasa	44
Prueba de la coagulasa en tubo	44
Prueba de Voges Proskauer para revelación de productos de fermentación de la glucosa	45
Crecimiento en medio con alta concentración salina y fermentación del manitol	45
Hemólisis	46
Test de producción de DNAsa	46
Selección final de cepas para ensayos posteriores	47
Caracterización de potenciales factores de virulencia para las cepas identificadas como <i>S. aureus</i>	48
Producción de cápsula	48
Producción de limo	48
Ensayo de formación de biofilms	49
Ensayo de agregación celular	52
Ensayo de hemaglutinación	56
Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos	58
DISCUSIÓN	61
Aislamiento e identificación	63
Factores de virulencia	65
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos	72

CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXO 1	87
Procedencia, identificación y caracterización de los aislamientos bacterianos procedentes de leche mastítica	87
ANEXO 2	89
Medios de cultivo empleados en el presente estudio	89

Lista de Tablas y Figuras

Figura 1: Desarrollo de la prueba del CMT	14
Tabla 1: Relación entre el RCS y el resultado del CMT	15
Tabla 2: Clasificación de las cepas identificadas como <i>S. aureus</i> , según su capacidad de formación de biofilms	50
Figura 2: Formación de biofilm	51
Figura 3: Agregación celular	53
Tabla 3. Resultados de la evaluación estadística mediante test de Kruskal Wallis de los ensayos de formación de biofilms y agregación celular	55
Tabla 4: Resultados del ensayo de aglutinación de eritrocitos	57
Tabla 5: Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de uso común en la clínica veterinaria	59

Resumen

El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis subclínicas obtenidos de muestras de leche de vacas en ordeño pertenecientes a dos tambos de la zona sur de nuestro país con valores de California Mastitis Test de trazas, 1, 2 y 3. Las pruebas utilizadas para la identificación de *S. aureus* incluyeron catalasa, oxidasa, coagulasa en tubo y Voges Proskauer. Para la caracterización de los aislamientos se realizaron diferentes pruebas fenotípicas que permitieron inferir la capacidad de expresar diversos factores de virulencia potencialmente relacionados con la patogenia de la mastitis subclínica. Asimismo, se evaluó la sensibilidad bacteriana frente varios antimicrobianos de uso común en la clínica.

De un total de 508 muestras de leche, se obtuvieron 20 aislamientos que fueron identificados como *S. aureus*. Todos exhibieron cápsula, produjeron limo, fueron capaces de autoagregar y formaron biofilms. Estos factores de virulencia se relacionarían con la persistencia de la bacteria en la glándula mamaria y la cronicidad de la enfermedad. Asimismo, contribuyen a la persistencia del microorganismo en los equipos e instalaciones del establecimiento.

El porcentaje de *S. aureus* resistentes a los antimicrobianos fue bajo, no encontrándose en este trabajo ninguna cepa multirresistente. Este resultado podría indicar un buen manejo de la terapia antimicrobiana en los tambos estudiados.

Nuestros resultados sugieren la expresión de distintos factores de virulencia vinculados a la persistencia y la cronicidad, los que pueden resultar importantes en la patogénesis de la mastitis bovina subclínica causada por *S. aureus*. El estudio de estos factores podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para el control de esta enfermedad.

Palabras clave: mastitis bovina subclínica, *S. aureus*, factores de virulencia

Introducción

El sector lechero en Uruguay

Uruguay constituye un ejemplo dentro de América, tanto por el elevado consumo de lácteos de su población como por la amplia oferta de diversos productos que posee (Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Estadísticas Agropecuarias (DIEA), 2010). En el Reporte Lácteo que realiza el Instituto Nacional de la Leche (Uruguay, Instituto Nacional de la Leche (INALE), 2012), se informó por un lado que Uruguay es el segundo país con mayor crecimiento en el sector lechero y además, el que tiene el mayor consumo per cápita de lácteos de América del Sur. Según las estadísticas de 2009 del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay contaba con 4507 productores lecheros con fines comerciales y 800 mil hectáreas y casi 400 mil vacas en ordeño destinadas a tal fin (Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Estadísticas Agropecuarias (DIEA), 2010).

A partir de 1980, se logró que la producción de litros de leche por animal se incrementara dramáticamente para satisfacer las demandas del comercio que hoy alcanza más de 1766 millones de litros por año (Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Estadísticas Agropecuarias (DIEA), 2010).

Es importante destacar que en la misma medida en que se desarrolla la ganadería y se obtienen rodeos de mayor potencial genético

y especialización productiva, también se incrementan los riesgos de aparición de alteraciones en la composición de la leche, asociadas a ciertas enfermedades de la producción, pues se aumentan las exigencias ambientales, nutricionales y de manejo (Montero, 2001).

Las enfermedades contagiosas representan un profundo impacto para la salud, el bienestar y la productividad animal a nivel nacional y mundial. La mastitis bovina es la enfermedad contagiosa más común que afecta directamente la salud de la ubre provocando elevadas pérdidas económicas (Barkema et al., 2009).

Mastitis bovina

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria. Puede ser causada por agentes infecciosos y sus toxinas, traumas físicos o irritantes químicos. Es casi siempre causada por microorganismos, usualmente bacterias (Jones y Bailey, 2009). La mastitis se caracteriza por un aumento en el número de células somáticas (RCS) en la leche que se acompaña con cambios físicos, químicos, y microbiológicos en la misma y cambios patológicos en los tejidos mamarios (Giannechini et al., 2002). En la mastitis bacteriana, la inflamación se produce luego de que el microorganismo logra acceder a la glándula a través del canal del pezón, el cual es considerado la primera línea de defensa contra patógenos invasores. Los músculos del esfínter del pezón mantienen el orificio cerrado entre ordeñes previniendo la penetración de agentes

microbianos. La bacteria debe ser capaz de evadir estos obstáculos anatómicos para colonizar la glándula; otro de ellos, es la queratina que provee una barrera física y química natural dificulta la penetración de las bacterias (Zhao y Lacasse, 2008). De hecho su remoción se ha correlacionado con un incremento de la susceptibilidad a la invasión y colonización bacterianas (Sordillo et al., 1997). Asimismo los microorganismos deben resistir el efecto de "arrastre" originado durante el ordeño dos veces al día (Lindahl et al., 1990). Superadas las defensas anatómicas de la ubre, son los mecanismos de defensa humorales y celulares de la glándula mamaria los que protegen al huésped (Zhao y Lacasse, 2008). Durante la primera etapa de la respuesta inflamatoria gran número de leucocitos polimorfonucleares (PMN) acceden al tejido mamario y difunden hacia la leche incrementando el RCS en la misma (Harmon, 1994).

El aumento de la permeabilidad en la barrera endotelio capilar-epitelio mamario durante las primeras etapas de la inflamación provoca la afluencia anormal de diversos constituyentes del plasma sanguíneo como el plasminógeno (precursor de plasmina) y numerosas enzimas hacia la leche. Algunas de estas enzimas, además de alterar la composición láctea, degradan los componentes del tejido mamario. Las células epiteliales mamarias también pueden activar el pasaje de plasminógeno a plasmina, hecho que se relaciona con la involución gradual del tejido, su fibrosis y afuncionalidad (Burvenich et al., 2004; Zhao y Lacasse, 2008). En general, el RCS en leche permanece elevado durante las infecciones bacterianas persistentes. Las toxinas producidas por las bacterias o los

mediadores de la inflamación dañan el parénquima resultando en una reducción de la producción láctea. Los cambios en la permeabilidad de los vasos sanguíneos y el epitelio mamario incrementan el intercambio entre el fluido extracelular y la leche, alterando su composición. En algunos casos pueden llegar a apreciarse cambios visibles en la leche (grumos, apariencia acuosa, color amarillento y en ocasiones sangre) y en la ubre como resultado de la inflamación. El daño del epitelio mamario y la posible obstrucción de los ductos (debido a la formación de coágulos de sangre y la agregación de los leucocitos) pueden impedir la correcta circulación de la leche desde el acino, llegando incluso a la pérdida total de la funcionalidad del tejido (Harmon, 1994).

Mastitis clínicas y subclínicas

De acuerdo a la presencia de síntomas visibles, las mastitis se pueden clasificar en mastitis subclínicas y clínicas. Las mastitis subclínicas son aquellas en las que no ocurren cambios visibles en la apariencia de la leche o la ubre, pero la producción de leche decrece, las bacterias están presentes en la secreción y la composición está alterada (Harmon, 1994; Jones y Bailey, 2009). A pesar de no existir cambios visibles en el animal, este tipo de inflamación puede ser detectada a través de pruebas de campo y de laboratorio.

En las mastitis clínicas la enfermedad se manifiesta con síntomas claros asociados a la inflamación de la ubre (dolor, enrojecimiento,

hinchazón, elevada temperatura, tumefacción) y la alteración macroscópica de la leche (presencia de grumos, apariencia acuosa, color amarillento y en ocasiones sangre). Al igual que en las mastitis subclínicas los patógenos están presentes en la leche, el RCS es elevado, y la composición de la misma está alterada. Tanto las mastitis clínicas como subclínicas reducen la producción de leche (Wolter et al., 2002). La reducción en la producción de leche atribuida a mastitis subclínica podría representar entre un 70 - 80% del total de las pérdidas asociadas a la enfermedad (Giannechini et al., 2002).

La llegada de PMN al cuarto mamario infectado (cada una unidades anatómicas y funcionales que componen la glándula mamaria bovina) provoca un incremento en el número de células somáticas en leche. El recuento de las células somáticas o una estimación indirecta del mismo es a menudo utilizado para diferenciar los cuartos mamaros infectados de los no infectados (Harmon, 1994) ya que existe una correlación positiva entre el número de células somáticas presentes en la leche, la respuesta inflamatoria y la ocurrencia de una infección (Schukken et al., 2003).

El California Mastitis Test (CMT) es una técnica rápida y confiable que permite obtener una medida cualitativa del RCS presentes en leche y puede ser usado fácilmente en el tambo al pie de la vaca con el fin de detectar mastitis subclínicas (Dingwell et al., 2003). El test se aplica para muestras de cada una de los cuartos mamaros, determinando la presencia de mastitis subclínicas (Figura 1).



Figura 1: Desarrollo de la prueba del CMT. La figura muestra los diferentes pasos a seguir para la realización del test. En la imagen puede apreciarse la paleta plástica utilizada para la realización del test con cada pocillo rotulado correspondiente a cada cuarto mamario del animal. Tomado de <http://www.infovets.com/demo/demo/dairy/d100.htm>

El reactivo del CMT está compuesto por un detergente y el indicador de pH púrpura de bromocresol (Pyörälä, 2003). El detergente desorganiza las membranas celulares de los leucocitos y en consecuencia el ADN celular es liberado del núcleo y junto con agentes proteicos de la leche gelifica (Mellenberger, 2001). Cuanto mayor el número de leucocitos en la leche, más intensa es la formación del gel. La Tabla 1 muestra cómo el RCS en leche influye sobre la apariencia del resultado de

este test y afecta el valor de CMT. El color púrpura intenso indica un pH básico lo que refleja una composición anormal de la leche (Robert T. Marshall and J. E. Edmondson, 1993)

Tabla 1: Relación entre el RCS y el resultado del CMT (*)

Valor de CMT	Apariencia del test	Rango de células somáticas (cél./mL)
Negativo (N)	Mezcla líquida	0 - 200.000
Trazas (T)	Leve espesamiento de la mezcla que tiende a desaparecer al rotar la paleta	200.000 - 400.000
1 (Positivo débil)	Se observa un espesamiento persistente en la mezcla	400.000 - 1.200.000
2 (Positivo)	Leve gelificación	1.200.000 - 5.000.000
3 (Fuertemente positivo)	Fuerte gelificación que tiende a unirse a la paleta	Más de 5.000.000

*<http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/CMT-Paddle1.pdf>

Diferentes prácticas de manejo del tambo como el tratamiento en período seco de las vacas, técnicas de ordeño, desinfección postordeño del pezón y tratamiento antibiótico de vacas con mastitis clínicas, han demostrado ser factores importantes en el RCS en el tanque. Asimismo, la higiene del tambo y las buenas prácticas implementadas durante la rutina de ordeño, son de fundamental importancia sobre todo para mantener RCS más bajos (Barkema et al., 1998, Barkema et al., 1999).

Impacto económico de la mastitis

El impacto económico de la mastitis se debe principalmente a las pérdidas en la producción que se asocian a la disminución del volumen de leche producida, la pérdida de la calidad de la misma y de los productos de ella derivados, así como los gastos devenidos del control de la enfermedad (honorarios de profesionales y quimioterápicos entre otros) y las horas hombre empleadas para ello (Seegers et al., 2003; Halasa et al., 2007).

Gran parte de las pérdidas asociadas a mastitis se deben a los efectos negativos en la producción y a menudo son bastante difíciles de valorar (Seegers et al., 2003). Generan una disminución en los ingresos, no solo la reducción sustancial en la producción, sino el descarte de leche proveniente de vacas mastíticas (Halasa et al., 2007) debido a cambios composicionales y/o a presencia de residuos de antibióticos o químicos, la presencia de patógenos para el hombre y el descarte obligatorio de animales afectados en forma crónica (Wolter et al., 2002). Los recuentos bacterianos y el RCS cambian cuantitativa y cualitativamente durante el curso de la mastitis, y por lo tanto, en la mayoría de los países existe un límite regulatorio (esquema de pago o bonificación) para la cantidad de bacterias y el RCS en el tanque. El RCS se incrementa en las mastitis subclínicas y esto tiene consecuencias económicas ya que la mayoría de los esquemas de pago para la leche testean el RCS y su excesiva presencia hace perder bonificaciones al productor. Los residuos antibióticos pueden encontrarse en establecimientos donde la leche de

vacas tratadas es vertida al tanque y su presencia se penaliza (Halasa et al., 2007).

Por último debe tenerse en cuenta que frecuentemente hay un perjuicio permanente en el rendimiento lechero de la vaca ya que el parénquima mamario se afecta y se torna afuncional (Wolter et al., 2002) y que las vacas enfermas son una constante fuente de infección durante el ordeño (Halasa et al., 2007).

Etiología de la mastitis bovina

Los patógenos causantes de mastitis bovina han sido clasificados como contagiosos o ambientales.

Se denominan patógenos contagiosos a aquellos organismos adaptados a sobrevivir dentro de la glándula mamaria (DeRong et al., 2010). El mayor reservorio de estos patógenos lo constituye la ubre infectada y la infección se disemina entre los animales principalmente durante el ordeño a través de las pezoneras, manos del personal de ordeño, papel o toallas usadas para la higiene, etc. (Harmon, 1994; Jones y Bailey, 2009). En este caso las infecciones tienden a ser crónicas o subclínicas con episodios clínicos (Harmon, 1994). Ejemplos de estos patógenos contagiosos causantes de mastitis bovina son *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus* (Harmon, 1994; Jones y Bailey, 2009; Abdel-Rady y Sayed, 2009). Los patógenos ambientales son mejor descritos como invasores oportunistas de la glándula mamaria, no

adaptados a sobrevivir dentro del hospedero (DeRong et al., 2010). La fuente de estos patógenos es el entorno del animal (camas, estiércol, tierra). Aunque las nuevas infecciones por estos patógenos pueden ocurrir durante el ordeño, se producen generalmente entre ordeños y la mayoría causan mastitis clínicas (Jones y Bailey, 2009). Como ejemplos de microorganismos causantes de estas patologías se pueden mencionar a *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis* (Jones y Bailey, 2009; Abdel-Rady y Sayed, 2009; DeRong et al., 2010).

Otro criterio de clasificación que proponen algunos autores consiste en categorizar a los patógenos como mayores y menores (Harmon, 1994). La palabra "mayor" refleja su considerable impacto sobre la salud de la vaca, calidad de la leche y productividad (Zadoks y Fitzpatrick, 2009). Estos provocan los mayores cambios composicionales, incluyendo el incremento de células somáticas. Son los patógenos que ocasionan el mayor impacto económico para la producción lechera. En este grupo, se puede mencionar como los más comunes a *S. aureus* y *S. agalactiae*. Asimismo, coliformes, estreptococos y enterococos de origen ambiental también son causa frecuente de estos cuadros. Casos individuales o brotes esporádicos de mastitis podrían ser causados por *Pseudomonas* spp., *Actinomyces pyogenes*, *Serratia* spp., u otros patógenos inusuales (Harmon, 1994). Trabajos más recientes señalan que en la mayoría de los países los patógenos mayores más comunes son *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *S. aureus* y *E. coli* (Zadoks y Fitzpatrick, 2009).

Los patógenos menores causan inflamación moderada con recuento de células somáticas que exceden de dos a tres veces el número hallado en glándulas no infectadas. Las infecciones producidas por estos microorganismos están infrecuentemente asociadas con mastitis clínica, marcados cambios composicionales, o drástico decremento de la producción de la leche. Como ejemplos de patógenos menores Harmon menciona a estafilococos coagulasa negativos y *Corynebacterium bovis* (Harmon, 1994).

La incidencia y prevalencia de los diferentes patógenos asociados a mastitis varían entre diferentes países o regiones productoras de leche (Zadoks y Fitzpatrick, 2009). Esto puede asociarse con factores como tipo de razas lecheras, niveles de producción, sistemas de producción y factores medioambientales (Olde Riekerink et al., 2007).

En particular, en un estudio realizado en el litoral oeste de Uruguay, los patógenos aislados de mastitis subclínicas y sus frecuencias relativas fueron *S. aureus* 62,8%, *S. agalactiae* 11,3%, enterococos 8%, estafilococos coagulasa negativos 7,4%, *S. uberis* 6,4%, *S. dysgalactiae* 1,8%, *E. coli* 1,5% y *Staphylococcus hyicus* coagulasa positivos 0,6% (Giannechini et al., 2002).

Staphylococcus aureus

En bovinos *S. aureus* está principalmente implicado en infecciones intramamarias de hembras lactantes (Sutra y Poutrel, 1994). En vacas lecheras, es el patógeno contagioso más importante y prevalente de la glándula mamaria causando infecciones intramamarias clínicas y subclínicas provocando serias pérdidas económicas y problemas de manejo del rebaño (Kerro Dego et al., 2002).

En 1998, Giannechini y colaboradores comenzaron un relevamiento nacional de la enfermedad. En el mismo se comprobó una alta prevalencia de animales afectados con mastitis subclínica (52,4% para el litoral y 49,8% para la cuenca lechera del sur) y los análisis bacteriológicos determinaron que *S. aureus* era el agente etiológico más importante asociado con mastitis bovina en el país (Giannechini et al., 2010).

S. aureus forma parte de la familia Micrococaceae, del género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes, muchas de éstas habitantes naturales de la piel y las mucosas del ser humano (Bustos-Martínez, 2006). El género *Staphylococcus* incluye bacterias anaerobias facultativas capaces de generar energía por respiración aeróbica y por fermentación que rinde principalmente ácido láctico (Plata et al., 2009). *S. aureus* no produce esporas, no es móvil, es capaz de producir catalasa y no produce oxidasa (Sutra y Poutrel, 1994).

Su genoma consiste en un cromosoma circular de 2,8- 2,9 Mpb de tamaño y un contenido GC de 33%. El cromosoma codifica para aproximadamente 2700 secuencias codificantes de proteínas así como RNAs estructurales y regulatorios.

Los componentes del genoma básico están presentes en más del 95% de los aislamientos y representan más del 75% del genoma de este microorganismo. La organización del genoma básico está altamente conservada y la identidad de los genes individuales entre aislamientos es de 98-100%. La mayoría de estos genes están asociados con funciones *housekeeping* y del metabolismo central.

Los componentes accesorios incluyen regiones genéticas presentes en 1-95% de los aislamientos y representan el 25% del genoma de *S. aureus*. Típicamente consisten en elementos genéticos móviles que tienen o han tenido la habilidad de transferirse horizontalmente entre cepas. Estos elementos incluyen plásmidos, islas genómicas, profagos, y transposones cromosomales (Plata et al., 2009).

S. aureus es un habitante natural de la piel y las mucosas de mamíferos y es el agente causal de varias enfermedades en humanos y animales domésticos (Sutra y Poutrel, 1994).

Este microorganismo es el principal patógeno en infecciones adquiridas por la comunidad y también en ambientes nosocomiales (Fournier y Philpott, 2005). En estos ámbitos, las infecciones por *S. aureus* afectan el torrente sanguíneo, la piel, tejidos blandos y el tracto respiratorio bajo. También puede ser causa de bacteriemias e infecciones profundas, como endocarditis y osteomielitis. A menudo es responsable

de enfermedades mediadas por toxinas como síndrome de shock tóxico, síndrome de la piel escaldada y enfermedades estafilocócicas transmitidas por alimentos (Plata et al., 2009).

Factores de virulencia de *S. aureus*

Los componentes bacterianos y productos secretados que afectan la patogenia de las infecciones por *S. aureus* son numerosos e incluyen adhesinas asociadas a la superficie, una cápsula polisacáridica, exoenzimas y exotoxinas. Éstos permiten a *S. aureus* adherirse a las membranas de las células eucariotas, resistir la opsonofagocitosis, lisis de las células eucariotas y desencadenar la producción de una cascada de moléculas inmunomoduladoras en el huésped (O'Riordan y Lee, 2004; Huseby et al., 2007). Kerro Deigo y colaboradores propusieron la división de los factores de virulencia de *S. aureus* en tres categorías funcionales: factores que median la adhesión de la bacteria a la célula hospedadora, factores que promueven el daño y la diseminación tisular y factores que protegen a la bacteria del sistema inmune del hospedador (Kerro Deigo et al., 2002).

Factores que median la adhesión

Diferentes proteínas, incluso aquellas pertenecientes a la familia de componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de matriz "microbial surface components recognizing adhesive

matrix molecules" (MSCRAMMs), están involucradas en la adhesión de *S. aureus* (Cucarella et al., 2001).

La mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones intramamarias bovinas poseen una superficie altamente hidrofóbica. Esta superficie característica favorecería la interacción de la bacteria con las células de la mucosa del hospedero (Sutra y Poutrel, 1994).

La proteína de superficie de unión al fibrinógeno (*clumping factor*) media la aglutinación y la adherencia de las células bacterianas al fibrinógeno, en presencia de fibronectina. Se ha demostrado que esta proteína tiene un importante papel en la virulencia de *S. aureus* (Plata et al. 2009).

Por otro lado, la proteína de unión al colágeno, Cna, es necesaria para la adherencia al colágeno presente en los tejidos y es particularmente importante en la adhesión al tejido dañado donde las capas subyacentes de la piel están expuestas (Foster, 1996; Plata, 2009).

La hemaglutinación consiste en la agregación de los eritrocitos causada por la adhesión bacteriana. Las hemaglutininas son proteínas localizadas en organelos filamentosos que interactúan específicamente con receptores carbohidrato en la superficie de los eritrocitos y otras células eucariotas. Estas interacciones receptor-lectina son importantes para la adherencia a las superficies mucosas, un paso de vital importancia en la patogenia de muchas enfermedades (Rupp y Archer, 1992).

Factores que promueven el daño a los tejidos y diseminación

Una característica importante de *S. aureus* es su capacidad para secretar toxinas que desorganizan las membranas celulares del hospedero. Las citotoxinas se insertan en la membrana citoplasmática del hospedero formando poros (β -barril) provocando la pérdida del contenido celular y la lisis osmótica. *S. aureus* secreta varias toxinas citolíticas entre ellas la α -hemolisina, β -hemolisina, γ - hemolisina, δ - hemolisina y Pantón- Valentine leucocidina (PVL) (Plata et al., 2009).

De las cuatro toxinas hemolíticas, las α y β toxinas parecen ser las más relevantes en la mastitis bovina. Mediante estudios de mutagénesis dirigida en un modelo de ratón se ha demostrado que ambas promueven el crecimiento de *S. aureus* en la glándula mamaria y que α - hemolisina causa además necrosis en el tejido. La α - hemolisina es producida por entre un 20 y un 50% de los aislamientos provenientes de infecciones intramamarias bovinas (Sutra y Poutrel, 1994). La mayoría de estos aislamientos expresan β -hemolisina, esta toxina daña membranas ricas en esfingomielina. La lisis celular provee a *S. aureus* de nutrientes promoviendo la diseminación de la infección (Foster 1996; Huseby et al., 2007).

La γ - hemolisina es una exotoxina de dos componentes, que comprende al menos seis combinaciones de proteínas, una de ellas es también leucocidina.

La δ - hemolisina es una pequeña toxina peptídica que forma estructuras multiméricas con la habilidad de lisar muchos tipos celulares (Huseby et al., 2007).

La mayoría de los aislamientos provenientes de muestras de leche bovina, expresan PVL in vitro. Esta toxina consiste en dos componentes separados y sinérgicos con efectos citotóxicos sobre los leucocitos PMN bovinos (Sutra y Poutrel, 1994)

S. aureus puede expresar enzimas proteasas, lipasa, y desoxirridonucleasa (DNasa) las cuales probablemente contribuyan a la obtención de nutrientes por parte de la bacteria favoreciendo de esta manera la persistencia en los tejidos y la expansión del sitio de infección (Foster, 1996).

Las toxinas llamadas superantígenos son poderosos inmunoestimuladores. Estas toxinas tienen la habilidad de entrecruzar MHC (Complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II localizados en las células presentadoras de antígeno (Ag) con receptores de células T, formando un complejo trimolecular. Esto induce una intensa proliferación de células T y la masiva producción y liberación de citoquinas. Estas toxinas son resistentes a la desnaturalización por calor y a las proteasas e incluyen la toxina del Síndrome de shock tóxico, toxinas exfoliativas involucradas en el Síndrome estafilocócico de la piel escaldada y las enterotoxinas. Los superantígenos son típicamente codificados por elementos genéticos móviles (Plata et al., 2009).

Factores que protegen del sistema inmune del hospedero

La proteína A es una proteína asociada a la pared de *S. aureus* que se une al dominio Fc de las inmunoglobulinas G de numerosas especies de mamíferos (Sutra y Poutrel, 1994). Durante la patogénesis esta característica le permite a *S. aureus*, secuestrar anticuerpos no específicos en su superficie, lo cual lo protege eficientemente del sistema inmune innato y adaptativo (DeLeo et al., 2009).

Muchas cepas de *S. aureus* pueden evitar ser reconocidas por los componentes del sistema inmune, produciendo una cubierta polisacáridica (cápsula) e inhibiendo así la función fagocítica (De Leo et al., 2009). La cápsula tiene una composición química específica para cada cepa. La misma potencia la virulencia de la bacteria, impidiendo la fagocitosis y permitiendo la persistencia de la bacteria en el hospedero infectado. La cápsula de *S. aureus* promueve además la formación de abscesos (O'Riordan y Lee, 2004).

La coagulasa es una proteína extracelular que se une a la protombina del huésped para formar un complejo llamado staphylotrombina. La actividad proteasa característica de la trombina es activada en el complejo, resultando en la conversión de fibrinógeno a fibrina (Foster, 1996). El coágulo de fibrina que rodea a *S. aureus* funciona como un "disfraz inmunológico" que lo protege de la respuesta inmune del huésped (Sibbald et al., 2006).

S. aureus puede producir y secretar moléculas específicas para bloquear la función del receptor del fagocito. Por ejemplo, las proteínas

llamadas CHIPS (*chemotaxisinhibitory protein of S. aureus*), bloquean el reconocimiento mediado por receptor de los péptidos formilados, un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) central para la detección de bacterias invasivas por los fagocitos. Una vez dentro del fagocito, la bacteria usa mecanismos para disminuir la eficiencia de los antimicrobianos, los cuales probablemente expliquen la sobrevivencia de *S. aureus* post fagocitosis. Por ejemplo, las enzimas catalasa y superoxidodismutasa eliminan las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas por los neutrófilos (DeLeo et al., 2009).

Biofilms

La formación de biofilms en *S. aureus* es considerado un importante factor de virulencia en la patogenia de la mastitis bovina (Chavhan et al., 2012). Éstos son comunidades microbianas embebidas en una matriz extracelular producida por ellos mismos (Yarwood et al., 2007). La formación de biofilms y el *quorum sensing* han sido relacionados frecuentemente y pareciera que su interacción es central para la patogénesis de muchas infecciones bacterianas. El *quorum sensing* funciona a través de la secreción y detección de moléculas autoinductoras, las cuales se acumulan en forma dependiente de la densidad celular (Nadell et al., 2008). Los *S. aureus* asociados a biofilms, son más resistentes a la respuesta del sistema inmune y a los antimicrobianos que sus contrapartes planctónicos, lo cual a menudo

complica el tratamiento de la infección (Plata et al., 2009). Estas bacterias que crecen en biofilms causan en general infecciones crónicas que se caracterizan por daño al tejido e inflamación persistente (Høiby et al., 2011). Se ha demostrado que los biofilms facilitan la adherencia y la colonización de *S. aureus* en el epitelio glandular mamario. También contribuyen a la evasión de las defensas inmunológicas y a la dificultad para la erradicación del patógeno, a menudo resultando en infecciones crónicas (Cucarella et al., 2004; Dhanawade et al., 2010). La marcada característica de persistencia que poseen los biofilms, generan un grave problema tanto en la clínica como en la industria (Nadell et al., 2008).

El desarrollo del biofilm consta de distintas etapas que involucran la adhesión inicial de *S. aureus* al sustrato y la subsecuente fase de maduración (Otto, 2008).

En particular en estafilococos, la principal molécula responsable de la adhesión intercelular es el polisacárido de adhesión intercelular poli-N-acetilglucosamina (PNAG) de acuerdo con su composición química, también llamado PIA. Esta molécula, junto con otros polímeros como ácidos teicoicos y proteínas, forman la mayor parte del limo, la matriz extracelular del biofilm que forman los estafilococos (Otto, 2008).

En aislamientos de *S. aureus* provenientes de animales con mastitis se ha demostrado la presencia de una proteína unida a la pared celular llamada "*Biofilm associated protein*", Bap. Esta proteína promovería tanto la adhesión primaria como las etapas posteriores en la formación del biofilm, en las cuales la adhesión intercelular juega un importante papel (Cucarella et al., 2001). Las fases finales de separación

o dispersión que involucran la separación de bacterias individuales o en *clusters* por distintos mecanismos, son cruciales para la diseminación de la bacteria (Otto, 2008).

Resistencia a los antimicrobianos

S. aureus posee la habilidad de adquirir resistencia a los antibióticos rápidamente (Graves et al., 2010). Este microorganismo es, naturalmente susceptible, a virtualmente todos los antimicrobianos que han sido desarrollados. La resistencia es a menudo adquirida por transferencia horizontal de genes desde fuentes externas, aunque la mutación cromosomal y selección antibiótica son también importantes (Chambers y DeLeo, 2009). Aunque la penicilina fue altamente efectiva en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*, para fines de 1940, resultaba ineficiente (Graves et al., 2010). Desde 1960, alrededor del 80% de todas las cepas de *S. aureus*, son resistentes a la penicilina (Deurenberg y Stobberingh, 2008). Los *S. aureus* resistentes a la meticilina (una penicilina resistente a penicilinasas) fueron reportados en 1961, dos años después de su introducción para el tratamiento de infecciones por *S. aureus* resistentes a la penicilina (Deurenberg y Stobberingh, 2008; Graves et al., 2010). *S. aureus* meticilino resistente (MRSA) se ha extendido alrededor del mundo y es ahora endémico en hospitales y entornos médicos de los países más industrializados (Graves et al., 2010). Debido a la emergencia de *S. aureus* resistentes a los

antimicrobianos es importante monitorear la susceptibilidad a los mismos, para estimar el comportamiento de las bacterias bajo tratamiento antimicrobiano y poder establecer terapias más efectivas (Rabello et al., 2005).

Hipótesis

La incidencia de la mastitis subclínica en el tambo podría estar correlacionada con la capacidad de *S. aureus* para expresar factores de virulencia que favorecen la persistencia de los microorganismos en la glándula mamaria.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue identificar y caracterizar cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica en establecimientos lecheros de nuestro país.

Objetivos específicos

- Generar una colección de cepas nativas de *S. aureus* causantes de mastitis bovina subclínica
- Caracterizar potenciales factores de virulencia de los *S. aureus* para la patogenia de esta enfermedad
- Determinar el perfil de sensibilidad a antimicrobianos de uso común para *S. aureus*.
- Determinar la incidencia de *S. aureus* asociados a mastitis bovina subclínica

Materiales y métodos

Aislamiento bacteriano

Las muestras de leche para análisis bacteriano se obtuvieron en el marco de un estudio llevado a cabo durante un período de doce meses, desde mayo de 2008 hasta abril de 2009, en dos tambos del Uruguay: Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria ubicado en Libertad, departamento de San José (tL) y un tambo comercial ubicado en Pando, departamento de Canelones (tP). Todas las vacas ordeñadas fueron testeadas mensualmente por medio del CMT para determinar la incidencia de mastitis subclínicas. Se analizaron cuartos mamarios individuales y la leche de aquellos cuartos cuyo valor de CMT fue de trazas, 1, 2, o 3 fue remitida al laboratorio para análisis. En el tL el total de animales en ordeño fue de 1341 y en el tP el total fue de 823. En el tL 108 animales y 230 cuartos presentaron CMT positivo lo que resulta en una prevalencia de mastitis subclínicas de 8,1% (n° de animales con CMT positivo/n°de animales en ordeño) para los animales y 4,3% para los cuartos (n° de cuartos con CMT positivo /(n°de animales en ordeño x4)). En el tP fueron 165 animales y 278 cuartos los que tuvieron algún valor de positividad en la prueba de CMT; esto resulta en una prevalencia de 20,0% para los animales y de 8,4% para los cuartos mamarios.

Las muestras individuales de leche fueron tomadas de acuerdo con la guía del *National Mastitis Council* (*National Mastitis Council*, 1999).

Las muestras de leche fueron sembradas directamente en Agar Sangre al 5% e incubadas aeróbicamente a 37°C por 24 a 48 hs. (La composición de todos los medios de cultivo empleados en este trabajo se presenta en el Anexo 2).

Luego de la incubación, las colonias con morfología macroscópica presuntamente correspondiente a *S. aureus* (colonias pequeñas a medianas, blanquecinas a amarillas, cremosas, brillantes, de forma circular, bordes redondeados, superficie lisa y convexa) fueron aisladas mediante siembra por estrías en Agar Sangre al 5% y Agar Baird Parker e incubadas aeróbicamente a 37°C por 24 a 48 hs.

Identificación de Staphylococcus aureus

Las colonias fueron observadas macro y microscópicamente, se efectuó tinción de Gram y cuando correspondió se realizó una serie de pruebas bioquímicas para confirmar la identificación. Todas las pruebas empleadas para la identificación de *S. aureus*, se realizaron a partir de cultivos frescos (de 18 a 24 hs) cultivados en Agar Sangre a 37°C y en atmósfera aerobia, salvo la prueba de la catalasa que se realizó a partir de cultivos en TSA.

Como controles se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* ATCC 29213 (Boerlin et al., 2003), ATCC 25923 (Kateete et al., 2010), y ATCC 6538 (O'Reilly et al., 2000), *E. coli* aislada de piómetra canina (Delucchi et al., 2008) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Reinis et

al., 2011). Tres cepas de origen clínico de *Staphylococcus epidermidis*, *S. agalactiae* y *Klebsiella pneumoniae* (Servicio de Bacteriología del Hospital Central de las Fuerzas Armadas, H.C.FF.AA.) fueron también usadas como controles.

Prueba de la catalasa

Para confirmar la producción de catalasa, se transfirió una ansada de células del centro de una colonia individual a la superficie de un portaobjetos en el que se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indicó una prueba positiva (Gerhardt, 1994).

Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* y como control negativo la cepa de *S. agalactiae*.

Prueba de la oxidasa

Para evaluar la presencia de enzimas oxidasas se realizó el ensayo propuesto previamente por Baron y colaboradores (Baron et al., 1994). Las muestras fueron cultivadas en agar sangre a 37°C durante 24 hs. Luego, una ansada de las bacterias fue esparcida sobre papel de filtro ordinario previamente embebido en dihidrocloruro de tetrametil- p-fenilendiamina (reactivo de Kovacs) y examinado por no más de 30 segundos. El desarrollo de un color púrpura oscuro indicó una reacción

positiva, mientras que la prueba se consideró negativa cuando no hubo cambio de color.

Como control positivo se utilizó *P. aeruginosa* ATCC 27853 y como controles negativos las cepas de referencia de *S. aureus* ya mencionadas.

Prueba de la coagulasa en tubo

Para detectar la producción de coagulasa, se suspendió una ansada de bacterias de cada aislamiento en 0,5 mL de plasma de conejo (Becton y Dickinson) en un tubo estéril, se incubó a 37°C y se examinó a las 4 y 24 hs. La presencia de un coágulo sólido o suspendido en el plasma se consideró como una reacción positiva (Gerhardt, 1994).

Como control positivo se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* y la cepa de *S. epidermidis* se utilizó como control negativo.

Prueba de Voges Proskauer

Para determinar la vía metabólica del procesamiento de la glucosa se realizó la prueba de Voges Proskauer (VP). Se inoculó el caldo VP con una ansada de la colonia en estudio. Luego de incubar los caldos de cultivo a 37°C durante 48 hs, se transfirió 1 mL del caldo a un nuevo tubo para realizar la prueba de VP al cual se le agregaron 0,6 mL de alfa-naftol al 5% (diluido en alcohol etílico absoluto) y 0,2 mL de KOH al 40%. Se mezcló cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico

y se dejó reposar durante 10 a 15 minutos. La prueba VP se consideró positiva cuando se observó un color rojo- fucsia luego de 15 minutos, indicativo de la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetoína (Gerhardt, 1994).

Como control positivo se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* y la cepa de *E. coli* se utilizó como control negativo.

Evaluación de la habilidad para crecer en medio con alta concentración salina y capacidad de fermentar manitol

Para este ensayo las cepas se sembraron en medio Manitol Sal Agar y se incubaron durante 24 hs a 37°C en atmósfera aerobia (se observó el crecimiento y el viraje de color del medio). Los estafilococos capaces de fermentar el manitol crecen formando colonias pequeñas a medianas, rodeados de zonas amarillas (Kateete et al., 2010).

En este ensayo las cepas de referencia de *S. aureus* fueron utilizadas como controles positivos y la cepa de *S. epidermidis* como control negativo.

Producción de hemólisis

Las cepas bacterianas se sembraron en Agar Sangre y se incubaron 24 hs a 37°C. Para detectar la hemólisis se observó la presencia de una zona traslúcida alrededor de las colonias la cual se consideró como positiva (Gerhardt, 1994).

Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* y una cepa de *K. pneumoniae* se utilizó como control negativo.

Test de producción de DNasa

Para determinar si las cepas producían DNasa, se sembró por la técnica de *spot* un inóculo denso de cada aislamiento en placas con medio DNasa agar. Las placas se incubaron aeróbicamente durante 24 hs a 37°C. Una prueba positiva estuvo dada por la presencia de una zona clara alrededor de las colonias (Smith et al., 1969).

Al igual que en los ensayos anteriores las cepas de referencia de *S. aureus* fueron utilizadas como controles positivos y la cepa de *S. epidermidis* como control negativo.

Presencia de cápsula

Con el fin de evaluar la presencia de cápsula, las células fueron cultivadas en TSB suplementado con glucosa al 0,25 % (TSB- glu)

durante 24 hs a 37°C. Luego se transfirió una ansada de la suspensión bacteriana a un portaobjeto y se mezcló con una gota de tinta china (marca Staedtler). Inmediatamente se colocó un cubre objeto y se observó en el microscopio óptico a 40X y 100X. La cápsula se observó como una zona clara rodeando las células sobre un fondo oscuro (Turkyilmaz y Kaya, 2006).

Las cepas de referencia de *S. aureus* fueron utilizadas como controles positivos.

Producción de limo

Para determinar la habilidad de producir limo se utilizó el método de crecimiento en Agar Rojo Congo (Freeman et al., 1989). Las placas fueron inoculadas y se incubaron 24 hs a 37°C. Las colonias negras con una consistencia seca cristalina indican una reacción positiva. Las cepas no productoras de limo usualmente permanecen rosadas (Turkyilmaz y Kaya, 2006).

Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* y como control negativo la cepa *E. coli* (Delucchi et al., 2008).

Formación de biofilms

La técnica se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Arrizubieta y colaboradores (Arrizubieta et al., 2004), con las siguientes

modificaciones. A partir de cultivos en Agar Sangre de 24 hs, se inoculó una ansada de cada aislamiento en TSB- glu y se incubó a 37°C por 24 hs en atmósfera aerobia. Para este ensayo se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. Se transfirió a cada pocillo 5 µL de cada suspensión bacteriana y 195 µL de TSB- glu. La placa fue incubada a 37°C durante 48 hs en aerobiosis. Posteriormente se removió el medio y la placa se lavó dos veces con agua destilada. Las células adheridas se tiñeron agregando 200 µL de cristal violeta al 1% en cada pocillo durante 20 minutos. Luego se realizaron tres lavados con agua destilada para retirar el cristal violeta no adherido y por último se solubilizó el colorante asociado a las células agregando 200 µL de etanol de 95° a cada pocillo. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm utilizando un lector de placas (Varioscan Flash 4.00.51).

Se realizaron cuatro replicas para cada cultivo. Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* y el medio sin inocular se utilizó como blanco.

Ensayo de autoagregación

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo propuesto por Arrizubieta y colaboradores (Arrizubieta et al., 2004) con modificaciones. A partir de cultivos en Agar Sangre de 24 hs, se inoculó una ansada de cada aislamiento en TSB- glu y se incubó a 37°C durante 18 hs en aerobiosis. A partir de estos cultivos se realizó una dilución 1/1000 en un volumen

final de 5 mL de suspensión en caldo TSB- glu para cada muestra con el fin de estandarizar el inóculo. Estas últimas suspensiones fueron incubadas a 37°C por 48 hs y luego permanecieron 24 hs más a 4°C. De la superficie de cada tubo se extrajeron 200 µL para transferirlos a una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en u. Luego se midió la DO a 600 nm (DO final). Posteriormente los tubos fueron agitados vigorosamente durante 30 segundos. Se extrajeron 200 µL de cada tubo para transferirlos a una segunda placa de microtitulación y medir la DO a 600nm (DO inicial). El porcentaje de autoagregación se calculó como $\%A=100 (1- (DO_{final}/DO_{inicial}))$ (Sorroche et al., 2010).

Se realizaron tres cultivos independientes para cada experimento y al menos tres replicas para cada cultivo. Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia de *S. aureus* y el medio sin inocular se utilizó como blanco.

Ensayo de hemaglutinación

La técnica de hemaglutinación se realizó como se describió anteriormente (Rupp y Archer, 1992), con modificaciones. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C durante 18 hs en TSB y recuperadas por centrifugación y dos lavados con *buffer* fosfato salino (PBS). Las concentraciones fueron ajustadas de acuerdo al tubo 0,5 de la escala de Mc. Farland que corresponde a una concentración celular de 10^8 ufc/mL aproximadamente. Las suspensiones bacterianas fueron luego diluidas

1:10 en PBS. El ensayo de hemaglutinación se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en u. Diluciones seriadas de 1:2 de las suspensiones al 10% se llevaron a cabo en la placa de microtitulación para dar un volumen total de 50 µL por pocillo. Luego se transfirieron 50 µL de una suspensión de eritrocitos ovinos al 1% en PBS a cada pocillo. La placa se cubrió con un film de parafina, se colocó en el agitador por unos minutos, y se incubó a temperatura ambiente por 2 hs.

Como controles positivos se utilizaron dos de las cepas de referencia de *S. aureus* (ATCC 25923 y 6835) y la cepa de *E. coli* fue utilizada como control negativo. El ensayo de hemaglutinación fue positivo cuando se observaron agregados de eritrocitos en el fondo del pocillo.

Patrones de susceptibilidad antimicrobiana

La técnica se realizó de acuerdo al método propuesto por Kirby & Bauer (Bauer et al., 1966). Se realizaron suspensiones bacterianas de cada una de las cepas que se ajustaron de acuerdo al estándar de turbidez de la escala de 0,5 Mc. Farland. Con un hisopo estéril humedecido en cada suspensión bacteriana se realizó una siembra extendida en placas de Mueller Hinton agar de modo de cubrir toda la superficie. Luego, se colocaron en cada placa los discos impregnados con los antimicrobianos correspondientes. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 hs, en aerobiosis. Transcurrido este tiempo, se midieron los

diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento y las cepas se interpretaron como sensibles, intermedias o resistentes a cada antimicrobiano según las categorías establecidas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997).

En este ensayo se emplearon discos de ciprofloxacina (5 µg), sulfam trimetoprim (25 µg), gentamicina (10 µg), clindamicina (2 µg), cefalotina (30 µg), nafcilina (1 µg), penicilina (10 µg), y neomicina (30 µg), todos fabricados por Himedia (India).

Tests estadísticos

Con el fin de evaluar la significación de las medidas fotométricas realizadas a 540 nm en el ensayo de formación de biofilm, se empleó la prueba de Kruskal Wallis comparando todas las cepas entre ellas. Los valores utilizados para el test ya tenían la medida fotométrica correspondiente al blanco restado.

Con el fin de evaluar la significación de los porcentajes obtenidos a partir de las medidas fotométricas realizadas a 540 nm en el ensayo de agregación celular, se realizó la prueba de Kruskal Wallis comparando todas las cepas entre ellas. Para el cálculo del porcentaje de autoagregación se utilizaron las medidas fotométricas con el blanco restado.

El programa utilizado para ambos test estadísticos fue el Statistica 7.

Resultados

Identificación de *S. aureus*

Observación microscópica y tinción de Gram

De las 508 muestras de leche obtenidas se obtuvieron en total 67 aislamientos de cocos Gram positivos pertenecientes a la familia Micrococcaceae. Estas cepas fueron seleccionadas para continuar con el proceso de identificación tras exhibir morfología y características tintoriales consistentes con las características esperadas para *S. aureus*, es decir cocos Gram positivos agrupados en racimos.

Los datos referentes a la procedencia de cada aislamiento se muestran en la Anexo 1. Los cuatro primeros números de identificación de las cepas indican el año y el mes en que se recolectó la muestra, en ese orden.

Prueba de producción de catalasa

Todas las cepas seleccionadas produjeron catalasa. Al suspender las colonias en peróxido de hidrógeno se pudo observar la formación de burbujas, demostrando así que eran capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

Los controles positivos utilizados en este ensayo reaccionaron formando burbujas mientras que la cepa de *S. agalactiae* utilizada como control negativo no reaccionó.

Prueba de la oxidasa

Del total de cepas, sólo tres de ellas exhibieron un color púrpura al reaccionar con el reactivo de Kovacs, demostrando que estas producen citocromo oxidasa y por lo tanto son capaces de obtener energía por respiración y utilizar el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Anexo 1).

La cepa utilizada como control positivo, *P. aeruginosa* ATCC 27853, viró al color púrpura, mientras que en los controles negativos no se observó este cambio en la coloración.

Prueba de la coagulasa en tubo

Del total de las cepas analizadas, 22 fueron capaces de formar un coágulo visible en plasma de conejo cuando se realizó este ensayo. Sin embargo, de estas 22 cepas, 20 fueron positivas a las 4 hs y 24 hs, mientras que las otras dos solo fueron capaces de coagular el plasma de conejo tras 24 hs de incubación (Anexo 1).

Las cepas de *S. aureus* utilizadas como control positivo formaron un coágulo visible a las 4 hs y 24 hs, mientras que la cepa utilizada como control negativo, *S. epidermidis*, no formó coágulo.

Prueba de Voges Proskauer para revelación de productos de fermentación de la glucosa

Tras 15 minutos de haber agregado el revelador al medio de cultivo, se pudo observar en 31 de las muestras en estudio, y en aquellas correspondientes a los controles positivos, que el medio de cultivo viró al color rojo. Esto indicó la presencia de acetoina, un producto final de la fermentación butanodiolica de la glucosa. En el resto de los cultivos, no se observó cambio de color del medio (Anexo1).

Los cultivos de *S. aureus* utilizados como controles positivos viraron al color rojo tras el agregado del revelador, mientras que en el medio de cultivo con la cepa de *E. coli* utilizada como control negativo no se observó dicho cambio en la coloración.

Crecimiento en medio con alta concentración salina y fermentación del manitol

En atmósfera aerobia, todas las cepas fueron capaces de crecer en MSA demostrando tolerar la alta concentración salina del mismo. Sin

embargo, solo 38 fueron capaces de fermentar manitol. Mientras que estas últimas formaron colonias amarillas en MSA, las cepas incapaces de fermentar el manitol formaron colonias rosadas (Anexo 1).

Los controles positivos utilizados en este ensayo (cepas de referencia de *S. aureus*) fermentaron el manitol, y el control negativo (*S. epidermidis*) creció pero no fermentó el azúcar.

Hemólisis

Un halo translúcido alrededor de las colonias en los cultivos en medio Agar Sangre indicó la presencia de enzimas celulares capaces de lisar los eritrocitos contenidos en el medio. Del total de aislamientos 54 (80,6%) resultaron hemolíticas ya que lisaron los eritrocitos del medio de cultivo. Todos los aislamientos que posteriormente fueron identificadas como *S. aureus* hemolizaron completamente los eritocitos.

Las cepas de *S. aureus* utilizadas como controles positivos exhibieron hemólisis completa. La cepa de *K. pneumoniae* utilizada como control negativo no exhibió halo de hemólisis.

Test de producción de DNAsa

Aunque con diferente diámetro, se pudo observar un halo translúcido alrededor de las colonias de 59 aislamientos. Según este test, la presencia de este halo estaría indicando la descomposición del ADN

contenido en el medio y por consiguiente la presencia de desoxirribonucleasas en las células en estudio (Anexo 1).

Las cepas de referencia de *S. aureus* utilizadas como controles positivos exhibieron halo translúcido alrededor de las colonias mientras que en la placa donde se cultivó la cepa de *S. epidermidis* utilizada como control negativo no se observó halo.

Selección final de cepas para ensayos posteriores

La selección se basó de acuerdo con las características esperadas para *S. aureus*. Todas las cepas con resultado positivo para las pruebas de coagulasa en tubo (a las 4 y 24 hs. de incubación) y VP fueron seleccionadas para la realización de ensayos posteriores. Estas cepas demostraron además tener otras características esperadas para *S. aureus*. Todas fueron cocos Gram positivos, catalasa positivos, oxidasa negativos, exhibieron un halo translúcido cuando se las cultivó en DNasa agar, y fueron capaces de crecer en altas concentraciones salinas y fermentar el manitol (a excepción de 3 cepas que no fermentaron el azúcar) (Anexo 1, los aislamientos identificados como *S. aureus* se resaltan en color).

De los 20 aislamientos identificados como *S. aureus*, 11 provinieron del tambo de Libertad, y los restantes 9 del tambo de Pando. Tres aislamientos se recuperaron de muestras obtenidas el mes de junio, una el mes de agosto, tres en setiembre, dos en enero, seis en marzo y

las restantes cinco en el mes de abril. La prevalencia anual de mastitis subclínica asociada a *S. aureus* para el tL fue 8,3% para los animales y de 4,8% para el tP (nº de animales con aislamiento positivo para *S. aureus*/ nº de animales con CMT positivo).

Caracterización de potenciales factores de virulencia para las cepas identificadas como *S. aureus*

Producción de cápsula

Al observar las bacterias embebidas en tinta china bajo el microscopio, se pudo notar en todas las cepas un halo claro rodeando las células. Este halo indicaría la presencia de la cápsula, por lo que la totalidad de las cepas sería capaz de producirla bajo las condiciones establecidas para este ensayo.

Las cepas de referencia de *S. aureus* utilizadas como controles positivos exhibieron formación de cápsula.

Producción de limo

Todas las cepas identificadas como *S. aureus* fueron capaces de producir limo en cultivos sobre Agar Rojo Congo. Esto pudo constatarse al

observarse la coloración negra típica que exhiben las colonias productoras de limo cuando crecen en este medio.

Las cepas de referencia de *S. aureus* utilizadas como controles positivos exhibieron esta coloración típica. En contraste, el control negativo utilizado para este ensayo, la cepa de *E. coli*, exhibió un color rosado característica de cepas no productoras de limo.

Ensayo de formación de biofilms

Luego de medir la DO determinada por el cristal violeta solubilizado en alcohol asociado al biofilm en la placa de microtitulación se calcularon las medianas para cada cepa.

En forma similar a como lo hicieron Mathur y colaboradores, se clasificaron las cepas en base a la mediana de la DO calculada para cada cepa. El criterio establece cepas no productoras o débilmente productoras de biofilm ($DO < 0,120$), moderadamente productoras de biofilm ($0,120 \leq DO \leq 0,240$) o fuertemente productoras de biofilm ($DO > 0,240$) (Mathur et al, 2006). Según este criterio, de las veinte cepas identificadas como *S. aureus*, 15 cepas demostraron ser fuertemente productoras de biofilm, y 5 moderadas. Las cepas de referencia de *S. aureus* fueron todas fuertemente productoras de biofilm. Según estos parámetros, ningún aislamiento no formó biofilm o fue débilmente productora de biofilm. El valor máximo para las medianas de las medidas de absorbancia realizadas en este ensayo fue de 2,101 para la cepa ATCC

6835, seguida de un valor de 1,241 para el aislamiento 080919, mientras que la mínima fue de 0,144 para el aislamiento 090333 (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 2: Clasificación de las cepas identificadas como *S. aureus*, según su capacidad de formación de biofilms

Aislamiento	Mediana	Clasificación
080607	0,423	Fuerte
080611	0,258	Fuerte
080619	0,527	Fuerte
080849	0,330	Fuerte
080903	0,376	Fuerte
080919	1,241	Fuerte
080941	0,309	Fuerte
090108	0,329	Fuerte
090109	0,484	Fuerte
090305	0,222	Moderado
090307	0,375	Fuerte
090317	0,185	Moderado
090322	0,146	Moderado
090323	0,169	Moderado
090333	0,144	Moderado
090403	0,251	Fuerte
090409	0,285	Fuerte
090410	0,506	Fuerte
090431	0,697	Fuerte
090436	0,285	Fuerte
6835	2,101	Fuerte
25923	0,255	Fuerte
29213	0,285	Fuerte

Para la clasificación se utilizó el criterio de Mathur y colaboradores (Mathur et al., 2006). A la izquierda se muestra la identidad del aislamiento, la columna siguiente corresponde a las medianas de las medidas fotométricas utilizadas para el test, y la columna de la derecha clasifica la cepa como fuertemente productora de biofilms o moderadamente según el criterio de Mathur et al. No se obtuvieron cepas débilmente productoras o no productoras de biofilms según este criterio.

Formación de biofilms

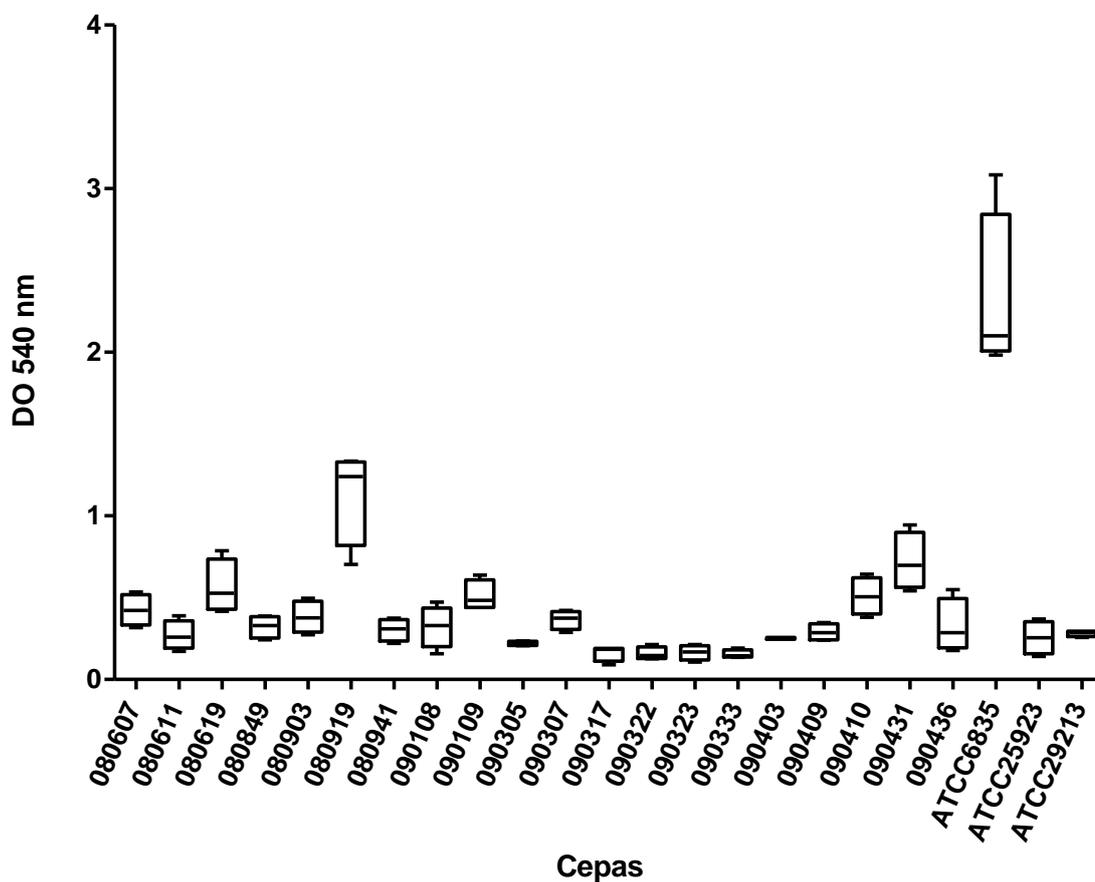


Figura 2: Gráfica (boxplot) de la absorbancia a 540 nm obtenida en el ensayo de formación de biofilm. La figura muestra los valores de absorbancia medidos a 540nm para cada cepa obtenidos en el ensayo de formación de biofilm. La mediana está representada por una línea horizontal, las mediciones entre el 25 y el 75% del rango de valores están representados dentro del rectángulo y los valores no atípicos representados por una línea vertical.

Por último, se evaluaron las medidas fotométricas realizadas a 540nm mediante el test de Kruskal Wallis y se constató que para este ensayo la amplia mayoría de las cepas no tuvieron diferencias

significativas entre ellas. Los análisis estadísticos mostraron que de las 5 cepas clasificadas como moderadamente formadoras de biofilm, una de ellas (090305) no tenía diferencias significativas con el resto de las cepas fuertemente productoras de biofilm. Asimismo no hubo diferencias significativas entre las 15 cepas clasificadas como fuertemente productoras, ni entre 4 de las moderadas (Tabla 3).

Ensayo de agregación celular

Luego de medir la DO final e inicial de cada uno de los cultivos en las placas de microtitulación, se calcularon los porcentajes de autoagregación de cada aislamiento. Todos autoagregaron en las condiciones del ensayo, aunque en algunos casos la agregación celular fue más notoria. La menor mediana de porcentaje de agregación celular fue de 54,93% y la máxima alcanzada fue de 77,72% para la cepa de referencia 25923 y de 75,57% por el aislamiento 090305 (Figura 3).

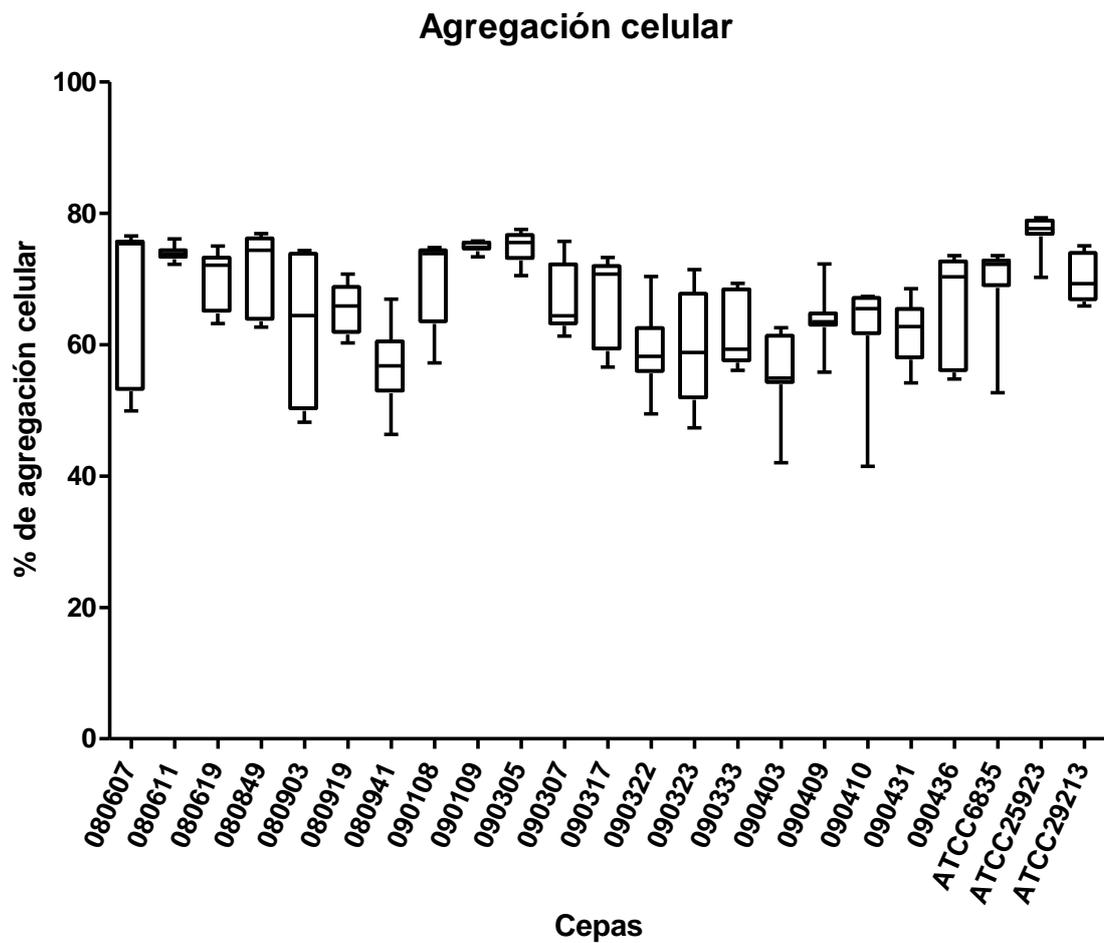


Figura 3: Gráfica (boxplot) que representa los porcentajes de agregación celular obtenidos a partir de las medidas fotométricas final e inicial realizadas a 600nm en este ensayo. En la figura la mediana de los porcentajes para cada cepa está representada por una línea horizontal, los porcentajes entre el 25 y el 75% del rango de valores están representados dentro del rectángulo y los valores no atípicos están representados por una línea vertical.

Al evaluar la significancia de los porcentajes de agregación celular mediante el test de Kruskal Wallis comparando las cepas entre ellas, se pudo observar mayor heterogeneidad que la observada para el ensayo de formación de biofilm. Los resultados del test estadístico señalan que 8 de

los *S. aureus* aisladas en este trabajo tuvieron diferencias significativas al compararlas con alguna de 6 cepas que exhibieron los mayores porcentajes de autoagregación. Todas las cepas que tuvieron mayor capacidad de adhesión intercelular en este ensayo, fueron fuertes formadoras de biofilms, excepto el aislamiento 090317. Esta cepa presentó un porcentaje de agregación celular relativamente alto (sin diferencias significativas con las demás cepas) pero exhibió una moderada capacidad para formar biofilms (en este caso sí con diferencias significativas). Lo contrario no se cumplió en todos los casos, ya que de las 8 cepas que mostraron menor capacidad de agregación celular, sólo 3 formaron biofilms moderados (090322, 090323 y 090333), mientras que las restantes fueron fuertes formadoras de biofilms (Tabla 3, Figuras 2 y 3).

Tabla 3: Resultados de la evaluación estadística mediante test de Kruskal Wallis de los ensayos de formación de biofilms y agregación celular

		Formación de biofilms																						
		080607	080611	080619	080849	080903	080919	080941	090108	090109	090305	090307	090317	090322	090323	090333	090403	090409	090410	090431	090436	6835	25923	29213
Agregación celular	080607	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	080611	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	080619	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	080849	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	080903	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	080919	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	080941	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090108	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090109	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090305	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090307	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	090322	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	090323	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	090333	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	090403	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090409	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090410	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090431	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	090436	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6835	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25923	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
29213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	

La tabla muestra los resultados obtenidos mediante test de Kruskal Wallis utilizando el programa Statistica 7. El triángulo superior exhibe los resultados para la formación de biofilms y el triángulo inferior los resultados para el ensayo de agregación celular. 0: no hubo diferencias significativas; 1: hubo diferencias significativas entre los aislamientos ($p < 0,05$).

Ensayo de hemaglutinación

Solo 7 cepas fueron capaces de aglutinar glóbulos rojos ovinos. La reacción fue positiva cuando se observó un precipitado en el fondo del pocillo de la placa de microtitulación. Cuando las diluciones bacterianas fueron mayores a 10^{-1} no se observó hemaglutinación en ninguna cepa. Los controles positivos aglutinaron visiblemente los eritrocitos en este ensayo (ATCC 25923 y 6835) y la cepa de *E. coli* utilizada como control negativo no hemaglutinó (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados del ensayo de aglutinación de eritrocitos

Aislamiento	Dilución	
	10 ⁻¹	20 ⁻¹
080607	+	-
080611	+	-
080619	-	-
080849	+	-
080903	-	-
080919	-	-
080941	-	-
090108	+	-
090109	+	-
090305	-	-
090307	-	-
090317	-	-
090322	-	-
090323	-	-
090333	-	-
090403	-	-
090409	-	-
090410	-	-
090431	+	-
090436	+	-
ATCC25923	+	-
ATCC29213	-	-
ATCC6835	+	-
<i>E. coli</i>	-	-

La tabla muestra que 7 cepas identificadas como *S. aureus* fueron capaces de hemaglutinar. Cuando las concentraciones bacterianas fueron mayores de 10⁻¹ no se observó hemaglutinación en ninguno de los aislamientos. Las cepas utilizadas como controles positivos (ATCC 25923 y 6835) produjeron hemaglutinación mientras que la cepa utilizada como control negativo (*E. coli*) no aglutinó los eritrocitos.

Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos

Mediante ensayo de difusión de disco se pudo observar que todas las cepas de *S. aureus* eran sensibles a ciprofloxacina 5 µg, sulfa trimetoprim 25 µg, gentamicina 10 µg, clindamicina 2 µg, cefalotina 30 µg, nafcilina 1 µg, y novobiocina 30 µg. Solo 4 del total de cepas fueron resistentes a la penicilina 10 µg, mientras que las restantes 16 cepas exhibieron sensibilidad a esta droga en base al diámetro del halo de inhibición. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Perfil de sensibilidad a los antimicrobianos de uso común en la clínica veterinaria

Aislamiento	Antimicrobianos testeados							
	COT2	GEN10	N30	P10	CH30	NAF1	CD2	CIP5
080607	S	S	S	S	S	S	S	S
080611	S	S	S	R	S	S	S	S
080619	S	S	S	S	S	S	S	S
080849	S	S	S	S	S	S	S	S
080903	S	S	S	R	S	S	S	S
080919	S	S	S	S	S	S	S	S
080941	S	S	S	S	S	S	S	S
090108	S	S	S	S	S	S	S	S
090109	S	S	S	S	S	S	S	S
090305	S	S	S	S	S	S	S	S
090307	S	S	S	S	S	S	S	S
090317	S	S	S	S	S	S	S	S
090322	S	S	S	S	S	S	S	S
090323	S	S	S	R	S	S	S	S
090333	S	S	S	R	S	S	S	S
090403	S	S	S	S	S	S	S	S
090409	S	S	S	S	S	S	S	S
090410	S	S	S	S	S	S	S	S
090431	S	S	S	S	S	S	S	S
090436	S	S	S	S	S	S	S	S

La letra "S" indica sensibilidad a los antimicrobianos mientras que letra "R" indica resistencia. **COT25:** Trimetoprim, 1,25 µg – Sulfametazol, 23,75 µg (resistente ≤ 10 mm; intermedio: 11-15 mm; sensible ≥ 16 mm); **GEN10:** Gentamicina (resistente ≤ 12 mm; intermedio: 13-14 mm; sensible ≥ 15 mm); **N30:** Neomicina (resistente <13 mm; intermedio: 13-16 mm; sensible ≥ 17 mm); **P10:** Penicilina, 10 U (resistente ≤ 28 mm; sensible ≥ 29 mm); **CH30:** Cefazolina, 30 µg (resistente ≤ 14 mm; intermedio: 15-17 mm; sensible ≥ 18 mm); **NAF1:** nafcilina, 1 µg (resistente ≤ 1 mm; intermedio: 11-12 mm; sensible ≥ 13 mm); **CD2:** Clindamicina, 2 µg (resistente ≤ 14 mm; intermedio: 15-20 mm; sensible ≥ 21 mm); **CIP5:** Ciprofloxacina 5 µg (resistente ≤ 18 mm; intermedio : 19-20; sensible ≥21) (NCCLS, 1997).

En relación al número de muestras de leche con CMT positivo remitidas al laboratorio, el número de *S. aureus* aislados fue bajo. Todos (a excepción de dos) provinieron de muestras de leche con valores de CMT bajos (T y 1) (Anexo 1).

Discusión

El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis subclínicas, en dos establecimientos lecheros de nuestro país. Dichos establecimientos fueron el Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, ubicado en Libertad, departamento de San José (tL) y un tambo comercial ubicado en Pando, departamento de Canelones (tP).

Las mastitis subclínicas representan del 90 al 95% de todos los casos de infecciones de la ubre de bovinos (Buzzola et al., 2007). Además, constituyen la principal fuente de pérdidas económicas para el tambo, debido a la baja en el potencial de producción y al decremento en la calidad de la leche (Zadoks y Fitzpatrick, 2009) y son sólo detectables mediante el uso de tests diagnósticos (Rabello et al., 2005).

En el presente estudio, la prevalencia de mastitis subclínica para los animales y de los cuartos en los establecimientos estudiados fue menor que las halladas en otros estudios (Li et al., 2009, Valero-Leal et al., 2010) incluso realizados en nuestro país (Gianneechini et al., 2002). Considerando que la higiene y la rutina de ordeño fueron mejores en el tL, posiblemente sea ésta la principal explicación a las diferencias encontradas en las prevalencias de mastitis subclínicas entre los establecimientos estudiados. Otros factores como el clima, razas de ganado, niveles de producción, manejo, factores metodológicos y epidemiológicos podrían explicar las diferencias encontradas con otras

regiones (Bartlett et al., 1992). Varios trabajos asocian diferentes prácticas de manejo e infraestructura con el recuento de células somáticas y los resultados de CMT. Prácticas vinculadas con bajos recuentos incluyen el uso de una terapia de secado, el registro de parámetros asociados a la calidad de la leche, y el uso de desinfectantes post ordeño. También se ha asociado el bajo recuento a una mayor higiene de las instalaciones (Barkema et al., 1998; Barkema et al., 1999; Kelly et al., 2009).

Las vacas con mastitis subclínicas deben ser consideradas como un factor de riesgo de diseminación de patógenos dentro y entre los rebaños y por lo tanto, son de particular interés para establecer las medidas de control de la enfermedad (Persson et al., 2011).

El cultivo de las muestras de leche provenientes de vacas con mastitis clínicas o subclínicas constituye una herramienta fundamental ya que permite la identificación del agente causal, el monitoreo de la transmisión y la selección de los animales como candidatos para tratamiento, segregación o sacrificio (Barkema et al., 2009).

La ocurrencia y la prevalencia de los diferentes agentes etiológicos de las mastitis varía entre diferentes regiones o países productores de leche. Esto puede estar asociado con factores tales como razas lecheras, niveles de producción, sistemas de producción (estabulados o a pastoreo), manejo y factores medio ambientales (temperatura, humedad, ambiente, estación). Por estas razones, es crucial el conocimiento de la prevalencia de las mastitis clínicas y subclínicas, así como la prevalencia

de los diferentes agentes infecciosos causantes de la enfermedad a nivel predial, regional o nacional (Giannechini et al., 2010).

S. aureus ha sido categorizado como uno de los patógenos más importantes causantes de mastitis bovina, en particular subclínica (Rabello et al., 2005), que provoca grandes pérdidas económicas en la industria láctea (Harmon, 1994; Kalorey et al; 2007). Las enterotoxinas producidas por *S. aureus* constituyen una de las causas más importantes de intoxicación alimentaria en el hombre. Las enterotoxinas estafilocócicas son proteínas de bajo peso molecular, termoestables y resistentes a enzimas proteolíticas (Neder et al., 2011). La frecuencia de los aislamientos que llevan uno o más genes codificantes de enterotoxinas varía de 20 a 100% dependiendo de la fuente de los aislamientos y del área geográfica. De hecho, cuando mejoran los métodos de detección, la frecuencia de aislamientos provenientes de leche de vaca con resultados positivos a los genes se incrementa, confirmando que el potencial de producción de enterotoxinas en leche es alto (Zecconi, 2006). La presencia de *S. aureus* y/o su toxina en la leche utilizada en la industria, constituye una amenaza para la salud pública (Sutra y Poutrel, 1994).

Aislamiento e identificación

En estudios previos realizados en nuestro país, *S. aureus* fue el patógeno más frecuentemente aislado de muestras de leche provenientes

de vacas con mastitis clínicas (alcanzando un 37,5% de las muestras) y subclínicas (62,8%) en la región litoral oeste (Gianeechini et al., 2002). En nuestro trabajo se identificaron 20 aislamientos como *S. aureus* de un total de 67 aislamientos pertenecientes a la familia Micrococcaceae. La prevalencia de este microorganismo en el tambo fue mayor para el tL que para el tP. Esta diferencia en los índices podría ser explicada por la prevalencia de otros patógenos asociados a mastitis subclínicas, que no fueron identificados en este trabajo.

Las pruebas concluyentes para la identificación de *S. aureus* fueron la prueba de coagulasa en tubo y la prueba de Voges Proskauer. Adicionalmente, se realizaron las pruebas de fermentación de manitol y DNasa con el fin de mejorar la eficiencia de la identificación (Kateete et al., 2010). Muchos de los aislamientos SCN exhibieron actividad DNasa por lo que el test no resultó apropiado como prueba confirmatoria para la identificación de *S. aureus*. Otros autores señalaron también este hecho, haciendo referencia a la subjetividad del test, a la necesidad de un operador altamente experimentado y a la realización de otras pruebas bioquímicas para la utilización del mismo como herramienta taxonómica (Boerlin et al., 2003). Todos los aislamientos identificados como *S. aureus* exhibieron actividad DNasa. Si bien, el test no nos fue útil como herramienta taxonómica, puede aportar información adicional acerca de la virulencia de *S. aureus*. La actividad nucleasa ha sido vinculada a la formación del biofilm (Kiedrowski et al., 2011).

En este trabajo la mayoría de los aislamientos provinieron de muestras de leche con valores de CMT bajos. Este hecho podría indicar

que los aislamientos de *S. aureus* se obtuvieron en las primeras etapas de la infección bacteriana.

Factores de virulencia

Las hemolisinas son toxinas que desorganizan la membrana citoplasmática causando lisis y la pérdida del contenido celular (Plata et al., 2009). Se ha propuesto que las hemolisinas, proveen al microorganismo la habilidad de adquirir hierro en forma de hemo, el cual está presente en la hemoglobina y mioglobina de los eritrocitos del huésped (Huseby et al., 2007).

En nuestro trabajo todos los aislamientos de *S. aureus* hemolizaron completamente los eritrocitos ovinos del medio demostrando la presencia de β - hemolisinas. En un trabajo realizado en este país (Giannechini et al., 2010) se encontró que del total de cepas analizadas, el 83,75% poseía actividad hemolítica, un valor cercano al encontrado en este estudio (100%).

La cápsula potencia la virulencia bacteriana ya que provee al microorganismo de resistencia a la fagocitosis facilitando la persistencia de la bacteria en el huésped infectado frecuentemente mediante la formación de abscesos (O’Riordan y Lee, 2004). En este trabajo el 100% de los aislamientos expresó cápsula y por ello poseerían mayor habilidad para evadir la respuesta inmune y persistir en el hospedero que cepas no capsuladas.

Han sido identificados 11 serotipos estafilocócicos capsulares, pero sólo los serotipos capsulares CP1, CP2, CP5 y CP8 han sido químicamente caracterizados (Luong et al., 2002). Teniendo en cuenta esto, los serotipos CP5 y CP8 son los únicos considerados para la construcción de una vacuna para la prevención de las mastitis causadas por *S. aureus* (Sordelli et al., 2000), sería interesante en un futuro realizar un relevamiento de la presencia de estos dos serotipos en aislamientos de nuestro territorio, comenzando por los 20 aislamientos de este trabajo.

Los biofilms incrementan la resistencia a los antibióticos y a mecanismos clave de defensa innata del huésped, como los péptidos antimicrobianos y la fagocitosis por los neutrófilos (Otto, 2008). La formación de biofilms y su inherente resistencia a los agentes antimicrobianos son la raíz de muchas infecciones bacterianas persistentes y crónicas (Costerton et al., 1999). En particular, los biofilms facilitan la adherencia y colonización de los estafilococos en el epitelio de la glándula mamaria, contribuyen a la evasión inmunológica de las defensas y dificultan la erradicación del patógeno, a menudo resultando en infecciones persistentes (Oliveira et al., 2006).

En nuestro trabajo todas las cepas formaron biofilm en placa de microtitulación y produjeron limo por el método del Agar Rojo Congo. Si bien ambos métodos detectan la producción de biofilm, no siempre los resultados coinciden para todas las cepas (Mathur et al., 2006, Hassan et al., 2011) como sucedió en nuestro ensayo.

El método de formación de biofilm en placa permitió semicuantificar su producción. Según el criterio utilizado por Mathur y colaboradores (Mathur et al., 2006), se estableció que 15 de las cepas fueron fuertemente productoras de biofilm y 5 moderadas. Los análisis estadísticos mostraron homogeneidad en los resultados. Según éstos se podría clasificar 16 cepas como fuertemente productoras de biofilms, y 4 como moderadas. Podríamos especular con que todas las cepas tienen la habilidad de persistir en la glándula mamaria causando infección crónica. En un trabajo realizado por Cucarella et al., en 2004 se comprobó mediante ensayos in vitro que a mayor edad del biofilm la eficiencia del antimicrobiano decrece. En el mismo trabajo se pudo constatar que el efecto biocida de los antibióticos resulta menor en biofilms fuertes (Cucarella et al., 2004). Un tratamiento ineficiente conducirá a una posible reinfección con las consecuencias que esto conlleva (diseminación, pérdidas en la producción y aparición de resistencias). En este punto debemos subrayar la importancia de la detección temprana de la enfermedad, identificación del microorganismo y prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

La información genética involucrada en la formación de biofilms por *S. aureus* consiste en el *cluster icaADBC*, que codifica proteínas implicadas en la síntesis de la matriz polisacáridica del biofilm (PIA) de *S. aureus*, principalmente implicadas en la adhesión intercelular y el gen *bap*, que codifica para una proteína de superficie también implicada en la formación de biofilms de *S. aureus*, promoviendo principalmente la adhesión a superficies inertes y adhesión intercelular (Cucarella et al.,

2004). La formación de biofilms sería un mecanismo importante para *S. aureus* en el desarrollo de la mastitis bovina. Es posible que la alta tasa de falla terapéutica (Sutra y Poutrel, 1994) esté asociada a la alta prevalencia de cepas formadoras de biofilms. Por este motivo, sería interesante investigar la presencia de los genes *icaADBC* y *bap* en nuestra colección y en un número mayor de cepas de nuestro territorio, así como la formación de estas proteínas in vivo. Estos estudios podrían aportar datos para el desarrollo de nuevas estrategias contra la mastitis bovina causada por *S. aureus*, por ejemplo vacunas (Harro et al., 2010).

Las interacciones celulares bacteria-bacteria contribuyen tanto a la autoagregación como al desarrollo de microcolonias que son importantes en las primeras etapas de la formación del biofilm (Sorroche et al., 2010).

La agregación intercelular es la segunda etapa que caracteriza a la fase de maduración del biofilm, la cual es precedida por la fase de adhesión al sustrato (Otto, 2008). La autoagregación celular podría facilitar la adherencia a los tejidos del huésped (Kuroda et al., 2008). Estas dos fases son diferentes fisiológicamente una de otra y requieren factores fase específicos (Otto, 2008). En nuestro trabajo todas las cepas de *S. aureus* autoagregaron y tuvieron la capacidad de formar biofilms. Sin embargo, no se evidenció una relación entre la capacidad de adhesión intercelular y la formación de biofilms. La adhesión bacteriana al sustrato es la primera etapa en el proceso de formación de biofilm, que es seguida de la etapa de adhesión intercelular (Cerca et al., 2005). Por otra parte, el proceso de formación de biofilms está regulado por un sistema de

quorum sensing por el cual las células son capaces de detectar la densidad bacteriana en el ambiente (Nadell et al., 2008). Cerca y colaboradores, en estudios de adherencia temprana y formación de biofilms de *S. epidermidis*, obtuvieron resultados en los que las mismas cepas diferían en su capacidad de formar biofilms según se desarrollasen en superficies hidrofóbicas o hidrofílicas (Cerca et al., 2005). En consecuencia, se puede concluir que la adhesión intercelular juega un papel en la formación de biofilm, aunque en el contexto de un proceso complejo en el que participan distintos factores. Esto explicaría la no correlación entre autoagregación y formación de biofilm.

Varios trabajos han relacionado la capacidad de hemaglutinar de *S. aureus* con la patogénesis de la mastitis bovina. El 73% de *S. aureus* aislados de mastitis bovina fue capaz de aglutinar los eritrocitos de oveja cuando se cultivó las bacterias en un medio de crecimiento sólido y nutricionalmente pobre (Lindahl et al., 1990). Es posible que estas diferencias con nuestros resultados (35%) se deban a las condiciones experimentales. Otros estudios encontraron que el 23% de las cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina, eran capaces de hemaglutinar (Rupp et al., 1995), un porcentaje similar al obtenido en este trabajo.

Rupp y Archer sugirieron que como ocurre para *S. epidermidis*, la hemaglutinación y la adherencia al plástico podrían estar relacionadas en *S. aureus* (Rupp y Archer, 1992). Se ha propuesto que la molécula PIA en *S. epidermidis* está involucrada en la hemaglutinación (Fey et al., 1999). Esta característica ha permitido identificar la presencia de PIA, a partir de ensayos de hemaglutinación para los *S. epidermidis* (Cerca et al., 2005).

Aunque el entorno químico de estos dos microorganismos es diferente, es posible que PIA esté involucrada también en la hemaglutinación de *S. aureus*. Algunos autores han encontrado una relación lineal entre la capacidad de formar biofilms de *S. epidermidis* y los títulos de hemaglutinación (Cerca et al., 2005). En este trabajo no encontramos tal relación para *S. aureus*, aunque todas las cepas que hemaglutinaron fueron fuertes formadoras de biofilms y exhibieron altos porcentajes de agregación celular.

Las cepas de *S. aureus* capaces de hemaglutinar podrían adherirse más fácilmente al epitelio mamario y al equipo de ordeño. Esta capacidad le conferiría una ventaja para establecerse y formar biofilms, constituyendo una fuente de infección continua para el rebaño.

El monitoreo de la resistencia a antimicrobianos entre los aislamientos bacterianos del rebaño es de importancia para poder establecer el perfil de sensibilidad, el cual podría permitir el establecimiento de una terapia más efectiva para las infecciones estafilocócicas de la ubre (Rabello et al., 2005). En el trabajo realizado por Giannechini y colaboradores (Giannechini et al., 2010) (quienes utilizaron el mismo método que en este trabajo), las cepas resistentes a la penicilina representaron el 45% del total de los aislamientos de *S. aureus* provenientes tanto de mastitis subclínicas como clínicas, un valor muy por encima del que obtuvimos en nuestro trabajo. Incluso en esa ocasión se caracterizaron varias cepas multirresistentes. Con un número significativamente menor de muestras, nuestros aislamientos fueron sensibles a todos los antimicrobianos testeados, con excepción de 4

aislamientos (20%) que fueron resistentes a la penicilina. Debido a la facilidad con la que *S. aureus* adquiere resistencia a los antimicrobianos, (Graves et al., 2010) se puede sospechar que este porcentaje de resistencia únicamente frente a la penicilina, podría estar indicando un buen manejo de los antimicrobianos en los establecimientos. Es importante notar que el rango de cura de *S. aureus* con terapia antimicrobiana es relativamente bajo debido a las características del patógeno como la habilidad de sobrevivir dentro de la células del hospedero y de inducir cambios patológicos en infecciones crónicas (Rabello et al., 2005). Todos los aislamientos demostraron ser capaces de formar biofilms, lo que debería ser tomado en cuenta a la hora de elegir el agente antimicrobiano (Cucarella et al., 2004).

Se han encontrado diferencias significativas en la formación de biofilms de *S. aureus* entre los fenotipos sensibles a penicilina y los resistentes, siendo este último fenotipo el de mayor producción de biofilm (Giannechini et al., 2010). En nuestro trabajo de las cuatro cepas que fueron resistentes a la penicilina, dos fueron fuertemente productoras de biofilm y otras dos, moderadas. Si bien no pudimos encontrar relación alguna entre ambas características, sería importante el estudio de un número mayor de cepas.

Staphylococcus coagulasa negativos

Del total de aislamientos obtenidos en este trabajo, 43 fueron identificados como SCN tras exhibir morfología de cocos, dispuestos en racimo y ser positivos a la tinción de Gram, producir catalasa y ser negativos a la prueba de la coagulasa (Baron et al., 1994). Esta situación no se corresponde con trabajos anteriores realizados en nuestro país en los que *S. aureus* fue el agente etiológico identificado de mayor prevalencia causante de mastitis bovinas subclínicas, quedando los SCN desplazados a un lugar de menor importancia (Giannechini et al., 2002; Giannechini et al., 2010). En algunos países se ha visto que en paralelo con el decremento de la prevalencia de los patógenos mayores, la importancia relativa de otros microorganismos, particularmente los SCN, se incrementa. Estos últimos están ahora entre los organismos más comúnmente aislados de muestras de leche de vaca con mastitis subclínicas en muchos países (Zadoks y Fitzpatrick, 2009).

Conclusiones

En este trabajo pudimos demostrar la importancia de las mastitis subclínicas por *S. aureus* en los dos tambos estudiados, pertenecientes a la cuenca de mayor importancia productiva del país.

Todos los aislamientos obtenidos en este trabajo demostraron capacidad de expresar factores de virulencia vinculados a la adhesión y a la persistencia de la bacteria en la glándula mamaria y en los establecimientos lecheros. Esto sugiere fuertemente que estos factores le confieren una ventaja selectiva frente a otros *S. aureus* que no poseen estos determinantes de virulencia y que estos son de importancia en la patogénesis de la mastitis bovina subclínica.

La persistencia de *S. aureus* en el huésped y en el establecimiento tiene importantes consecuencias para la salud de los animales y la economía del tambo y resulta de riesgo para la salud de la población.

Para poder establecer un tratamiento exitoso, es necesaria la identificación temprana del microorganismo causante de la enfermedad y la realización de pruebas de sensibilidad a antibióticos en el laboratorio microbiológico.

En este trabajo se detectaron muy pocas resistencias a los antimicrobianos y ninguna cepa multirresistente, lo que sugiere un buen manejo de los antimicrobianos en los tambos.

Perspectivas

La identificación de genes involucrados en la virulencia de *S. aureus* nos ayudará a ampliar nuestro conocimiento de la patogenia de la mastitis bovina causada por este microorganismo.

También sería interesante extender los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana para *S. aureus* formando biofilms.

La identificación y caracterización de los factores de virulencia de los SCN aislados en este trabajo, nos permitirá ampliar nuestro conocimiento acerca de la patogenia de esta enfermedad.

Bibliografía

1. Abdel-Rady A, Sayed M. Epidemiological studies on subclinical mastitis in dairy cows in Assiut governorate. *VetWorld*. 2009; 2:373-380.
2. Arrizubieta MJ, Toledo-Arana A, Amorena B, Penadés JR, Lasa I. Calcium inhibits bap-dependent multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2004; 186:7490-7498.
3. Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ, Zadoks RN. The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci*. 2009; 92:4717-4729.
4. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJ, Beiboer ML, Benedictus G, Brand A. Management practices associated with low, medium, and high somatic cell counts in bulk milk. *J Dairy Sci*. 1998; 81:1917-1927.
5. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJ, Beiboer ML, Benedictus G, Brand A. Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. *J Dairy Sci*. 1999; 82:1643-1654.
6. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 9 ed. London: Mosby, c1994.
7. Bartlett PC, Miller GY, Lance SE, Heider LE. Clinical mastitis and intramammary infections on Ohio dairy farms. *Prev Vet Med*. 1992; 12:59-71.
8. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45:493-496.

9. Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol. 2003; 41:767-771.
10. Burvenich C, Monfardini E, Mehrzad J, Capuco AV, Paape MJ. Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis: physiology or pathology? Verh K Acad Geneesk Belg. 2004; 66:97-150; discussion 150-153.
11. Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas ME. *Staphylococcus aureus*: the reemergence of a pathogen in the community. Rev Biomed. 2006; 17:287-305.
12. Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LP, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvino L, Sordelli DO. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. Infect Immun. 2007; 75:886-891.
13. Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. J Antimicrob Chemother. 2005; 56:331-336.
14. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009; 7:629-641.
15. Chavhan SK, Kalorey DR, Nagdive AA, Purohit HJ, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Molecular characterization of intercellular adhesion gene in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk. Trop Anim Health Prod. 2012; 44: 247-252.

16. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284:1318-1322.
17. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001; 183: 2888-2896.
18. Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2004; 72: 2177-2185.
19. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; 23:17-34.
20. Delucchi L, Fraga M, Perelmuter K, Cidade E, Zunino P. Vaginal lactic acid bacteria in healthy and ill bitches and evaluation of in vitro probiotic activity of selected isolates. *Can Vet J*. 2008; 49:991-994.
21. DeRong SYZ, Zhao HY. Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *Afr J Microbiol*. 2010; 4: 1110- 1116.
22. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2008; 8: 747-763.
23. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun*. 2010; 34:81-89.
24. Dingwell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary

infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can Vet J.* 2003; 44:413-415.

25. Fey PD, Ulphani JS, Götz F, Heilmann C, Mack D, Rupp ME. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 1999; 179:1561-1564.

26. Foster T. *Staphylococcus*. En: Baron S. *Medical Microbiology*, 4 ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/> [Consulta: 14 nov. 2011]

27. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:521-540.

28. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989; 42:872-874.

29. Gerhardt P. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington DC: American Society for Microbiology, c1994.

30. Giannechini R, Colque-Navarro P, Kühn I, Concha C, Kader A, Moreno-Lopez J, Möllby R. Características de *Staphylococcus aureus* aislados en Uruguay de casos de mastitis bovina, producción de biofilm y resistencia antimicrobiana. *Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 37. Paysandú, Uruguay, 2010. En: *Anales*. Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú, [s.d.]: 90-96.

31. Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand.* 2002; 43:221-230.
32. Graves SF, Kobayashi SD, DeLeo FR. Community- associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. *J Mol Med (Berl).* 2010; 88:109-114.
33. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 2007; 29: 18-31.
34. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 1994; 77:2103-2112.
35. Harro JM, Peters BM, O'May GA, Archer N, Kerns P, Prabhakara R, Shirtliff ME. Vaccine development in *Staphylococcus aureus*: taking the biofilm phenotype into consideration. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59:306–323.
36. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15:305-311.
37. Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011; 3:55-65.
38. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2007; 189:8719-8726.

39. Jones GM, Bailey TL. Understanding the basics of mastitis. Virginia Polytechnic Institute and State University, 2009. Disponible en : <http://pubs.ext.vt.edu/404/404-233/404-233~pdf.pdf> [Consulta: 22 ago 2012]
40. Kalorey DR, Shanmugam Y, Kurkure NV, Chousalkar KK, Barbuddhe SB. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. J Vet Sci. 2007; 8:151-154.
41. Kateete DP, Kimani CN, Katabazi FA, Okeng A, Okee MS, Nanteza A, Joloba ML, Najjuka FC. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010; 9:23.
42. Kelly P, O'Sullivan K, Berry D, More S, Meaney W, O'Callaghan E, O'Brien B. Farm management factors associated with bulk tank somatic cell count in Irish dairy herds. Ir Vet J. 2009; 62 Suppl 4:S45-51.
43. Kerro Dego O, van Dijk JE, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. Vet Q. 2002; 24:181-198.
44. Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR. Nuclease modulates biofilm formation in community- associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2011; 6:e26714.
45. Kuroda M, Ito R, Tanaka Y, Yao M, Matoba K, Saito S, Tanaka I, Ohta T. *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to

intercellular autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 377:1102-1106.

46. Li JP, Zhou HJ, Yuan L, He T, Hu SH. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10:753-760.

47. Lindahl M, Holmberg O, Jonsson P. Adhesive proteins of haemagglutinating *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J Gen Microbiol*. 1990; 136:935-939.

48. Luong T, Sau S, Gomez M, Lee JC, Lee CY. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide expression by *agr* and *sarA*. *Infect Immun*. 2002; 70:444-450.

49. Marshall RT, Edmondson JE. Using the California Mastitis Test. 1993. Disponible en: <http://www.infovets.com/demo/demo/dairy/d100.htm> [Consulta: 30 nov 2012].

50. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol*. 2006; 24:25-29.

51. Mellenberger R. California Mastitis Test (CMT). 2001. Disponible en: <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/CMT-Paddle1.pdf> [Consulta: 30 nov 2012].

52. Montero, E. Situación actual y perspectivas del mercado mundial de los productos lácteos, 2001. En: Conferencia Internacional

"Aseguramiento de la Calidad en la Industria Láctea". 15 – 20 octubre, San José, Costa Rica.

53. Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR. The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. *PLoS Biol.* 2008; 6:e14.

54. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 4th ed. Documento M11-A4, v. 17. Wayne Pa: NCCLS, 1997.

55. National Mastitis Council. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Microbiological procedures for use in the diagnosis of Bovine Mastitis. Rev ed. Madison, Wisconsin: Natl Mastitis Council, 1999.

56. Neder VE, Canavesio VR, Calvino LF. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Argentine dairy farms. *Rev Argent Microbiol.* 2011; 43:104-106.

57. Olde Riekerink RG, Barkema HW, Stryhn H. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 2007; 90:1704-1715.

58. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 2006; 118:133-140.

59. O'Reilly CE, O'Connor PM, Kelly AL, Beresford TP, Murphy PM. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:4890-4896.

60. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17:218-234.

61. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008; 322:207–228.
62. Persson Y, Nyman AK, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand*. 2011; 53:36.
63. Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol*. 2009; 56:597-612.
64. Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*. 2003; 34:565-578.
65. Rabello RF, Souza CR, Duarte RS, Lopes RM, Teixeira LM, Castro AC. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci*. 2005; 88: 3211-3219.
66. Reinis A, Pilmane M, Stunda A, Vētra J, Kroiča J, Rostoka D, Salms G, Vostroilovs A, Dons A, Bērziņa-Cimdiņa L. An in vitro and in vivo study on the intensity of adhesion and colonization by *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on originally synthesized biomaterials with different chemical composition and modified surfaces and their effect on expression of TNF- α , β -defensin 2 and IL-10 in tissues. *Medicina (Kaunas)*. 2011; 47:560-565.
67. Rupp ME, Archer GL. Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*. 1992; 60:4322–4327.

68. Rupp ME, Han J, Gatermann S. Hemagglutination by *Staphylococcus aureus* strains responsible for human bacteremia or bovine mastitis. *Med Microbiol Immunol.* 1995; 184:33-36.
69. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res.* 2003; 34:579-596.
70. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 2003; 34:475-491.
71. Sibbald M, Ziebandt A, Engelmann S, Hecker M, De Jong Harmsen A, Raangs G, Stokroos I, Arends J, Dubois J, van Dijl J. Mapping the pathways to Staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biolog Rev.* 2006; 70:755-788.
72. Smith PB, Hancock GA, Rhoden DL. Improved medium for detecting deoxyribonuclease- producing bacteria. *Appl Microbiol.* 1969; 18:991-993.
73. Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee JC. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:846-850.
74. SordilloLM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci.*1997; 80:1851-1865.

75. Sorroche FG, Rinaudi LV, Zorreguieta A, Giordano W. EPS II-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Curr Microbiol.* 2010; 61:465-470.
76. Sutra L, Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 1994; 40:79-89.
77. Turkyilmaz S, Kaya O. Determination of some virulence factors in *Staphylococcus spp.* isolated from various clinical samples. *Turk J Vet Anim Sci.* 2006; 30:127-132.
78. Uruguay. Instituto Nacional de la Leche. (INALE). Incertidumbre y expectativas para el 2012 en la región. Reporte Lácteo.uy N° 52 - 20 de Enero de 2012. Disponible en: http://www.inale.org/innovaportal/v/1535/1/innova.front/incertidumbre_y_expectativas_para_el_2012_en_la_region.html. [consulta: 10 may 2012].
79. Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Estadísticas Agropecuarias (DIEA). Estadística del Sector Lácteo 2009. Serie Trabajos Especiales N°295. Montevideo: MGAP, 2010. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,108,O,S,0,MNU;E;41;2;MNU>. [consulta: 3 may 2012].
80. Valero-Leal K, Valbuena E, Chacón F, Olivares Y, Castro G, Briñez W. Patógenos contagiosos y ambientales aislados de cuartos mamarios con mastitis subclínica de alto riesgo en tres fincas del estado Zulia. *Rev Científica.* 2010; 20:498-505. Disponible en:

<<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=95916207008>

> [Consulta: 13 jun 2012].

81. Wolter W, Castañeda V, Kloppert B, Zschoek M. La mastitis bovina. 2002. Disponible en:

<http://bibd.unigiessen.de/gdoc/2002/uni/p020003.pdf> [Consulta: 7 mar 2012].

82. Yarwood JM, Paquette KM, Tikh IB, Volper EM, Greenberg EP. Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. J Bacteriol. 2007; 189:7961-7967.

83. Zadoks R, Fitzpatrick J. Changing trends in mastitis. Ir Vet J. 2009; 62 Suppl 4:59-70.

84. Zecconi, A. Can we eradicate *Staphylococcus aureus* Mastitis? World Buatrics Congress, 24. Universita degli studi di Milano, 2006. Disponible en: <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2006/zeconni.pdf> [Consulta: 3 jul 2012].

85. Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. J Anim Sci. 2008; 86:57-65.

Anexo 1

Procedencia, identificación y caracterización de los aislamientos bacterianos procedentes de leche mastítica

Aislmto.	Tambo	Animal	Cto.	CMT	Oxi.	He.	MSA	BP	DNA	Co4	Co24	VP
080607	Libertad	6920	A	1	0	1	1	0	1	1	1	1
080608	Libertad	6920	B	1	0	0	0	1	1	0	0	0
080609	Libertad	211	C	1	0	0	0	1	1	0	0	1
080611	Libertad	211	A	1	0	1	1	0	1	1	1	1
080612	Libertad	211	B	1	0	0	0	1	1	0	0	1
080613	Libertad	07	D	1	0	0	0	0	0	0	0	1
080619	Libertad	416	B	1	0	1	1	0	1	1	1	1
080624	Libertad	015	D	1	0	0	0	0	0	0	0	0
080629	Pando	220	A	1	0	0	0	1	0	0	0	1
080639	Pando	415	A	1	1	0	1	0	1	0	0	0
080654	Pando	3	C	1	0	1	1	0	1	0	0	0
080717	Pando	200	A	1	0	1	0	0	0	0	0	0
080723	Pando	43	D	1	0	0	0	1	1	0	0	0
080809	Libertad	303	C	2	0	0	0	0	1	0	0	0
080826	Pando	292	B	1	0	0	0	1	1	0	0	0
080828	Pando	205	B	1	0	0	1	1	1	0	0	0
080831	Pando	357	B	1	0	0	0	0	1	0	0	0
080849	Pando	43	D	1	0	1	0	0	1	1	1	1
080903	Libertad	22	D	1	0	1	1	0	1	1	1	1
080919	Pando	44	B	1	0	1	1	0	1	1	1	1
080928	Pando	218	B	1	0	1	1	1	1	0	0	0
080935	Pando	409	C	1	0	1	0	1	1	0	0	0
080941	Pando	S/C	B	1	0	1	1	0	1	1	1	1
081003	Libertad	304	D	3	0	1	1	0	0	0	0	1
081004	Libertad	304	C	1	0	1	1	0	0	0	0	0
081006	Libertad	113	B	3	0	1	0	1	1	0	0	0
081008	Libertad	113	C	1	0	1	0	0	1	0	0	1
081010	Pando	S/D	S/D	S/D	0	1	0	1	1	0	0	0
081017	Pando	S/C	A	1	0	1	0	1	1	0	0	0
081115	Libertad	402	B	3	1	1	0	0	0	0	0	1
081117	Libertad	10	D	1	0	1	1	0	0	0	0	0
081128	Pando	S/C	A	2	0	1	0	1	1	0	0	0
090108	Libertad	10	B	2	0	1	1	0	1	1	1	1
090109	Libertad	015	A	1	0	1	1	0	1	1	1	1
090111	Libertad	015	D	2	0	1	1	1	1	0	0	0
090112	Libertad	203	A	1	1	1	1	0	1	0	0	0
090113	Libertad	203	B	2	0	1	1	1	1	0	0	0

090115	Libertad	203	D	2	0	1	1	1	1	0	0	0
090129	Libertad	130	A	1	0	1	1	1	1	0	0	0
090131	Libertad	130	D	1	0	1	1	0	1	0	0	0
090305	Libertad	015	A	1	0	1	1	1	1	1	1	1
090307	Libertad	015	C	1	0	1	1	1	1	1	1	1
090317	Pando	06	A	1	0	1	1	1	1	1	1	1
090318	Pando	09	A	1	0	0	0	1	1	0	0	0
090320	Pando	169	C	1	0	1	0	1	1	0	0	0
090321	Pando	211	C	2	0	1	0	1	1	0	0	0
090322	Pando	213	A	T	0	1	1	1	1	1	1	1
090323	Pando	213	D	T	0	1	1	1	1	1	1	1
090324	Pando	213	C	T	0	1	0	1	1	0	0	0
090327	Pando	415	B	1	0	1	0	1	1	0	0	0
090333	Pando	S/C	D	1	0	1	1	1	1	1	1	1
090403	Libertad	440	D	2	0	1	1	0	1	1	1	1
090409	Libertad	03	D	1	0	1	1	1	1	1	1	1
090410	Libertad	202	D	1	0	1	1	1	1	1	1	1
090411	Libertad	202	C	2	0	1	1	0	1	0	0	1
090417	Libertad	010	A	1	0	1	1	1	1	0	0	0
090418	Libertad	39	B	1	0	1	1	0	1	0	1	0
090425	Libertad	410	B	2	0	1	1	1	1	0	0	0
090428	S/D	S/D	S/D	S/D	0	1	1	1	1	0	0	0
090431	Pando	220	A	1	0	1	0	0	1	1	1	1
090436	Pando	S/C	C	1	0	1	0	0	1	1	1	1
090440	Pando	210	A	1	0	1	1	0	1	0	0	1
090442	Pando	96	A	1	0	1	1	1	1	0	0	0
090449	Pando	129	B	2	0	1	0	0	1	0	0	1
090452	Pando	246	A	1	0	1	0	1	1	0	1	0
090702	S/D	S/D	S/D	S/D	0	1	0	1	1	0	0	0
090710	S/D	S/D	S/D	S/D	0	1	1	0	1	0	0	1
ATCC6538	-	-	-	-	0	1	1	1	1	1	1	1
ATCC2921	-	-	-	-	0	1	1	1	1	1	1	1
ATCC2592	-	-	-	-	0	1	1	1	1	1	1	1

Aislamiento: aislamiento; **Cto.:** cuarto mamario (A: delantero izquierdo, B: delantero derecho, C: trasero izquierdo y D: trasero derecho); **CMT:** valor de CMT; **oxi.:** prueba de la oxidasa; **He.:** hemólisis; **MSA:** fermentación del manitol; **BP:** actividad lecitinásica en medio Baird Parker; **DNA:** prueba de DNAsa; **Co4:** prueba de la coagulasa en tubo a las 4 hs; **Co24:** prueba de la coagulasa en tubo a las 24 hs; **VP:** producción de acetoina. **0:** negativo; **1:** positivo; **S/C:** sin clasificar; **S/D:** sin dato. Todos los aislamientos estudiados resultaron ser cocos Gram positivos, catalasa positivos, produjeron limo al cultivarlas en Agar Rojo Congo y exhibieron cápsula. Los aislamientos identificados como *S. aureus* se resaltan en color.

Anexo 2

Medios de cultivo empleados en el presente estudio

Agar Sangre (Himedia)

Ingredientes por litro de solución en agua destilada.

Tripteína 15,0 g
Peptona de soya 5,0 g
Cloruro de sodio 5,0 g
Sangre ovina 50,0 mL
Agar 15,0 g
pH final 7,3 ± 0,2

Baird Parker Agar (Himedia)

Ingredientes por litro de solución en agua destilada.

Peptona decaseína 10,0 g
Extracto de carne 5,0 g
Extracto de levadura 1,0 g
Cloruro de litio 5,0 g
Glicina 12,0 g
Piruvato de sodio 10,00 g
Agar 17,0 g
Emulsión yema de huevo 50,0 mL
Telurito de potasio 1% 10,0 mL
pH final: 6,8 ± 0,2

Manitol Sal Agar (Himedia)

Ingredientes por litro de solución en agua destilada.

Extracto de carne 1,0 g

Pluripeptona 10,0 g

d-Manitol 10,0 g

Cloruro de sodio 75,0 g

Agar 15,0 g

Rojo de fenol 0,025 g

pH final: 7,4 ± 0,2

DNAsa agar (Himedia)

Ingredientes por litro de solución en agua destilada.

Tripteína 20,0 g

Acido desoxirribonucleico 2,0 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Agar 15,0 g

pH final: 7,3 ± 0,2

Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP) (Himedia)

Ingredientes por litro de solución en agua destilada.

Pluripeptona 7,0 g

Glucosa 5,0 g

Fosfato dipotásico 5,0 g

pH final: 6,9 ± 0,2

Tripteína soya agar (TSA) (Himedia)

Ingredientes por litro de solución en agua destilada.

Tripteína 15,0 g
Peptona de soya 5,0g
Cloruro de sodio 5,0g
Agar 15,0 g
pH final: 7,3 ± 0,2

Tripteína soya caldo (TSB- glu) (Himedia)

Ingredientes por litro de solución en agua destilada.

Tripteína 17,0 g
Peptona de soya 3,0 g
Cloruro de sodio 5,0 g
Fosfato dipotásico 2,5 g
Glucosa 2,5 g
Suplemento glucosa 1,0 g
pH final: 7,3 ± 0,2

Agar Rojo Congo

Ingredientes por litro de solución en agua destilada

Infusión cerebro de 200,0 g
Infusión corazón vacuno 250,0 g
Peptona 10,0 g
Cloruro de sodio 5,0 g
Glucosa 2,0 g
Fosfato disodico 2,5.g
Rojo congo 0,8 g
Sucrosa 50,0 g
Agar 10,0 g

Reactivo de Kovacs

Ingredientes por 100 mL de solución en agua destilada

Diclorohidrato de N,N,N,N-tetrametil-p-fenilendiamina 1 gr