



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**FACTORES DE VIRULENCIA, RESISTENCIA A
ANTIBIOTICOS Y FORMACIÓN DE BIOFILMS EN
Staphylococcus spp. AISLADOS DE MASTITIS BOVINA EN
URUGUAY**

JUAN MARCOS MORENO MOREIRA

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY
2024



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

JUAN MARCOS MORENO MOREIRA

Dra. Leticia Diana
Director de Tesis

Dr. Rodrigo Puentes
Co-director

2024

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Dr. Álvaro González; DCV, MSc,

Unidad Ciencia y Tecnología de la Leche- Facultad de Veterinaria
Universidad de la Republica - Uruguay

Dra. Paola Scavone; MSc, PhD

Laboratorio de Biofilms Microbianos - Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - Uruguay

Dra. Lorena Pardo; MSc, PhD

Instituto de Higiene - Facultad de Medicina
Universidad de la Republica - Uruguay



Centro de Posgrados
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: SALUD ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 09/09/2024, FACULTAD DE VETERINARIA

TRIBUNAL: Dr. Álvaro González (presidente), Dra. Paola Scavone, Dra. Lorena Pardo

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4767818 - 1	MORENO MOREIRA, JUAN MARCOS	S.S.S.	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

Justificación: La Tesis de Maestría "Factores de virulencia, resistencia a antibióticos y formación de biofilms en *Staphylococcus* spp. aislados de mastitis bovina en Uruguay" presentada por el Dr. Juan Marcos Moreno en el día de la fecha, aborda la caracterización de un cepario importante y voluminoso de *Staphylococcus* causantes de mastitis bovina clínica y subclínica. El tema planteado es de suma relevancia para el país, en la salud animal y humana comprendido en el concepto de Una Salud, así como también a nivel industrial teniendo un impacto económico en el sector productivo. El documento escrito es adecuado y la información se presentó de forma ordenada, clara, completa y actualizada cumpliendo con los aspectos formales de escritura científica. La exposición oral fue excelente, y se realizó de forma didáctica resaltando los resultados obtenidos, así como el análisis crítico de los mismos. El estudiante mostró solidez en sus conocimientos y fue capaz de incorporar todas las sugerencias previamente realizadas por el tribunal y contestar con solvencia a las preguntas planteadas en esta instancia. Este tribunal alienta al Dr. Moreno a continuar sus estudios en la temática aportando al conocimiento y desarrollo científico del Uruguay. En base a lo antepuesto, este tribunal resuelve otorgar la aprobación con la calificación mencionada en la presente acta.

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Alvaro González Revello

Dra. Paola Scavone

Dra. Lorena Pardo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que contribuyeron al éxito de esta investigación.

En primer lugar, agradezco al Programa de Posgrados de la Facultad de Veterinaria por brindarme un entorno académico enriquecedor y los recursos necesarios para la ejecución exitosa de este estudio.

Asimismo, agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por otorgarme una beca de posgrado, cuyo respaldo ha sido fundamental para fomentar la investigación y mi desarrollo profesional.

Mi más sincero agradecimiento también a la Dra. Virginia Diana y su equipo en el Laboratorio Asociación Rural de San José por proporcionar generosamente una parte sustancial de las cepas utilizadas en este estudio. Además, extendiendo mi gratitud a Conaprole por su apoyo al proyecto.

Agradezco a Rodrigo Puentes por su estímulo para volver a estudiar y sumergirme nuevamente en la investigación, así como por su generosidad y apoyo incondicional. A Leticia Diana, por su dedicación en enseñarme y apoyarme, y por brindarme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación. A Victoria Iribarnegaray por brindarme apoyo en el estudio de los biofilms.

Un reconocimiento especial a mi familia, María Elisa, Joan, Luciano y Paulino, los que hacen que todo valga la pena.

Sin el respaldo de todas estas personas e instituciones, esta investigación no habría sido posible. Mi más sincero agradecimiento a todos ellos

INDICE

Tabla de contenido

1. RESUMEN	8
2. SUMMARY	9
3. INTRODUCCIÓN	10
3.1. Mastitis	10
3.2. Staphylococcus aureus	11
3.3. Estafilococcus no aureus	12
3.4. Factores de virulencia	13
3.5. Toxinas	14
3.5.1. Toxinas formadoras de poros	14
3.5.2. Toxinas exfoliativas	15
3.5.3. Superantigenos	15
3.6. Biofilm	15
3.7. Resistencia a antimicrobianos	17
4. HIPOTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1. OBJETIVO GENERAL	18
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1. Aislamientos bacterianos	19
6.2. Extracción de ADN bacteriano	19
6.3. Confirmación de Staphylococcus aureus por PCR.	19
6.4. Identificación de especies de estafilococos no aureus	19
6.5. Detección por PCR de genes asociados con resistencia, adhesión, formación de biofilm y factores de virulencia	19
6.6. Identidad de la secuencia	20
6.7. Producción de biofilm	20
6.8. Resistencia a los antimicrobianos	21
6.9. Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS	22
7.1. Aislamiento e identificación bacteriana	22
7.2. Detección de factores de virulencia y genes de biofilm en Staphylococcus aureus 22	

7.3. Detección de factores de virulencia y genes de biofilms en estafilococos no aureus 23	
7.4. Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana	24
7.5. Genes Asociados con Resistencia en Muestras Resistentes.....	25
7.6. Asociaciones entre genes de virulencia y patrones de resistencia antimicrobiana	25
7.7. Formación de biofilm	26
7.8. Asociación entre presencia de genes y formación de biofilm	27
7.9. Análisis de Clusters y reducción de dimensionalidad	28
8. DISCUSION.....	32
9. CONCLUSIONES.....	38
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
11. ANEXOS	1
11.1. Anexo I. Primers usados en este estudio.....	1
11.2. Anexo II. Controles positivos utilizados en PCR.....	2

1. RESUMEN

La mastitis bovina, una enfermedad prevalente en el ganado vacuno, es causada principalmente por microorganismos bacterianos y dentro de los patógenos con mas prevalencia encontramos a bacterias del género *Staphylococcus spp.* Estos microorganismos pueden expresar una amplia variedad de genes de virulencia y tienen la capacidad de formar biofilms, estableciendo una sólida defensa contra antimicrobianos y respuestas inmunitarias del hospedero. En este estudio, analizamos 191 cepas de *Staphylococcus spp.*, de las cuales el 81% fueron identificadas como *Staphylococcus aureus* (n=155), y el 19% como estafilococos no aureus (SNa) (n=36), incluyendo especies como *S. borealis* (n=13), *S. chromogenes* (n=12), *S. haemolyticus*(n=5), *S. saprophyticus* (n=3), *S. capitis* (n=1), *S. ratti* (n=1) y *S. pasteurii* (n=1). Nuestro análisis incluyó la determinación de perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos, la evaluación de la capacidad de formación de biofilm y la identificación de genes asociados con factores de virulencia y la resistencia a antimicrobianos. Se observó que el 17.2% de las cepas mostraron resistencia a la penicilina, con un 97% que portaba el gen *blaZ*, mientras que el 9.4% demostró resistencia a la eritromicina. Todas las cepas fueron sensibles a la gentamicina y la cefoxitina. Además, se observó resistencia a la clindamicina (8.4%) y la tetraciclina (1.0%). En cuanto al desarrollo de biofilms, el 2.6% no mostró formación, el 24.6% se categorizó como productor débil, el 47.1% como moderado y el 25.7% como formador fuerte. Nuestra investigación también reveló la presencia de genes de virulencia, superantígenos como *sea* (4.7%), *seb* (3.7%), *sec* (8.4%), *sed* (1.6%) y *tst* (6.8%); toxinas formadoras de poros como leucocidina de Pantone-Valentine (*pvl*) (59.7%); hemolisinas *hla* (88.5%) y *hly* (91.1%); genes relacionados

a la formación de biofilm *icaA* (87.9%), *icaD* (78.5%) y *bap* (4.2%); y genes de adhesión *fnbpA* (89.5%), *fnbpB* (20.4%) y *clfA* (89.0%). Además, las cepas se categorizaron en cuatro grupos en función de sus atributos de virulencia, revelando diferencias entre *Staphylococcus aureus* y los SNa, donde esto últimos mostraron menor presencia de los genes estudiados que las cepas de *S. aureus*. Esta investigación profundiza sobre los perfiles de virulencia de las cepas de *Staphylococcus spp.* asociadas a la mastitis bovina, proporcionando información valiosa para posibles enfoques de tratamiento.

2. SUMMARY

Bovine mastitis, a prevalent disease in cattle, is primarily caused by bacterial microorganisms, among which *Staphylococcus spp.* are the most common pathogens. These microorganisms can express a wide variety of virulence genes and have the ability to form biofilms, establishing a strong defense against antimicrobials and host immune responses. In this study, we analyzed 191 strains of *Staphylococcus spp.*, of which 81% were identified as *Staphylococcus aureus*, and 19% as non-*aureus* staphylococci (NAS), including species such as *S. borealis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. ratti*, and *S. pasteurii*. Our analysis included the determination of antimicrobial susceptibility profiles, evaluation of biofilm-forming capacity, and identification of genes associated with virulence factors and antimicrobial resistance. We observed that 17.2% of the strains showed resistance to penicillin, with 97% carrying the *blaZ* gene, while 9.4% demonstrated resistance to erythromycin. All strains were sensitive to gentamicin and cefoxitin. Additionally, resistance to clindamycin (8.4%) and tetracycline (1.0%) was observed. Regarding biofilm formation, 2.6% showed no formation, 24.6% were classified as weak producers, 47.1% as moderate producers, and 25.7% as strong biofilm formers. Our research also revealed the presence of virulence genes, including superantigens such as *sea* (4.7%), *seb* (3.7%), *sec* (8.4%), *sed* (1.6%), and *tst* (6.8%); pore-forming toxins like Pantone-Valentine leukocidin (*pvl*) (59.7%); hemolysins *hla* (88.5%) and *hly* (91.1%); biofilm-related genes *icaA* (87.9%), *icaD* (78.5%), and *bap* (4.2%); and adhesion genes *fnbpA* (89.5%), *fnbpB* (20.4%), and *clfA* (89.0%). Additionally, the strains were categorized into four groups based on their virulence attributes, revealing differences between *Staphylococcus aureus* and NAS, with the latter showing a lower presence of the studied genes compared to *S. aureus* strains. This research provides insights into the virulence profiles of *Staphylococcus spp.* strains associated with bovine mastitis, offering valuable information for potential treatment approaches.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Mastitis

La mastitis bovina es una de las enfermedades más prevalentes y económicamente perjudiciales que afectan a la industria láctea en todo el mundo (Ruegg 2017). Es definida como un proceso inflamatorio en la glándula mamaria que puede resultar de un traumatismo, irritación química o infección microbiana en la ubre. La mayoría de los casos de mastitis son causados por invasión bacteriana; sin embargo, también pueden estar involucrados virus, levaduras y algas (Pérez et al. 2020). La mastitis se ha convertido en la enfermedad de mayor importancia en el ganado lechero, ya que conduce a una baja rentabilidad y una disminución de la sostenibilidad de la producción lechera, lo que tiene un impacto significativo en el bienestar animal, la eficiencia de la producción y la calidad de la leche (Adriaens et al. 2021). Las pérdidas económicas causadas por la mastitis pueden dividirse en dos categorías: directas e indirectas. Las pérdidas directas incluyen los costos de las pruebas de diagnóstico, el servicio veterinario, los medicamentos, la leche descartada y la mano de obra. Por otro lado, las pérdidas indirectas están asociadas con la futura disminución en la producción de leche, la reducción en la capacidad reproductiva, el sacrificio prematuro y el reemplazo de vacas afectadas por mastitis. Los costos de las medidas preventivas también deben considerarse en los costos totales de la mastitis (van Soest et al. 2011; Heikkilä et al. 2018).

En la mastitis causada por agentes infecciosos, los mismos entran en la glándula mamaria por el conducto del pezón estableciendo una infección intramamaria y resultando en una reacción inflamatoria (Harmon 1994).

La mastitis se puede clasificar según las características clínicas en mastitis clínica y subclínica. La primera se caracteriza por la presencia de grumos, coágulos o secreciones acuosas en la leche. Generalmente, los cuartos infectados están hinchados, calientes y doloridos. En algunos casos clínicos agudos, se pueden encontrar signos generales como hipertermia, anorexia y depresión. Las consecuencias son graves, causando la muerte de la vaca o agalactia, lo que lleva a un sacrificio prematuro (Morales-Ubaldo et al. 2023). La mastitis subclínica es más difícil de diagnosticar debido a la falta de signos evidentes en la leche o en los animales. Sus principales síntomas están relacionados con el aumento del recuento de células somáticas y la disminución de la producción de leche. La duración de la mastitis subclínica es más larga que la clínica y la infección permite la propagación de patógenos dentro del rebaño (Cobirka et al., 2020). La forma más prevalente de la enfermedad es la mastitis subclínica (Pumipuntu et al. 2017) ocasionando disminución en la producción, aumentando recuentos de células somáticas y aumentando riesgo de mastitis clínica durante la lactación (Reksen et al. 2006). La incidencia de la mastitis subclínica es estimada en 15-40 veces mayor que la mastitis clínica (Ruegg 2017).

Se estima que alrededor de 150 especies/subespecies bacterianas diferentes pueden inducir mastitis en ganado lechero. Sin embargo, más del 95% de los casos son inducidos por miembros de solo 10 grupos (El-Sayed & Kamel 2021). Esos grupos pueden dividirse en microorganismos causantes de mastitis contagiosas y ambientales (Cheng & Han, 2020). En las mastitis contagiosas las bacterias están adaptadas a

sobrevivir dentro del hospedero y son transmitidos de vaca a vaca principalmente en el proceso de ordeño. Estas infecciones tienen el potencial de propagarse dentro de un rodeo de forma fácil y rápida. Por otro lado, los patógenos que producen mastitis ambientales son capaces de sobrevivir fuera del hospedero y son parte de la microbiota normal del ambiente de la vaca (Kabelitz et al. 2021). Dentro de las especies principales de patógenos de mastitis contagiosa podemos encontrar a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.* y *Corynebacterium bovis*, mientras que los patógenos ambientales más comunes son *Escherchia coli*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus uberis* (Girma et al. 2012). Otras especies como el *Streptococcus dysgalactiae* están asociados tanto a una transmisión por vaca o por ambiente (Wente & Krömker, 2020).

3.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es uno de los principales patógenos de mastitis bovina aislados en el mundo (Ruegg 2017), incluyendo Uruguay, donde, sumados a las otras especies de staphylococcus (SNa), se han informado como los patógenos más prevalentes (R. Giannechini et al. 2002; R. E. Giannechini et al. 2014; Larumbe & Vidart 2016).

Las especies de *Staphylococcus* son bacterias comensales y patógenos oportunistas que tienen el potencial de causar una amplia gama de enfermedades que pueden variar considerablemente en severidad (Jenul & Horswill 2019). Son contaminantes frecuentes de los alimentos, y representan uno de los principales patógenos transmitidos por alimentos que causa problemas de salud tanto en animales como en humanos (Abril et al. 2020). Además, es una de las principales causas de mastitis bovina, ovina y caprina, lo que resulta en una reducción sustancial tanto en la producción como en la calidad de la leche, generando pérdidas económicas considerables en la industria láctea (Merz et al. 2016).

Es un microorganismo gram positivo catalasa, coagulasa y, por lo general, Voges-Proskauer positivo. No es formador de esporas, es oxidasa negativo, inmóvil, anaeróbico facultativo que crece en un amplio rango de temperaturas y pH (Abril et al. 2020). La mastitis por *S. aureus* se caracteriza comúnmente por un episodio agudo de mastitis clínica leve a moderada, pero en muchos casos, la infección no se elimina con éxito, lo que resulta en el desarrollo de mastitis subclínica crónica. La persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria y la pobre respuesta del patógeno a la terapia antibiótica hacen que las infecciones por *S. aureus* sean una causa común de descarte (Pereyra et al. 2016).

Tanto las primeras interacciones entre *S. aureus* y las células del huésped como los eventos que llevan al establecimiento de la mastitis crónica no se entienden completamente, pero las infecciones persistentes a menudo se asocian con una disminución de la respuesta inmune debido a factores relacionados tanto con la bacteria como con el hospedero. *S. aureus* tiene una variedad de factores de virulencia que favorecen la supervivencia y multiplicación bacteriana en la glándula mamaria (Zecconi & Scali 2013).

3.3. Estafilococcus no aureus

Los estafilococos pueden subdividirse en dos grupos, coagulasa-positivos y coagulasa-negativos, según su capacidad para coagular el plasma de conejo, un paso diagnóstico clave en los laboratorios de microbiología clínica. La coagulasa estafilocócica es una proteína extracelular codificada por el gen *coa* (De Buck et al., 2021). La secreción de coagulasa es una estrategia clave de virulencia en la patogénesis y persistencia de las enfermedades estafilocócicas (Bonar et al., 2018) y a menudo se ha utilizado para distinguir *S. aureus* de otros estafilococos. En el contexto de la mastitis bovina, históricamente se clasificó a los estafilococos en dos grupos: uno que incluía a *S. aureus*, considerado más patogénico y, por lo tanto, un “patógeno mayor”, y un segundo grupo que incluía a otros estafilococos que se agruparon como “patógenos menores” y fueron denominados estafilococos coagulasa-negativos (SCN) (De Buck et al., 2021).

Un esquema de clasificación adoptado en la literatura más reciente sobre mastitis agrupa a todos los estafilococos que no son *S. aureus* en una sola categoría, los estafilococos no-aureus (SNa). Algunos patógenos de mastitis coagulasa-positivos y coagulasa-variables (por ejemplo, *Staphylococcus hyicus* y *Staphylococcus agnetis*) también se incluyen con frecuencia en la categoría de coagulasa-negativos. Además, se sabe que existen variantes coagulasa-negativas de *S. aureus*, algunas de las cuales pueden tener una patogenicidad similar a sus variantes coagulasa-positivas (Fox et al., 1996). Dado que el término “estafilococos coagulasa-negativos”, basado en la capacidad de las proteínas para causar coagulación como prueba diagnóstica, puede resultar ambiguo en el contexto de la mastitis, “estafilococos no-aureus” (SNa) proporciona un término más adecuado para clasificar patógenos asociados con la mastitis bovina al ofrecer una clara dicotomía entre *S. aureus* y las otras especies de estafilococos (De Buck et al., 2021). Además, los SNa a menudo se consideran patógenos de menor importancia en la producción lechera (los llamados patógenos menores), especialmente en comparación con *S. aureus*, algunos estreptococos y algunas bacterias coliformes (Schukken et al., 2009). Sin embargo, en la mayoría de los estudios han sido las bacterias más frecuentemente aisladas de cuartos mamarios con mastitis subclínica (Condas et al., 2017), y su capacidad para causar mastitis clínica no debe subestimarse (De Buck et al., 2021). Algunos estudios también han demostrado que los SNa pueden reducir la infección por *S. aureus* y otros patógenos causantes de mastitis (Crippa et al., 2024).

Entre todos los SNa encontrados en el ganado, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. capitis* y *S. xylosus* son las especies más prevalentes (Traversari et al., 2019). Además de los SNa, es importante destacar el nuevo género reclasificado recientemente a partir de *Staphylococcus*, el *Mammaliicoccus* (Crippa et al., 2024). Se ha sugerido que los SNa podrían actuar como un posible reservorio de genes de resistencia, los cuales pueden ser transferidos e integrados en el genoma de *S. aureus* (Vitali et al., 2014). Se han reportado diferencias entre y dentro de las especies de SNa bovinos en cuanto a su epidemiología y ecología (Souza et al., 2016), resistencia a los antimicrobianos (Fergestad et al., 2021), virulencia (Wuytack et al., 2019), posibles características protectoras e interacción con el hospedador (Crippa et al., 2024) y su impacto en la salud de la ubre y la producción de leche (Valckenier et al., 2020). Los SNa pueden estar presentes en una amplia gama de hábitats ecológicos, que incluyen los canales de los pezones bovinos y los ápices de los pezones (Adkins et al., 2018; Traversari et al., 2019) así como en el ambiente de las granjas, incluyendo la leche del tanque de almacenamiento, el material de cama y las heces (Adkins et al., 2022). *S. chromogenes* y *S. epidermidis* se aíslan predominantemente de la leche. Por lo tanto,

se consideran especies adaptadas al hospedero, mientras que *S. equorum* y *S. devriesei* se encuentran principalmente en el ambiente y se clasifican como especies ambientales de SNa (Crippa et al., 2024). Otras especies, como *S. haemolyticus*, provienen de varios sitios extramamarios y, por lo tanto, se etiquetan como oportunistas (Adkins et al., 2022). Múltiples estudios contradicen esta clasificación actual por especies, y estas observaciones contradictorias podrían atribuirse a diferencias entre cepas dentro de las mismas especies de SNa (Crippa et al., 2024).

3.4. Factores de virulencia

La capacidad de las especies de *Staphylococcus* para causar infecciones está relacionada con la expresión de factores de virulencia (Pérez et al. 2020) que ayudan a la bacteria a evadir las defensas del hospedero y contribuir a la permanencia y patogenicidad. Estos factores incluyen componentes estructurales (colágeno, fibrinógeno, proteínas de unión a elastina, proteína de unión a penicilina, ácido teicoico, proteína α , β -lactamasa, proteasas, cápsulas y limos), enzimas (coagulasa, estafiloquinasa, DNasa, fosfatasa, lipasa, fosfolipasa, hialuronidasa) y toxinas (enterotoxinas estafilocócicas, toxina 1 del síndrome de shock tóxico, leucocidina, hemolisinas y exfoliatina). Además, tienen mecanismos específicos, como la formación de biofilms, que facilitan su adherencia e invasión de las células epiteliales mamarias (Zecconi et al. 2006; Abril et al. 2020; Pérez et al. 2020). Para sobrevivir y adaptarse a diferentes nichos ambientales, ha desarrollado una intrincada red reguladora para controlar la producción de estos factores de virulencia tanto en el tiempo como en la ubicación del hospedero (Novick 2003a; Jenul & Horswill 2019). La maquinaria reguladora y los factores de virulencia se conocen como genes accesorios, ya que no son esenciales para el crecimiento normal. Estos factores accesorios se utilizan para establecer la dominancia en el hospedero y contribuir a la patogenicidad. Estos elementos genéticos accesorios se codifican directamente en el cromosoma, y también en elementos móviles que incluyen fagos, plásmidos e islas de patogenicidad (Jenul & Horswill 2019; Pérez et al. 2020).

Los estafilococos son bacterias con un genoma central conservado (Feil et al. 2003), y su evolución es principalmente impulsada a través de la mutación y la transferencia horizontal de genes. Los elementos genéticos móviles, como los bacteriófagos integrados (profagos), son una de las contribuciones más comunes a la variación de cepa a cepa de *S. aureus* (Jenul & Horswill 2019). Debido a su bajo nivel de competencia natural, la transducción fágica es un modo frecuente de transferencia de ADN entre cepas de *S. aureus* (Xia & Wolz 2014). La leucocidina Pantón-Valentine es un ejemplo de factor de virulencia encontrado en profagos (Shallcross et al. 2013). Otros importantes factores de virulencia codificados por bacteriófagos incluyen la toxina exfoliativa A (Goerke et al. 2009), el factor de virulencia anclado a la pared celular SasX, el inhibidor estafilocócico del complemento, la estafilocinasa, la proteína inhibidora de la quimiotaxis y las enterotoxinas codificadas por *sea*, *selk2* y *selp* (Jenul & Horswill 2019). Las islas de patogenicidad estafilocócica (SaPI) son otro elemento genético móvil que puede codificar toxinas pirogénicas llamadas superantígenos. Los genes de superantígeno codificados en SaPIs incluyen la toxina

del shock tóxico (*tst*) (Novick 2003b), la enterotoxina B (*seb*) y la proteína similar a la enterotoxina Q (*selq*) (Schelin et al. 2011). Los plásmidos juegan un papel importante en la adquisición de resistencia a los antibióticos de *S. aureus*, pero también hay algunos ejemplos que documentan su importancia para la adquisición de factores de virulencia. Hasta la fecha se ha demostrado que varias toxinas pueden estar codificadas en plásmidos, incluida la toxina exfoliativa B, la enterotoxina D, la proteína similar a la enterotoxina SER y la proteína similar a la enterotoxina J (Jenul & Horswill 2019).

3.5. Toxinas

Como vimos anteriormente la eficiencia de *S. aureus* y especies SNa como patógenos puede atribuirse a su arsenal de factores de virulencia, entre los cuales las toxinas secretadas desempeñan un papel importante. Las principales toxinas estafilocócicas se pueden dividir en tres grupos principales: las toxinas formadoras de poros (PFTs por sus siglas en inglés), las toxinas exfoliativas (ETs) y las superantígenos (SAGs) (Oliveira et al. 2018).

3.5.1. Toxinas formadoras de poros

Numerosas toxinas tienen como blanco la membrana citoplasmática. Estas toxinas generan poros en la membrana, desencadenando la liberación de moléculas y metabolitos esenciales, lo que las hace citolíticas (Otto 2014). En este conjunto de toxinas, destacan las hemolisinas y las leucocidinas.

Las hemolisinas son reconocidas por su papel como factores virulentos y son especialmente relevantes en infecciones persistentes de la glándula mamaria. *S. aureus* tiene a las hemolisinas α y β como las más representativas, siendo codificadas por los genes *hla* y *hlb*, respectivamente (Burnside et al. 2010; Pérez et al. 2020). De estas, la hemolisina α es la que se produce en mayor medida. Su capacidad patogénica se asocia a sus efectos hemolíticos, dermonecróticos y neurotóxicos, que en humanos pueden desencadenar edema pulmonar y daño dermonecrótico. En ganado, favorece la persistencia del microorganismo en la glándula mamaria (Berube & Wardenburg 2013). La hemolisina β , a pesar de no inducir lisis celular, actúa como esfingomielinasa, mostrando una actividad notoria contra eritrocitos bovinos (Pérez et al. 2020). Es relevante mencionar que la interacción entre las hemolisinas α y β puede potenciar la adhesión a células epiteliales mamarias bovinas y fomentar la proliferación de bacterias al dañar el epitelio y exponer la matriz subcelular. La degradación de la esfingomielina por estas toxinas conlleva un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática y una consecuente pérdida progresiva de la carga eléctrica negativa en la superficie celular, facilitando la adhesión bacteriana (Cifrian et al. 1996).

Las leucocidinas son también toxinas formadoras de poros de dos componentes que atacan específicamente a las células inmunitarias, destruyendo células fagocitarias como monocitos y polimorfonucleares (Alonzo & Torres 2014). Existen siete tipos diferentes de leucocidinas, y la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) es la toxina con el efecto más potente sobre las células inmunitarias (Abril et al. 2020).

3.5.2. Toxinas exfoliativas

Las toxinas exfoliativas (TE), también conocidas como toxinas epidermolíticas, son serinas extremadamente específicas secretadas por *S. aureus*. Estas proteasas reconocen e hidrolizan las cadherinas desmosómicas en las capas superficiales de la piel. Las TE son exotoxinas asociadas con la escisión de las uniones de los queratinocitos y la adhesión célula-célula en la epidermis del hospedero, lo que puede inducir descamación de la piel y formación de ampollas (Oliveira et al. 2018).

3.5.3. Superantígenos

Originalmente, los Superantígenos (SAGs) fueron denominados enterotoxinas estafilocócicas (SEs) porque causan síntomas típicos de intoxicación alimentaria por *S. aureus*, como vómitos y diarrea (Grumann et al. 2014). Sin embargo, dado que algunas de las toxinas más recientemente identificadas pertenecientes a este grupo no presentaban estas propiedades eméticas, en 2004, el Comité Internacional de Nomenclatura dio a SE esta nueva nomenclatura (Oliveira et al. 2018). Se han descrito más de 23 toxinas SAGs estafilocócicas, particularmente la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1) y las enterotoxinas estafilocócicas (SEA a SEE, SEG a SEJ, SEL a SEQ y SER a SET), y 11 toxinas semejantes a superantígenos estafilocócicos (SSL) (SEIK a SEIQ, SEIU a SEIX) (Oliveira et al. 2018).

Los SAGs activan el sistema inmunológico uniéndose al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y a moléculas receptoras de células T sin procesamiento de antígenos (Lin et al. 2010). Las moléculas MHC II parecen impactar en la capacidad de los macrófagos para regular la respuesta de las células T a los SAGs. Los SAGs liberados actúan sistémicamente, desencadenando un gran número de células T para producir grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias (IL-2, IFN- γ y TNF), causando así la manifestación de síntomas (por ejemplo, fiebre alta, erupción, descamación, vómitos, diarrea, hipotensión y, con frecuencia, pueden resultar en fallo multiorgánico) (Oliveira et al. 2018). Las enterotoxinas clásicas SEA, SEB, SEC, SED y SEE son responsables del 95% de las intoxicaciones estafilocócicas; con SEA y SED como las causas más comunes de intoxicación alimentaria, debido a su estabilidad en una amplia gama de actividades de agua y condiciones de pH (Abril et al. 2020). Una característica importante es que estas enterotoxinas conservan su potencia después de la pasteurización (Tam & Torres 2019; Homsombat et al. 2021), por lo tanto, la capacidad de las cepas de *S. aureus* de origen animal para producir toxinas representa riesgos sustanciales tanto para la salud animal como pública.

3.6. Biofilm

Los biofilms se pueden definir como ecosistemas en los que las células microbianas están incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Esta matriz representa un espacio estructurado y compartido, que es generado y controlado por los organismos que viven dentro. La composición, las propiedades y la dinámica de la matriz influyen en el modo de vida (Flemming et al. 2023; Rather et al. 2021;

Sauer et al. 2022). Estos microorganismos presentan variaciones en la tasa de crecimiento y la expresión génica en comparación con su forma planctónica (Gupta et al. 2016). Para establecer una relación con el hospedero, resistir condiciones externas desfavorables y enfrentar los antibióticos conocidos, así como otras señales ambientales, los microorganismos han evolucionado para formar una cubierta protectora alrededor de sí mismos (Castiblanco & Sundin 2016). La formación de biofilms contribuye al desarrollo de resistencia a los antibióticos y a la aparición de células persistentes, las cuales son responsables de la persistencia difícil de manejar de las infecciones microbianas (Rather et al. 2021). La matriz extracelular del biofilm comprende carbohidratos retenidos a través de la formación de enlaces de hidrógeno con polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (Nasser et al. 2021).

Los miembros del género *Staphylococcus*, incluidos *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, el miembro más destacado de los estafilococos no aureus (SNa), son patógenos oportunistas y ambos producen biofilm robustos (Crippa et al., 2024; Schilcher & Horswill, 2020). El desarrollo del biofilm estafilocócico es un proceso complejo que involucra tres etapas principales: (i) la adhesión inicial, (ii) la producción de la matriz extracelular y la proliferación celular, y (iii) la estructuración del biofilm y la separación celular (Schilcher & Horswill 2020). En los biofilms que están asociados a superficies, durante la primera etapa, la bacteria se adhiere a una superficie biótica o abiótica utilizando una variedad de factores y mecanismos, tales como adhesinas de superficie (Foster et al. 2014; Foster 2019), ácidos teicoicos de pared (Gross et al. 2001), cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular, y la producción de ADN ambiental (Mann et al. 2009). Las bacterias adheridas se multiplican y forman microcolonias en la superficie. Posteriormente, estas microcolonias evolucionan en estructuras bien definidas que constituyen el biofilm. Tras la adhesión de una capa de células bacterianas a la superficie, la capa bacteriana subsiguiente no se adherirá directamente a la misma. Por lo tanto, la adhesión de célula a célula es un proceso esencial para mantener y desarrollar la formación de biofilms (Nasser et al. 2021). Esta acumulación y desarrollo de una etapa madura se debe principalmente a las adhesiones intercelulares polisacáridas (PIA), las cuales facilitan la acumulación bacteriana, en especial el polisacárido poli-N-succinil- β -1-6 glucosamina (PNAG). La biosíntesis de PNAG está controlada por enzimas codificadas por el operón *icaADBC* (Oliveira et al. 2018; Pérez et al. 2020). Las proteínas de la superficie bacteriana desempeñan un papel significativo en la adhesión, y se han identificado varias proteínas clave en la formación de biofilms (Felipe et al. 2017). Entre ellas se encuentran las involucradas en la adhesión bacteriana, como el factor de aglutinación (ClfA y ClfB) (Abraham & Jefferson 2012) y las proteínas de unión a fibronectina (FnbpA y FnbpB) (O'Neill et al. 2008), siendo particularmente importante la proteína asociada a biofilm (Bap) (Cucarella et al. 2004). Se ha descrito a la proteína Bap como un factor patogénico específico en el ganado, ya que se ha identificado en aislamientos procedentes de infecciones intramamarias bovinas (Cucarella et al. 2004; Vautor et al. 2008). La remoción del biofilm se produce por factores disruptivos, como nucleasas y surfactantes (PSMs), que son considerados esenciales para el desarrollo de la estructura tridimensional del biofilm estafilocócico maduro (Schilcher & Horswill 2020). Finalmente, el desprendimiento celular durante la desintegración del biofilm se debe principalmente

a la degradación de la matriz del biofilm impulsada por proteasas y la interrupción del biofilm por PSMs (Joo & Otto 2012; Periasamy et al. 2012).

3.7. Resistencia a antimicrobianos

Los antibióticos se utilizan ampliamente en animales de producción de alimentos para combatir enfermedades y mejorar el rendimiento animal. En los establecimientos lecheros, se utilizan antibióticos como la penicilina, la cefalosporina, la estreptomycin, la tetraciclina y muchos otros para el tratamiento y la prevención de la mastitis causada por una variedad de bacterias. A menudo, se administran antibióticos de forma rutinaria a todo el rebaño para prevenir la mastitis durante el período seco (Oliver & Murinda, 2012). Se estima que desde 2010 hasta 2030, el consumo global de antimicrobianos en la producción ganadera aumentará en dos tercios, y se duplicará en Brasil, Rusia, India, China y Sudáfrica (Van Boeckel et al. 2015). El riesgo de la presencia de residuos de antibióticos en la leche cruda no es solo un problema de salud pública y seguridad alimentaria, sino también un factor económico importante para el productor que es penalizado por la leche adulterada y para la planta procesadora de leche que pone en peligro la fabricación de alimentos al procesar leche adulterada (Oliver & Murinda 2012).

Además de ser una etiología de mastitis, *S. aureus* ha sido considerada como un importante riesgo para la salud humana, especialmente debido al desarrollo de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Se ha informado que el complejo clonal 398 asociado al ganado (LA-MRSA) también es responsable de infecciones en humanos (M. Cui et al. 2020). El uso de diferentes antimicrobianos es el enfoque ampliamente utilizado para tratar cualquier infección intramamaria (IMI) en el ganado (Saeed et al. 2024). Sin embargo, existen ciertos inconvenientes en este enfoque actual debido a la posibilidad de residuos de antimicrobianos en la leche, desarrollo de resistencia antimicrobiana (RAM) y baja tasa de curación (Cheng & Han 2020). Además, las bacterias que causan mastitis, particularmente *S. aureus*, no responden fácilmente a la terapia con agentes antimicrobianos debido a la capacidad de las bacterias para ingresar y residir intracelularmente dentro de la glándula mamaria, lo que proporciona desafíos adicionales para la terapia (Fraunholz & Sinha 2012). La invasión celular de los estafilococos en la ubre establece un reservorio que promueve la reinfección posterior, lo que conduce a una fase de enfermedad prolongada e infecciones recurrentes (Saeed et al. 2024). Además, las infecciones recurrentes y subclínicas también son facilitadas por la supervivencia facultativa de estas especies dentro de las células (Fraunholz & Sinha 2012). En consecuencia, los estafilococos permanece protegido de la reacción inmune dentro del hospedero y de la actividad antimicrobiana mediante la formación de biofilm y el desarrollo de supervivencia intracelular (Rollin et al. 2017).

En este escenario, el surgimiento y la propagación de la resistencia antimicrobiana continúa desafiando nuestra capacidad para tratar enfermedades bacterianas y requiere un conocimiento avanzado sobre la frecuencia de resistencia entre bacterias potencialmente zoonóticas, así como en relación con los determinantes genéticos de esta resistencia, para monitorear mejor los riesgos para la población humana. Esta

información es esencial para la toma de decisiones con respecto a las terapias adoptadas, las acciones de vigilancia sanitaria y la evaluación del uso de antimicrobianos en la producción animal (Pérez et al. 2020).

Debido a todo esto muchos esfuerzos de investigación actuales están dirigidos hacia terapias basadas en una estrategia anti-virulencia (Sabino et al. 2023), con el objetivo de atenuar los factores de virulencia de las bacterias y reducir su capacidad nociva (Martínez et al. 2019). Se anticipa que estos tratamientos tendrán un menor impacto en el crecimiento del patógeno, por lo que la tendencia evolutiva hacia la resistencia sería menor en comparación con los antibióticos (Quave & Horswill 2014; Sully et al. 2014). Los tratamientos anti-virulencia atacan directamente a los patógenos, asegurando que no afecten negativamente a la microbiota beneficiosa (Dickey et al. 2017). Considerando los factores de virulencia identificados en especies de *Staphylococcus* y su relación con la mastitis bovina, es esencial entender estas propiedades virulentas.

4. HIPOTESIS

Se espera encontrar diferencias significativas en los perfiles de virulencia, la capacidad de formación de biofilms y la resistencia antimicrobiana entre cepas de *Staphylococcus aureus* y estafilococos no aureus (SNa) aisladas de mastitis bovina. Estas diferencias podrían influir en la capacidad de ambos grupos para causar infección y en su respuesta a los tratamientos antimicrobianos

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Conocer el perfil de virulencia y resistencia de cepas de *Staphylococcus spp.* aislados de casos de mastitis bovina en Uruguay.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detección de genes de virulencia *sea, seb, sec, sed, tst, luk (pvl), hla, hlb, icaA, icaD, bap, clfA, fnbpA y fnbpB* y comparar su presencia en cepas de *S.aureus* y SNa.
2. Conocer el perfil de resistencia a los antimicrobianos de las cepas estudiadas.
3. Conocer la habilidad de las cepas estudiadas de formar biofilm, asociarlo con los genes presentes y comparar esta formación en cepas de *S.aureus* y SNa
4. Asociar estadísticamente la presencia de genes de virulencia, resistencia a los antimicrobianos y su capacidad de formar biofilms

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Aislamientos bacterianos

Un total de 191 cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas de vacas con mastitis clínica (n=170) y subclínica (n=21) entre 2017 y 2023 fueron utilizadas en el presente estudio. Los aislados fueron proporcionados por dos laboratorios comerciales de diagnóstico de mastitis. Las cepas se recuperaron en placas de TSA (Agar de Soya Trypticase) para observar su viabilidad e incubadas a 37°C durante 24 horas. Todas las cepas se almacenaron a -80°C en TSB con agregado de 20% glicerol.

6.2. Extracción de ADN bacteriano

La extracción de ADN de los aislados recuperados se realizó utilizando el método de lisis térmica añadido con la enzima acromopeptidasa (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO) para una mejor ruptura de la pared celular estafilocócica (Diana et al. 2019). Luego se centrifugó a 13.000 RPM por 7 minutos y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos. La pureza y cantidad de ADN extraído se evaluó utilizando NanoDrop (Thermo, USA) y los extractos obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

6.3. Confirmación de *Staphylococcus aureus* por PCR.

Todos los aislados se confirmaron como *S. aureus* o estafilococos no aureus (SNa) mediante PCR para amplificar el marcador genético sa442 (PCR puesta a punto en laboratorio de microbiología de Facultad de Veterinaria). Los cebadores utilizados en los ensayos PCR, así como el tamaño del producto amplificado esperado, se enumeran en el ANEXO I.

6.4. Identificación de especies de estafilococos no aureus

La identificación de especies de SNa se llevó a cabo por secuenciación del gen ARNr 16S. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Utilizando el programa Bioedit (Hall. 1999) se analizan cromatogramas y se realiza una edición y recorte de secuencias de baja calidad, luego se ensamblan secuencias forward (sentido) y reverse (antisentido). Se trabaja la secuencia con el fin de obtener una secuencia más precisa. La identificación de las cepas mediante blast se realizó utilizando el servidor online www.ezbiocloud.net que utiliza una base de datos propia (Chalita et al. 2024).

6.5. Detección por PCR de genes asociados con resistencia, adhesión, formación de biofilm y factores de virulencia.

Se examinó la presencia de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *pvl*, *tst*, *hla*, *hly*, *bap*, *clfA*, *fnbpA*, *fnbpB*, *icaA* y *icaD* en todo el ADN genómico de los aislados de *Staphylococcus spp.* Los cebadores utilizados en los ensayos PCR, así como los tamaños de los productos amplificados esperados y las referencias, se enumeran en el

ANEXO I. Los oligonucleótidos cebadores fueron sintetizados por Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur). La mezcla de reacción de PCR (12.5 μ L) se compuso de 1 μ L de ADN molde (140 ng promedio), 6.25 de Master mix (NZYTaQ II Green, Portugal), 1 mM de cada cebador y 3.25 μ L de agua estéril desionizada para completar el volumen de la mezcla. El perfil de ciclado térmico se realizó en un termociclador (Corbett Research, Australia). Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificación, cada uno consistiendo en desnaturalización a 94°C durante 1 min, temperatura de anillado durante 1 min, y elongación a 72°C durante 1 min, con una extensión final a 72°C durante 5 min. La presencia y tamaño de los productos amplificados se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100V durante 45 minutos. Los amplicones fueron visualizados mediante tinción con SYBR Green Safe DNA gel stain de Invitrogen y exposición a luz ultravioleta (UV) (Life Technologies TFK-20M, EE. UU.) y los tamaños de los productos de amplificación se estimaron en comparación con un estándar de tamaño molecular de 100 pb (Thermo Scientific™). Se utilizaron como controles positivos muestras con presencia de genes (ver Anexo II) y agua estéril libre de ADN como control blanco.

6.6. Identidad de la secuencia

Los productos de PCR amplificados se enviaron a Macrogen, Corea para secuenciación. Con el programa Bioedit (Hall, 1999), se editó el cromatograma y la secuencia recibida del servicio de secuenciación mediante inspección visual. Se corrigieron los errores típicos del secuenciador Sanger y se empalmaron las secuencias de cada primer para obtener una secuencia única. La identificación de las cepas se realizó utilizando BLAST en un servidor en línea del NCBI.

6.7. Producción de biofilm

Para determinar el potencial de los aislamientos para formar biofilm, realizamos el ensayo en placas de microtitulación y la formación de biofilm en superficies abióticas se cuantificó como describieron O'Toole & Kolter (O'Toole & Kolter 1998), con algunas modificaciones. Se realizó un precultivo de las cepas a estudiar en placas con TSB durante 24 horas a 37°C. A partir de estos cultivos, se realiza una dilución 1:10 para evaluar la formación de biofilm en placa duplicada. Se transfirió cada cepa a otra a 3 pocillos diferentes de una placa con TSB e incubaron 30 hs a 37°C. en TSB.

Cada placa de cultivo incluyó 12 pocillos con medio TSB sin inocular como control negativo. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS 1x, se secaron al aire y se tiñeron con una solución de violeta de cristal al 0.1% durante 15 min. Luego las microplacas se lavaron, se secaron al aire y el cristal violeta se disolvió en etanol al 95% (v/v). La intensidad de color se midió a 493 nm en un lector ELISA (BIOBASE BK-EL10C, China), y se expresó en valores de densidad óptica (OD). Los aislados que mostraron capacidad para producir biofilm se clasificaron como no formadores (Promedio de densidad óptica de la muestra (ODM) < Promedio de densidad óptica del control negativo (ODNC=0,07)), débiles (ODNC < ODM < 2*ODNC), moderados (2*ODNC < ODM < 4*ODNC) o fuertes (ODM > 4*ODNC)

(Angel Villegas et al. 2013). La producción de biofilm por cada cepa se determinó a partir de dos ensayos independientes y cada uno de estos incluyó triplicados para cada cepa.

6.8. Resistencia a los antimicrobianos

El perfil de resistencia de *Staphylococcus spp.* se determinó utilizando el método de difusión en disco. Las colonias aisladas, se seleccionaron de una placa de TSA (Tryptic Soy Agar) (Oxoid, Reino Unido) incubadas durante 24 horas. A partir de las mismas se realizó una suspensión equivalente a una McFarland 0.5 en suero fisiológico estéril. Utilizando un hisopo de algodón, se sembró la suspensión en una placa de agar Mueller Hinton (Oxoid, Reino Unido).

Se colocaron discos (Oxoid, Reino Unido) impregnados con antimicrobianos específicos en la superficie del agar. Los antimicrobianos incluyeron penicilina (10 unidades), cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), clindamicina (2 µg), enrofloxacin (5 µg) y eritromicina (15 µg). Después de 16 a 18 horas de incubación a 35 ± 2 °C, se examinó cada placa y los resultados se interpretaron de acuerdo con los puntos de corte del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para todos los antimicrobianos (CLSI 2023^a; CLSI 2023b).

6.9. Análisis estadístico

En el análisis descriptivo de los datos, determinamos frecuencias para varias categorías, incluyendo el tipo de mastitis, especies de *Staphylococcus*, presencia de genes de virulencia, formación de biofilm y resistencia antimicrobiana. Para explorar posibles asociaciones entre genes de virulencia y resistencia antimicrobiana, se realizaron pruebas de chi-cuadrado y residuos ajustados. Estas pruebas evaluaron si la presencia o ausencia de genes de virulencia específicos estaba significativamente asociada con la resistencia o sensibilidad antimicrobiana. Se consideraron valores *p* inferiores a 0,05 como indicativos de una asociación significativa entre el gen de virulencia y la resistencia antimicrobiana correspondiente.

Se realizó Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA) para reducir la dimensionalidad del conjunto de datos y visualizar grupos en dos y tres dimensiones. El MCA, diseñado para variables categóricas, transformó eficazmente nuestros datos categóricos multidimensionales en un espacio de menor dimensionalidad. Realizamos MCA tanto en dos como en tres dimensiones para optimizar la interpretabilidad y visualización. Después del MCA, el agrupamiento K-modos particionó el conjunto de datos en distintos clusters. El número óptimo de clusters se identificó utilizando el método de Silhouette con distancia de Hamming, asegurando agrupaciones bien definidas y distintas. El análisis de Silhouette evalúa la similitud de un objeto con su propio grupo en comparación con otros grupos. Para cada configuración de grupo, calculamos el puntaje de Silhouette promedio, que oscila entre -1 y +1, con puntajes más altos que indican grupos mejor definidos. K-modos, adecuado para datos categóricos, agrupó puntos de datos en función de modas.

Después del agrupamiento, cada grupo se examinó para identificar atributos prevalentes, proporcionando información sobre las características dominantes de cada

cluster. Todos los cálculos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R (R Core Team, 2020).

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento e identificación bacteriana

De los 191 aislamientos de *Staphylococcus spp.*, el 81.1% fueron identificados como *Staphylococcus aureus* mediante PCR específica de especie, confirmando la predominancia de este patógeno. Las cepas restantes revelaron una diversa variedad de especies de estafilococos no aureus (SNa), incluyendo *Staphylococcus borealis* (n=13), *Staphylococcus chromogenes* (n=12), *Staphylococcus haemolyticus* (n=5), *Staphylococcus saprophyticus* (n=3), *Staphylococcus capitis* (n=1), *Staphylococcus ratti* (n=1) y *Staphylococcus pasteurii* (n=1). Estas cepas compartieron una alta homología genética, con porcentajes que oscilaron entre el 99% y el 100%.

7.2. Detección de factores de virulencia y genes de biofilm en *Staphylococcus aureus*

La Tabla 1 y el Gráfico 1 ilustra la frecuencia general de genes encontrados tanto en *S. aureus* como en SNa. Entre los 155 aislamientos de *S. aureus*, el 3.9% (6/155) resultó positivo para el gen de la enterotoxina A (*sea*), el 2.6% (4/155) para el gen de la enterotoxina B (*seb*), el 7.7% (12/155) para el gen de la enterotoxina C (*sec*) y el 1.9% (3/155) para el gen de la enterotoxina D (*sed*). Notablemente, el 63.9% (99/155) llevaba el gen de la leucocidina Pantón-Valentine (*pvl*), el 8.4% (13/155) albergaba el gen de la toxina del síndrome del shock tóxico-1 (*tst*) y el 96.8% (150/155) resultó positivo para el gen de la hemolisina A (*hla*), con todas las cepas dando positivo para el gen de la hemolisina B (*hlyB*). En cuanto a los genes asociados con la formación de biofilms, el 98.0% (152/155) y el 87.7% (136/155) fueron identificados con los genes *icaA* e *icaD*, respectivamente. Los resultados para los genes que codifican proteínas de adhesión fueron los siguientes: el 98.7% (153/155) para la proteína A de unión a fibronectina (*fnbpA*), el 21.9% (34/155) para la proteína B de unión a fibronectina (*fnbpB*) y el 98.0% (152/155) para el gen del factor de aglutinación A (*clfA*). Además, el 3.9% (6/155) dio positivo para el gen de la proteína asociada a biopelículas (*bap*).

Tabla 1. Detección de genes asociados con adhesión, biofilm y factores de virulencia.

Factor	Gen	Especies (n/%)								Total SNa (n/%)
		<i>S. aureus</i> (n=155)	<i>S. borealis</i> (n=13)	<i>S. chromogenes</i> (n=12)	<i>S. haemolyticus</i> (n=5)	<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	<i>S. capitis</i> (n=1)	<i>S. rattii</i> (n=1)	<i>S. pasteurii</i> (n=1)	
Superantígenos	<i>sea</i>	6/3,9	1/7,7	1/8,3	1/20,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	3/8,3
	<i>seb</i>	4/2,6	2/15,3	0/0,0	1/20,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	3/8,3
	<i>sec</i>	12/7,7	0/0,0	4/33,3	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	4/11,1
	<i>sed</i>	3/1,9	0/0,0	0/0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0
	<i>tst</i>	13/8,4	0/0,0	0/0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0
Leucocidinas	<i>pvl</i>	99/63,9	10/76,9	1/8,3	2/40,0	2/66,6	0/0,0	0/0,0	0/0,0	15/41,6
Hemolisinas	<i>hla</i>	150/96,8	13/100,0	2/16,6	3/60,0	1/33,3	0/0,0	0/0,0	0/0,0	17/47,2
	<i>hly</i>	155/100,0	13/100,0	1/8,3	4/80,0	0/0,0	1/100,0	0/0,0	0/0,0	17/47,2
PIA	<i>icaA</i>	152/98,0	12/92,3	0/0	4/80,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	16/44,4
	<i>icaD</i>	136/87,7	10/76,9	0/0	4/80,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	14/38,9
Adhesinas	<i>bap</i>	6/3,9	0/0,0	0/0	0/0,0	2/66,6	0/0,0	0/0,0	0/0,0	2/5,5
	<i>fnbpA</i>	153/98,7	13/100,0	0/0	4/80,0	0/0,0	1/100,0	0/0,0	0/0,0	18/50,0
	<i>fnbpB</i>	34/21,9	2/15,3	1/8,3	2/40,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	5/13,9
	<i>clfA</i>	152/98,0	13/100	1/8,3	4/80,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	0/0,0	18/50,0

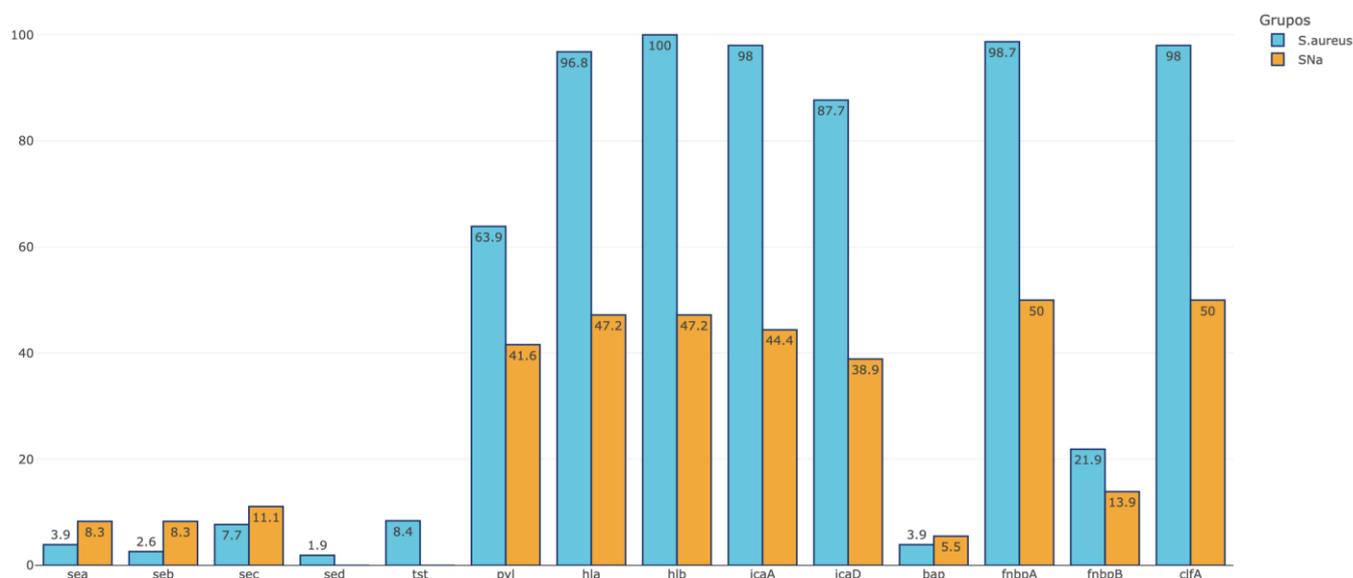


Figura 1. Porcentaje de aislamientos positivos y negativos a los distintos genes buscados.

7.3. Detección de factores de virulencia y genes de biofilms en estafilococos no aureus

Entre las 36 cepas de SNa identificadas, el 8.3% (3/36) resultaron positivas para los genes *sea* y *seb*, el 8.3% (3/36) para *seb* y el 11.1% (4/36) para *sec*. Ninguna cepa (0/36) dio positivo para el gen *sed*. Además, el 41.6% (15/36) fue positivo para *pvl* y

ninguna (0/36) para *tst*. Además, el 47.2% (17/36) dio positivo para ambos genes *hla* y *hlb*. En cuanto a los genes de biofilm y adhesión, el 44.4% (16/36) fue positivo para *icaA*, el 38.9% (14/36) para *icaD* y el 50.0% (18/36) para *fnbpA*. Para *fnbpB*, el 13.9% (5/36) de las cepas dio positivo, mientras que el 50.0% (18/36) fue positivo para *clfA* y el 5.5% (2/36) para el gen *bap*. Los resultados por especie se describen en la Tabla 1.

7.4. Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en *Staphylococcus spp.* (como se muestra en la Tabla 2) revelaron niveles variables de resistencia contra antimicrobianos. Predominantemente, se observó una alta sensibilidad en la mayoría de los antimicrobianos probados. Para la penicilina, de las muestras totales, 33 (17.2%) mostraron resistencia. Todas las cepas mostraron sensibilidad tanto a gentamicina como a cefoxitina. En el caso de la eritromicina, 18 (9.4%) fueron resistentes, y se observó una respuesta intermedia en 4. Para la clindamicina, 16 muestras mostraron resistencia (8.4%), y 3 exhibieron un perfil intermedio. Las pruebas de sensibilidad a tetraciclina revelaron 2 resistentes (1.0%) y 8 con reacciones intermedias. Por último, con respecto a la enrofloxacin, 3 mostraron una respuesta intermedia. La resistencia por especie se puede ver en la tabla 3, donde el 62%, 15% y 8% de los *S. borealis* mostraron resistencia a penicilina, eritromicina y clindamicina respectivamente. El 42% y 8% de los *S. chromogenes* mostraron resistencia a penicilina y a eritromicina respectivamente. El 80% de los *S. haemolyticus* fue resistente a la penicilina y de los 3 *S. saprophyticus* 1 mostró resistencia a la penicilina y los otros 2 a clindamicina y eritromicina.

Tabla 2. Porcentaje de sensibilidad a distintos antimicrobianos

Antimicrobiano	Sensible(%)	Intermedio(%)	Resistente(%)
Penicilina	82,8	0,0	17,2
Cefoxitin	100,0	0,0	0,0
Eritromicina	88,5	2,1	9,4
Clindamicina	90,0	1,6	8,4
Gentamicina	100,0	0,0	0,0
Tetraciclina	94,8	4,2	1,0
Enrofloxacin	98,4	1,6	0,0

Tabla 3. Distribución de resistencia por especie

	<i>n</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. borealis</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. ratti</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. pasteurii</i>
Penicilina	33	15	8	5	4	1	-	-	-
Eritromicina	22	17	2	1	-	2	-	-	-
Clindamicina	19	16	1	-	-	2	-	-	-
Tetraciclina	10	10	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	3	3	-	-	-	-	-	-	-

cepas resistentes incluye las cepas con resistencia y con resistencia intermedia

7.5. Genes Asociados con Resistencia en Muestras Resistentes

Entre las 33 muestras que mostraron resistencia a la penicilina, 32 (97%) albergaban el gen *blaZ*. En el caso de las 18 muestras resistentes a eritromicina, ninguna mostró los genes *ermA* y *ermB*, mientras que 15 (83%) de ellas llevaban el gen *ermC*.

7.6. Asociaciones entre genes de virulencia y patrones de resistencia antimicrobiana

En el análisis de la asociación entre genes de virulencia y resistencia a antibióticos, se observó una correlación significativa entre la presencia del gen *sea* y la resistencia a la penicilina. La prueba de chi-cuadrado reveló que la presencia del gen *sea* está asociada significativamente con la resistencia a la penicilina ($p = 0,0004$), con un residuo ajustado de 4.0149, indicando una mayor presencia de este gen en cepas resistentes a penicilina en comparación con las cepas sensibles. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre la presencia de los genes *sea* y *seb* y la resistencia a otros antibióticos como eritromicina, clindamicina, tetraciclina y enrofloxacin (p > 0.05). lo mismo se observa con el gen *tst* y la resistencia a eritromicina y clindamicina ($p = 0,00689$ y $0,00208$ respectivamente). La presencia de los genes *hla*, *hlb*, *pvl*, *icaA*, *fnbpA* y *clfA* mantuvo relación con la resistencia a penicilina. EL número de cepas con ausencia y presencia de los genes según la resistencia observada se puede ver en la tabla 4 y los valores de p se detallan en la Tabla 5.

Tabla 4. Distribución de la presencia y ausencia de genes de virulencia en cepas de *Staphylococcus spp* según la resistencia a distintos antibióticos.

Gen	Penicilina		Eritromicina		Clindamicina		Tetraciclina		Enrofloxacin	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
<i>sea (+)</i>	6	3	2	7	1	8	0	9	0	9
<i>sea (-)</i>	27	155	20	162	18	164	10	172	3	179
<i>seb (+)</i>	0	7	0	7	0	7	0	7	0	7
<i>seb (-)</i>	33	151	22	162	19	165	10	174	3	181
<i>sec (+)</i>	2	14	4	12	4	12	1	15	0	16
<i>sec (-)</i>	31	144	18	157	15	160	9	166	3	172
<i>sed (+)</i>	0	3	0	3	0	3	1	2	0	3
<i>sed (-)</i>	33	155	22	166	19	166	9	179	3	185
<i>tst (+)</i>	0	13	5	8	5	8	1	12	0	13
<i>tst (-)</i>	33	145	17	161	14	164	9	169	3	175
<i>hla (+)</i>	25	144	19	150	17	152	10	159	3	166
<i>hla (-)</i>	8	14	3	19	2	20	0	22	0	22
<i>hlb (+)</i>	26	148	20	154	17	157	10	164	3	171
<i>hlb (-)</i>	7	10	2	15	2	15	0	17	0	17
<i>pvl (+)</i>	14	100	15	99	13	101	7	107	3	111
<i>pvl (-)</i>	19	58	7	70	6	71	3	74	0	77
<i>fnbpA (+)</i>	25	146	19	152	17	154	10	161	3	168
<i>fnbpA (-)</i>	8	12	3	17	2	18	0	20	0	20
<i>fnbpB (+)</i>	10	29	8	31	6	33	2	37	1	38

<i>fnbpB</i> (-)	23	129	14	138	13	139	8	144	2	150
<i>clfA</i> (+)	24	146	20	150	17	153	10	160	3	167
<i>clfA</i> (-)	9	12	2	19	2	19	0	21	0	21
<i>icaA</i> (+)	24	144	19	149	17	151	10	158	3	165
<i>icaA</i> (-)	9	14	3	20	2	21	0	23	0	23
<i>icaD</i> (+)	23	127	14	136	12	138	9	141	3	147
<i>icaD</i> (-)	10	31	8	33	7	34	1	40	0	41
<i>bap</i> (+)	2	6	3	5	2	6	0	8	0	8
<i>bap</i> (-)	31	152	19	164	17	166	10	173	3	180

R: cepas resistente (incluye las cepas con resistencia y con resistencia intermedia), S: cepas sensibles

Tabla 5. Resultados de la prueba de chi-cuadrado (valores p) para genes de virulencia y resistencia a antibióticos

Gen	Penicilina	Eritromicina	Clindamicina	Tetraciclina	Enrofloxacina
<i>sea</i>	0,00040*	0,62020	1,00000	1,00000	1,00000
<i>seb</i>	0,46990	0,71180	0,80060	1,00000	1,00000
<i>sec</i>	0,85510	0,17520	0,09590	1,00000	1,00000
<i>sed</i>	0,97750	1,00000	1,00000	0,37030	1,00000
<i>tst</i>	0,18453	0,00689*	0,00208*	1,00000	1,00000
<i>hla</i>	0,02658*	0,02660*	1,00000	1,00000	0,50716
<i>hlb</i>	0,01663*	1,00000	1,00000	0,65634	1,00000
<i>pvl</i>	0,04261*	0,52699	0,56763	0,72490	0,40000
<i>fnbpA</i>	0,01146*	0,88444	1,00000	0,56160	1,00000
<i>fnbpB</i>	0,18976	0,09080	0,33114	1,00000	1,00000
<i>clfA</i>	0,00288*	1,00000	1,00000	0,53360	1,00000
<i>icaA</i>	0,00777*	1,00000	1,00000	0,48213	1,00000
<i>icaD</i>	0,26003	0,12522	0,15393	0,60895	0,83830
<i>bap</i>	0,91039	0,07410	0,39542	1,00000	1,00000

7.7. Formación de biofilm

Entre los 191 aislamientos de estafilococos, observamos una importante variación en la formación de biofilm entre las cepas. En general, el 2.61% se categorizó como no formadores de biofilms (NFB), el 24.60% como debiles formadores de biofilms (DFB), el 47.12% como moderados formadores de biofilms (MFB) y el 25.67% como fuertes formadores de biofilms (FFB). Al estratificar las cepas por especie, observamos que el 1.9% de las cepas de *S. aureus* fueron NFB, el 25.2% fueron DBF, el 50.1% fueron MFB y el 21.9% fueron FFB. En contraste, para los SNa, la distribución fue del 5.6% NFB, el 22.2% DFB, el 30.6% MFB y el 41.7% FFB (Figura 2).

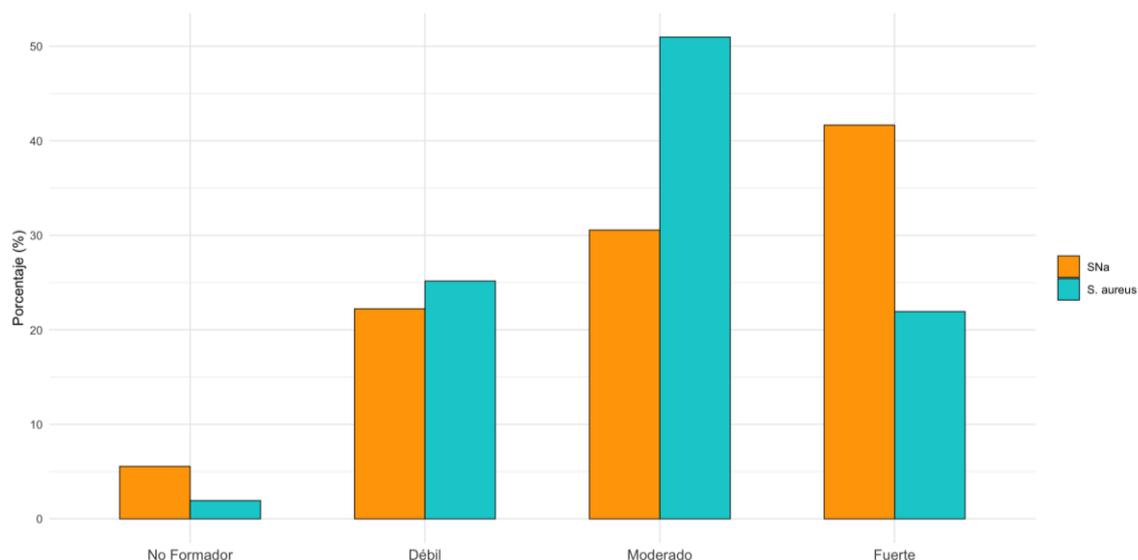


Figura 2. Categorías de formación de biofilm según grupo bacteriano

7.8. Asociación entre presencia de genes y formación de biofilm

El análisis estadístico de la relación entre la presencia de genes específicos (*fnbpA*, *fnbpB*, *clfA*, *icaA*, *icaD* y *bap*) y la formación de biofilm en cepas estudiadas reveló patrones significativos en la distribución de residuos ajustados y valores de chi-cuadrado que pueden verse en la figura 3 y en la tabla 6.

Tabla 6. Distribución de la presencia y ausencia de genes asociados con la formación de biofilm en cepas de *Staphylococcus spp* y sus valores de p.

Gen	NFB	DFB	MFB	FFB	valor p
<i>fnbpA</i> (+)	3	40	85	43	0.043*
<i>fnbpA</i> (-)	2	7	5	6	
<i>fnbpB</i> (+)	1	8	17	13	0.092
<i>fnbpB</i> (-)	4	39	73	36	
<i>clfA</i> (+)	3	40	83	44	0.073
<i>clfA</i> (-)	2	7	7	5	
<i>icaA</i> (+)	3	40	83	42	0.049*
<i>icaA</i> (-)	2	7	7	7	
<i>icaD</i> (+)	2	37	73	38	0.160
<i>icaD</i> (-)	3	10	17	11	
<i>bap</i> (+)	1	1	3	3	0.396
<i>bap</i> (-)	4	46	87	46	

FFB: fuerte formador de biofilm, MFB: moderado formador de biofilm, DFB: débil formador de biofilm, NFB: no formador de biofilm.



Figura 3. Distribución de genes: presencia/ausencia y residuo ajustado en diversas categorías de formación de biofilm

El análisis de la asociación entre los genes y las categorías de formación de biofilm reveló hallazgos significativos para los genes *fnbpA*, *clfA* e *icaA*. El gen *fnbpA* mostró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con la formación de biofilm, especialmente en cepas de moderada formación (MFB) donde el valor de residuo ajustado indica que hay muchas más cepas con presencia de lo esperado para indicar independencia de las variables. El gen *clfA* también mostró un patrón significativo ($p < 0.10$) en relación con la formación de biofilm, especialmente en cepas de biofilm moderado (MFB) y débil (DFB). Aunque el valor p no alcanzó el umbral de significancia del 0.05, las observaciones sugieren una tendencia hacia una mayor asociación con la presencia del gen *clfA*. El gen *icaA* presentó resultados significativos ($p < 0.05$) en todas las categorías de biofilm, con una notable correlación en las cepas de biofilm moderado (MFB). En contraste, los genes *bap*, *icaD* y *fnbpB* no mostraron significancia estadística ($p > 0.05$). Los valores de los residuos ajustados para estos genes sugieren que no contribuyen de manera destacada a la variación observada en la formación de biofilm.

7.9. Análisis de Clusters y reducción de dimensionalidad

Se realizó Análisis de Correspondencias Múltiples (MCA) para reducir la dimensionalidad del conjunto de datos y visualizar grupos. El gráfico Scree (Figura 4), nos permite ver que el 41,8% de la variabilidad se explicaba en las 3 primeras dimensiones. Por lo tanto se procedió a realizar una reducción en 3D (Figura 6).

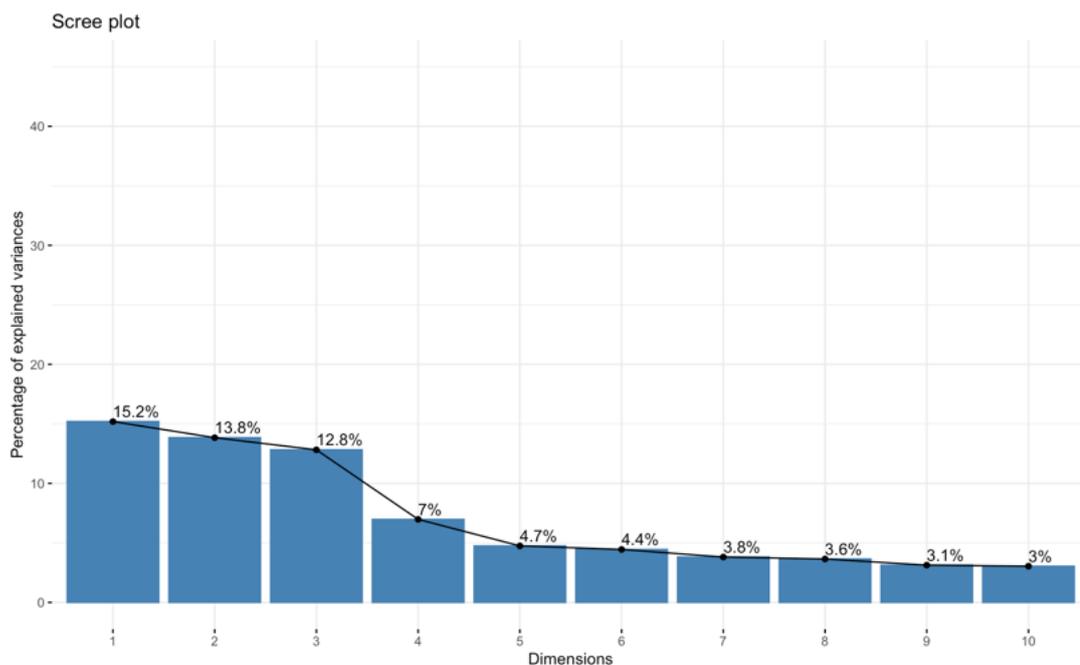


Figura 4. Porcentaje de variabilidad explicada por cada componente

En la exploración de la heterogeneidad entre estas cepas bacterianas, se empleó el análisis de agrupamiento k-modos para separar en 4 clusters. La configuración con el puntaje de Silhouette promedio más alto guió la segmentación de los datos en cuatro grupos distintos como se observa en la figura 5.

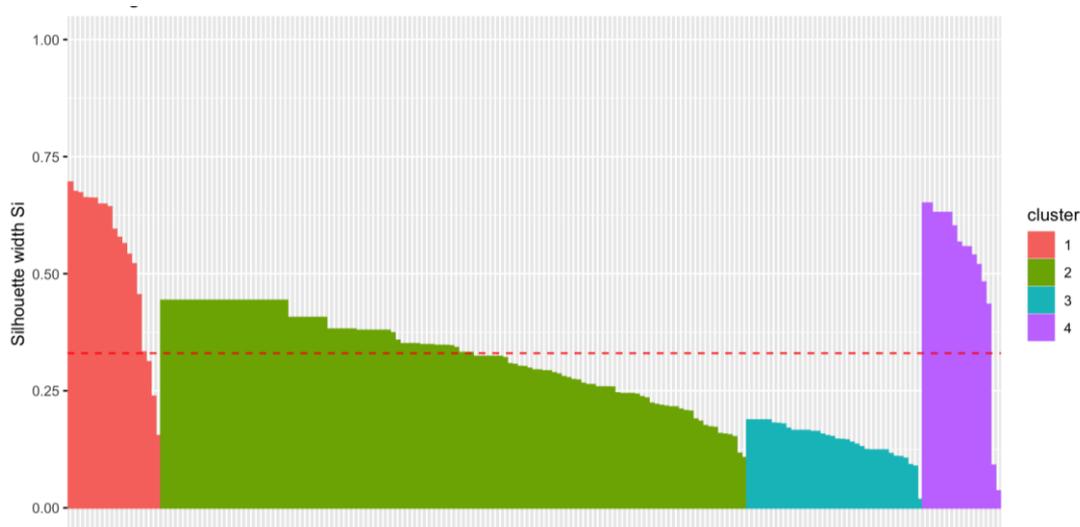


Figura 5. Puntaje de Silhouette para la cepas estudiadas agrupadas en 4 clusters

Tener en cuenta que no se toma la característica de especie para realizar los análisis de MCA y de clusters.

Cluster 1 (n=16): incluyó predominantemente cepas causantes de mastitis subclínica causada por *Staphylococcus aureus*. Estas cepas fueron principalmente positivas para genes como *pvl*, *hla*, *hly*, *icaA*, *icaD*, *fnbpA* y *clfA*, mostraron una formación de biofilm fuerte y fueron notablemente resistentes a la penicilina y sensibles a los otros antimicrobianos listados. Cluster 2 (n=19): consistió principalmente en cepas causantes de mastitis clínica que llevaban los mismos genes que el cluster 1 pero diferían al mostrar una formación débil de biofilm y resistencia a eritromicina y

clindamicina. Cluster 3 (n=137): en su mayoría abarcaba cepas causantes de mastitis clínica causada por *Staphylococcus aureus*, predominantemente positivas para genes como *pvl*, *hla*, *hly* y *clfA*, mostrando una formación moderada de biofilm. Grupo 4 (n=19): compuesto por cepas SNa que mostraron una formación de biofilm variable. La mayoría de ellas no presentaban virulencia, pero demostraban una notable resistencia a la penicilina. Las particularidades de cada cluster pueden visualizarse en la figura 6 y las especies que integran cada uno en la tabla 7.

Tabla 5. Distribución de especies en los distintos clusters

	<i>n</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. borealis</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. ratti</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. pasteurii</i>
Cluster 1	16	13	1	-	1	1	-	-	-
Cluster 2	19	19	-	-	-	-	-	-	-
Cluster 3	137	122	12	-	3	-	-	-	-
Cluster 4	19	1	-	12	1	2	1	1	1

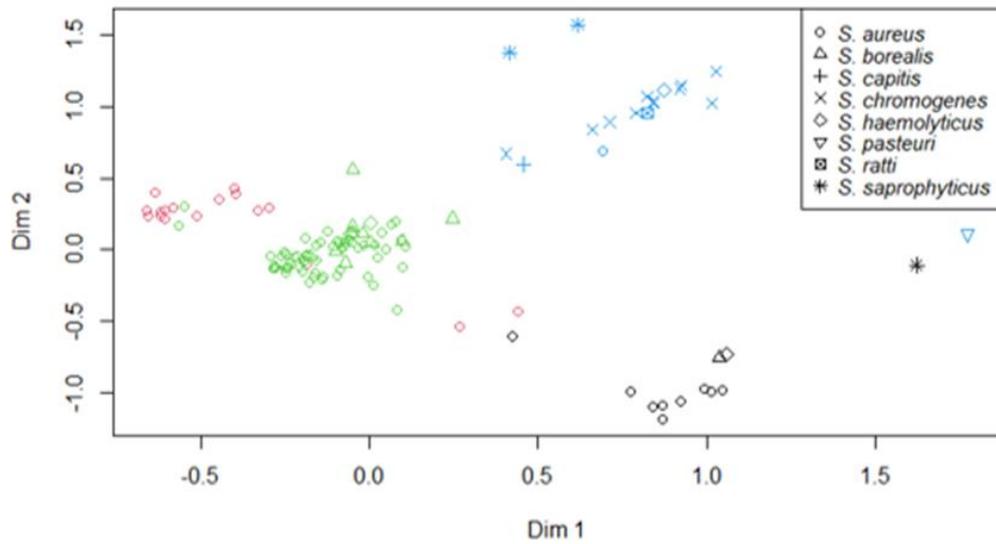
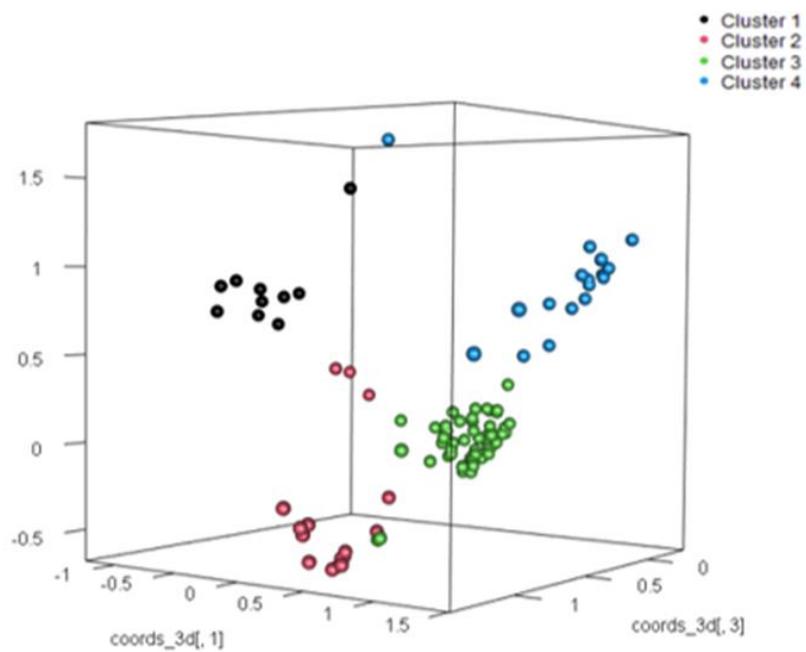
A**B**

Figura 6. Visualización del espacio MCA de los diferentes clusters en 2 y 3 dimensiones. En el gráfico A, la forma de los puntos representa las especies de estafilococos y los colores representan los diferentes clusters asignados. En el gráfico B puedes visualizar los diferentes clusters en 3D.

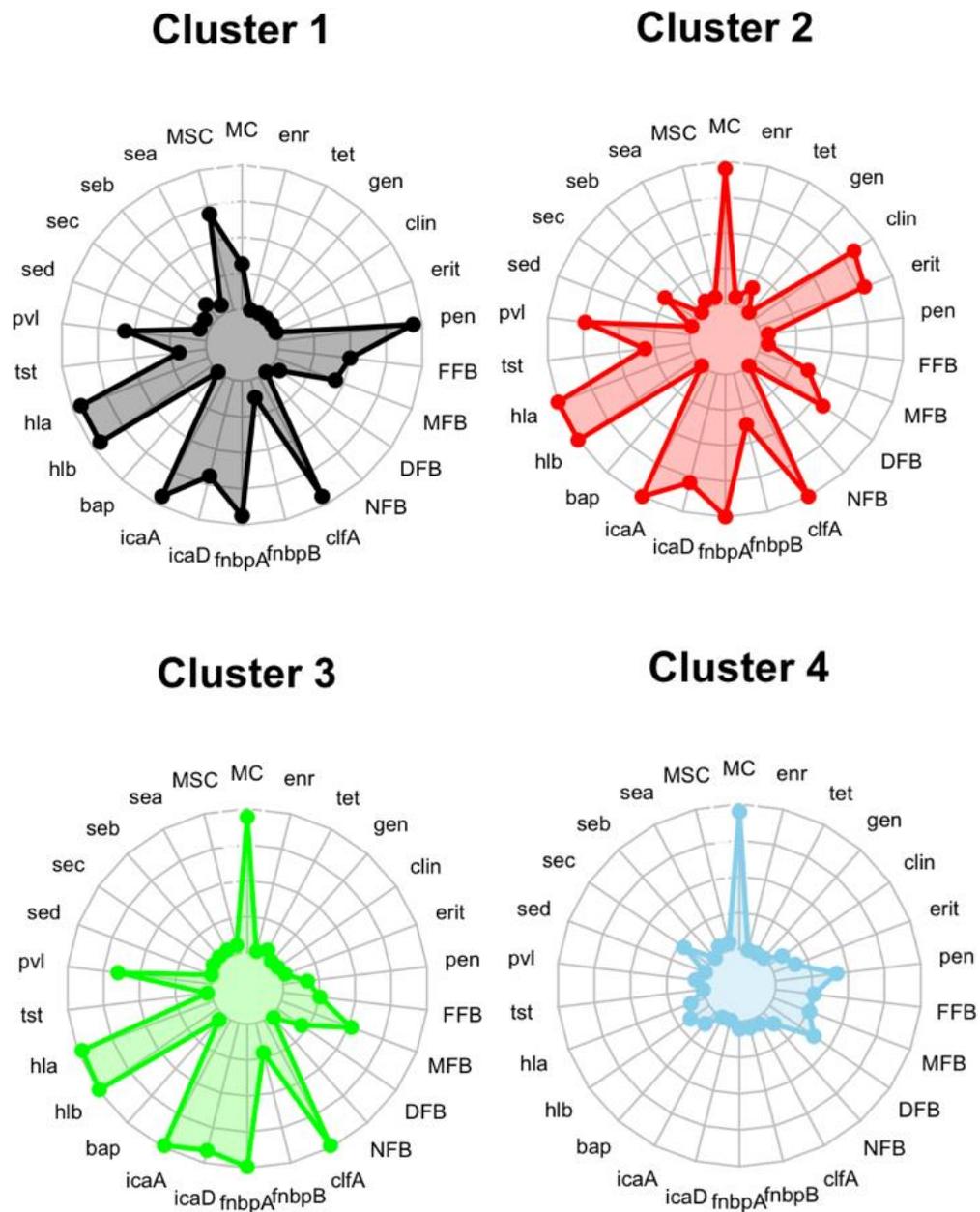


Figura 6. Gráfico radial representando los porcentajes de presencia de genes y resistencia de cada cluster.

MC: mastitis clínica, MSC: mastitis subclínica, enr: resistencia a enrofloxacina, tet: resistencia a tetraciclina, gen: resistencia a gentamicina, clin: resistencia a clindamicina, pen: resistencia a penicilina, FFB: fuerte formador de biofilm, MFB: moderado formador de biofilm, DFB: débil formador de biofilm, NFB: no formador de biofilm.

8. DISCUSION

La mastitis bovina sigue siendo una preocupación primordial dentro de la producción lechera, en gran medida atribuible a las considerables repercusiones económicas directas e indirectas que conlleva. Se ha implicado a una variedad de bacterias en la infección de mastitis, siendo los estafilococos considerados uno de los agentes causales más significativos y prevalentes en varios países (Ruegg 2017). De manera intrigante, estos microorganismos han experimentado adaptaciones evolutivas, manifestándose en una serie de mecanismos moleculares dirigidos a eludir las

defensas inmunológicas del hospedero. Es imperativo enfatizar que estos mecanismos adaptativos no están intrínsecamente incorporados dentro del ADN estructural. En su lugar, se adquieren a través de elementos genéticos móviles, facilitando la transmisión entre cepas (Pérez et al. 2020). Dadas estas observaciones, la comprensión del potencial de virulencia inherente a las cepas bacterianas regionales se vuelve indispensable para la formulación de estrategias de intervención eficaces. Tales esfuerzos estratégicos no deberían limitarse únicamente al ámbito de los antimicrobianos que demuestran susceptibilidad bacteriana, sino que deberían abarcar la exploración de nuevas vías terapéuticas (Tomanić et al. 2023), incluyendo compuestos anti-virulencia, que prometen atenuar la patogenicidad bacteriana (Sabino et al. 2023).

En los laboratorios de diagnóstico rutinario de mastitis, los SNa generalmente no se distinguen por especie, sino que se clasifican colectivamente como un grupo único. Como resultado, hay escasez de información sobre la epidemiología y la importancia comparativa de las diversas especies dentro de este grupo (Yang et al. 2023); algunas de ellas, capaces de causar infecciones tanto en el ganado como en los humanos, también pueden representar el riesgo de transmisión zoonótica (Vishnupriya et al. 2014). El grupo de SNa aislado de muestras de leche bovina comprende más de 50 especies distintas asociadas a infecciones intramamarias y presentes en leche de tanque, con su distribución evolucionando con el tiempo y diferenciándose en diversas regiones (Pyörälä & Taponen, 2009; Vanderhaeghen et al., 2015). Este estudio es de los pocos informes publicados sobre la identificación de especies SNa causantes de mastitis bovina en Uruguay, en otro trabajo reciente donde se identificaron especies SNa encontraron presencia de *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* y *S. warneri* (de los Santos et al., 2022). Las especies predominantes de SNa encontradas en nuestro estudio fueron *S. borealis* (36% de SNa) y *S. chromogenes* (33%). *Staphylococcus chromogenes* es una especie común aislada de vacas con mastitis, mientras que *S. borealis* es mucho menos frecuente. *S. chromogenes* ha sido identificado como la especie más prevalente en aislamientos en leche de vacas sanas y de vacas con mastitis clínica o subclínica (Valckenier et al., 2020). *S. chromogenes* puede superar la barrera física de la glándula mamaria y formar biofilms. Además, esta especie está más adaptada a la glándula mamaria de la vaca y puede convertirse en un reservorio microbiano y una posible fuente de infección (Crippa et al., 2024). Tanto los *S. chromogenes* como los *S. haemolyticus* son asociados a casos clínicos (Persson Waller et al., 2023).

Staphylococcus borealis es una nueva especie de SNa descrita en 2020 basada en seis aislamientos humanos (Pain et al. 2020). Debido a su similitud genética con *S. haemolyticus*, algunas de estas cepas fueron identificadas inicialmente como tal, pero más tarde, con secuenciación de genoma completo, fueron identificadas como *S. borealis* (Król et al. 2023). Las otras especies aisladas ya han sido reportadas como poco frecuentes en varios estudios (Raspanti et al., 2016; Wanecka et al. 2018; Jenkins et al. 2019), excepto por *Staphylococcus ratti*, para el cual no existen registros publicados como agente etiológico de mastitis.

Las cepas de *S. aureus* y SNa son cada vez más reconocidas como notables patógenos transmitidos por los alimentos, principalmente debido a su propensión a la producción de enterotoxinas. El papel definitivo de estas enterotoxinas en la patogénesis de la

mastitis bovina aún debe ser dilucidado; sin embargo, su detección en la leche sin duda eleva las preocupaciones de salud pública. Es importante destacar que estas enterotoxinas exhiben una notable estabilidad térmica, preservando su bioactividad incluso después de los procesos de pasteurización (Hennekinne et al. 2012). Las ubres afectadas por infecciones por estafilococos enterotoxigénicos representan reservorios potenciales que introducen estas toxinas en la leche, lo que, al ser consumido, puede desencadenar trastornos gastrointestinales y complicaciones adicionales en los seres humanos (Tarekgne et al. 2016). En la presente investigación, nos embarcamos en un análisis de todas las cepas de estafilococos para determinar la prevalencia de los genes de las enterotoxinas estafilocócicas en los aislamientos de nuestro trabajo, específicamente *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *tst*, obteniendo bajos porcentajes de presencia de genes, 4.7%, 3.7%, 8.4%, 1.6% y 6.8% respectivamente. Esto concuerda con los resultados obtenidos en Brasil, donde las cepas estudiadas de diferentes áreas presentaron bajos porcentajes para los genes que codifican las enterotoxinas (Mello et al. 2016; Pérez et al. 2020), a diferencia de lo que se ha encontrado en investigaciones realizadas en China e India, donde se encontró una alta prevalencia de genes de enterotoxinas (Wu et al. 2016; Mahato et al. 2017; Roshan et al. 2022; Wang et al. 2018; Jung & Lee 2022). Esto demuestra la variabilidad que existe en la virulencia de las cepas de estafilococos. Cabe señalar que el porcentaje de genes *sec* encontrados es el más alto, la concentración de enterotoxina C (SEC) en las secreciones de la glándula mamaria aumentó con la gravedad de la mastitis, lo que indica un papel importante de SEC en la patología de la mastitis bovina estafilocócica y siendo un claro objetivo para terapias alternativas (Cui et al. 2010; Artursson et al. 2016).

Las hemolisinas, particularmente la hemolisina α (*hla*) y la hemolisina β (*hlb*), desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de *Staphylococcus aureus* en la mastitis bovina. Las hemolisinas α y β contribuyen a la invasión bacteriana y a escapar de la respuesta inmune del hospedero, permitiendo una mayor persistencia del patógeno en la glándula mamaria, causando infecciones crónicas (Pérez, Costa, et al., 2020). En este estudio, un abrumador 96,8% de los aislamientos de *S. aureus* dieron positivo para el gen de la hemolisina α , y el 100% de los aislamientos fueron positivos para el gen de la hemolisina β , y todas las cepas de *S. borealis* albergaban los genes *hla* y *hlb*. Una observación interesante que contrasta con estas cepas es que dentro de las otras cepas de SNa, apenas el 22.2% albergaban ambos genes *hla* y *hlb*. Esta marcada diferencia en la prevalencia de los genes *hla* y *hlb* entre las especies subraya la variación potencial en virulencia y patogenicidad entre estos grupos bacterianos observados en otros estudios (Yang et al. 2023).

El gen de la leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*) es un factor de virulencia notable que se ha asociado con infecciones graves de la piel y tejidos blandos y se considera como la toxina con el efecto más fuerte en las células inmunes (Abril et al. 2020). Se encontró que una proporción sustancial de los aislamientos de *S. aureus* (63.9%) y SNa (41.6%) albergaban el gen *pvl*. Esta alta prevalencia subraya la virulencia potencial de estas cepas y su capacidad para causar infecciones graves en bovinos. La presencia del gen *pvl* en una proporción significativa de los aislamientos de *S. aureus*

sugiere que estas cepas podrían tener una capacidad mejorada para causar necrosis y daño tisular, lo que podría exacerbar la gravedad de la mastitis en los animales afectados (Jia et al. 2020). Estudios en medicina humana han demostrado que la presencia del gen *pvl* está asociada con resistencia a los antimicrobianos (Otter & French 2010; Dubos et al. 2014; Zeouk et al. 2021), esto coincide con nuestro análisis estadístico donde encontramos que la presencia de *pvl* está asociada con resistencia a la penicilina con un valor de $p=0.042$.

Los resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana realizadas en esta colección de cepas revelaron una alta susceptibilidad general a la mayoría de los antimicrobianos evaluados, con algunas excepciones como penicilina, pero siendo esta resistencia baja en comparación con estudios de resistencia en cepas aisladas de mastitis. El 17.2%, de las cepas mostraron resistencia a la penicilina y esta se correlaciona con la presencia del gen *blaZ* en el 97% de estas cepas, indicando un posible mecanismo común de resistencia mediado por β -lactamasas.

Con respecto a las cepas SNa cabe destacar un alto porcentaje de resistencia a la penicilina donde el 62%, el 42% y el 80% de los *S. borealis*, *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* respectivamente mostraron resistencia. Esto está de acuerdo con reportes de resistencia en especies SNa donde en general los porcentajes son altos, y las especies SNa son conocidas como más resistentes que las especies de *S. aureus* a diferentes drogas presentando baja tasa de curación (Crippa et al., 2024). La resistencia asociada a SNa puede estar relacionada a que estas cepas son habitantes comensales de las vacas, estando más expuestas a distintos residuos de antibióticos (Khazandi et al., 2018). Las cepas de *S. haemolyticus* se consideran como posible reservorio de genes de resistencia (*SCCmec* cassette) para otras especies de estafilococos como *S. aureus* (Czekaj et al., 2015).

Los biofilms son comunidades estructuradas de bacterias que están dentro de una matriz extracelular autogenerada, la cual puede proporcionar a las bacterias una mejor resistencia a los antimicrobianos y a la respuesta inmune del hospedero. La capacidad de formar biofilms puede conferir ventajas a las bacterias, especialmente en infecciones crónicas (Felipe et al. 2017; Pérez et al. 2020). En el ensayo basado en placas de microtitulación para determinar la capacidad de formar biofilm, se observó una variación notable entre cepas. Mientras que la mayoría de las cepas mostraron una capacidad moderada para formar biofilms, es interesante destacar la distinción entre *S. aureus* y SNa donde las cepas de SNa tenían una proporción más alta de fuertes formadores de biofilms.

Los genes *icaA* y *icaD* forman parte del operón *ica*, que es responsable de la producción de adhesina intercelular de polisacárido (PIA), un componente importante de la matriz del biofilm en estafilococos. El PIA promueve la adhesión célula a célula y es crucial para el establecimiento de un biofilm maduro (Götz 2002). En *S. aureus*, se encontró que el 98% de los aislamientos albergaban el gen *icaA* y el 87.7% eran positivos para *icaD*. Esta alta prevalencia indica que una gran mayoría de los aislamientos de *S. aureus* en este estudio tienen el potencial genético para formar biofilms robustos, aunque en la prueba in vitro el 28% mostró formación de biofilm débil o nula. En contraste, los SNa mostraron el mismo porcentaje de formación de

biofilm débil o nula y un porcentaje más alto de formación de biofilm fuerte pero una prevalencia notablemente menor para los genes *icaA* (44.4%) y *icaD* (38.9%), principalmente los aislamientos de *S. borealis* que fueron positivos. Esto indica que puede estar funcionando un proceso de formación de biofilm independiente de *ica* en estas cepas, consistente con estudios previos (Chokr et al., 2006; Christner et al., 2010). Las proteínas superficiales y secretoras pueden reemplazar la función del PIA durante el desarrollo del biofilm en cepas de estafilococos deficientes en *ica* (O’Gara 2007). Esto implica que *S. aureus* puede emplear múltiples mecanismos de patogenicidad para producir biofilm sin la necesidad de un gen específico (Pérez et al. 2020).

En cuanto a los genes de proteínas de adhesión, las cepas de *S. aureus* exhibieron un alto porcentaje de *fnbpA* (98.7%) y *clfA* (98.0%), en línea con investigaciones previas que indican la importancia de estas proteínas en la patogenicidad de *S. aureus* (Singh et al. 2010; Felipe et al. 2017; Speziale & Pietrocola 2020). En contraste, el gen *fnbpB* fue menos prevalente, presente en solo el 21.9% de las cepas. Para las cepas de SNa, la presencia de estos genes fue notablemente menor, con un 50% que tenía *fnbpA* y *clfA*, y solo un 13.9% que tenía *fnbpB*. En las cepas que formaron parte de este estudio se observó una correlación entre la presencia de estos genes y la formación de biofilm, ya que las cepas portadoras mostraban una mayor propensión a formarlos de forma moderada, confirmado por los resultados de la prueba de chi-cuadrado. En las cepas de *S. aureus*, la mayoría formó biofilm moderado, especialmente aquellas con *fnbpA* y *clfA*. Del mismo modo, en las cepas negativas a *S. aureus*, las que tenían *fnbpB* mostraron una marcada tendencia a formar biofilm fuerte. En el desarrollo de la arquitectura de los biofilms de *S. aureus*, FnbpA se destaca como un componente crucial, ya que es necesario y suficiente para la formación de la estructura del biofilm (Gries et al., 2020). A diferencia de FnbpB, que no es necesario para este desarrollo, FnbpA desempeña un papel dominante en la unión a fibronectina (Fn), incluso cuando ambos poseen alta homología en sus dominios de unión (McCourt et al., 2014). Ambas proteínas, FnbpA y FnbpB, son grandes y de multidominio, ancladas a la pared celular, y además de su papel en la unión a la fibronectina, también promueven la acumulación intercelular y el desarrollo del biofilm. La formación de biofilm mediada por estas proteínas es independiente del mecanismo clásico dependiente de *ica* en cepas meticilino resistentes, y está relacionada con la acumulación celular intercelular, más que con la adhesión primaria (O’Neill et al., 2008). Aunque las mutaciones en los genes *fnbpA* y *fnbpB* por separado no afectan significativamente la formación de biofilm, la sobreexpresión de cualquiera de estos genes puede restaurar su formación, indicando que ambas proteínas son necesarias para promover el biofilm (O’Neill et al., 2008). Además, estudios muestran que los biofilms deficientes en FnbpA son más susceptibles a la invasión de macrófagos en comparación con los biofilms que la contienen, sugiriendo que FnbpA es esencial para resistir la invasión de células inmunitarias durante infecciones mediadas por biofilms (Gries et al., 2020). En modelos de infección asociados a catéteres en ratones, se ha observado que las variantes de *fnbpA*(-) presentan una capacidad reducida para adherirse y/o colonizar los catéteres implantados, lo que subraya la importancia de FnbpA en las infecciones asociadas a dispositivos (Gries et al., 2020; Thurlow et al., 2011). En contraste, los componentes del suero parecen afectar diferencialmente la función y/o estabilidad de

FnbpA en comparación con FnbpB, sugiriendo que la contribución de estos a la unión a Fn puede variar dependiendo del modo de crecimiento, ya sea en biofilms o en condiciones planctónicas (Gries et al., 2020). Se han hecho ensayos con bacterias mutantes de *S. aureus* que carecen de proteínas de unión a fibronectina (Fnbps⁻) donde se observa una adherencia y una capacidad de internalización reducidas en comparación con las cepas que producen Fnbp. En estudios in vitro, la adherencia a la fibronectina y a las células MAC-T es menor en las bacterias Fnbps⁻. Además, la capacidad de internalización de estas bacterias mutantes también está reducida, aunque no eliminada por completo. En modelos in vivo de mastitis en ratones, las bacterias mutantes Fnbps⁻ aún pueden ser internalizadas dentro de las células epiteliales mamarias, aunque a un ritmo más lento. Estos resultados sugieren que, aunque las Fnbps son importantes para la adhesión e internalización de *S. aureus* en las células epiteliales mamarias, no son absolutamente esenciales, ya que existen otras proteínas de adhesión de superficie que pueden compensar parcialmente la ausencia de Fnbps (Brouillette et al. 2003).

La proteína ClfA de *Staphylococcus aureus*, identificada como un componente clave para estrategias de inmunización (Gong et al. 2010; Camussone & Calvino 2013; Reidel et al. 2019), desempeña un papel en la virulencia en infecciones invasivas a través de varios mecanismos. Estos incluyen el recubrimiento de la bacteria con fibrinógeno plasmático y la división del opsonina C3b del complemento (McCormack et al. 2014). Los anticuerpos contra el polisacárido capsular y ClfA pueden prevenir eficazmente la mastitis y la aparición de variantes no encapsuladas y de colonias pequeñas del patógeno (Pujato et al. 2018). Se ha observado que el gen *clfA*, es un gen sobreexpresado en biofilms de *Staphylococcus aureus* a las 24 horas de cultivados, lo que sugiere un papel significativo de *clfA* en las primeras etapas de la formación de biofilms (Herman-Bausier et al., 2018; Vlaeminck et al., 2022). Además, se encontró que la expresión de *clfA* era mayor en los biofilms de 24 horas en comparación con cultivos planctónicos de la misma cepa cultivados durante el mismo periodo de tiempo, lo que indica que la sobreexpresión de este gen podría ser un marcador de un cambio hacia la formación de biofilms en *S. aureus* (Vlaeminck et al., 2022).

La alta prevalencia de los genes *ClfA* y *fnbpA* tanto en las cepas de *Staphylococcus aureus* como en las de SNa subraya su importancia en la patogénesis, enfatizando su significado como objetivos en el desarrollo de vacunas y terapias (Scali et al. 2015; Reidel et al. 2019; Camussone et al. 2022).

Respecto a la presencia y ausencia de genes de virulencia, proteínas de adhesión y formación de biofilm, cabe destacar que las cepas de *S. aureus* y *S. borealis* exhibieron similitudes notables, aunque *S. borealis* está clasificado dentro del grupo SNa. Esta similitud es evidente en la Figura 5, donde la mayoría de las cepas están agrupadas juntas. Es importante señalar que la designación de especies no se empleó como variable en el proceso de formación de clústeres.

Nuestros resultados de agrupamiento y análisis de correspondencia múltiple (MCA) proporcionan información sobre la heterogeneidad de las cepas bacterianas estudiadas, revelando cuatro clústeres distintos con variaciones significativas en virulencia y resistencia. La prevalencia de genes como *pvl*, *hla*, *hly* y *clfA* en los Clústeres 1, 2 y 3, asociados principalmente con *Staphylococcus aureus*, coincide con estudios previos que identificaron la relevancia de estos genes en la virulencia de *S.*

aureus en la mastitis bovina (Pérez et al. 2020). La asociación entre ciertos genes y la capacidad de formar biofilms moderados podría tener implicaciones para la persistencia y resistencia de estas cepas en el ambiente bovino. El Clúster 4, compuesto principalmente por cepas de SNa, carece notablemente de todos los genes evaluados. Estos hallazgos pueden sugerir una reducida virulencia en estas cepas en comparación con *S. aureus* pero muestran una resistencia específica a la penicilina asociada con el gen *blaZ*.

La asociación entre la presencia de genes de virulencia y las características de la mastitis no está del todo clara, en estudio hecho con genoma completo de 440 aislamientos de más de 25 especies de estafilococos donde se analizó la distribución de 191 genes de virulencia y su relación con la salud de la ubre, no se encontraron asociaciones claras entre el número de genes y la severidad de la enfermedad (Naushad et al., 2019). Estos resultados sugieren que la virulencia es compleja y depende de la interacción de varios genes y factores externos, como el manejo del rebaño y las condiciones ambientales (De Buck et al., 2021).

Es crucial reconocer las limitaciones de nuestro estudio. Si bien el MCA y el agrupamiento k-modos proporcionan una vista simplificada de los datos, es claro que no capturan todas las complejidades y relaciones entre las variables. Para seguir profundizando el conocimiento de los factores de virulencia de estas cepas sería necesario aplicar algunas otras metodologías. Sería interesante poder hacer estudios de filogenia entre *S. borealis* y algunas cepas de *S. aureus* para encontrar similitudes. Con respecto a la formación de biofilm se puede complementar el análisis con metodologías que simulen mejor el ambiente mamario, como sistemas de flujo, con shaker, con leche como medio y con recambio de esta cada 12 hs. También sería interesante investigar la expresión de genes en las distintas etapas de la formación del biofilm. Investigaciones adicionales que incorporen técnicas analíticas avanzadas y un conjunto de datos más grande mejorarían nuestra comprensión de las dinámicas intrincadas de virulencia y resistencia en las cepas estafilocócicas asociadas con la mastitis bovina.

9. CONCLUSIONES

La mastitis bovina, principalmente atribuible a especies de estafilococos, sigue siendo una preocupación sustancial debido a su considerable impacto económico en la industria láctea. Este trabajo ha proporcionado valiosos conocimientos sobre los perfiles de virulencia de varias cepas causantes de mastitis, previamente no exploradas en este país. La prevalencia relativamente baja de genes de enterotoxinas implica que, en la actualidad, estas cepas no representan una amenaza notable en términos de intoxicaciones alimentarias relacionadas con la mastitis bovina. Sin embargo, la identificación de diversos genes de toxinas, especialmente *pvl*, *hla* y *hly*, junto con proteínas de adhesión como *fmbpA* y *clfA*, sugiere que los estudios terapéuticos en curso dirigidos a estos determinantes de virulencia podrían ser prometedores para mitigar el impacto de las cepas prevalentes en Uruguay.

La notable capacidad de estas cepas para formar biofilms robustos agrega una capa de complejidad a los desafíos asociados con el tratamiento. Surgió una disparidad llamativa entre las cepas de *S. aureus* y SNa con respecto tanto a la formación de biofilm como a la prevalencia de genes, subrayando las diferencias inherentes en la virulencia entre las especies de *Staphylococcus*.

Estos hallazgos enfatizan la imperativa necesidad de idear estrategias adaptadas para el manejo efectivo de la mastitis en el contexto de estas cepas diversas. Se necesitan investigaciones adicionales para profundizar nuestra comprensión del espectro de virulencia exhibido por estas cepas, lo que requiere explorar genes adicionales y un análisis profundo de sus mecanismos de expresión y regulación. Tales esfuerzos contribuirán al desarrollo de enfoques más matizados y efectivos para abordar los desafíos multifacéticos planteados por la mastitis bovina.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, N. M., & Jefferson, K. K. (2012). Staphylococcus aureus clumping factor B mediates biofilm formation in the absence of calcium. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(6), 1504–1512. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057018-0>
- Abril, A. G., Villa, T. G., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calomata, P., & Carrera, M. (2020). Staphylococcus aureus Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. En *Toxins* (Vol. 12, Número 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins12090537>
- Adame-Gómez, R., Castro-Alarcón, N., Vences-Velázquez, A., Toribio-Jiménez, J., Pérez-Valdespino, A., Leyva-Vázquez, M. A., & Ramírez-Peralta, A. (2020). Genetic Diversity and Virulence Factors of *S. aureus* Isolated from Food, Humans, and Animals. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1048097>
- Adkins, P. R. F., Dufour, S., Spain, J. N., Calcutt, M. J., Reilly, T. J., Stewart, G. C., & Middleton, J. R. (2018). Cross-sectional study to identify staphylococcal species isolated from teat and inguinal skin of different-aged dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3213–3225. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13974>
- Adkins, P. R. F., Placheta, L. M., Borchers, M. R., Bewley, J. M., & Middleton, J. R. (2022). Distribution of staphylococcal and mammaliococcal species from compost-bedded pack or sand-bedded freestall dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 105(7). <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21500>
- Adriaens, I., Van Den Brulle, I., Geerinckx, K., D'Anvers, L., De Vlieghe, S., & Aernouts, B. (2021). Milk losses linked to mastitis treatments at dairy farms with automatic milking systems. *Preventive Veterinary Medicine*, 194. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105420>
- Alonzo, F., & Torres, V. J. (2014). The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2), 199–230. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00055-13>
- Angel Villegas, N., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverría, A., Becerra, M., Padola, N., & Paraje, M. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing escherichia coli infection. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/607258>
- Arrizubieta, M. J., Toledo-Arana, A., Amorena, B., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2004). Calcium inhibits bap-dependent multicellular behavior in

- Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, 186(22).
<https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7490-7498.2004>
- Artursson, K., Söderlund, R., Liu, L., Monecke, S., & Schelin, J. (2016). Genotyping of Staphylococcus aureus in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Veterinary Microbiology*, 193, 156–161.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.012>
- Bonar, E., Międzobrodzki, J., & Władyka, B. (2018). The Staphylococcal Coagulases. En *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00007-8>
- Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P., & Talbot, B. G. (2003). In vivo and in vitro demonstration that Staphylococcus aureus is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microbial Pathogenesis*, 35(4), 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00112-8](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00112-8)
- Camussone, C. M., Reidel, I. G., Molineri, A. I., Cicotello, J., Miotti, C., Suarez Archilla, G. A., Curti, C. C., Veaute, C., & Calvino, L. F. (2022). Efficacy of immunization with a recombinant S. aureus vaccine formulated with liposomes and ODN-CpG against natural S. aureus intramammary infections in heifers and cows. *Research in Veterinary Science*, 145, 177–187.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.02.014>
- Camussonea, C., & Calvino, L. (2013). Factores de virulencia de Staphylococcus aureus asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Rev Argent Microbiol*, 45, 119–130.
- Castiblanco, L. F., & Sundin, G. W. (2016). New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4), 362–372. <https://doi.org/10.1111/jipb.12428>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020a). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. En *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* (Vol. 33, Número 11).
<https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020b). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. En *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* (Vol. 33, Número 11, pp. 1699–1713). Asian-Australasian Association of Animal Production Societies.
<https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Chokr, A., Watier, D., Eleaume, H., Pango, B., Ghnassia, J. C., Mack, D., & Jabbouri, S. (2006). Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(6), 381–388. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2006.02.018>
- Christner, M., Franke, G. C., Schommer, N. N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., Kroll, G., Schulze, C., Buck, F., MacK, D., Aepfelbacher, M., & Rohde, H. (2010). The giant extracellular matrix-binding protein of Staphylococcus epidermidis mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular Microbiology*, 75(1), 187–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06981.x>
- CLSI. (2023a). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals: Vol. VET01S ED6:2023* (6a ed.).
- CLSI. (2023b). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (33a ed., Vols. M100-ED33:2023).

- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and classification of mastitis. En *Animals* (Vol. 10, Número 12, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Condas, L. A. Z., De Buck, J., Nobrega, D. B., Carson, D. A., Naushad, S., De Vliegheer, S., Zadoks, R. N., Middleton, J. R., Dufour, S., Kastelic, J. P., & Barkema, H. W. (2017). Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *100*(7). <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12478>
- Crippa, B. L., De Matos, L. G., Souza, F. N., & Silva, N. C. C. (2024). Non-aureus staphylococci and mammaliicocci (NASM): their role in bovine mastitis and One Health. En *Journal of Dairy Research* (Vol. 91, Número 1, pp. 44–56). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0022029924000165>
- Cucarella, C., Tormo, M. Á., Úbeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, Í., & Penadés, J. R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, *72*(4), 2177–2185. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004>
- Cui, J. C., Zhang, B. J., Lin, Y. C., Wang, Q. K., Qian, A. D., Nakane, A., Hu, D. L., & Tong, G. Z. (2010). Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against *Staphylococcus aureus*-induced bovine mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *135*(1–2), 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2009.11.001>
- Cui, M., Li, J., Ali, T., Kalim, K., Wang, H., Song, L., Li, Z., Ren, X., Ma, F., Zou, M., Shen, S., & Xu, S. (2020). Emergence of livestock-associated MRSA ST398 from bulk tank milk, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(12), 3471–3474. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa367>
- Czekaj, T., Ciszewski, M., & Szweczyk, E. M. (2015). *Staphylococcus haemolyticus* – An emerging threat in the twilight of the antibiotics age. En *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 161, Número 11). <https://doi.org/10.1099/mic.0.000178>
- De Buck, J., Ha, V., Naushad, S., Nobrega, D. B., Luby, C., Middleton, J. R., De Vliegheer, S., & Barkema, H. W. (2021). Non-aureus Staphylococci and Bovine Udder Health: Current Understanding and Knowledge Gaps. En *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.658031>
- de los Santos, R., González-Revello, Á., Majul, L., Umpiérrez, A., Aldrovandi, A., Gil, A., Hirigoyen, D., & Zunino, P. (2022). Subclinical bovine mastitis associated with *Staphylococcus* spp. in eleven Uruguayan dairy farms. *Journal of Infection in Developing Countries*, *16*(4), 630–637. <https://doi.org/10.3855/jidc.12960>
- Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. En *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Número 7, pp. 457–471). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.23>
- Dubos, M., Barraud, O., Fedou, A. L., Fredon, F., Laurent, F., Brakbi, Y., Cypierre, A., & François, B. (2014). Prostatic abscesses and severe sepsis due to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-466>
- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2021). Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production*, *53*. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02680-9/Published>

- Feil, E. J., Cooper, J. E., Grundmann, H., Robinson, D. A., Enright, M. C., Berendt, T., Peacock, S. J., Smith, J. M., Murphy, M., Spratt, B. G., Moore, C. E., & Day, N. P. J. (2003). How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology*, *185*(11), 3307–3316. <https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3307-3316.2003>
- Felipe, V., Morgante, C. A., Somale, P. S., Varroni, F., Zingaretti, M. L., Bachetti, R. A., Correa, S. G., & Porporatto, C. (2017). Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microbial Pathogenesis*, *104*, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.047>
- Fergestad, M. E., Touzain, F., De Vlieghe, S., De Visscher, A., Thiry, D., Ngassam Tchamba, C., Mainil, J. G., L’Abee-Lund, T., Blanchard, Y., & Wasteson, Y. (2021). Whole Genome Sequencing of *Staphylococci* Isolated From Bovine Milk Samples. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.715851>
- Flemming, H. C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., Wingender, J., & Wuertz, S. (2023). The biofilm matrix: multitasking in a shared space. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 21, Número 2). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>
- Foster, T. J. (2019). The MSCRAMM Family of Cell-Wall-Anchored Surface Proteins of Gram-Positive Cocci. En *Trends in Microbiology* (Vol. 27, Número 11, pp. 927–941). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.06.007>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 12, Número 1, pp. 49–62). <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Fox, L. K., Besser, T. E., & Jackson, S. M. (1996). Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *209*(6). <https://doi.org/10.2460/javma.1996.209.06.1143>
- Fraunholz, M., & Sinha, B. (2012). Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. En *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 43). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00043>
- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., & Moreno López, J. (2002). Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. En *Acta vet. scand. vol* (Vol. 43, Número 4).
- Giannechini, R. E., Concha, C., & Franklin, A. (2002). Antimicrobial Susceptibility of Udder Pathogens Isolated from Dairy Herds in the West Littoral Region of Uruguay. En *Acta vet. scand* (Vol. 43, Número 1).
- Girma, S., Mammo, A., Bogele, K., Sori, T., Tadesse, F., & Jibat, T. (2012). Study on prevalence of bovine mastitis and its major causative agents in West Harerghe zone, Doba district, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, *4*(8).
- Goerke, C., Pantucek, R., Holtfreter, S., Schulte, B., Zink, M., Grumann, D., Bröker, B. M., Doskar, J., & Wolz, C. (2009). Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *Journal of Bacteriology*, *191*(11), 3462–3468. <https://doi.org/10.1128/JB.01804-08>
- Gong, R., Hu, C., Xu, H., Guo, A., Chen, H., Zhang, G., & Shi, L. (2010). Evaluation of clumping factor a binding region a in a subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Clinical and Vaccine Immunology*, *17*(11), 1746–1752. <https://doi.org/10.1128/CVI.00162-10>

- Götz, F. (2002). Staphylococcus and biofilms. En *Molecular Microbiology* (Vol. 43, Número 6, pp. 1367–1378). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02827.x>
- Gries, C. M., Biddle, T., Bose, J. L., Kielian, T., & Lo, D. D. (2020). Staphylococcus aureus fibronectin binding protein a mediates biofilm development and infection. *Infection and Immunity*, 88(5). <https://doi.org/10.1128/IAI.00859-19>
- Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F., & Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in Staphylococcus aureus colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity*, 69(5), 3423–3426. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001>
- Grumann, D., Nübel, U., & Bröker, B. M. (2014). Staphylococcus aureus toxins - Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.013>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. En *Archives of Microbiology* (Vol. 198, Número 1, pp. 1–15). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Harmon, R. J. (1994). Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8)
- Heikkilä, A. M., Liski, E., Pyörälä, S., & Taponen, S. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 101(10). <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>
- Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. En *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 36, Número 4, pp. 815–836). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x>
- Herman-Bausier, P., Labate, C., Towell, A. M., Derclaye, S., Geoghegan, J. A., & Dufrene, Y. F. (2018). Staphylococcus aureus clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.1718104115>
- Homsombat, T., Boonyayatra, S., Awaiwanont, N., & Pichpol, D. (2021). *Effect of Temperature on the Expression of Classical Enterotoxin Genes among Staphylococci Associated with Bovine Mastitis*. <https://doi.org/10.3390/pathogens>
- Jenkins, S. N., Okello, E., Rossitto, P. V., Lehenbauer, T. W., Champagne, J., Penedo, M. C. T., Arruda, A. G., Godden, S., Rapnicki, P., Gorden, P. J., Timms, L. L., & Aly, S. S. (2019). Molecular epidemiology of coagulase-negative Staphylococcus species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. *PeerJ*, 2019(5). <https://doi.org/10.7717/peerj.6749>
- Jenul, C., & Horswill, A. R. (2019). Regulation of Staphylococcus aureus Virulence. *Microbiology Spectrum*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018>
- Jia, F., Ma, W., Zhang, X., Wang, D., & Zhou, X. (2020). Matrine and baicalin inhibit apoptosis induced by Panton-Valentine leukocidin of Staphylococcus aureus in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2731–2742. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17619>
- Joo, H. S., & Otto, M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. En *Chemistry and Biology* (Vol. 19, Número 12, pp. 1503–1513). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.10.022>

- Jung, H. R., & Lee, Y. J. (2022). Characterization of Virulence Factors in Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bulk Tank Milk. *Animals*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ani12030301>
- Kabelitz, T., Aubry, E., van Vorst, K., Amon, T., & Fulde, M. (2021). The role of streptococcus spp. in bovine mastitis. En *Microorganisms* (Vol. 9, Número 7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>
- Khazandi, M., Al-Farha, A. A. B., Coombs, G. W., O’Dea, M., Pang, S., Trott, D. J., Aviles, R. R., Hemmatzadeh, F., Venter, H., Ogunniyi, A. D., Hoare, A., Abraham, S., & Petrovski, K. R. (2018). Genomic characterization of coagulase-negative staphylococci including methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* causing bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 219. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.004>
- Król, J., Wanecka, A., Twardoń, J., Florek, M., Marynowska, M., Banaszkiwicz, S., Kaczmarek-Pieńczewska, A., Płaskowska, E., Brodala, M., Chwirot, W., Korzeniowska-Kowal, A., & De Buck, J. (2023). *Staphylococcus borealis* – A newly identified pathogen of bovine mammary glands. *Veterinary Microbiology*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109876>
- Lin, C. F., Chen, C. L., Huang, W. C., Cheng, Y. L., Hsieh, C. Y., Wang, C. Y., & Hong, M. Y. (2010). Different types of cell death induced by Enterotoxins. En *Toxins* (Vol. 2, Número 8, pp. 2158–2176). <https://doi.org/10.3390/toxins2082158>
- Mahato, S., Mistry, H. U., Chakraborty, S., Sharma, P., Saravanan, R., & Bhandari, V. (2017). Identification of variable traits among the methicillin resistant and sensitive coagulase negative staphylococci in milk samples from mastitic cows in india. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01446>
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill, A. R., & Bayles, K. W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005822>
- Martineau, F., Ois Picard, F. J., Lansac, N., Mé Nard, C., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (2000). *Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis* (Vol. 44, Número 2).
- Martínez, O. F., Cardoso, M. H., Ribeiro, S. M., & Franco, O. L. (2019). Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, quorum-sensing interference and biofilm inhibition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00074>
- McCormack, N., Foster, T. J., & Geoghegan, J. A. (2014). A short sequence within subdomain N1 of region A of the *Staphylococcus aureus* MSCRAMM clumping factor A is required for export and surface display. En *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 160, Número PART 4, pp. 659–670). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074724-0>
- Mccourt, J., O’Halloran, D. P., Mccarthy, H., O’Gara, J. P., & Geoghegan, J. A. (2014). Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. *FEMS Microbiology Letters*, 353(2). <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12424>
- Mello, P. L., Riboli, D. F. M., Pinheiro, L., Martins, L. de A., Brito, M. A. V. P., & da Cunha, M. de L. R. de S. (2016). Detection of enterotoxigenic potential and

- determination of clonal profile in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis in different Brazilian states. *Toxins*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/toxins8040104>
- Merz, A., Stephan, R., & Johler, S. (2016). *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00319>
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza-Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. En *Veterinary and Animal Science* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306>
- Nasser, A., Dallal, M. M. S., Jahanbakhshi, S., Azimi, T., & Nikouei, L. (2021). *Staphylococcus aureus*: Biofilm Formation and Strategies Against it. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 23(5), 664–678. <https://doi.org/10.2174/1389201022666210708171123>
- Naushad, S., Naqvi, S. A., Nobrega, D., Luby, C., Kastelic, J. P., Barkema, H. W., & De Buck, J. (2019). Comprehensive Virulence Gene Profiling of Bovine Non-aureus *Staphylococci* Based on Whole-Genome Sequencing Data. *mSystems*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00098-18>
- Novick, R. P. (2003a). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. En *Molecular Microbiology* (Vol. 48, Número 6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x>
- Novick, R. P. (2003b). Mobile genetic elements and bacterial toxins: The superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. En *Plasmid* (Vol. 49, Número 2, pp. 93–105). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00157-9)
- O’Gara, J. P. (2007). *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. En *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 270, Número 2, pp. 179–188). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
- Oliveira, D., Borges, A., & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. En *Toxins* (Vol. 10, Número 6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060252>
- Oliver, S. P., & Murinda, S. E. (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. En *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 28, Número 2, pp. 165–185). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., Foster, T. J., & O’Gara, J. P. (2008). A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3835–3850. <https://doi.org/10.1128/JB.00167-08>
- O’Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Otter, J. A., & French, G. L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. En *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 10, Número 4, pp. 227–239). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70053-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70053-0)
- Pain, M., Wolden, R., Jaén-Luchoro, D., Salvà-Serra, F., Iglesias, B. P., Karlsson, R., Klingenberg, C., & Cavanagh, J. P. (2020). *Staphylococcus borealis* sp.

- Nov., isolated from human skin and blood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004499>
- Pereyra, E. A. L., Picech, F., Renna, M. S., Baravalle, C., Andreotti, C. S., Russi, R., Calvinho, L. F., Diez, C., & Dallard, B. E. (2016). Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 183, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.002>
- Pérez, V. K. C., Costa, G. M. da, Guimarães, A. S., Heinemann, M. B., Lage, A. P., & Dorneles, E. M. S. (2020). Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. En *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 22, pp. 792–802). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>
- Pérez, V. K. C., Custódio, D. A. C., Silva, E. M. M., de Oliveira, J., Guimarães, A. S., Brito, M. A. V. P., Souza-Filho, A. F., Heinemann, M. B., Lage, A. P., & Dorneles, E. M. S. (2020). Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 2111–2122. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00363-5>
- Periasamy, S., Joo, H. S., Duong, A. C., Bach, T. H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1281–1286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109>
- Persson Waller, K., Myrenås, M., Börjesson, S., Kim, H., Widerström, M., Monsen, T., Sigurðarson Sandholt, A. K., Östlund, E., & Cha, W. (2023). Genotypic characterization of *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus simulans* from Swedish cases of bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 106(11), 7991–8004. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23523>
- Pujato, N., Camussone, C. M., Renna, M. S., Perrig, M. S., Morein, B., Calvinho, L. F., & Marcipar, I. S. (2018). Evaluation of the humoral immune response to a multicomponent recombinant vaccine against *S. aureus* in healthy pregnant heifers. *Veterinary Journal*, 235, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.03.005>
- Pumipuntu, N., Kulpeanpravit, S., Santajit, S., Tunyong, W., Kong-ngoen, T., Hinthong, W., & Indrawattana, N. (2017). Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. *Veterinary World*, 10(7). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.721-726>
- Pyörälä, S., & Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>
- Quave, C. L., & Horswill, A. R. (2014). Flipping the switch: Tools for detecting small molecule inhibitors of staphylococcal virulence. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Número DEC). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00706>
- Raspanti, C. G., Bonetto, C. C., Vissio, C., Pellegrino, M. S., Reinoso, E. B., Dieser, S. A., Bogni, C. I., Larriestra, A. J., & Odierno, L. M. (2016). Prevalencia y sensibilidad a antibióticos de especies de estafilococos coagulasa negativos provenientes de mastitis subclínica en bovinos de tambos de la región central de Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.12.001>

- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. En *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 52, Número 4, pp. 1701–1718). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Reidel, I. G., Camussone, C., Suarez Archilla, G. A., Calvinho, L. F., & Veaute, C. (2019). Liposomal and CpG-ODN formulation elicits strong humoral immune responses to recombinant *Staphylococcus aureus* antigens in heifer calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 212, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.04.011>
- Reksen, O., Sølverød, L., Branscum, A. J., & Østerås, O. (2006). Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(8). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72565-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72565-6)
- Rollin, G., Tan, X., Tros, F., Dupuis, M., Nassif, X., Charbit, A., & Coureuil, M. (2017). Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in endothelial cells: A matter of growth or persistence. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01354>
- Roshan, M., Parmanand, Arora, D., Behera, M., Vats, A., Gautam, D., Deb, R., Parkunan, T., & De, S. (2022). Virulence and enterotoxin gene profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101724>
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381–10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Sabino, Y. N. V., Cotter, P. D., & Mantovani, H. C. (2023). Anti-virulence compounds against *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis: A new therapeutic option? En *Microbiological Research* (Vol. 271). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127345>
- Saeed, S. I., Kamaruzzaman, N. F., Gahamanyi, N., Nguyen, T. T. H., Hossain, D., & Kahwa, I. (2024). Confronting the complexities of antimicrobial management for *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis: an innovative paradigm. En *Irish Veterinary Journal* (Vol. 77, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13620-024-00264-1>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Número 10, pp. 608–620). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Scali, F., Camussone, C., Calvinho, L. F., Cipolla, M., & Zecconi, A. (2015). Which are important targets in development of *S. aureus* mastitis vaccine? En *Research in Veterinary Science* (Vol. 100, pp. 88–99). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.019>
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M. T., Lindqvist, R., Barker, G. C., & Rådström, P. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. En *Virulence* (Vol. 2, Número 6, pp. 580–592). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.18122>
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies*. <https://doi.org/10>

- Schukken, Y. H., González, R. N., Tikofsky, L. L., Schulte, H. F., Santisteban, C. G., Welcome, F. L., Bennett, G. J., Zurakowski, M. J., & Zadoks, R. N. (2009). CNS mastitis: Nothing to worry about? *Veterinary Microbiology*, *134*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.014>
- Shallcross, L. J., Fragaszy, E., Johnson, A. M., & Hayward, A. C. (2013). The role of the Panton-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70238-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70238-4)
- Singh, R., Ray, P., Das, A., & Sharma, M. (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(9), 1955–1958. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq257>
- Souza, F. N., Piepers, S., Della Libera, A. M. M. P., Heinemann, M. B., Cerqueira, M. M. O. P., & De Vlieghe, S. (2016). Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *Journal of Dairy Science*, *99*(4). <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10230>
- Speziale, P., & Pietrocola, G. (2020). The Multivalent Role of Fibronectin-Binding Proteins A and B (FnBPA and FnBPB) of *Staphylococcus aureus* in Host Infections. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02054>
- Sully, E. K., Malachowa, N., Elmore, B. O., Alexander, S. M., Femling, J. K., Gray, B. M., DeLeo, F. R., Otto, M., Cheung, A. L., Edwards, B. S., Sklar, L. A., Horswill, A. R., Hall, P. R., & Gresham, H. D. (2014). Selective Chemical Inhibition of agr Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Promotes Host Defense with Minimal Impact on Resistance. *PLoS Pathogens*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004174>
- Tam, K., & Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes . *Microbiology Spectrum*, *7*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0039-2018>
- Tarekgne, E. K., Skjerdal, T., Skeie, S., Rudi, K., Porcellato, D., Félix, B., & Narvhus, J. A. (2016). Enterotoxin gene profile and molecular characterization of *staphylococcus aureus* isolates from bovine bulk milk and milk products of Tigray Region, Northern Ethiopia. *Journal of Food Protection*, *79*(8), 1387–1395. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-003>
- Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., Engebretsen, I. L., Bayles, K. W., Horswill, A. R., & Kielian, T. (2011). *Staphylococcus aureus* Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo . *The Journal of Immunology*, *186*(11). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002794>
- Tomanić, D., Samardžija, M., & Kovačević, Z. (2023). Alternatives to Antimicrobial Treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review. En *Antibiotics* (Vol. 12, Número 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>
- Traversari, J., Van Den Borne, B. H. P., Dolder, C., Thomann, A., Perreten, V., & Bodmer, M. (2019). Non-aureus staphylococci species in the teat canal and milk in four commercial swiss dairy herds. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00186>
- Valckenier, D., Piepers, S., De Visscher, A., & De Vlieghe, S. (2020). The effect of intramammary infection in early lactation with non-aureus staphylococci in general and *Staphylococcus chromogenes* specifically on quarter milk somatic cell count and quarter milk yield. *Journal of Dairy Science*, *103*(1). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16818>

- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- van Soest, F., Huijps, K., Dohmen, W., Riekerink, R. O., Santman-Berends, I., Sampimon, O. C., Lam, T. J. G. M., & Hogeveen, H. (2011). Costs and benefits of mastitis management measures on individual dairy farms. En *Udder Health and Communication*. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-742-4_35
- Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2015). Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *The Veterinary Journal*, *203*(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2014.11.001>
- Vautor, E., Abadie, G., Pont, A., & Thiery, R. (2008). Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Veterinary Microbiology*, *127*(3–4), 407–411. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.018>
- Vishnupriya, S., Antony, P. X., Mukhopadhyay, H. K., Pillai, R. M., Thanislass, J., Vivek Srinivas, V. M., & Kumar, R. S. (2014). Methicillin resistant staphylococci associated with bovine mastitis and their zoonotic importance. *Veterinary World*, *7*(6). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.422-427>
- Vitali, L. A., Petrelli, D., Lamikanra, A., Prenna, M., & Akinkunmi, E. O. (2014). Diversity of antibiotic resistance genes and staphylococcal cassette chromosome *mec* elements in faecal isolates of coagulase-negative staphylococci from Nigeria. *BMC Microbiology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-106>
- Vlaeminck, J., Lin, Q., Xavier, B. B., De Backer, S., Berkell, M., De Greve, H., Hernalsteens, J. P., Kumar-Singh, S., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2022). The dynamic transcriptome during maturation of biofilms formed by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.882346>
- Wanecka, A., Król, J., Twardoń, J., Mrowiec, J., Bania, J., Korzeniowska-Kowal, A., & Tobiasz, A. (2018). Characterization of a genetically distinct subpopulation of *Staphylococcus haemolyticus* isolated from milk of cows with intramammary infections. *Veterinary Microbiology*, *214*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.004>
- Wang, W., Lin, X., Jiang, T., Peng, Z., Xu, J., Yi, L., Li, F., Fanning, S., & Baloch, Z. (2018). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01123>
- Wente, N., & Krömker, V. (2020). *Streptococcus dysgalactiae*—contagious or environmental? *Animals*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/ani10112185>
- Wu, S., Duan, N., Gu, H., Hao, L., Ye, H., Gong, W., & Wang, Z. (2016). A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. En *Toxins* (Vol. 8, Número 7). <https://doi.org/10.3390/toxins8070176>
- Wuytack, A., De Visscher, A., Piepers, S., Boyen, F., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2019). Non-aureus staphylococci in fecal samples of dairy cows: First report and phenotypic and genotypic characterization. *Journal of Dairy Science*, *102*(10). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16662>
- Xia, G., & Wolz, C. (2014). Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, *21*, 593–601. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2013.04.022>

- Yang, F., Shi, W., Meng, N., Zhao, Y., Ding, X., & Li, Q. (2023). Antimicrobial resistance and virulence profiles of staphylococci isolated from clinical bovine mastitis. *Frontiers in Microbiology*, *14*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1190790>
- Yehia, H. M., Al-Masoud, A. H., Alarjani, K. M., & Alamri, M. S. (2020). Prevalence of methicillin-resistant (*mecA* gene) and heat-resistant *Staphylococcus aureus* strains in pasteurized camel milk. *Journal of Dairy Science*, *103*(7), 5947–5963. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17631>
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., & Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, *40*(4), 177–183.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.01.001>
- Zecconi, A., & Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. En *Immunology Letters* (Vol. 150, Números 1–2). <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.01.004>
- Zeouk, I., Ouedrhiri, W., Sifaoui, I., Bazzocchi, I. L., Piñero, J. E., Jiménez, I. A., Lorenzo-Morales, J., & Bekhti, K. (2021). Bioguided isolation of active compounds from *rhamnus alaternus* against methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (Mrsa) and panton-valentine leucocidin positive strains (mssa-pvl). *Molecules*, *26*(14). <https://doi.org/10.3390/molecules26144352>

11. ANEXOS

11.1. Anexo I. Primers usados en este estudio

Gen	Función	Secuencia Primers (5' to 3')	Tam (bp)	hibrid. temp. (°C)	Referencia
<i>sa442</i>	Marcador genético <i>S. aureus</i>	F: GTCGGGTACACGATATTCTTCACG R: CTCTCGTATGACCAGCTTCGGTAC	179	52	(Yehia et al., 2020)
<i>sea</i>	Enterotoxina A	F: GGTTATCAATGTGCGGGTGG R: CGGCACTTTTTCTCTTCGG	102	61	(Pérez Custódio et al., 2020)
<i>seb</i>	Enterotoxina B	F: GTATGGTGGTGAAGTACTGAGC R: CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	61	(Pérez Custódio et al., 2020)
<i>sec</i>	Enterotoxina C	F: AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG R: CACACTTTTGAATCAACCG	451	61	(Pérez Custódio et al., 2020)
<i>sed</i>	Enterotoxina D	F: CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG R: ATTGGTATTTTTTCGTTTC	278	61	(Pérez Custódio et al., 2020)
<i>pvl</i>	Leucocidina Pantón Valentine (PVL)	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC	433	61	(Adame-Gómez et al., 2020)
<i>tst</i>	Toxina del Shock tóxico 1	F: ACCCCTGTTCCCTTATCATC R: TTTTCAGTATTTGTAACGCC	326	61	(Adame-Gómez et al., 2020)
<i>hla</i>	Hemolisina Alpha	F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R: CTTCCAGCCTACTTTTTATCAGT	209	61	(Adame-Gómez et al., 2020)
<i>hlb</i>	Hemolisina Beta	F: GTGCCTTACTGACAATAGTGC R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309	61	(Adame-Gómez et al., 2020)
<i>icaA</i>	N-acetylglucosaminyltransferase para síntesis PIA	F: TATACCTTTCTTCGATGTGC R: CTTTCGTTATAACAGGCAAG	561	61	(Felipe et al., 2017)
<i>icaD</i>	N-acetylglucosaminyltransferase para síntesis PIA	F: AAACGTAAGAGAGGTGG R: GGCAATATGATCAAGATAC	381	61	(Felipe et al., 2017)
<i>bap</i>	Formación Biofilm	F: CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC R: GCTGTTGAAGTTAATACTGTACTCTGC	971	61	(Felipe et al., 2017)
<i>fnbpA</i>	Proteína unida a la Fibronectina	F: CATAAATTGGGAGCAGCATCA R: ATCAGCAGCTGAATCCATT	127	61	(Felipe et al., 2017)
<i>fnbpB</i>	Proteína unida a la Fibronectina	F: GTAACAGCTAATGGTGAATTGATACT R: CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524	61	(Felipe et al., 2017)
<i>clfA</i>	Factor de anclaje	F: ATGGCGTGGCTTCAGTGCT R: CGTTTCTCCGATGTTGCATTTG	294	61	(Felipe et al., 2017)
<i>blaZ</i>	Resistencia Beta-lactámicos	F: TGACCACTTTTATCAGCAACC R: ACTCAACACCTGCTGCTTTC	173	50	(Martineau et al., 2000)
<i>ermA</i>	Resistencia Eritromicina	F: CTACACTTGGCTTAGGATGAAA R: TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT	139	53	(Martineau et al., 2000)
<i>ermB</i>	Resistencia Eritromicina	F: GTTACTCTTGGTTAGGATGAAA R: CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT	142	55	(Martineau et al., 2000)
<i>ermC</i>	Resistencia Eritromicina	F: ATCTTTTAGCAAACCGTATTC R: CTGTTGATCACGATAATTTCC	190	55	(Martineau et al., 2000)

11.2. Anexo II. Controles positivos utilizados en PCR

Gen	Control Positivo Utilizado
<i>sea</i>	ATCC 6538
<i>seb</i>	cepa cedida por UTEC
<i>sec</i>	cepa cedida por UTEC
<i>sed</i>	cepa cedida por UTEC
<i>tst</i>	cepa cedida por UTEC
<i>pvl</i>	cepa cedida por UTEC
<i>hla</i>	ATCC 29213
<i>hlb</i>	ATCC 29213
<i>icaA</i>	ATCC 29213
<i>icaD</i>	ATCC 29213
<i>fnbpA</i>	ATCC 29213
<i>fnbpB</i>	cepa interna
<i>clfA</i>	ATCC 29213
<i>bap</i>	cepa interna
<i>blaZ</i>	ATCC 6538
<i>ermA</i>	cepa interna
<i>ermB</i>	cepa interna
<i>ermC</i>	cepa interna
<i>sa442</i>	ATCC 6538