

**Identificación molecular de factores de virulencia en cepas de
Streptococcus agalactiae aisladas de mastitis bovina y su
asociación con la respuesta al tratamiento antibiótico**

Investigador principal:

Diana Macías Prada

Trabajo de investigación para optar al título de:

Magister en Microbiología y bioanálisis

Comité tutorial:

Giovanny Torres Lindarte Bact., MSc
Julián Reyes Vélez M.V., PhD

Universidad de Antioquia

Escuela de Microbiología

Medellín, Colombia

2017

Tabla de contenido

	Pág.
Portada.....	1
Tabla de contenido.....	2
Lista de tablas.....	5
Lista de figuras.....	6
Título.....	7
Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. Introducción.....	10
2. Materiales y Métodos.....	12
2.1 Tipo de estudio.....	12
2.2 Población de estudio.....	12
2.3 Recolección de las muestras de leche.....	12
2.4 Aislamiento e identificación de las cepas de <i>S. agalactiae</i>	13
2.5 Esquema de tratamiento de los animes infectados con la cepa <i>S. agalactiae</i>	14
2.6 Análisis composicional para grasa, proteína y células somáticas (RCS).....	14
2.7 Reactivación de las cepas de <i>S. agalactiae</i>	15
2.8 Extracción de ADN.....	15
2.9 Selección y evaluación de los cebadores <i>In Silico</i>	15

2.10	Identificación de los marcadores de virulencia.....	16
2.11	PCR´s empleada para la identificación de los marcadores.....	16
2.11.1	PCR´s múltiple para los marcadores <i>bca</i> , <i>hylB</i> , <i>cylE</i> , <i>lmb</i> y <i>cfb</i>	16
2.11.2	PCR para el marcador <i>scpB</i>	17
2.12	Electroforesis.....	17
2.13	Conformación de perfiles de cepas.....	17
2.14	Conformación de los grupos y la variable respuesta.....	18
2.14.1	Conformación de los grupos.....	18
2.14.2	Variable respuesta.....	18
2.15	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	18
2.16	Análisis estadístico.....	19
3.	Resultados	19
3.1	Análisis descriptivo.....	19
3.1.1	Variables composicionales y sanitarias de la leche.....	19
3.1.2	Distribución de los aislamientos en los hatos y por zonas.....	19
3.1.3	Distribución de los aislamientos en los grupos de tratamiento.....	20
3.1.4	Marcadores de virulencia amplificados en los aislamientos de <i>S. agalactiae</i> evaluados.....	20
3.1.4.1	Amplificación de los marcadores <i>hylB</i> y <i>bca</i> (PCR múltiple 1).....	20
3.1.4.2	Amplificación de los marcadores <i>cylE</i> , <i>lmb</i> y <i>cfb</i> (PCR múltiple 2).....	21
3.1.4.3	Amplificación del marcador <i>scpB</i>	22
3.1.5	Distribución de los marcadores de virulencia en	

	los 12 hatos lecheros de estudio.....	23
3.1.6	Perfiles de virulencia.....	23
3.1.7	Distribución de los perfiles de virulencia por zonas	
	Geográficas.....	23
3.2	Análisis bivariado.....	25
3.3	Modelo multivariado.....	26
3.4	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	27
4.	Discusión.....	28
	Conclusiones.....	31
	Agradecimientos.....	32
	Referencias bibliográficas.....	33

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Pruebas y criterios para la identificación microbiológica <i>S. agalactiae</i>	14
Tabla 2. Listado de cebadores utilizados en la PCR.....	15
Tabla 3. Distribución de variables composicionales y sanitarias de la leche en los animales de estudio.....	20
Tabla 4. Distribución de los 181 aislamientos en los 12 hatos y por zonas.....	20
Tabla 5. Distribución de los 181 aislamientos de <i>S. agalactiae</i> , según el grupo	23
Tabla 6. Perfiles de virulencia establecidos para los 181 aislamientos.....	24
Tabla 7. Distribución de los perfiles de virulencia más frecuentes y ciclos de tratamiento en 120 aislamientos de <i>S. agalactiae</i>	26
Tabla 8. Asociación del marcador <i>Imb</i> y los ciclos de tratamiento en los animales de estudio.....	26
Tabla 9. Modelo de regresión logístico con efectos mixtos de dos niveles entre los ciclos de tratamientos y perfiles de virulencia.....	27
Tabla 10. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos para <i>S. agalactiae</i> con el marcador " <i>Imb</i> ".....	28

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Productos PCR múltiple para los marcadores <i>hylB</i> y <i>bca</i>	21
Figura 2. Productos PCR múltiple para los marcadores <i>cylE</i> , <i>lmb</i> y <i>cfb</i>	22
Figura 3. Productos PCR para el marcador <i>scpB</i>	22
Figura 4. Frecuencias de los seis marcadores de virulencia evaluados en los 181 aislamientos de <i>S. agalactiae</i>	22
Figura 5. Distribución de los marcadores de virulencia en los 12 hatos lecheros de estudio.....	23
Figura 6. Distribución de los perfiles de virulencia por zona geográfica.....	24

Identificación molecular de factores de virulencia en cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de mastitis bovina y su asociación con la respuesta al tratamiento antibiótico

Diana Macías¹, Julián Reyes² y Giovanni Torres³

¹Cooperativa Colanta, ²University of Prince Edward Island, Canadá.

³Instituto Colombiano de Medicina Tropical.
Sabaneta, Antioquia, Colombia

Palabras clave: marcadores genéticos, *Streptococcus*, infección intramamaria, mastitis subclínica.

Keywords: genetic markers, *Streptococcus*, intramammary infection, subclinical mastitis

Resumen

Introducción: la mastitis bovina es una de las enfermedades que más pérdidas económicas causa a los productores de leche a nivel mundial. En Colombia, especialmente en Antioquia, principal zona lechera de país, uno de los patógenos más aislado de la mastitis bovina es *Streptococcus agalactiae*; bacteria que compromete significativamente la calidad, cantidad e inocuidad de la leche producida. De acuerdo con la bibliografía consultada, se seleccionaron seis genes que están relacionados con virulencia de este patógeno y buscar la asociación con el número de tratamientos antibióticos, datos que aportarán al conocimiento de *S. agalactiae*, con el fin de mejorar la calidad de la leche, la economía de los productores lácteos y por ende de la industria de Colombia.

Objetivo: identificar molecularmente los factores de virulencia en cepas de *S. agalactiae* aisladas de mastitis bovina y explorar la asociación con el número de tratamientos antibióticos necesarios para curar la infección.

Materiales y Métodos: se incluyeron 181 cepas de *S. agalactiae* aisladas de 121 vacas con mastitis en periodo de producción, pertenecientes a 12 fincas lecheras especializadas del departamento de Antioquia (Colombia). A cada cepa se le identificaron genes asociados a virulencia, mediante técnicas moleculares. Los resultados se exploraron buscando asociación de los genes amplificados y el número de tratamientos antibióticos aplicados a cada animal, empleando herramientas estadísticas.

Resultados: en las 181 cepas de *S. agalactiae* aisladas, se amplificaron diferentes marcadores de virulencia: *cylE* y el *hylB* en el 100% (181/181), *lmb* en el 15% (28/181), *cfb* en el 99% (180/181), *scpB* en el 40% (73/181) y el marcador *bca* no se amplificó en ninguno de los aislamientos evaluados. El análisis estadístico mostró asociación entre la presencia del marcador *lmb* y la aplicación de más de un ciclo de tratamiento a los animales infectados con cepas portadoras de este gen.

Conclusión: este es el primer reporte en Colombia donde se identificó genes de virulencia en cepas de *S. agalactiae* aisladas de mastitis bovina y se encontró asociación con la respuesta al tratamiento antibiótico; sin embargo, es importante ampliar la investigación de estos factores con el objetivo de continuar entendiendo la epidemiología de la bacteria, por consiguiente, para ajustar las medidas de diagnóstico y control.

Abstract

Introduction: Bovine mastitis is one of the diseases that cause the greatest economic losses to milk producers worldwide. In Colombia, especially in Antioquia, the main country dairy, one of the most isolated pathogens of bovine mastitis is *Streptococcus agalactiae*; Bacteria that significantly compromise the quality, quantity and safety of the milk produced. According to the literature consulted, six genes were selected that are related to virulence of this pathogen and to seek association with the number of antibiotic treatments, data that will contribute to the knowledge of *S. agalactiae*, to improve the quality of milk, The economy of the dairy producers and, therefore, of the Colombian industry.

Objective: Molecularly identify virulence factors in strains of *S. agalactiae* isolated from bovine mastitis and explore the association with the number of antibiotic treatments necessary to cure the infection.

Materials and Methods: We included 181 strains of *S. agalactiae* isolated from 121 cows with subclinical mastitis during the production period, belonging to 12 specialized dairy farms in the department of Antioquia (Colombia). Virulence-associated genes were identified for each strain using molecular techniques. The results were explored looking for association of the amplified genes with the number of antibiotic treatments, using statistical tools.

Results: In the 181 isolates of *S. agalactiae* isolated, different virulence markers were amplified: *cylE* and *hylB* in 100% (181/181), *lmb* in 15% (28/181), *cfb* in 99% (180 / 181), *scpB* by 40% (73/181). The marker *bca* was not amplified in any of the isolates evaluated. When performing the statistical analysis, it was found that only the presence of the *lmb* marker had statistical significance regarding the number of treatment cycles performed on each animal.

Conclusions: This is the first report in Colombia where virulence genes were identified in strains of *S. agalactiae* isolated from bovine mastitis and association with response to antibiotic treatment was found; However, it is important to expand the investigation of these factors with the aim of continuing to understand the epidemiology of the bacteria, therefore, to adjust the diagnostic and control measures.

1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una de las enfermedades que más pérdidas económicas causa en la industria láctea. Se considera que más del 70% de los gastos de los ganaderos se debe a la mastitis (Bedoya, 2008), ocasionando reducción en la producción de leche, servicios veterinarios, tratamientos con antibióticos, el descarte de la leche, depreciación en los animales, gastos de alimentación y pérdidas en bonificaciones (Keefe, 2010a). En Colombia uno de los principales causantes de mastitis bovina es *Streptococcus agalactiae*, patógeno que impacta negativamente la calidad, cantidad e inocuidad de la leche producida (Keefe, 2010b).

La prevalencia de *S. agalactiae* varía de país a país, encontrándose esporádicamente en países como Bélgica, Finlandia, Suecia, Noruega y Canadá; en este último país, a principios de los años noventa la prevalencia reportada fue de 18% (Keefe et al., 1997) y para el 2006 disminuyó en un 1.6% mediante la implementación de programas para el mejoramiento de la calidad de leche (Keefe, 2010c). Contrario a lo que se ha observado en Dinamarca, donde la prevalencia en el año 2000 estaba en un 2% e incrementó para el año 2009 al 6,1%, a pesar de tener programas de vigilancia obligatorios en la leche de tanque (Katholm et al., 2012). En estudio realizado en 2010 en Colombia por *University of Prince Edward Island* - UPEI, COLANTA y el Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) - Universidad CES, donde se evaluaron muestras de leche provenientes de 498 tanques de enfriamiento distribuidos a nivel nacional, se evidenció una prevalencia de *S. agalactiae* del 42%, encontrándose mayor presencia en los tanques ubicados en Antioquia (Keefe et al., 2010c). Ramírez et al, (2014) encontró durante un estudio realizado también en Antioquia, una prevalencia de *S. agalactiae* a nivel de vaca del 34,5% (Ramírez et al., 2014).

La diseminación de *S. agalactiae* dentro del hato generalmente ocurre durante el proceso de ordeño, debido a prácticas inadecuadas que facilitan la infección cruzada entre animales (Haltia et al., 2006). Los animales infectados no detectados

o los que no responden al tratamiento con antibióticos, podrían ser reservorios de infección, situación que al final va a permitir que persista la bacteria dentro de la glándula mamaria y se dificulte su control o erradicación (Berry et al., 2002; Erskine et al., 2003; Boonyayatra, 2012). A este patógeno, generalmente se le ha reportado buena respuesta a la terapia antibiótica, especialmente a los betalactámicos (Erskine et al., 2002; Edmondson, 2011); sin embargo, en un estudio reciente realizado en China, se reportó que alrededor del 60% de los aislamientos (n=57) presentaron *In vitro* una disminución en la sensibilidad a los betalactámicos evaluados (resistencia fenotípica) (Ding et al., 2015).

S. agalactiae posee una variedad de factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad, pues permiten evadir la respuesta inmune, la adhesión e invasión de las células, la destrucción del tejido y la diseminación de la bacteria. Algunos de los factores de virulencia estudiados en cepas aisladas de mastitis bovina son: la peptidasa C5a (gen *scpB*), enzima localizada en la superficie bacteriana que se ha asociado con la disminución de la migración de neutrófilos, debido a la actividad proteolítica que ejerce sobre uno de los productos del complemento (C5a) encargado de la quimioatracción; además, se le ha atribuido la capacidad de unirse a la fibronectina para invadir las células epiteliales (Beckmann et al., 2002); la proteína de unión a la laminina (gen *lmb*) y la proteína alfa-C (gen *bca*), son moléculas de superficie implicadas en la adhesión e invasión celular (Tenenbaum et al., 2007; Zadoks et al., 2011; Li et al., 1997); la β -hemolisina (gen *clyE*), es una enzima con capacidad citotóxica, relacionada con el daño al tejido y con la diseminación de la bacteria (Rosa-Fraile et al., 2014); la enzima hialuronidasa (gen *hylB*), actúa principalmente sobre el hialuronato, destruyendo la estructura normal del tejido conectivo del huésped y exponiendo las células del tejido a diversas toxinas bacterianas (Rojo et al., 2008); por último, el factor CAMP (gen *cfb*), es una proteína que potencia la acción de la esfingomielinasa estafilocócica (beta – toxina) y al cual se le atribuye acción citotóxica sobre el tejido mamario (Merl et al., 2003; Beenu et al., 2012; Dmitriev et al., 2002).

Estudios realizados en diferentes países han identificado factores de virulencia tanto en cepas aisladas en humanos como en bovinos; sin embargo, en Colombia no existe ningún reporte de factores de virulencia en cepas de origen bovino; por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue identificar molecularmente algunos factores de virulencia en cepas de *S. agalactiae* aisladas de mastitis bovina y explorar la asociación con el número de tratamientos antibióticos aplicados a los animales infectados con este patógeno.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de corte, para identificar marcadores moleculares de virulencia de *S. agalactiae* aislados de leche de bovinos con mastitis y explorar la asociación con el número de ciclos de tratamiento recibidos por animal.

2.2 Población del estudio

Se incluyeron por conveniencia 181 cepas de *S. agalactiae* aisladas de muestras de leche de bovinos con mastitis. Las cepas incluidas se aislaron de 121 bovinos pertenecientes a 12 hatos de lechería especializada, ubicados en dos zonas del departamento de Antioquia: zona norte (Entrerriós, Don Matías, San José de la Montaña, Santa Rosa, San Pedro de los Milagros y Belmira) y zona oriente (La Unión y Abejorral).

2.3 Recolección de las muestras de leche

El muestreo fue realizado entre julio de 2013 y mayo de 2014 (Reyes et al., 2015). Se recolectó aproximadamente 30 ml de leche proveniente de los cuatro pezones (muestra compuesta), previa desinfección de los mismos. Las muestras se recolectaron en tres momentos diferentes, como se describe a continuación:

- Muestreo inicial (**inicio**): se realizó a todos los bovinos en producción pertenecientes a los 12 hatos incluidos; el objetivo, identificar los animales positivos a *S. agalactiae*.
- Muestreo de seguimiento (**seguimiento**): se realizó solo a los animales que resultaron positivos en el primer muestreo y que recibieron el primer ciclo de tratamiento, de acuerdo con lo descrito en el estudio de Reyes et al. (2015). Este muestreo se hizo 21 días después de aplicada la última dosis del antibiótico; el objetivo, detectar por cultivo los animales positivos después del primer ciclo de tratamiento (ver ítem 2.5, esquema de tratamiento).
- Muestreo final (**final**): se realizó a todos los animales muestreados inicialmente, aproximadamente, 64 días después del primer muestreo; el objetivo, identificar los animales positivos al final de los tratamientos aplicados (ver ítem 2.5, esquema de tratamiento).

Después de recolectadas las muestras se transportaron al laboratorio para su análisis microbiológico y determinación de grasa, proteína y recuento de células somáticas (RCS).

2.4 Aislamiento e identificación de las cepas de *S. agalactiae*

Cada muestra fue sembrada (0,01 mL) en agar sangre esculina e incubada a 37°C por 48 horas. Las colonias sospechosas (esculina negativa) se identificaron mediante las pruebas y criterios establecidos por el Consejo Nacional de Mastitis (NMC, por sus siglas en inglés) (NMC, 2004). Ver Tabla 1.

Para confirmar que las cepas identificadas por las técnicas convencionales correspondían a *S. agalactiae*, se seleccionaron 23 cepas aleatoriamente y se remitieron a un laboratorio externo para su identificación con el sistema comercial VITEK 2 Compact de Biomerieux.

Al final, todas las 181 cepas fueron almacenadas en caldo tripticasa soya glicerinado y conservadas a -80°C , hasta su reactivación para los estudios moleculares.

Tabla 1. Pruebas y criterios para la identificación microbiológica *S. agalactiae*

Prueba	Criterio de aceptación
Gram	Cocos Gram positivos
Catalasa	Negativa
CAMP	Positiva

2.5 Esquema de tratamiento de los animales infectados con la cepa *S. agalactiae*

Los animales positivos a *S. agalactiae* fueron tratados con dos antibióticos, tal como se describió en el estudio de Reyes et al., (2015). Estos animales fueron distribuidos en dos grupos para ser tratados con un antibiótico diferente cada grupo; un grupo fue tratado con antibiótico intramamario (Masticilina Lactación: 200 mg de cloxacilina y 75 mg de ampicilina) y otro grupo con intramuscular (Mamyzin P: Penetamato Idohidrato), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Reyes et al., 2015). Brevemente, se especifica el esquema empleado:

- Primer ciclo de tratamiento: administrado a todos los animales positivos, de acuerdo con el antibiótico asignado.
- Segundo ciclo de tratamiento: administrado a los animales que continuaron positivos a *S. agalactiae*, después del primer ciclo de tratamiento.

2.6 Análisis composicional para grasa, proteína y células somáticas (RCS).

El análisis composicional (grasa y proteína) se realizó con el equipo CombiFoss™ - MilkoScan (Foss, Dinamarca) y el RCS con el equipo Fossomatic™ FC 6000 (Foss, Dinamarca). Estos análisis se realizaron de acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio de calidad de leche de Colanta en San Pedro de los

Milagros (adaptado de NTC-ISO/IEC 17025:2005 y certificación PMO Ordenanza de leche pasteurizada grado A).

2.7 Reactivación de las cepas de *S. agalactiae*

Las 181 cepas almacenadas, fueron reactivadas mediante repique en agar sangre esculina e incubadas a 37°C por 48 horas. Después de verificado el crecimiento y la pureza de cada una de las cepas, se identificaron nuevamente como se describió en el ítem 2.4.

2.8 Extracción de ADN

A cada una de las cepas reactivadas se le realizó extracción de ADN, empleando el estuche comercial *QIAamp DNA minikit* de QIAGEN, (Hilden, Germany, Cat. N°69506), de acuerdo con el protocolo recomendado para la extracción de ADN de bacterias Gram positivas. La extracción se realizó a partir de 200 µl de una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^8 ufc/mL (equivalente a la escala 0,5 Macfarland). Posteriormente, se determinó la concentración de ADN y su pureza usando el equipo NanoDrop 2000c (*Thermo Fischer Scientific Inc, EE.UU*). El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.9 Selección y evaluación de los cebadores *In Silico*

Los cebadores se seleccionaron inicialmente teniendo en cuenta las referencias bibliográficas disponibles (Tabla 2). Para determinar su especificidad estos fueron evaluados mediante BLASTn (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) y el simulador online “*In Silico PCR amplification*” (www.insilico.ehu.eus/PCR), utilizando como referencia la secuencia del genoma de *S. agalactiae* 2603V/R (AE009948).

Tabla 2. Listado de cebadores utilizados en las PCR

Gen	Secuencia	Tamaño del producto (pb)	Referencia
<i>Imb</i>	F: GACGCAACACACGGCAT	300	(Dmitriev et al., 2002; Duarte et al., 2005,)
	R: TGATAGAGCACTTCCAAATTTG		
<i>scpB</i>	F: ACAATGGAAGGCGCTACTGTTC	255	(Dmitriev et al., 2002; Beenu et al., 2012)
	R: ACCTGGTGTTTGACCTGAACTA		

<i>cylE</i>	F: ACGGCTTGTCCATAGTAGTGTGTTG	345	(Dmitriev et al., 2002)
	R: AACGACACTGCCATCAGCAC		
<i>hylB</i>	F: ACAAATGGAACGACGTGACTAT	346	(Dmitriev et al., 2002)
	R: CACCAATTGGCAGAGCCT		
<i>cfb</i>	F: ATGGGATTTGGGATAACTAAGCT	193	(Dmitriev et al., 2002)
	R: AGCGTGTATTCCAGATTTCTTAT		
<i>bca</i>	F: CAGAGTACAGGAAGGGCTAGTC	183	(Dmitriev et al., 1999, 2002)
	R: TTCTCCGTCCACTTAGGATC		

2.10 Identificación de los marcadores de virulencia

A cada uno de los aislamientos obtenidos se les buscó mediante técnicas moleculares basadas en PCR los siguientes marcadores genéticos asociados a virulencia: proteína de unión a la laminina (*lmb*), peptidasa C5a (*scpB*), β -hemolisina (*cylE*), enzima hialuronidasa (*hylB*), factor CAMP (*cfb*) y proteína alfa-C (*bca*).

2.11 PCR's empleadas para la identificación de los marcadores

Se realizaron dos PCR múltiples, una donde se incluyeron los marcadores *bca* y *hylB* y otra para los marcadores *cylE*, *lmb*, *cfb*. Para el marcador *scpB* se realizó una PCR individual. Como control se utilizó la cepa de referencia de *S. agalactiae* ATCC® BAA-611™. Las PCR se realizaron en el termociclador BioRad MyCycler.

2.11.1 PCR's múltiple para los marcadores *bca*, *hylB*, *cylE*, *lmb* y *cfb*

Las dos PCR múltiples se realizaron bajo las mismas condiciones de reacción y amplificación. A continuación, se describen las condiciones de reacción y amplificación empleadas: 25 μ L de volumen final de reacción, el cual contenía 12.5 μ L del master mix PCR múltiplex QIAGEN® (Cat. N° 206143), 2,5 μ L de una mezcla de iniciadores que contenían 0.2 μ M de cada uno (Tabla 2), 2.5 μ L del ADN y 7.5 μ L de agua Milli-Q estéril. El perfil térmico fue: 95°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 90 segundos, y 72°C por 90 segundos; por último, una extensión a 72°C por 10 minutos (Dmitriev et al., 2002, 2004).

2.11.2 PCR para el marcador *scpB*

Las condiciones de reacción y amplificación para esta PCR fueron: volumen final de reacción 25 μL , el cual contenía 5 μL de buffer de PCR (KCl) a una concentración 10X, (*Thermo Scientific Taq DNA polymerase [recombinant]*, (Cat. N° EP0405, Lot: 00170353)), 3,5 μL de MgCl_2 a una concentración de 3,0 mM, (*Thermo Scientific Taq DNA polymerase [recombinant]*, (Cat. N° EP0405, Lot: 00170353)), 1 μL de cada uno de los iniciadores a una concentración 0,2 μM (Tabla 2), 0,2 μL de dNTP a una concentración de 0,25 mM (*Thermo Fisher Scientific – Fermentas, dTTP solution* (Cat. N° R0171), *dATP solution* (Cat. N° R0141), *dGTP solution* (Cat. N° R0161) y *dCTP solution* (Cat. N° R0151) y 1,25 μL de *Taq* polimerasa a una concentración de 1U/ μL (*Thermo Scientific Taq DNA polymerase [recombinant]*, (Cat. N° EP0405, Lot: 00170353)), 2 μL de ADN y 11.05 μl agua Milli-Q estéril. El perfil térmico fue: 95°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguida de 40 ciclos a 94°C durante un minuto, 55°C durante un minuto y 72°C durante dos minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

2.12 Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis a 100 voltios por una hora, en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y se capturaron las imágenes empleando el analizador de imagen Epichemi3 DarkRoom.

2.13 Conformación de perfiles de cepas

De acuerdo con la presencia/ausencia del marcador amplificado de los seis genes de virulencia, se agruparon los aislamientos de estudio. Estos grupos fueron denominados “perfiles”, los cuales se identificarán con números consecutivos (1-5), Cada perfil correspondió a una combinación específica de los seis genes, iniciando con el perfil 1; en éste se incluyeron las cepas con el menor número de marcadores amplificados. A medida que aumentaba el número de marcadores amplificados, se le asignó al perfil el número consecutivo correspondiente.

2.14 Conformación de los grupos y la variable respuesta

2.14.1 Conformación de los grupos

Los aislamientos incluidos en este estudio fueron también agrupados de acuerdo con los ciclos de tratamientos aplicados a cada animal (un ciclo o dos ciclos) y con el número de veces que el patógeno fue aislado del animal tratado (Reyes et al., 2015). A continuación, se describen los grupos establecidos:

Grupo 1: las cepas aisladas en los tres muestreos realizados (inicio, seguimiento y final) a los animales que recibieron dos ciclos de tratamiento.

Grupo 2: las cepas aisladas en dos muestreos (inicio y seguimiento) de los tres muestreos realizados a los animales que recibieron dos ciclos de tratamiento.

Grupo 3: las cepas aisladas en dos muestreos (inicio y final) de los tres muestreos realizados a los animales que solo recibieron un ciclo de tratamiento.

Grupo 4: las cepas aisladas en un solo muestreo (inicio) de los tres muestreos realizados a los animales que solo recibieron un ciclo de tratamiento.

2.14.2 Variable respuesta

La variable respuesta se realizó a nivel de vaca, fue conformada como binaria, donde “0” correspondió a los aislamientos de los animales que requirieron un ciclo de tratamiento (Grupos 3 y 4) y “1” a los aislamientos de los animales que requirieron dos ciclos de tratamiento (Grupos 1 y 2).

2.15 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Se evaluó el perfil de susceptibilidad a los antibióticos, mediante el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) a los aislamientos de *S. agalactiae* que se les detectó el marcador de virulencia “*Imb*”. La CMI fue determinada en un laboratorio externo empleando el sistema comercial “*VITEK 2 Compact*” de Biomerieux específico para *Streptococcus* (AST- ST01). (Julio et al., 2014).

2.16 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables cualitativas y cuantitativas de interés y un análisis bivariado para explorar la distribución de las variables y su relación con el número de ciclos. El análisis multivariado se realizó al nivel de vaca, debido a que la variable respuesta fue medida al nivel de animal tratado. Posteriormente se realizó el análisis a nivel multivariado, usando un modelo de regresión logístico mixto de dos niveles, con el objetivo de explorar las asociaciones entre los perfiles de virulencia más frecuentes y los ciclos del tratamiento. La parte aleatoria del modelo estuvo conformada por los hatos. La descomposición de la varianza (σ^2) del modelo se realizó por medio del método de la variable latente (Dohoo et al., 2009).

$$\rho = \sigma^2_{\text{hato}} / (\sigma^2_{\text{hato}} + \pi^2 / 3)$$

El almacenamiento de los datos se realizó en hojas de cálculo de Excel y el análisis estadístico se realizó con el programa Stata versión 14 (StataCorp. Texas, USA 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Análisis descriptivo

3.1.1 Variables composicionales y sanitaria de la leche

Se realizó descripción de las variables composicionales y sanitarias de los hatos lecheros, los cuales no se usaron en la modelación epidemiológica. El análisis composicional de grasa, proteína y RCS se realizó a cada uno de los animales positivos a *S. agalactiae* durante los tres muestreos. Las variables grasa y proteína tuvieron una mediana de 2,61% y 3,30%, respectivamente (Tabla 3). Para el RCS se encontró que el 75% de los datos tenían al menos 1527, con una mediana de 643 y un rango intercuartil de 1302.

Tabla 3. Distribución de variables composicionales y sanitarias de la leche en los animales de estudio

Percentiles	Grasa	Proteína	RCS x 1000
25	2,06	3,03	225
50	2,61	3,3	625
75	3,07	3,58	1527

3.1.2 Distribución de los aislamientos por hatos y zonas

Tabla 4. Distribución de los 181 aislamientos en los 12 hatos y por zonas

Zona - Municipio		Número de hatos	Número de Animales positivos a <i>S. agalactiae</i>	Número de aislamientos
Oriente	La Unión	1	3	3
	Abejorral	10	6	12
Norte	Entrerrios	2	9	14
	Don Matías	3	15	30
		5	5	5
		7	9	10
	San José de la Montaña	4	18	32
		9	8	8
	Santa Rosa	6	15	28
		8	3	3
San Pedro	11	19	25	
Belmira	12	11	11	
Total	8	12	121	181

3.1.3 Distribución de los aislamientos en los grupos de tratamiento.

En la tabla 5 se observa la distribución de los 181 aislamientos de *S. agalactiae* de acuerdo con el grupo establecido (Ítem 2.14.1).

Tabla 5. Distribución de los 181 aislamientos de *S. agalactiae*, según el grupo

Muestreo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Inicio	15	11	19	76
Seguimiento	15	11	0	0
Final	15	0	19	0
Total	45 (25%)	22 (12%)	38 (21%)	76 (42%)

3.1.4 Marcadores de virulencia amplificados en los aislamientos de *S. agalactiae* evaluados.

3.1.4.1 Amplificación de los marcadores *hylB* y *bca* (PCR múltiple 1)

En el 100% (181/181) de los aislamientos de *S. agalactiae* evaluados se amplificó el marcador *hylB* y no se obtuvo amplificación del marcador *bca*. El marcador *bca* fue analizado también individualmente siguiendo el protocolo descrito por Dmitriev et al. (2002), para corroborar la ausencia del gen y tampoco se obtuvo amplificado (0/181). (Figura 1, 4).

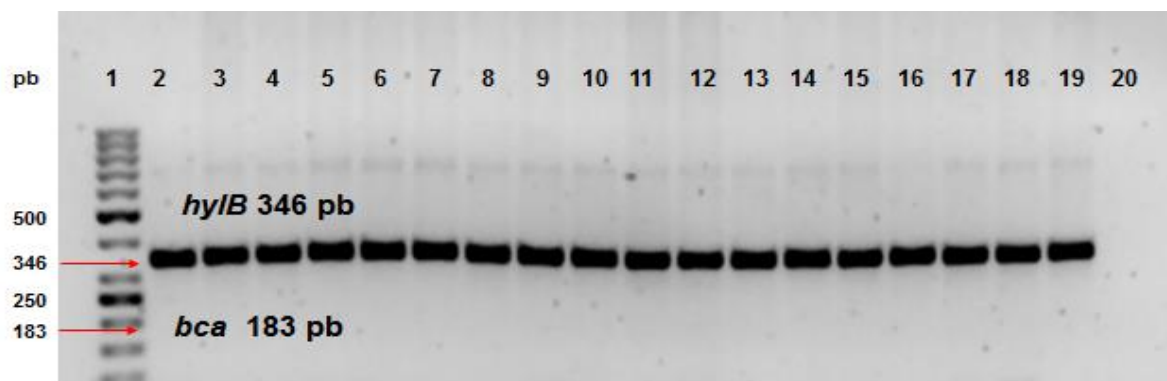


Figura 1. Gel de electroforesis de agarosa al 2% donde se observan los productos de la PCR múltiple 1 para los marcadores *hylB* y *bca*; carril 1: marcador de peso molecular (50pb), carril 2: control positivo (cepa de referencia *S. agalactiae*); carril 3 a 19: amplificados de los aislamientos de *S. agalactiae*; carril 20: control negativo (agua Milli-Q estéril).

3.1.4.2 Amplificación de los marcadores *cylE*, *lmb* y *cfb* (PCR múltiple 2)

En el 100% (181/181) de los aislamientos de *S. agalactiae* evaluados se amplificó el marcador *cylE*, en el 15,47% (28/181) el marcador *lmb* y en el 99,45% (180/181) el marcador *cfb* (Figura 2, 4).

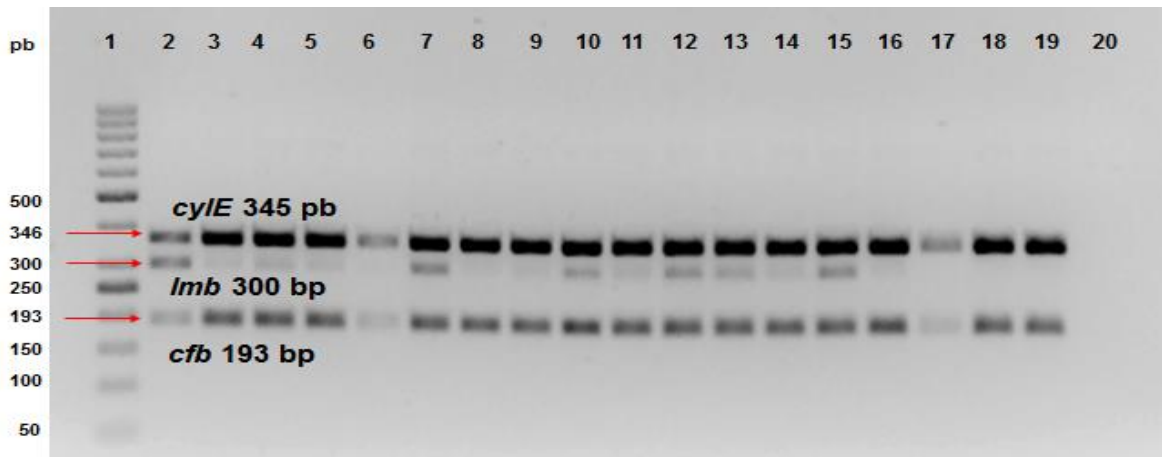


Figura 2. Gel de electroforesis de agarosa al 2% donde se observan los productos de la PCR múltiple 2 para los marcadores *cyle*, *lmb* y *cfb*; carril 1: marcador de peso molecular (50pb), carril 2: control positivo (cepa de referencia *S. agalactiae*); carril 3 a 19: amplificados de los aislamientos de *S. agalactiae*; carril 20: control negativo (agua Milli-Q estéril).

3.1.4.3 Amplificación del marcador *scpB*

En el 40.33% (73/181) de los 181 aislamientos de *S. agalactiae* evaluados se amplificó el marcador *scpB* (Figura 3, 4).

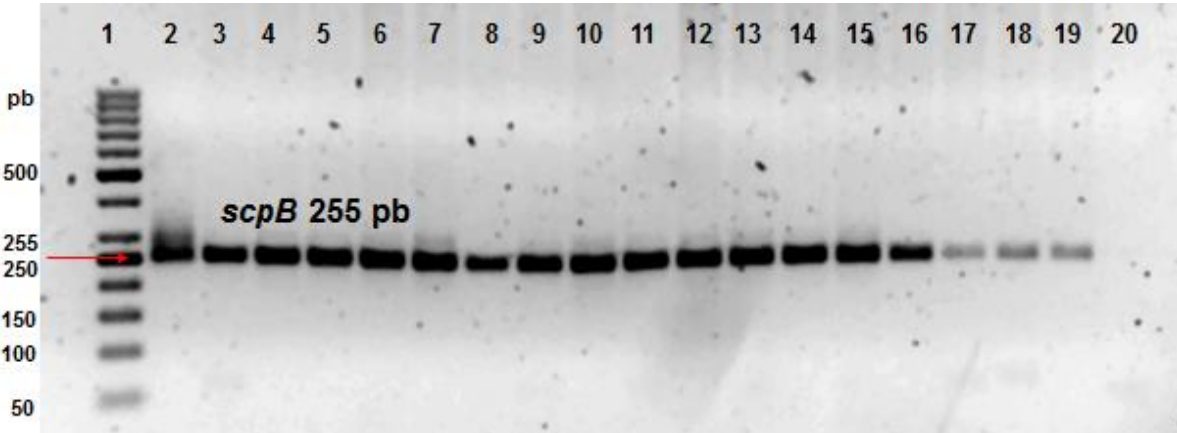


Figura 3. Gel de electroforesis de agarosa al 2% donde se observan los productos de la PCR para el marcador *scpB*; carril 1: marcador de peso molecular (50pb), carril 2: control positivo (cepa de referencia *S. agalactiae*); carril 3 a 19: amplificados de los aislamientos de *S. agalactiae*; carril 20: control negativo (agua Milli-Q estéril).

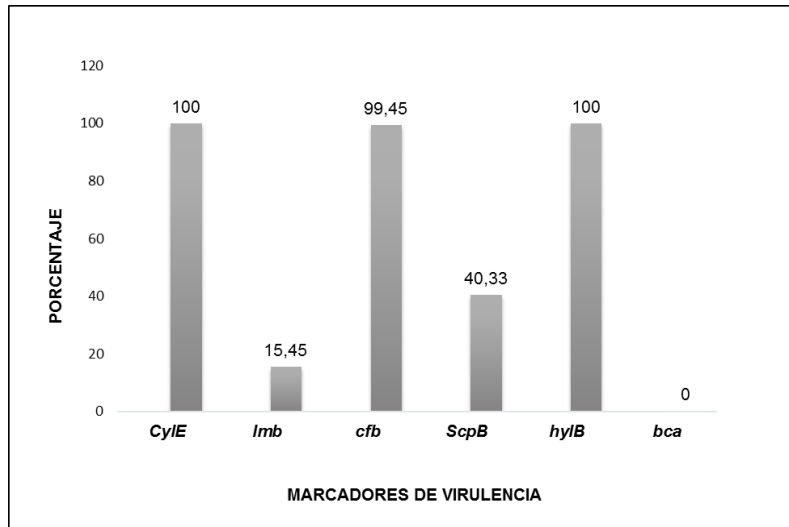


Figura 4. Frecuencias de los seis marcadores de virulencia evaluados en los 181 aislamientos de *S. agalactiae*.

3.1.5 Distribución de los marcadores de virulencia en los 12 hatos

En el 100% de los hatos lecheros se amplificó los marcadores *hylB*, *cyIE* y *cfb*, en el 75% el marcador *scpB* y en el 25% el marcador *lmb* (Figura 5).

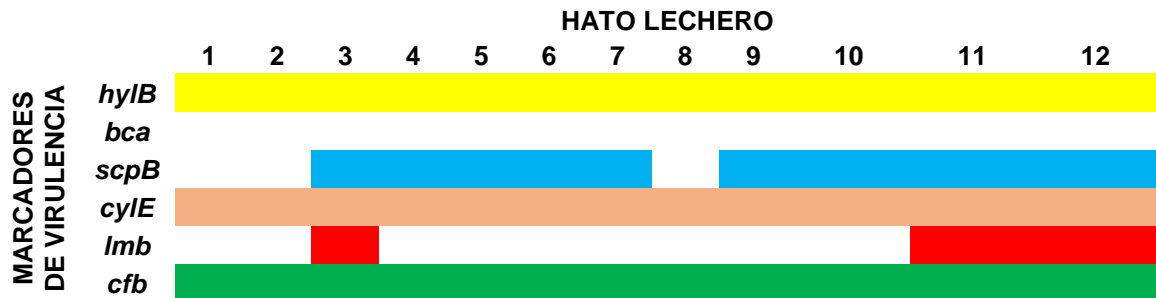


Figura 5. Distribución de los marcadores de virulencia en los 12 hatos lecheros de estudio.

3.1.6 Perfiles de virulencia

Los perfiles de virulencia establecidos para los 181 aislamientos se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Perfiles de virulencia establecidos para los 181 aislamientos.

Perfil	Combinación de genes						Número de aislamientos	%
	<i>hylB</i>	<i>cylE</i>	<i>cfb</i>	<i>lmb</i>	<i>scpB</i>	<i>bca</i>		
1	A	A	NA	NA	NA	NA	1	0,6
2	A	A	A	NA	NA	NA	105	58
3	A	A	A	A	NA	NA	2	1,1
4	A	A	A	NA	A	NA	47	26
5	A	A	A	A	A	NA	26	14,4
Total							181	100

A: Marcador amplificado - NA: Marcador no amplificado

3.1.7 Distribución de los perfiles de virulencia por zona geográfica

En la figura 6 se observa la distribución de los perfiles por zonas geográficas, en donde se puede evidenciar que los perfiles menos frecuentes fueron el perfil 1 con una distribución del 7,1% en el municipio de Entreríos y el perfil 3 con una distribución del 4% en el municipio de San Pedro y San José de la Montaña con un 2.5%. El perfil 5 se encontró solo en la zona norte: San Pedro con un 12%, Belmira con un 54.5% y Don Matías con un 37.8%. El perfil 4 se encontró en la zona norte: Don Matías con un 35.6%, San José de la Montaña con un 25%, Santa Rosa con un 22.6%, San Pedro con un 36%, Belmira con un 27.3% y en la zona de oriente: Abejorral con un 16.7%, mientras que, el perfil 2 tuvo distribución en la totalidad de las zonas evaluadas, con una distribución del 100% para el municipio de la Unión, Entreríos con un 92.9%, Abejorral con un 83.3%, Santa Rosa con un 77.4%, San José de la Montaña con un 72.5%, San Pedro con un 48%, Don Matías con un 26.7% y Belmira con un 18.2%.

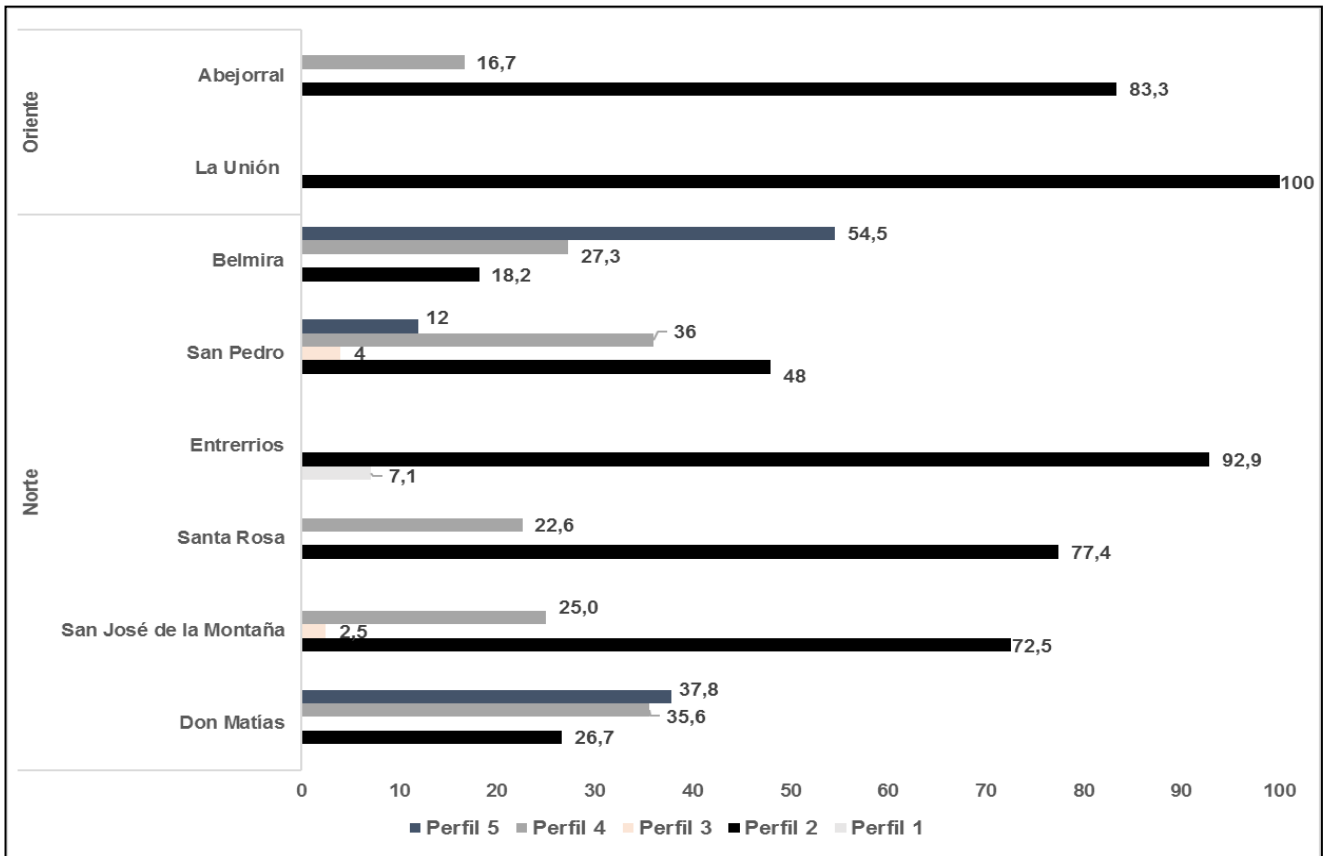


Figura 6. Distribución de los perfiles de virulencia por zona geográfica

3.2 Análisis bivariado

Para este análisis fueron excluidos dos perfiles, el perfil 1 (un aislamiento) y el perfil 3 (dos aislamientos), por lo tanto, también se excluyó un animal, debido a que en este se aisló una de las cepas eliminadas. Solo quedaron para el análisis los perfiles 2, 4 y 5, distribuidos en 120 animales. El análisis bivariado se realizó para explorar la distribución de cada marcador genético y la relación con el número de ciclos de tratamiento (Tabla 7). En los resultados del análisis no se observó asociación entre los marcadores *hylB*, *cylE*, *cfb*, *scpB* y el número de ciclos de tratamiento, mientras que, con el marcador *lmb* se observó asociación entre la presencia de este marcador y la aplicación de más de un ciclo de tratamiento a los animales infectados (Tabla 8).

Tabla 7. Distribución de los perfiles de virulencia más frecuentes y ciclos de tratamiento en 120 animales de *S. agalactiae*

Perfil	Combinación de genes						Número de animales	%	Ciclos de tratamiento	
	<i>hylB</i>	<i>cylE</i>	<i>cfb</i>	<i>lmb</i>	<i>scpB</i>	<i>bca</i>			1 Ciclo	2 Ciclos
2	A	A	A	NA	NA	NA	63	52.5	52 (82.5%)	11 (17.5%)
4	A	A	A	NA	A	NA	41	34.2	34 (82.9%)	7 (17.1%)
5	A	A	A	A	A	NA	16	13.3	8 (50%)	8 (50%)
Total							120	100	94 (78.3%)	26 (21.7%)

Tabla 8. Asociación del marcador *lmb* y los ciclos de tratamiento en los animales de estudio.

Ciclos de Tratamiento	Marcador <i>lmb</i>			Valor p
	Ausencia	Presencia	Total	
0	86 (91.4%)	8 (8.5%)	94	0.0029
1	18 (69.2%)	8 (30.8%)	26	
Total	104	16	120	

0: los animales que recibieron un ciclo de tratamiento

1: los animales que recibieron dos ciclos de tratamiento

3.3 Modelo multivariado

En el modelo de regresión logístico mixto, se pudo observar la asociación estadísticamente significativa ($p=0.051$) entre los perfiles y los ciclos de tratamiento por medio del estadístico de Wald para hipótesis lineales compuestas.

El perfil 5 tuvo incremento en el logaritmo de odds en 5.8 de los ciclos de tratamiento, comparado con el perfil 2 (Tabla 9). Es decir, el perfil 5 incrementó el riesgo de recibir más de dos ciclos de tratamiento. Con respecto al componente aleatorio del modelo, el porcentaje de la varianza de los datos explicado por el modelo fue de 79%.

Tabla 9. Modelo de regresión logístico con efectos mixtos de dos niveles entre los ciclos de tratamientos y perfiles de virulencia

Perfil 2 (Referencia) Ciclos de Tratamiento	Coef.	Err. Std	Z	Valor p^1	95% IC ²	
					LI ³	LS ³
Perfiles						
4	.304	.672	0.45	0.651	-1.014	1.623
5	5.812	2.389	2.43	0.015	1.129	10.495

Efectos aleatorios por hato	Parámetros	Estimación	Err. Std	95% IC ²	
				LI ³	LS ³
	Varianza	12.9	10.9	2.4	67.9

p^1 valor utilizado en la prueba de la hipótesis nula del coeficiente.

IC² Intervalo de Confianza del 95%: LI³= límite inferior; LS³ = límite superior

3.4 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Fue realizado al 78.5% (22/28) de las cepas que portaban el marcador de virulencia “*Imb*”, por ser el único marcador que se asoció con más de dos ciclos de tratamiento antibiótico. Solo se realizó a 22 cepas, debido a que las cepas restantes no cumplieron con las condiciones mínimas de crecimiento (inhibición) requerida para realizar el ensayo. El 18.2% fue sensible a todos los antimicrobianos, el 86.3% fue resistente a la tetraciclina, y el 31.8% fue resistente a eritromicina y clindamicina. (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba de susceptibilidad a los antibióticos para *S. agalactiae* con el marcador “*Imb*”

Antibiótico	CMI (µg/mL)		Resultado (% de cepas)		
	Mínimo	Máximo	S	I	R
*Bencilpenicilina	<= 0,06	0,12	100	-	-
*Ampicilina	<= 0,25	0,25	100	-	-
*Cefotaxima	<= 0,12	0,12	100	-	-
*Ceftriaxona	<= 0,12	0,12	100	-	-
Levofloxacino	0,5	2	100	-	-
Resistencia inducible a Clindamicina	Neg	Neg	100	-	-
Eritromicina	<= 0,12	>= 8	68.2	-	31.8
Clindamicina	<= 0,5	>= 1	59.1	9.1	31.8
Linezolid	<= 2	2	100	-	-
Vancomicina	0,5	1	100	-	-
Tetraciclina	<= 0,25	>= 16	13.7	-	86.3
Trimetoprima/Sulfametoxazol	<= 10	10	100	-	-

S, Sensibilidad; I, Resistencia intermedia; R, Resistencia.

*Grupo de betalactámicos

4. Discusión

Los marcadores de virulencia que fueron objeto de estudio son algunos de los más frecuentes presentes en los aislamientos de *S. agalactiae* en bovinos, los cuales están implicados en la adhesión e invasión de células del huésped, así como, en la evasión del sistema inmune.

Los hallazgos evidenciaron la presencia de cinco de los seis marcadores evaluados. En las 181 cepas de *S. agalactiae* aisladas, se logró amplificar los marcadores *cylE* y *hylB* en un 100% (181/181), el marcador *cfb* en el 99,4% (180/181), resultados acordes a lo hallado en Rusia por Dmitriev et al. (2002), que reportaron 100% (33/33) de amplificación en los aislamientos de bovinos. Shome et al. (2012) en India, encontró que el marcador *cfb* fue amplificado en el 100% (30/30) de las cepas aisladas de bovinos. A diferencia de lo evidenciado en este estudio, Beenu et al. (2012) en India identificó el marcador *cylE* solo en un 22,2%

(6/27) de los aislamientos bovinos incluidos y Ding et al. (2015) en China, amplificó algunos de los marcadores evaluados en aproximadamente la mitad de las cepas; el marcador *hylB* en el 49,4% (40/81), el *cfb* en el 50,6% (41/81), el *cyIE* en el 48,1% (39/81).

En las 40,3% (73/181) de las cepas de *S. agalactiae* evaluadas, se logró amplificar el marcador *scpB*, diferente a lo hallado por Dmitriev et al. (2002), Beenu et al. (2012) y Ding et al. (2015) quienes reportaron el 21% (7/33), el 22,2% (6/27) y el 4,9% (4/81), respectivamente. Duarte et al. (2004 - 2005), en Brasil, obtuvo resultados similares a este trabajo, pues lograron amplificar el marcador *scpB* en el 50,5% (43/85) y en el 65,8% de las cepas evaluadas en los dos estudios. Shome et al. (2012) en India, no detectaron el marcador en ninguna de las cepas bovinas estudiadas.

El 100% de los aislamientos no presentó el gen *bca*, diferente a lo hallado por otros estudios (Dmitriev et al., 2002; Duarte et al., 2004; Duarte et al., 2005; Ding et al., 2015) que reportaron amplificado en el 52% (17/33), en el 64,7% (55/85), en el 78,9% (30/38) y en el 3,7% (3/81), respectivamente.

El marcador *Imb* se identificó en el 15,4% de los aislamientos, similar a lo reportado por Duarte et al. (2005), en Brasil, que reportaron 15,8% (6/38) y por Ding et al. (2015), que reportaron el 21% (17/81); contradictorio a lo hallado por Duarte et al. (2004), donde reportaron solo un 8,2% (7/85), mientras que, en el estudio de Shome et al. (2012) no reportaron amplificado. En los estudios publicados por Dmitriev et al. (2002) y Beenu et al. (2012), los resultados mostraron porcentajes superiores a lo encontrado en este trabajo, el 39% (13/33) y el 29,6% (8/27), respectivamente.

Interesantemente, se halló en este trabajo que la presencia del gen "*Imb*", podría estar implicado en el fracaso de la terapia antibiótica, pues se encontró que los animales infectados con cepas positivas para este marcador requirieron más de un

ciclo de tratamiento, a pesar de ser sensibles *In vitro* a los antibióticos betalactámicos. Se ha demostrado en aislamientos humanos que las cepas portadoras de este gen presentan mayor capacidad de invasión celular que las no portadoras, característica que le permite quedar fuera del alcance de los antibióticos, incluso, de la respuesta inmune (Spellerberg et al., 1999; Tenenbaum et al., 2007).

Adicionalmente, nuestro interés fue determinar la sensibles a los betalactámicos al 78.5% (22/28) de las cepas que portaban el marcador de virulencia *Imb*, único marcador que tuvo significancia estadística frente a la asociación con los ciclos de tratamiento, determinando que el 100% fueron fenotípicamente sensible a los betalactámicos (Tabla 10), antibióticos utilizados como primera elección para infecciones estreptocócicas de la ubre (Denamiel et al., 2005), siendo la penicilina el fármaco de elección para el tratamiento de infecciones por *S. agalactiae* tanto humanas como bovinas (Keefe, 1997). Estudio realizado por Gao et al. (2012), evidenció susceptibilidad a la penicilina en un 100% en los aislamientos de *S. agalactiae* de vacas con mastitis, dato similar a lo hallado en nuestro estudio, pero difiere a lo hallado por Ding et al. (2015), donde observó resistencia superior al 60% para los betalactámicos. El hallazgo del gen *Imb* y la susceptibilidad antibiótica sugiere la asociación del marcador con la supervivencia en la glándula mamaria del *S.agalactiae*, independientemente de la susceptibilidad a los antibióticos betalactámicos en este caso. La persistencia del *S. agalactiae* puede ser potencializada por medio de su capacidad de adherencia a las células alveolares o a la invasión asintomática de la glándula mamaria. Esta invasión asintomática se ha descrito previamente en el *S.agalactiae* el cual produce infecciones subclínicas (Keefe, 2012). Justo con la adherencia, Rosini et al. (2015) demostró que algunas adhesinas de *S. agalactiae* desempeñan un papel en la formación de biofilm bacteriano (Rosini et al., 2015), que podría estar asociado a un aumento de la resistencia a los antimicrobianos (Boonyayatra et al., 2016; Beceiro et al., 2013). Beceiro et al. (2013) ha descrito la relación entre los factores de virulencia y el perfil de susceptibilidad. Esta relación difiere según los géneros y la especie de la

bacteria y se han propuesto los mecanismos de coselección y mutaciones compensatorias que favorecen la persistencia de patógenos más virulentos y resistentes (Beceiro et al., 2013). Adicionalmente, los genes de virulencia y resistencia se han obtenido por medio de transferencia horizontal de genes, considerado como un mecanismo evolutivo de las bacterias. Específicamente para *Streptococcus* beta hemolíticos, el gen *Imb* se ha reportado como un transposon de 16 kb, que potencialmente puede ser transferido por medio de transferencia horizontal de genes y mediar la colonización y/o causar enfermedad del huésped. (Franken et al., (2001).

Con la información anterior, las detecciones microbiológicas convencionales junto con las pruebas de sensibilidad no son suficientes para tomar decisiones referentes a la eliminación o el control de este patógeno dentro del hato. En estos casos, la detección de este gen y otros factores de virulencia mediante técnicas moleculares entraría hacer parte de las opciones diagnósticas, lo que al final conllevaría a replantear las medidas de control recomendadas y aplicadas en el medio.

En conclusión, Es el primer reporte en Colombia donde se identificó genes de virulencia en cepas de *S. agalactiae* aisladas de mastitis bovina y se encontró asociación con la respuesta al tratamiento antibiótico.

Se evidenció variabilidad en las cepas de estudio, lo que podría explicar el comportamiento clínico y la epidemiología de la bacteria.

Este estudio deja como pregunta abierta para trabajos futuros, si verdaderamente la presencia del gen *Imb* en las cepas de *S. agalactiae*, está implicado o no en la respuesta del tratamiento.

Probablemente las detecciones microbiológicas convencionales y las pruebas de sensibilidad no son suficientes para tomar decisiones frente al manejo de este patógeno en el hato lechero.

Se sugiere implementar herramientas moleculares para el diagnóstico de estos marcadores de virulencia.

Se debe continuar investigando estos factores de virulencia asociados con el *S. agalactiae* para reducción las afectaciones negativas a los productores lácteos y la industria.

AGRADECIMIENTO

Primero a Dios, a mi familia por apoyarme incondicionalmente siempre en todo lo que me he propuesto.

A la Cooperativa COLANTA, a todo el personal directivo que de una u otra manera estuvo involucrado, así como, al Instituto Colombiano de Medicina Tropical; a mis tutores Giovanni Torres Lindarte y Julián Reyes Vélez, por brindarme su conocimiento, su paciencia y su disposición para que esté trabajo fuera un aprendizaje académico y personal.

¡Con toda gratitud a todas las personas que contribuyeron al éxito de esta investigación, Dios les pague!

CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaramos que no existen conflictos de interés

FUENTE DE FINANCIACIÓN

Por el Instituto Colombiano de Medicina Tropical, la Cooperativa COLANTA y Colciencias.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Beckmann, C., JD, Waggoner., TO, Harris., GS, Tamura., CE, Rubens. (2002). Identification of novel adhesins from group B *Streptococci* by use of phage display reveals that c5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun*, 70:2869–76.
- Beceiro, A., M, Tomás., G, Bou. (2013). Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World. *Clin. Microbiol. Rev.* 26:185–230. [doi:10.1128/CMR.00059-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12)
- Berry, EA., JE Hillerton. (2002). The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *J. Dairy Science.* 85: 112–121.
- Bedoya, CC; L, Ponce. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera, *Redvet. Revista electrónica de Veterinaria*, Vol. IX (No 4), <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
- Beenu, J., Anuj, T., BB, Bhandari., K, JhalaMayur. (2012). Antibiotic resistance and virulence genes in Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. *veterinarski arhiv*, 82(5), 423–432.
- Boonyayatra, S. (2012). Tratamiento de la mastitis bovina durante el período de lactancia. *Chiang Mai Vet. J* 10: 89 - 109.
- Boonyayatra, S., P, Pata., P, Nakharuthai., and W, Chaisri. (2016). Antimicrobial Resistance of Biofilm-Forming *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis. *J. Vet. Sci. Technol.* [doi:10.4172/2157-7579.1000374](https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000374).
- Caliot, E., D, Shaynoor., MP, Chapot-Chartier., P, Courtin., S, Kulakauskas., C, Longin., CP, Trieu., M, Mistou. (2012). Role of the Group B Antigen of *Streptococcus agalactiae*: A Peptidoglycan-Anchored Polysaccharide Involved in Cell Wall Biogenesis. *PLoS Pathogens*, vol 8 (6), www.plospathogens.org.
- Ding, Y., J, Zhao., H, Xiuling., M, Li., G, Hong., Z, Zhang & P, Li. (2015). Antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* obtained from dairy cows with mastitis in Inner Mongolia, China. *pharmaceutical Biology*, 54:1, 162-167. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1025290>
- Dmitriev, A., E, Shakleina., I, Mikula., A, Totolian. (2002). Genetic Heterogeneity of the Pathogenic Potentials of Human and Bovine Group B *Streptococci*. *Folia Microbiol*, Vol 47 (3), 291-295.
- Dmitriev, A., A, Suvorov., A, Shen., YH, Yang. (2004): Clinical diagnosis of group B *Streptococci* by scpB gene based PCR. *Indian J. Med. Res.* Vol 119, 233-236.

- Dohoo, I., W, Martin., and H, Stryhn. (2009). Veterinary Epidemiologic Research. 2nd ed. AVC Inc., Charlottetown.
- Doran, KS., GY, Liu., V, Nizet. (2003). Group B *Streptococcal* beta hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. J Clin Invest 112:736–44.
- Duarte, RS., M, Otavio., B, Bruna., MA, Brito., LM,Teixeira. (2004). Phenotypic and Molecular Characteristics of *Streptococcus agalactiae* Isolates Recovered from Milk of Dairy Cows in Brazil. Journal of clinical microbiology, Vol. 42, No. 9, 4214–4222
- Duarte, R; B, Bruna., M, Otavio., MA, Brito., LM,Teixeira. (2005). Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B *Streptococci* Recovered from Bovine and Human Sources. Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol 49 (1), 97–103.
- Duran-Reynals F. (1942). Tissue permeability and spreading factors in infection. Bacteriol Rev 6:197–252.
- Edmondson, P. (2011). Blitz therapy for the eradication of *Streptococcus agalactiae* infections in dairy cattle. in pract. 33:33-37. [http:// dx.doi.org/10.1136/inp.c7449](http://dx.doi.org/10.1136/inp.c7449)
- Erskine, R.J., RD, Walker., CA, Bolin., PC, Bartlett., and DG, White. (2002). Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci. 85:1111-1118. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74172-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74172-6).
- Erskine, R.J., S, Wagner., FJ, DeGraves. (2003). Mastitis therapy and pharmacology. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 19:109–138. [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00067-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00067-1).
- Franken, C., G, Haase., C, Brandt., J, Weber-Heynemann., S, Martin., C, Lämmler., A, Podbielski., R, Lütticken., B, Spellerberg. (2001), Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic *Streptococci*: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *Imb*; Molecular Microbiology 41(4), 925–935.
- Gao, J., Y, Fu-Qing., L, Li-Ping., H, Jian-Zhong., H, Rong-Guang., Z, Han-Qi., L, Shu-Mei., S, Jing-Liang., H, Bo. (2012). Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. The Veterinary Journal 194 (2012) 423–424
- Haltia, L., T, Honkanen-Buzalski., I,Spiridonova., A, Olkonen., A, Myllys. (2006). A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25

Estonian dairy herds. Acta Vet. Scand. 48: 22–27. [doi:10.1186/1751-0147-48-22](https://doi.org/10.1186/1751-0147-48-22).

Julio, JA., JC, Hernández., MC, Suárez. (2014). Identificación Manual y Automatizado de Aislamientos de la Familia *Streptococcaceae* Provenientes de muestras de leche de vacas. Researchgate. <https://www.researchgate.net/publication/272621471>

Katholm, J., TW, Bennedsgaard., MT, Koskinen., and E, Rattenborg. (2012). Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 95:5702–5708.

Keefe, G. (2010a). Control de Mastitis en hatos lecheros. VII seminario Internacional Competitividad en carne y leche COLANTA, 43 – 51.

Keefe, G. 2012. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 28:203–216.

Keefe, G. (2010b). Mastitis: Su efecto en la calidad de la leche y plan de control. VII seminario Internacional Competitividad en carne y leche COLANTA, 59 – 62.

Keefe, G., A, Ceballos., JM, Ceron., M, Jaramillo., M, Londoño., M, Chaffer., M, Toro., MI, Montoya. (2010c). Prevalencia de *Streptococcus agalactiae* en tanques de enfriamiento en la Cooperativa COLANTA. VII seminario Internacional Competitividad en carne y leche COLANTA.

Keefe, G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. Can Vet J, Vol38, 429– 437.

Lindahl G, M, Atalhammar-Calemalm, T, Areschoug. (2005). Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clinical Microbiol. Rev, Vol18 (1):102-127.

Li J., D, Kasper., F, Ausubel, B, Rosner., and J, Michel. (1997). Inactivation of the α C protein antigen gene, *bca*, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B *Streptococcus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Microbiology, Vol. 94, 13251–13256

Martínez, G., J, Harel., R, Higgins., S, Lacouture., D, Daignault., and M, Gottschalk. (2000). Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates of Bovine and Human Origin by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. Journal of clinical microbiology, 38(1), 71–78.

- Martínez, M., A, Ovalle., C, Durán., I, Reid., G, Urriola, B, Garay, M, Cifuentes. (2004). Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae*. Rev.Med. Chile., Vol 132, 549-555.
- Merl, K., A, Abdulmawjood., C, Lämmler., M, Zschöck. (2003). Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. FEMS. Microbiology Vol 226, 87-92.
- NMC, (*National Mastitis Council*). (2004), Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality, NMC a global organization for Mastitis Control and Milk Quality, Vol 4, 1-18.
- Perez, J., A, Limansky., I, Toresani., G, Ebner., B, Di., I, Inocenti., G, Pretto., N, Salazar. (2004). Distribución de tipo capsular y sensibilidad antimicrobiana de *Streptococcus agalactiae* productores de infecciones en Argentina. Revista Argentina de Microbiología., Vol 36, 63-67.
- Ramírez, NF., G, Keefe., I, Dohoo., J, Sánchez., O, Arroyave., J, Cerón., M, Jaramillo., and LG, Palacio. (2014). Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. J. Dairy Sci. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-6815>.
- Radtke, A, T, Bruheimc., JE, Afseta., K, Bergha. (2012). Multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) is a useful tool for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus agalactiae* strains causing bovine mastitis. Veterinary Microbiology, Vol 157, 398–404.
- Reyes, J., M, Chaffer., J, Sanchez., G, Torres., D, Macías., M, Jaramillo., PC, Duque., A, Ceballos., and GP, Keefe. (2015). Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. J. Dairy Sci. 98:5294–5303.
- Rojo, P., P, Araya., A, Martínez., JC, Hormazábal., A, Maldonado., J, Fernández. (2008). Caracterización molecular en aislamientos chilenos de *Streptococcus agalactiae*. Revista Médica Chile, Vol 136, 606-612.
- Rosa-Fraile, M., S Dramsi., B, Spellerber.(2014). Group B *streptococcal* haemolysin and pigment, a tale of twins. FEMS. Microbiol Rev 38, 932–946
- Rosini, R., and I, Margarit. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. Front. Cell. Infect. Microbiol. 5. [doi:10.3389/fcimb.2015.00006](https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00006).
- Shome, BR., M, Bhuvana., S, Mitra., D, Krithiga., R, Shome., D, Velu., A, Banerjee., K, Prabhudas., H, Rahman.(2012). Molecular characterization of *Streptococcus*

agalactiae and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. Trop Anim Health Prod 44:1981–1992

Spellerberg, B., E, Rozdzinski., S, Martin., J, Weber - Heynemann., N, Sxhnitzler., R, Lutticken., A, Podbielski. (1999): *Imb*, a Protein with Similarities to the Lral Adhesin Family, Mediates Attachment of *Streptococcus agalactiae* to Human Laminin. Infect. Immun. Vol 67, 871-878.

StataCorp. (2011). Stata Statistical Software. StataCorp LP, College Station, TX

Tenenbauma, T., B, Spellerberg., A, Rüdiger., M, Vogela., SK, Kwang., Horst. (2007). *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein *Lmb*. Elsevier, Microbes and Infection, Volume 9, Issue 6, May 2007, Pages 714–720

Trigo, G., P, Ferreira., N, Ribeiro., M, Dinis., EB, Andrade., J, Melo-Cristino., M, Ramirez., D, Tavares. (2008). Identification of immunoreactive extracellular proteins of *Streptococcus agalactiae* in bovine mastitis; Can. J. Microbiol. Vol 54, 899–905.

Yamamoto, S., M, Katsuhide., K, Yoichi., W, Masaki., M, Yuichi., O, Michio., and L, Shinji. (1999). Molecular Characterization of Type-Specific Capsular Polysaccharide Biosynthesis Genes of *Streptococcus agalactiae* Type Ia. Journal of bacteriology. Vol. 181 (17), 5176–5184.

Yildirim, AÖ., C, Lämmner., and R. Wei. (2002). Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses. Vet. Microbiol. 85:31–35.

Zadoks, RN., YH, Schukken., JR, Middleton., S, McDougall., J, Katholm. (2011). Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. J. Mammary Gland Biol Neoplasia. Vol.16, 357–372.