



Caracterización Molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche de bovinos con mastitis en Antioquia.

Karen Stephany Vargas Hoyos

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título

MAGISTER EN CIENCIAS ANIMALES

Directora

Martha Olivera Angel. DMV, Dr Sci Agr.

Comité tutorial

**Giovanny Torres, Microbio., Msc -CES
Judy Natalia Quiceno, Bact y Lab., Msc. PhD**

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Antioquia

2018

RESUMEN

La mastitis es considerada una enfermedad crítica para la economía lechera, genera pérdidas económicas, disminución en la producción y calidad de leche, gastos médicos veterinarios, uso de antibióticos y descarte de las vacas. *Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos causante de mastitis, aislado entre el 20 – 30 % en muestras de leche de bovinos con mastitis en Colombia. En la actualidad se ha demostrado mediante métodos de tipificación molecular que existe una alta variabilidad en el genoma de las cepas de *S. aureus*; muchas de las cuales se presentan en genes relacionados con la virulencia y la resistencia. Los usos de estas metodologías permiten obtener más información de las propiedades epidemiológicas del agente y su relación con la patogénesis de la infección intramamaria bovina.

En este proyecto se trabajó con un total de 94 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de leche de bovinos con mastitis en Antioquia, se realizó una tipificación molecular por medio de la técnica *spa* typing y se describió la resistencia presentada por estas cepas, usando la técnica de difusión en disco Kirby – Bauer, en el medio de Muller – Hinton. Los resultados obtenidos muestran que 69 (73.4 %) cepas fueron clasificadas en determinados *spa* tipo. Los *spa* tipo t521 y t267 fueron predominantes, ambos pertenecientes al complejo clonal CC9. Se encontraron 25 nuevos *spa* tipos. Los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia fueron Penicilina y Lincomicina con un 37% (n = 35) cada uno, seguidos por Ampicilina/sulbactam con 10% (9), el antibiótico que presento menor resistencia fue Amoxicilina/ácido clavulánico con un 2% (2).



Mejorar el entendimiento de las infecciones intramamarias por *S. aureus* en cuanto a características genéticas, ayuda a entender el comportamiento del microorganismo en la glándula mamaria, causando implicaciones importantes en el control y prevención de la misma. De ahí que conocer los genotipos de las cepas de *S. aureus* circulantes en Antioquia podría a mediano y largo plazo mejorar las estrategias de diagnóstico, control y tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo en la glándula mamaria.

Abstract

Mastitis is considered a critical disease for the dairy economy, generates economic losses, decrease in the production and quality of the milk, veterinary medical expenses, use of antibiotics and culling of cows. *Staphylococcus aureus* is one of the main pathogens causing mastitis, isolated between 20 - 30% in milk samples from cattle with mastitis in Colombia. At present, it has been demonstrated by molecular typing methods that there is a high variability in the genome of *S. aureus* strains; many of which occur in genes related with virulence and resistance. The uses of these methodologies allow obtaining more information about the epidemiological properties of the agent and its relationship with the pathogenesis of intramammary bovine infection.

In this project we worked with a total of 94 *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk with mastitis in Antioquia, molecular typing was performed by the *spa* typing technique and the resistance presented in these strains was described using the Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test. The results obtained show that 69 (73.4 %) strains were classified in certain *spa* type. The t521 and t267 *spa* type were predominant, both belonging to the CC9 clonal complex. 25 new *spa* types were found.

The antibiotics with the highest percentage of resistance were Penicillin and Lincomycin with 37% (n = 35), followed by Ampicillin / sulbactam with 10%(n = 9), the antibiotic that showed the least resistance was Amoxicillin / clavulanic acid with 2% (n = 2).

Improving the understanding of intramammary infections with *S. aureus* in relation to its genotype profile has important implications in the control and prevention. Hence, knowing the genotypes of the circulating *S. aureus* strains in Antioquia could, in the medium and



long term, improve the strategies of diagnosis, control and treatment of the infections caused by this microorganism in the mammary gland.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
CAPITULO I	7
Introducción.....	7
Planteamiento del problema.....	9
Justificación.....	11
Objetivos.....	13
CAPITULO II	14
Marco Teórico.	14
CAPITULO III	24
Materiales y métodos	24
Resultados	28
Discusión.....	38
CAPITULO IV	44
Conclusiones	44
Bibliografía.....	45

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El control de *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria es poco exitoso, debido a infecciones no detectadas y baja respuesta a los antibióticos usados para el tratamiento (Zadoks & Middleton, 2011)(Riekerink et al., 2006). Adicional a esto, en la mayoría de las fincas, se pueden encontrar variabilidad de clones (asociadas a sitios extra mamarios, al ambiente, a humanos, especializadas en infectar la ubre) los cuales sobresalen por su alta prevalencia (Haveri et al, 2008).

La presencia de múltiples clones de *S.aureus* demuestra que puede tener una epidemiología variable, en algunos casos se pueden aislar hasta 5 clones diferentes de *S. aureus* del mismo animal en distintos momentos de su vida (Haveri, Hovinen, Roslo, & Pyo, 2008). Se han relacionado clones específicos de *S. aureus* con aumento en las infecciones intramamarias en bovinos, variaciones en el recuento de células somáticas, el volumen de la leche, la formación de biopelículas, los signos clínicos, la persistencia de la infección y la baja sensibilidad a los tratamientos (Riekerink et al., 2006) (Sakwinska et al., 2011)(Haveri et al., 2008)(Feltrin et al., 2016).

Estudios han demostrados que existe hasta un 30% de diversidad en los genomas de *S. aureus*, (Smith et al., 2016);la mayoría de los genes que le proveen virulencia y resistencia se ubican en este porcentaje de variación (Smith et al., 2016). A nivel mundial se han identificado clones exitosos de *S. aureus* especializados en infectar la ubre bovina,

causando infecciones intramamarias persistentes que expresan algunos factores de virulencia y resistencia específicos (Haveri et al, 2008).

Los métodos de tipificación molecular sirven determinar la variabilidad genética de *S. aureus* (Ryan, Salat, Zangerl, Steiner, & Graber, 2016) son útiles para obtener más información sobre las propiedades epidemiológicas del agente y su relación con la patogénesis de la infección intramamaria bovina (Smith et al., 2016)(Zadoks & Middleton, 2011) (Vanderhaeghen et al., 2014). Varios métodos de tipificación han sido reportados para este microorganismo, los más comunes son Tipificación multilocus de secuencias (MLST - Multilocus sequence typing) y el *spa* tipo. El primero se basa en la secuenciación de 7 genes conservados del *S. aureus*, mientras que el segundo se basa en la secuencia de ADN de la región espaciadora variable del gen *spa* del *Staphylococcus aureus* (Boss et al., 2016). El *spa* tipo reportado mundialmente más común en mastitis ha sido el t267, reportado en países como Brasil, Canada y Japón (Hata et al., 2010)

Conocer las poblaciones de *S. aureus* que se aíslan de leche de bovinos con mastitis en Antioquia permitirá determinar los clones responsables, si existe relación entre ellos, su procedencia geográfica y relacionarlos con los perfiles de sensibilidad a antibióticos y manifestaciones clínicas en las infecciones intramamaria bovinas. Así mismo, debido a la relación cercana de los bovinos con los humanos hace que estas poblaciones puedan variar con mayor facilidad de sus hospederos habituales, lo que genera variaciones en sus características, como se ha evidenciado en la presencia de clones bovinos causando infección en el hombre y la aparición de clones adaptados al humano comunes en la población bovina (García et al., 2003).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, causada principalmente por microorganismos. La mastitis bovina es una enfermedad crítica para la economía lechera, generando altos costos los cuales incluyen bajas en la producción y calidad de leche, gastos médicos, compra de antibióticos y descarte de las vacas causando pérdidas variables en la economía lechera (Hogeveen, Huijps, & Lam, 2011; Vissio, 2015). A nivel mundial, se han reportado pérdidas económicas entre 66,28 y 105 dólares por vaca a causa de mastitis clínica. En Colombia el ganado bovino se ha visto afectado por mastitis con un prevalencia por encima del 50% en el 2011 (Ramírez et al., 2011).

De los microorganismos frecuentemente aislados causando mastitis se encuentra *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), el cual se conoce como causa común de infecciones intramamaria persistentes (Cucarella et al., 2004)(Capurro, Aspán, Artursson, & Persson, 2010). Este microorganismo es un comensal y patógeno de seres humanos y varias especies animales, incluyendo el ganado bovino (Zadoks & Middleton, 2011), es recuperado en aproximadamente el 30% de muestras de leche de bovinos con mastitis en Antioquia (Ramírez et al., 2014), además en un estudio realizado en Boyacá se encontró que *S.aureus* fue el principal agente etiológico causante de mastitis aislado en 29.09%(Calderon & Rodriguez, 2008) y en un reporte realizado por los laboratorios de microbiología veterinaria de la Universidad de Antioquia y el Instituto Colombiano de Medicina Tropical- Universidad CES, en el cual se recolectaron muestras entre los años 2013 a 2015, se encontró una prevalencia del 17,9% para *S.aureus* (Vidal et al., 2016). El control de este microorganismo no ha sido exitoso, debido a que en campo se observan

fallas al eliminar el agente, infecciones no detectadas y baja respuesta a los antibióticos usados para el tratamiento (Zadoks & Middleton, 2011)(Riekerink et al., 2006). Adicionalmente, en la mayoría de las fincas, se pueden encontrar variabilidad de cepas (asociadas a sitios extramamarios, al ambiente, humanos, especializadas en infectar la ubre) de *S. aureus* de las cuales una o algunas cepas sobresalen por su alta prevalencia (Haveri et al, 2008). La presencia de múltiples cepas de *S.aureus* demuestra que puede tener una epidemiología variable, en algunos casos se pueden aislar hasta 5 cepas diferentes de *S.aureus* del mismo animal en distintos momentos de su vida (Haveri, Hovinen, Roslo, & Pyo, 2008). Se han relacionado cepas específicas de *S.aureus* con aumento en las infecciones intramamarias en bovinos, variaciones en el recuento de células somáticas, el volumen de la leche, la formación de biopelículas, los signos clínicos, la persistencia de la infección y la baja sensibilidad a los tratamientos (Riekerink et al., 2006) (Sakwinska et al., 2011)(Haveri et al., 2008)(Feltrin et al., 2016).

Estudios realizados en humanos han demostrados que existe alto nivel de diversidad en el genoma de *S.aureus*, el cual puede variar hasta un 30 % entre cepas (Smith et al., 2016);se conoce que la mayoría de los genes que le proveen virulencia y resistencia se ubican en este porcentaje (Smith et al., 2016).A nivel mundial se han identificado clones exitosos de *S. aureus* especializados en infectar la ubre bovina, causando infecciones intramamaria persistentes, expresando factores de virulencia y resistencia determinados (Haveri et al,2008). En la actualidad existen métodos de tipificación molecular apropiados para determinar la variabilidad genética de *S.aureus* (Ryan, Salat, Zangerl, Steiner, & Graber, 2016). Estos métodos son útiles para obtener más información sobre las propiedades epidemiológicas del agente y su relación con la patogénesis de la infección



intramamaria bovina causada por *S. aureus* (Smith et al., 2016)(Zadoks & Middleton, 2011) (Vanderhaeghen et al., 2014). En Colombia mejorar el entendimiento de las infecciones por *S. aureus* en cuanto al genotipo tendrá implicaciones importantes en el control y prevención de la mastitis bovina causada por este microorganismo.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se desconocen los genotipos de las cepas de *S. aureus* que se aíslan de leche de bovinos con mastitis en Antioquia; conocer esta información permite determinar las cepas circulantes, la relación entre estas, su procedencia geográfica y relacionarlas con los perfiles de sensibilidad y manifestaciones clínicas en las infecciones intramamaria bovinas. Debido a la relación cercana de los bovinos con los humanos hace que estas cepas puedan variar con mayor facilidad de sus hospederos habituales, lo que genera variaciones en sus características, como se ha evidenciado en la presencia de cepas de bovinos en el hombre y la aparición de cepas adaptadas al humano comunes en la población bovina (García et al., 2003).

La capacidad de *S. aureus* de propagarse con facilidad entre especies hace necesario conocer su distribución geográfica, potencial zoonótico, sus perfiles de sensibilidad y la presencia de clones exitosos en infecciones intramamaria persistentes. De ahí el conocimiento de cuáles son los genotipos de las cepas de *S. aureus* circulantes en Antioquia podría a mediano y largo plazo mejorar las estrategias de diagnóstico, control y tratamiento de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria.

Objetivo General

Caracterizar molecularmente las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche de bovinos con mastitis en Antioquia

Objetivos Específicos

1. Describir el lugar geográfico y el perfil de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de bovinos con mastitis
2. Tipificar molecularmente las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de bovinos con mastitis, empleando *spa typing*

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Mastitis Bovina

Se conoce como la inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, que reduce la producción del volumen de leche, alterando su composición y elevando la carga bacteriana. De acuerdo a su duración, se puede clasificar en aguda o crónica. En relación a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica. Es una enfermedad crítica para la economía lechera que genera altos costos, ya que incluyen bajas en la producción y calidad de la leche, causan pérdidas las cuales varían de acuerdo a la presentación clínica o subclínica de la mastitis (Vissio, 2015)(Hogeveen et al., 2011). A nivel mundial, se han reportado pérdidas económicas entre 66,28 y 105 dólares por vaca a causa de mastitis clínica. Colombia se ha visto gravemente afectada por la alta incidencia de mastitis crónica, reportándose prevalencias por encima del 50% en estudios realizados (Ramírez et al., 2011). La principal causa de esta enfermedad suele ser infecciosa. Los agentes infecciosos los cuales generan mastitis son diversos entre ellos se encuentra *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Restrepo, Ortiz, Cardona, & Olivera, 2012). Se determinó que la prevalencia de la enfermedad a causa de *S. aureus* en Antioquia por estudios llevados a cabo en San Pedro de los Milagros (Antioquia), es del 13%, en 1.679 cultivos analizados (Ramírez et al., 2011). Los laboratorios de la Universidad de Antioquia, el grupo de investigación Biogénesis, la Universidad CES, el Instituto de Medicina Tropical y la cooperativa Colanta, reportan que entre los años 2013 a 2015 la prevalencia de *S. aureus* aislados de muestras de leches en Antioquia fue del 17,9% (Vidal et al.,2016).

Staphylococcus aureus

La identificación de especies en la mayoría de los estudios se basa en características fenotípicas del microorganismo (Taponen & Pyörälä, 2009)(Vanderhaeghen et al., 2014) (Zendejas, Avalos, & Soto, 2014). Estos métodos incluyen la morfología de la colonia en medios selectivos y diferenciales, pruebas bioquímicas, pruebas de coagulasa y hemólisis, patrón de susceptibilidad a antibióticos, susceptibilidad a fagos y producción de toxinas. El diagnóstico molecular es un término que incluye técnicas de biología molecular para el beneficio de la salud humana y animal, detectando secuencias genéticas específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o proteínas. Para la detección de patógenos causantes de mastitis se han estandarizado técnicas moleculares que incluyen desde PCR hasta polimorfismos de cadena simple. Para *S. aureus* aislado de glándula mamaria, se han estandarizado PCR con genes como *nucA*, *femB* y *spa* (Shopsin et al 1999), los cuales son clasificados como genes específicos de *S. aureus*. Una de las grandes limitaciones de estas pruebas en este momento es el costo lo que dificulta el uso en masa de estas metodologías.

Resistencia de *Staphylococcus aureus* a antibióticos

La penicilina fue el primer antibiótico usado para el control de las infecciones por *S. aureus*, a partir de la exposición a este antibiótico *S. aureus* comenzó a producir β -lactamasas (penicilinasas) que son enzimas codificadas por el gen *blaZ*, que está regulado por dos genes adyacentes: uno que actúa como represor, *bla1* y un antirepresor, *blaR1*. En presencia de antibióticos β -lactámicos, se produce la proteína blaR1 que experimenta una escisión autolítica para convertirse en proteasa la cual genera la ruptura de la proteína represora Bla1 y así desbloquear la transcripción del gen *blaZ* (Tang 2014). Con la introducción de la meticilina, las cefalosporinas de primera generación y, posteriormente, las otras penicilinas semisintéticas resistentes a la penicilinasas (Cloxacilina, Flucloxacilina) comenzaron a aparecer las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina; esta resistencia está mediada por la expresión de una proteína de unión a la penicilina mutada (*Penicillin binding proteins – PBP2a*), esta proteína tiene baja afinidad a los antibióticos β -lactámicos. El gen que codifica a PBP2a se conoce como *mecA* y se localiza en un elemento genético móvil específico conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* ("staphylococcal cassette chromosome mec", SCCmec) que se integra en el cromosoma usando recombinasas (*ccrAB* o *ccrC*) (Tang 2014). Similar al sistema *blaZ*, la síntesis de PBP2a está regulada por *mecR1* y el gen del represor *mec1*; además, debido a homología de secuencia con las proteínas, la expresión de PBP2a puede ser inducida por el sistema *blaR1-blaI-blaZ*, si está presente (Tang 2014). Las cepas de *S. aureus* meticilino resistentes también deben considerarse resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas y otros betalactámicos tales como ampicilina - sulbactam, amoxicilina - ácido clavulánico, ticarcilina- ácido clavulánico,

piperacilina-tazobactam y carbapenems y es independiente de los resultados de la prueba *in vitro* obtenido con estos agentes (CLSI 2015). La presencia del gen *mec* suele estar ligada a la resistencia a aminoglucósidos, macrolidos, quinolonas, cloranfenicol, tetraciclinas y trimetropim sulfas. En estudios realizados en Colombia sobre la resistencia de *S. aureus* a los antibióticos que se usan de rutina en campo para la mastitis bovina, reportaron que *S. aureus* muestra resistencia a las penicilinas G, a las ampicilinas y a las tetraciclinas, debido a que son los antibióticos más ampliamente usados, expresión de genes de resistencia contra estos antibióticos, y resistencias cruzadas (Ruiz et al, 2001, Jimenez et al., 2012). *S. aureus* meticilino resistente está diseminado alrededor del mundo y en diferentes especies animales (bovino, humanos, cerdos, búfalos).

Tipificación molecular

La tipificación molecular se hace para determinar la relación clonal, las vías evolutivas, la diversidad genética y para realizar el seguimiento de las infecciones por *S. aureus*. Se pueden utilizar diversos métodos moleculares (Iqbal et al., 2016) (Goudarzi et al, 2016), entre ellos tenemos la electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE*) que está considerada como la prueba de oro de los métodos de tipificación, el éxito de la PFGE se debe a su excelente poder discriminatorio, alta concordancia epidemiológica y reproducibilidad intra-laboratorio (Sabat et al, 2013). Otra técnica es la *Multilocus sequence typing – MLST*, esta técnica molecular se fundamenta en la amplificación y secuenciación de siete genes constitutivos de la bacteria, esta técnica genera resultados reproducibles, pero su poder de discriminación no es tan alto. Los resultados generados por el MLST se leen como secuencia tipo (*Sequence type - ST*) y se conoce que los ST 352 y ST97 son las dos secuencias tipo más aisladas en los casos de mastitis bovina en países como Brasil, Chile, Italia, Japón, España y Estados Unidos.

La tipificación del gen *spa* es un método eficaz y rápido para describir aislamientos de *S. aureus*. La tipificación del *spa* es una técnica rápida, asequible y fácil de realizar que ofrece mejores capacidades discriminatorias y es más barata que la tipificación por MLST, lo que le ha permitido convertirse en una técnica de tipificación ampliamente distribuida para los aislamientos de *S. aureus* (Goudarzi et al, 2016). Se basa en la amplificación y secuenciación de una región que se ubica flanqueando el gen *spa* la cual es polimórfica y está compuesta por un número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number Tandem Repeat - VNTR*) que puede ser hasta de 24 pb. Se basa en la secuenciación de

la región polimórfica X del gen *spa*. La región X contiene un número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number Tandem Repeat - VNTR*) de aproximadamente 24-pb que se ubican en la región flanqueante del gen. La tipificación empleando el gen *spa* tiene alto poder de discriminación, rápida caracterización y por medio de esta se puede predecir la presencia de Complejos Clonales. Se realiza una amplificación y posterior secuenciación de la región polimórfica X (Shopsin et al., 1999). Los tipos de *spa* correspondientes fueron asignados utilizando el software de eGenomics (Mathema et al., 2008) (Shopsin et al., 1999) los tipos obtenidos de *spa* se compararon posteriormente mediante el sitio web de tipificación de *spa* (<http://www.spaserver.ridom.de/>)(Harmsen et al.2003) ((Jiménez et al., 2012)). Este método puede predecir los Complejos Clonales (CC) el cual se define como un grupo ancestral a los cuales pueden pertenecer los clones de *Staphylococcus aureus* según su caracterización genómica (Goudarzi et al, 2016). Los *spa* tipos predominantes en leche de bovinos con mastitis persistentes son t529 y t524 (Jans et al., 2017). los complejos clonales más asociados con mastitis persistentes son CC5, CC425, CC130, CC522 , estos mismo complejos clonales se han encontrado en humanos causando infecciones,incluyendo el complejo clonal CC398 asociado a la ganadería (livestock-Associated) (Zadoks & Middleton, 2011).

Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

S. aureus cuenta con un rango amplio y diverso de factores de virulencia, estos facilitan la invasión y la colonización del tejido del hospedero, la evasión de los mecanismos de respuesta inmune de hospedero y la diseminación de la bacteria en los tejidos (Budd, Mitchell, & Keane, 2016a). Una vez que el microorganismo entra en la glándula mamaria, se adhiere al revestimiento epitelial y desafía la inmunidad innata del huésped con una variedad de factores de virulencia. Una vez establecida la infección intramamaria, la bacteria inicia el proceso de ulceración del revestimiento epitelial de la glándula, oclusión de conductos, alvéolos e infiltración de células inflamatorias en el parénquima (Cucarella et al., 2004). Exámenes microscópicos de *S. aureus* en tejido mamario han mostrado que estos microorganismos se localizan principalmente en acúmulos dentro de los alvéolos y conductos lácteos (Melchior et al., 2006) debido a esto se ha propuesto que, para lograr la persistencia intracelular *S. aureus* debe evitar la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, para lo cual regularía negativamente la expresión de algunos factores de virulencia tales como inflamación en el hospedero (Camussone & Calvino, 2016)(Schmidt et al., 2017). Algunos factores de virulencia como polisacáridos capsulares, citotoxinas y enterotoxinas superantigénicas son utilizadas en el proceso de invasión del tejido y evasión de la respuesta inmune. Un gran número de citotoxinas producidas por *S. aureus* forman poros en la membrana celular causando la muerte celular, estas citotoxinas incluyen leucocidinas, modulinas solubles en fenol (*Phenol-soluble modulin - PSM*) y citolisinas(Figura1) (Schmidt et al., 2017). La leucocidina de Pantón-Valentine (*Pantón-Valentine Leukocidin - PVL*) está codificado por dos genes

contiguos y cotranscritos. Las dos proteínas *LukS-PV* y *LukF-PV* crean poros líticos en neutrófilos, monocitos y macrófagos, estas citotoxinas son agentes citotóxicos y proinflamatorios.

S. aureus produce una serie de superantígenos incluyendo las enterotoxinas (SE), toxina del Síndrome de Choque Tóxico y toxinas exfoliativas (Waryah et al., 2015). Los antígenos producidos se consideran superantígenos debido a su capacidad para liberar citoquinas inflamatorias de células T y macrófagos uniéndose a la superficie de las proteínas MHC de clase II y receptores de células T (Waryah et al., 2015)(Daum & Spellberg, 2014).

La capacidad de producir biopelículas es otro factor de virulencia expresado por *S. aureus* cuyo fin es la permanencia de la bacteria en la glándula mamaria, es una matriz de exopolisacáridos de fabricación propia la cual se puede adherir a una superficie inerte o viva (Melchior et al., 2006); el mecanismo principal para la adhesión a la célula huésped está mediada por proteínas de Unión a la Fribronectina (*Fibronectin binding protein - FnBP*) A y B, que permiten la interacción de las células bacterianas a través de un puente de fribronectina con los receptores de fribronectina de las células del hospedero (*integrinas $\alpha 5 \beta 1$*); otro mecanismo de adhesión del patógenos es a través del factor Clumping (*Clumping factor - Clf*) A y B (Pereyra et al., 2016, Daum & Spellberg, 2014)).

Epidemiología

Varios estudios epidemiológicos han sugerido que existen clones de *S. aureus* exitosos en la colonización de la glándula mamaria, responsables mundialmente de la mayoría de las infecciones intramamaria bovinas. También se ha informado de la aparición de cepas específicas de hato, cepas extra mamarias y cepas de humanos, las cuales han sido capaz de generar infecciones intra mamaria bovinas. Estudios han demostrado (Boss et al., 2008), que diferentes clones están asociados con diferentes resultados clínicos en el huésped incluyendo severidad, persistencia de infecciones y respuesta al tratamiento antimicrobiano. La mejor comprensión de la epidemiología, incluidas las características de transmisión y sensibilidad de cepas de *S. aureus*, puede ayudar con al desarrollo de estrategias para controlar la diseminación de la bacteria dentro de los hatos (Schmidt et al., 2017).

Los informes revisados sobre *Staphylococcus aureus* asociado al ganado señalan que el complejo clonal CC398, es uno de los más prevalentes catalogado como *Staphylococcus aureus* metilino resistente asociado a la ganadería (*livestock-associated MRSA* - LA-MRSA) causante de mastitis en países como Canadá y Estados Unidos, lo que crea preocupaciones adicionales de salud pública con respecto a los animales de producción, incluidas las vacas lecheras como fuente de bacterias resistentes a los antimicrobianos que pueden infectar a los seres humanos. Es de resaltar que las personas en contacto cercano con los animales corren mayor riesgo de ser colonizados o incluso infectados con bacterias zoonóticas transportadas por animales con los que trabajan (Haveri et al.,



2008); (Gonçalves et al., 2017)(Raji et al., 2016); (Veh et al., 2015)(Feltrin et al., 2016)(Ryan et al., 2016); (Capurro et al., 2010)).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de las cepas de *Staphylococcus aureus*

Este trabajo se realizó con 94 cepas de *Staphylococcus aureus* almacenadas en un banco de cepas, en un congelador a -80 grados, ubicado en la unidad de Diagnósticos de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. Fueron aisladas de leche de bovinos con mastitis, provenientes de diferentes regiones del departamento de Antioquia, clasificadas como *Staphylococcus aureus* de acuerdo al protocolo del Laboratorio de Microbiología Veterinaria (National Mastitis Council).

Se realizó el análisis de información de las 94 cepas de *S. aureus* causantes de mastitis por medio de tablas de Excel se separaron por municipio, número de aislamiento, raza, frecuencia de la mastitis (P: primera vez. R: recurrente) y tipo de mastitis encontrados (Clínica o Subclínica).

Confirmación de *Staphylococcus aureus*

Se reactivaron las 94 cepas en agar sangre (5% sangre de carnero) por 24 -72 horas, a 37 ° C, 5% de CO₂. Se realizó la extracción de ADN con el Kit de extracción de DNA Qiagen (DNeasy Blood & Tissue Kits) y se usó de acuerdo a la guía de la misma empresa (DNeasy Blood & Tissue Handbook).

Se confirmaron las cepas mediante PCR amplificando un fragmento del gen *nuc* (que codifica para una termonucleasa termoestable) y que es un gen específico de *S.aureus*: La PCR se realizó con ayuda de lo especificado por Graber et al., 2009, desnaturalización a 94 °C por 1 min, anillamiento a 60°C por 1 minutos y extensión 72 °C por 1 minuto, 35 ciclos en total. Los cebadores fueron *Nuc-S* (CTGGCATATGTATGGCAATTGTT) y *Nuc-AS* (TATTGACCTGAATCAGCGTTGTCT) con un amplicon de aproximadamente 664 pares de bases (Graber et al.,2009). Se utilizó un termociclador marca PTC 200 (Perkin-Elmer Inc., San Jose, CA,USA).

Tipificación por *spa* Typing

Se realizó la amplificación (*PCR*) del gen *spa* con una región polimórfica llamada región X, se usaron los cebadores 1095F (5'-AGACGATCCTTCGGTGAGC-3') y 1517R (5'-GCTTTTGCAATGTCATTTACTG-3') descritos por (Shopsin et al 1999). El perfil de *PCR* utilizado se estandarizó según lo reportado por (Jiménez et al., 2012), desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 60°C por 1 minutos y extensión 72 °C por 1 minuto, con un total de 30 ciclos amplificando una región de 1000 pb aproximadamente, posteriormente secuenciada. Los *spa* tipos correspondientes fueron asignados usando dos etapas, para la primera se usó el software *eGenomics* (Mathema et al., 2008; Shopsin et al., 1999), posteriormente se usó el sitio web (<http://www.spaserver.ridom.de/>) sitio desarrollado por Ridom GmbH, para determinar el *spa* tipo. Los Complejos Clonales fueron inferidos mediante el análisis del patrón de repeticiones de los *spa* tipos obtenidos (Mathema et al., 2008; Strommenger et al., 2006) o al consultar el sitio web de Ridom SpaServer.

Prueba de susceptibilidad

El perfil de susceptibilidad a los antibióticos de las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de bovinos con mastitis se realizó antes de este estudio, se obtuvieron de los reportes emitidos al analizar las muestras, el antibiograma fue realizado por el área de microbiología perteneciente a la unidad de diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. La metodología usada fue difusión en disco de Kirby – Bauer, en el medio de Muller – Hinton (Hudzicki et al. 2009), Siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Se utilizaron los controles, para las pruebas y para el control de calidad interno (*CLSI M2-A9*). Los sensidiscos utilizados de marca Oxoid fueron: Oxacilina (1µg), Penicilina G (UOF), Ceftiofour (30µg), Eritromicina (15µg), Doxiciclina (30µg), Tetraciclina (30 µg). Se consideraron como cepas sensibles o resistentes de acuerdo con los milímetros del halo formado en el agar y conforme a los parámetros del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Análisis estadístico

Este objetivo se logró realizando un análisis estadístico, por medio del Test de Fisher, con el fin de determinar la relación entre la resistencia de los antibióticos probados, municipios y genotipos. Se consideraron dependencias significativas con un valor de $p < 0.05$. Esta prueba se realizó en el programa R commander (<http://www.rcommander.com/>). Se usó el Test de correspondencia con el fin de graficar



las relaciones que fueron significativas por medio del Test de Fisher. Esta prueba se llevó a cabo en el programa R commander (<http://www.rcommander.com/>).

RESULTADOS

1. Distribución geográfica, características poblacionales

De las 94 cepas 71% (n=66) provenían del norte de Antioquia, 11% (n=11) del Valle de Aburra, 9% (n=9) del Oriente, del Suroccidente el 8% (n=7) y del Occidente un 1% (n=1).

El número de aislamientos por municipio, raza de donde se aisló la cepa, frecuencia de presentación de mastitis, tipo de mastitis y el spa tipo encontrado se puede ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de los aislados por municipio

Municipio	Numero de Aislamientos (n)	Raza (n)	Frecuencia de mastitis; Primer vez (P) y Recurrente (R) (n)	Tipo de mastitis; Subclínica y Clínica (n)
San Pedro de los Milagros	21	Holstein (21)	P (6) R (15)	Subclínica (20) Clínica (1)
Santa Rosa de Osos	16	Holstein (13), Jersey (2)	P (5) R (11)	Subclínica (16)
Belmira	12	Holstein (10), Jersey (2)	R (12)	Subclínica (12)
Bello	9	Holstein (7), Jersey (2)	P (5) R (4)	Subclínica (9)
Entrerriós	8	Holstein (5), Jersey (3)	P (1) R (7)	Subclínica (8)
Urrao	8	Holstein (5), Bon (2), Jersey (1)	P (7) R (1)	Subclínica (8)
Don Matías	6	Holstein (5), Jersey (1)	P (3) R (3)	Subclínica (6)
Carolina del Príncipe	3	Holstein (2), Girolando (1)	P (2) R (1)	Subclínica (3)
Abejorral	2	Holstein (2)	R (2)	Subclínica (2)
La Unión	2	Holstein (2)	P (1) R (1)	Subclínica (2)
Rionegro	2	Holstein (2)	R (2)	Subclínica (2)
San José de la Montaña	2	Holstein (1)	P (2)	Subclínica (2)
La Ceja	1	Holstein (1)	R (1)	Subclínica (1)
San Jerónimo	1	Holstein (1)	R (1)	Subclínica (1)
Santuario	1	Holstein (1)	R (1)	Subclínica (1)

2. Tipificación molecular, frecuencia de spa tipos diferentes y complejos clonales

San Pedro fue el municipio que registró mayor variedad de *Spa*, 10 en total, seguido por Belmira con ocho y Santa Rosa con siete *spa* siendo este el municipio que más cantidad de nuevos tipos de *spa* reportados (Tabla 2). De los municipios con menos aislados Santuario resalta porque la única muestra de este municipio obtuvo un *spa* nuevo (tabla 2).

3. Complejos Clonales, *Spa* tipos y características

Se relacionaron 9 Complejos Clonales con los *Spa* obtenidos, el más frecuente en la región fue el complejo clonal 97, que abarca los *spa* tipos t521 y t 267, reportados mundialmente en bovinos causando mastitis. El complejo clonal con menos representación fue el CC15, el cual solo tenía en un *spa* (t1885) (tabla 3). Se encontró la presencia de tres *spa* tipo (t4911 , t3626 y el t515) los cuales no lograron ser asignados a un complejo clonal. Además, se encontraron 25 nuevos *spa*, los cuales no pudieron ser asignados a *spa* y tampoco a complejo clonal (Tabla 3).

4. Asociaciones y perfil de resistencia

Se realizó el test exacto de Fisher con el fin de evaluar posibles relaciones de dependencia entre los antibióticos usados en el antibiograma, el municipio y el genotipo. Estos análisis se realizaron con el programa R studio (tabla 4). La prueba evidenció que existe una relación de dependencia entre la resistencia a Ampicilina/sulbactam, lincomicina y penicilina con la variable municipios. El resultado de la prueba entre antibióticos y genotipos solo mostró relación de dependencia con la variable genotipos y la Penicilina con un P igual a 0,01 (tabla 4).

Las demás asociaciones no fueron significativas. A las variables que fueron significativas se les realizó análisis de correspondencia municipio y Ampicilina/Sulbactam, y municipio y Penicilina, este análisis exploratorio muestran cómo pueden estar asociadas las variables. En las figuras 1 y 2 los puntos azules representan municipios y los puntos rojos son los niveles del antibiograma, los puntos azules que se encuentren cercanos a los rojos indican una relación de dependencia, esta es una forma visual de evidencia los resultados de dependencia obtenidos. En la figura 1 se puede observar que en municipios tales como La Unión, Belmira, La Ceja, Entreríos, se observó una mayor asociación con resistencia al antibiótico Ampicilina/Sulbactam. Para la asociación entre municipio y resistencia a Penicilina, se evidenció que los municipios, San Jerónimo, Urao, La Unión, San Pedro, Belmira, Entreríos y Santa Rosa son los que presentan mayor resistencia a este antibiótico (figura 2). La distribución de la resistencia en las cepas de estudio muestra que los antibióticos que presentan mayor resistencia con igual porcentaje (37%) son Penicilina y Lincomicina, seguidos con un porcentaje mucho menor por

Ampicilina/sulbactam 10%, Cefoperazone 7%, Trimetopim/sulfa 4%, Cloxacilina 3 % y en último lugar Amoxicilina/ácido clavulánico con un 2%.

Tabla 2. Genotipificación Spa tipos

Municipio	Frecuencia de Aislamientos (n)	Spa Tipos (n)	Spa tipos diferentes	Complejo Clonal
San Pedro de los Milagros	21	Nuevos (5), t605 (5), t543 (3), t527 (2), t604 (1), t2207 (1), t267 (1), t3626 (1), t521 (1), t571 (1)	10	CC1/188, CC479, CC97, CC398
Santa Rosa de Osos	16	Nuevos (8), t445 (2), t267 (2), t024 (1), t2143 (1), t521 (1), t543 (1)	7	CC45, CC97, CC8, CC479
Belmira	12	Nuevos (4), t543 (1), t008 (1), t064 (1), t1135 (1), t2207 (1), t4911 (1), t521 (1)	8	CC479, CC8, CC30, CC1/188, CC97
Bello	9	Nuevos (2), t267 (3), t1885 (1), t521 (1), t543 (1), t605 (1)	6	CC97, CC15, CC479, CC 1/188
Entrerriós	8	t521 (3), t267 (2), t1135 (2), t2207 (1)	4	CC97, CC30, CC 1/188
Urrao	8	Nuevos (2), t527 (2), t605 (1), t571 (1), t267 (1), t1190 (1)	6	CC 1/188, CC398, CC97
Don Matías	6	t521 (3), t2207 (2), t527	3	CC97, CC1/188
Carolina del Príncipe	3	t267 (2), t543 (1)	2	CC97, CC479
Abejorral	2	Nuevo (1), t267 (1)	2	CC97
La Unión	2	Nuevo (1), t521 (1)	2	CC97
Rionegro	2	Nuevo (1), t2207 (1)	2	CC1/188
San José de la Montaña	2	t521 (1), t515 (1)	2	CC97
La Ceja	1	t543 (1)	1	CC479
San Jerónimo	1	t521 (1)	1	CC97
Santuario	1	Nuevo (1)	1	

Tabla 3. Complejos clonales, spa tipos y características

Complejo Clonal	Spa tipo (n)	Presencia reporte de Spa tipos
CC 97	t521(12), t267(12)	Presencia en bovinos y humanos, reportado en Mastitis subclínicas en bovinos (Haveri et al., 2008)
CC1/188	t605(8), t527(5), t1190(1), t2207(6), t2207(6)	Presencia en bovinos, conejos (Haveri et al., 2008)
CC479	t543 (9)	Presencia en bovinos mastitis clínica y subclínica (Boss et al., 2016)
CC8	t008(1), t064(1), t024(1)	Infecciones adquiridas en la comunidad (hospitalarias) humanos, bovinos. (Boss et al., 2016)
CC30	t1135(3)	Principales clones HA y MRSA (Jimenez et al., 2012)
CC45	t2143(1) , t445(2)	Presencia en humanos, genotipo que acepta fácilmente gen <i>mecA</i> (Boss et al., 2016)
CC398	t571(2)	Presencia en humanos, asociado a la ganadería (Boss et al., 2016)
CC5	t149(2)	Presencia en Humanos (Jimenez et al., 2012)
CC15	t1885(1)	Presencia en humanos (Jimenez et al., 2012)
	t4911 (1)	Presencia en Humanos, reportado en Finlandia, Dinamarca y Suecia (Hogeveen et al., 2011)
	t3626 (1)	Reportado en Finlandia como cepa MRSA (Hogeveen et al., 2011)
	t515(1)	Reportado en reino unido como cepa MRSA (Shore et al., 2010)
Nuevos	(25)	

Tabla 4. Test de Fisher entre municipio y genotipo

Antibiótico	Municipio	Genotipos
	Fisher.tes	Fisher.tes
Trimetropim/Sulfa	0,24	0,24
Ampicilina/Sulba	* 0,04	0,14
Amoxicilina/Ac.cla	0,53	0,9
Cefoperazone	0,27	0,41
Cloxacilina	0,61	0,97
Lincomicina	* 0,01	0,29
Penicilina	* 0,01	* 0,01

Figura 1. Relación entre municipios y Ampicilina/Sulb

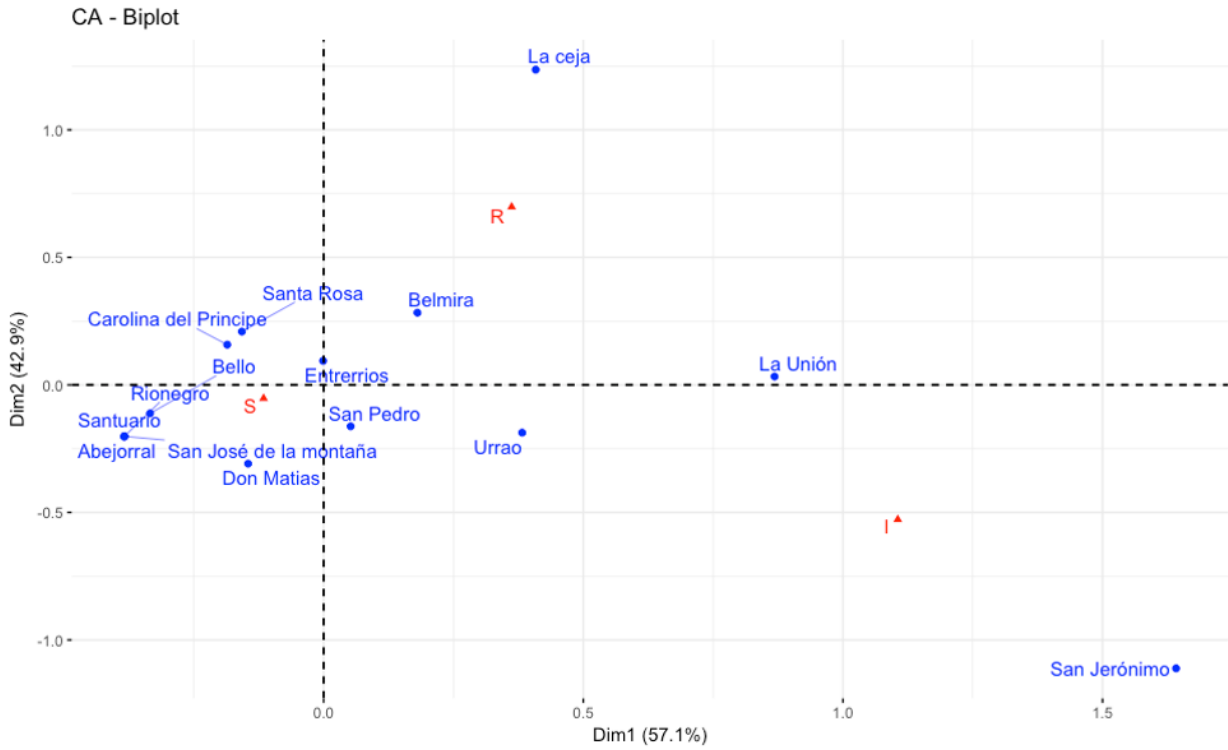
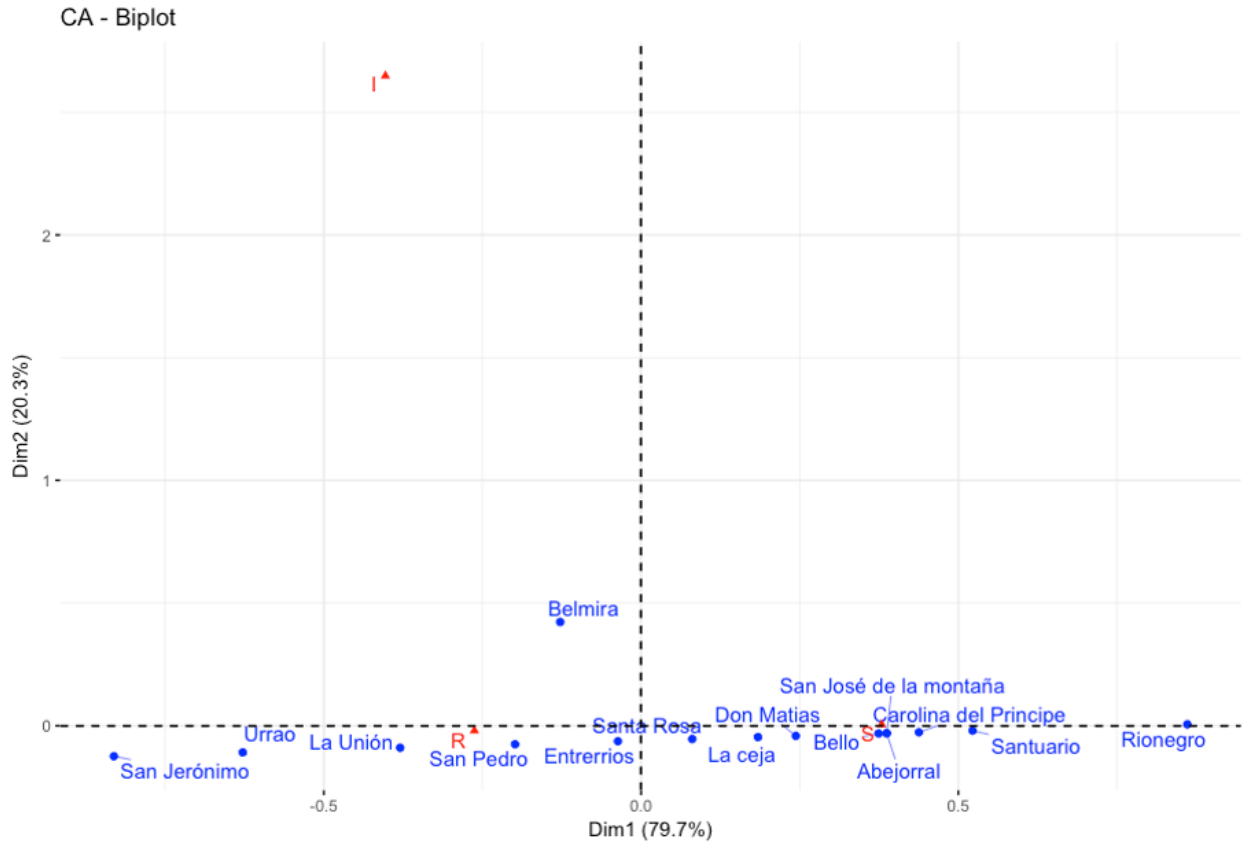


Figura 2. Relación entre municipios y Penicilina



DISCUSIÓN

La caracterización molecular de *S. aureus* facilita el entendimiento de cualidades de la cepa que no se pueden explicar desde su perfil fenotípico; como su origen, evolución, epidemiología y diseminación. La genotipificación de cepas de *S. aureus* además de evidenciar su perfil genético, entrega información sobre los factores de virulencia, resistencia, mecanismos usados en la evasión del sistema inmune, invasión celular o persistencia en la glándula mamaria bovina. La asociación entre los linajes específicos y la expresión de genes que codifica en cualquiera de estos tres momentos ha sido reportada en humanos y en animales. La tipificación por *spa* typing se considera un método de referencia debido a su poder discriminatorio, resultados no ambiguos utilizando una nomenclatura estandarizada y una aplicación reconocida en estudios moleculares de *S. aureus*; los datos obtenidos a partir de esta técnica se pueden comparar con resultados de otras técnicas epidemiológicas actuales de *S. aureus* en todo el mundo (Boss et al., 2016)(Kosecka-Strojek et al., 2016).

Para este estudio se usó la técnica molecular *spa* typing, obteniendo como resultados 20 *Spa* tipos distribuidos en 15 municipios del departamento de Antioquia (Tabla 2 y 3). Cada uno de estos *Spa* tipos con características patológicas en humanos, bovinos o demás animales; como los *Spa* tipos t521 y t267 los cuales han sido comúnmente reportados causando mastitis subclínicas en bovino, el t543 el cual ha sido reportado causando mastitis clínica y subclínicas (Schmidt et al., 2017). Además, se encontraron *Spa* tipos t064, t024 y t008 los cuales han sido reportados en humanos en nuestro país (Jiménez et al., 2012). Según Fenner et al., (2008) t008 ha sido reportada como un clon de *S. aureus* asociada a la comunidad, Bartels et al., (2007) reportan el *spa* t024 como una

asociada al ambiente hospitalario. Estos dos últimos *spa* han sido ampliamente reportados como meticilino resistentes, y en este estudio no presentaron el gen *mecA/C*, gen que confiere la resistencia a la meticilina. Se relacionaron nueve complejos clonales con 66 del total de los *Spa* encontrados (Tabla 3). El complejo Clonal CC8 es el que agrupa los *Spa* tipos t064, t008, t024 anteriormente mencionados. Este complejo clonal tiene un clado conocido como CC8bov el cual cuenta con la presencia de cepas positivas para t024, las cuales son comunes en infecciones humanas, lo cual podría sugerir algún potencial zoonótico de estas cepas bovinas (Boss et al., 2016). El clon t024 además ha sido reportado previamente en la ciudad de Medellín, causando infecciones asociadas a la comunidad en humanos (Jiménez et al., 2012).

El CC 97 es el complejo clonal con más presencia y ampliamente reportado en estudios de genotipificación en bovinos, datos que concuerdan con lo encontrado en este estudio. Este complejo es reconocido por tener los *spa* tipos t521 y t267, los cuales fueron hallados en este estudio. El t267 ha sido encontrado causando infección subclínica en la glándula mamaria bovina, estudios reportan su presencia en Brasil, Canadá y Japón (Hata et al., 2010). Es importante resaltar que la mayoría de las muestras en este estudio provenían de bovinos con reportes de mastitis subclínica, lo cual corroboraría lo reportado por la literatura acerca de este *spa* tipo y evidenciaría que puede poseer factores de virulencia que facilitan su persistencia en la glándula mamaria de los bovinos en el departamento de Antioquia.

En un estudio realizado en el año 2016, el cual compara tres linajes específicos entre ellos el CC97 y su capacidad de adhesión celular, encontraron que el complejo clonal 97 formaba uniones mucho más fuertes por medio de la fibronectina que los otros linajes

estudiados, lo que indica una capacidad de persistencia mayor en la glándula mamaria bovina y una posible disminución de células somáticas debido a que no hay expresión de factores de virulencia que exacerban la respuesta celular (Budd et al., 2016), lo que podría explicar la alta persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria de bovinos en Antioquia y su baja detección. Generalmente el umbral para diferencia vacas sanas y enfermas es a partir de muestras de leche con recuentos de células somáticas mayores de 200.000 cel/ml, lo que indica que si algún recuento da por debajo de este valor, no es tenido en cuenta como posible mastitis.

Se obtuvieron otros complejos clonales asociados a bovinos y ganadería como son el CC479, CC398 y CC1. El complejo clonal 398 es el más comúnmente asociado a la ganadería que contiene *Staphylococcus Meticilino resistentes*; también ha sido reportado en alimentos de origen animal y en humanos. En este estudio el *Spa* tipo asociado a este complejo clonal t571 fue negativo para el gen *mecA* (Wang et al., 2018). El CC1 ha sido reportado en cepas aisladas de humanos y de bovinos; estudios sugieren que la transmisión de este linaje se puede dar, desde animales a humanos, adaptándose a las características genéticas de cada grupo (Silva et al., 2013). La presencia de los *spa* tipo perteneciente a este complejo clonal en bovinos puede deberse a la relación humano – animal como el ordeño manual que aún se realiza en algunos municipios de Antioquia. CC30 es un linaje relativamente antiguo y altamente exitoso, cepas pertenecientes a este linaje causaron una pandemia de infecciones por *S. aureus* después de la Segunda Guerra Mundial. A lo largo del tiempo, las cepas CC30 se han convertido en los principales clones de (asociado al ambiente hospitalario) HA y MRSA. En este estudio se encontró el *spa* tipo 1135 metilino sensible, con una frecuencia de 3%, el éxito ecológico

y la transmisibilidad de este CC se evidencia en esta región en bovinos. Al igual que CC30, los linajes CC45 y CC8 también se encuentran con frecuencia entre los cinco linajes más prevalentes en varios estudios realizados en Europa (Holtfreter et al., 2016). Estos resultados demuestran que las cepas de *S. aureus* son clonales, observación que no es nueva, pero los resultados de este estudio muestra el espectro de las asociaciones entre humanos, bovinos, tipos de infecciones y resistencia.

La resistencia presentada en este estudio es comparable con estudios realizados años atrás en la misma región, como el realizado por Ramírez et al., 2011, donde del total de *S. aureus* obtenidos a partir de un muestreo, 71% presentaban resistencia a penicilina. En otro estudio realizado por Carillo & Villate, en 2007, con un total de 32 aislados de *S. aureus* de diferentes fincas que usaban ordeño mecánico y manual, encontraron resistencias de 16,6% para Cloxacilina y de 36,6% para Penicilina; estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio en el caso de la Penicilina (37%), la Cloxacilina en este estudio tuvo un porcentaje de resistencia más bajo, se resalta que el n de *S. aureus* en este estudio es mayor (94) que en los anteriores estudios nombrados, lo cual daría una visión mucho más amplia de la resistencia presente en la región y del uso indiscriminado de este grupo de antibióticos. Al igual que la Penicilina, la Lincomicina presentó una alta resistencia en este estudio, esta resistencia es importante porque este antibiótico actúa de manera muy similar a los macrólidos y a las estreptograminas, la resistencia a Lincomicina puede generar resistencia cruzada a los grupos anteriormente mencionados (Press, 2009). El resultado de 4% de resistencia para Trimetopim/Sulfa llama la atención, pues comparándolo con estudios como el de Ruiz & Arroyave, (2001) el cual no reporta resistencia en Antioquia; se evidencia el aumento de resistencia en un

medicamento que no es comúnmente usado para tratar mastitis, pero si para tratar otros procesos infecciosos, lo que estaría generando una selección de cepas resistente a este antibiótico.

Este estudio muestra que Antioquia cuenta con una alta diversidad de cepas de *S.aureus*, se evidencia que hay un efecto de presión antibiótica. El uso indiscriminado de antibióticos genera diversidad en los clones en cuanto a sus perfiles de resistencia, como lo muestran los resultados obtenidos. El intercambio de clones entre humanos y bovinos, se reporta como un peligro importante, al tener cepas que se adaptan a los hospederos, estas adquieren factores de virulencias tanto para colonizarlos como para generar nuevas infecciones. La diversidad en la expresión de factores de virulencia y sus diferentes combinaciones pueden causar cambios en el nivel de patogenicidad, sostenibilidad y propagación de infecciones dentro y entre Animales (Veh et al., 2015). Por lo tanto, el análisis de factores y la comparación entre las cepas de *S. aureus* es una herramienta útil en la reducción de la mastitis.

Otras razones para obtener esta alta diversidad pueden deberse a la alta densidad del ganado bovino, el intercambio de ganado, los sistemas de manejo que pueden cambiar entre zonas generando altas variabilidades genóticas entre cepas. A los hallazgos encontrados en este estudio se suman la aparición de *spa* tipos nuevos que aún no se encuentran caracterizados por la técnica molecular usada, y se encontraron tres *spa* tipos los cuales fueron clasificados con la técnica (t4911 , t3626 , t515) , pero todavía no se han sido asignados a ningún complejo clonal. Esto es una confirmación de esta variabilidad genética que tenemos en nuestra región y que todavía no es clara la dinámica

que tienen. Lo que sugeriría la posible presencia de cepas nuevas propias de la región, para determinarlo sería de necesario realizar estudios complementarios que ayuden a determinar su origen.

Estos resultados demuestran la importancia de realizar estudios a nivel genómico de las cepas de microorganismos, en este caso de *S. aureus*, evidenciando el potencial linaje específico de las cepas en la infección de la glándula mamaria bovina. El conocimiento de las características fenotípicas y genotípicas es de crucial importancia en el estudio de la patogénesis de la mastitis. Es importantes aclarar que se da un resultado por spa tipo encontrado, pero posiblemente cada clon tenga variaciones particulares. Los estudios moleculares además de brindar información epidemiológica aclaran mecanismos moleculares de patogenicidad usados por los linajes de *S. aureus*, facilitando el entendimiento en asociaciones de la bacteria y perfiles de virulencia. Estos estudios ayudarían a desarrollar controles más exitosos contra *S. aureus* causante de mastitis en bovinos, generando estrategias de tratamientos, prevención y control.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- A partir de los resultados obtenidos se concluye que en Antioquia se encuentra circulando una alta variabilidad de clones de *S. aureus*
- Con base en la información generada por la prueba *spa* typing y comparada con la literatura es posible evidenciar el potencial que tiene los clones de *S. aureus*, para invadir, infectar y persistir en la glándula mamaria bovina.
- Es importantes aclarar el hallazgo de los *spa* tipos posiblemente no especifique las variaciones particulares de cada clon, para lograr este resultado se deberá realizar estudios complementarios como secuenciación de genoma completo
- El uso indiscriminado de antimicrobianos para tratar la mastitis genera presión antibiótica en la bacteria, aumentando la resistencia antibiótica, como se evidencia en este estudio; seleccionando clones resistentes mejor adaptados para persistir en la glándula mamaria bovina.

REFERENCIAS

- Bartels, M. D., Boye, K., Larsen, A. R., Skov, R., & Westh, H. (2007). Rapid increase of genetically diverse methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Copenhagen, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 13(10), 1533.
- Boss, R., Cosandey, A., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Michel, A. (2016). Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 515–528.
- Budd, K. E., Mitchell, J., & Keane, O. M. (2016). Lineage associated expression of virulence traits in bovine-adapted *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, 189, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.013>
- Calderon, A., & Rodriguez, V. (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21, 582–589.
- Camussone, C. M., & Calvino, L. F. (2016). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con inmunógenos, *Resvista Argentina de Microbiología*. 45(2), 119–130.
- Capurro, A., Aspán, A., Artursson, K., & Persson, K. (2010). Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. *The Veterinary Journal*, 185(2), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.05.007>
- Carillo, A. C., Estepa, C., Lizarazo, J. H., & Villate, J. P. S. (2007). Identificación de bacterias causantes de Mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 10(1), 81–91.

- Cucarella, C., Tormo, M. Á., Úbeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Penadés, J. R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 72(4), 2177–2185. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2177-2185.2004>
- Daum, R., & Spellberg, B. (2014). Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Semin Immunopathol*, 34(2), 335–348. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0293-5>.Development
- Feltrin, F., Alba, P., Kraushaar, B., Ianzano, A., Argudín, A., & Matteo, D. (2016). A Livestock-Associated, Multidrug-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 97 Lineage Spreading in Dairy Cattle and Pigs in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(3), 816–821. <https://doi.org/10.1128/AEM.02854-15>.Editor
- Fenner, L., Widmer, A. F., Dangel, M., & Frei, R. (2008). Distribution of spa types among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 6 year period at a low-prevalence university hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 57(5), 612–616.
- García, L., Holden, M., Lindsay, H., Webb, C., Brown, D., Curran, M., Holmes, M. A. (2003). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark : a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 595–603. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
- Gonçalves, A., Baines, S. L., Carter, G. P., Heffernan, H., French, N. P., Ren, X., Williamson, D. A. (2017). A phylogenomic framework for assessing the global emergence and evolution of clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 1–7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000105>

- Graber, H. U., Naskova, J., Studer, E., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Brechbühl, M., Fournier, C. (2009). Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1442–1451.
- Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Uchida, I., Tanaka, K., & Eguchi, M. (2010). Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2130–2139.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslo, A., & Pyo, S. (2008). Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites . *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 46(11), 3728–3735. <https://doi.org/10.1128/JCM.00769-08>
- Hogeveen, H., Huijps, K., & Lam, T. J. G. M. (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1), 16–23. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.547165>
- Holtfreter, S., Grumann, D., Balau, V., Barwich, A., Kolata, J., Goehler, A., Döring, P. (2016). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the general population in Northeast Germany—results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0). *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-00312.
- Iqbal, Z., Seleem, M. N., Hussain, H. I., Huang, L., & Hao, H. (2016). Comparative virulence studies and transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals. *Nature Publishing Group*, (September), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35442>

- Jans, C., Merz, A., Johler, S., Younan, M., Tanner, S. A., Wambua, D., Meile, L. (2017). East and West African milk products are reservoirs for human and livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 65, 64–73.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.017>
- Jiménez, J. N., Ocampo, A. M., Vanegas, J. M., Rodriguez, E. A., Mediavilla, J. R., Chen, L., Restrepo, A. V. (2012). CC8 MRSA strains harboring SCCmec type IVc are predominant in Colombian hospitals. *PLoS One*, 7(6), e38576.
- Kosecka-Strojek, M., Ilczyszyn, W. M., Buda, A., Polakowska, K., Murzyn, K., Panz, T., Krol, J. (2016). Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting as a method for rapid and cost-effective typing of animal-associated *Staphylococcus aureus* strains from lineages other than sequence type 398. *Journal of Medical Microbiology*, 65(12), 1494–1504.
- Melchior, M. B., Vaarkamp, H., & Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?, *Veterinary Journal*, 171(3), 398–407.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.01.006>
- Pereyra, E. A. L., Picech, F., Renna, M. S., Baravalle, C., Andreotti, C. S., Russi, R., 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>
- Press, P. (2009). Martindale: the complete drug reference. *Sweetman SC, London*, 29–31.
- Raji, M. A., Garaween, G., Ehricht, R., & Monecke, S. (2016). Genetic Characterization

of *Staphylococcus aureus* Isolated from Retail Meat in Riyadh , Saudi Arabia,
7(June), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00911>

Ramírez, N., Arroyave Henao, O., Cerón-Muñoz, M., Jaramillo, M., Cerón, J., & Palacio, L. G. (2011). Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (22), 31–42.

Restrepo, J., Ortiz, L., Cardona, X., & Olivera, M. (2012). Evaluacion de la sensibilidad y especificidad del diagnostico molecular de *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis. *Biosalud*, (2), 40–51.

Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Veenstra, S., Poole, D. E., Dingwell, R. T., & Keefe, G. P. (2006). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J Volume*, Vol 47, 567–572.

Ruiz Buitrago, J. D., Ramírez Vásquez, N. F., & Arroyave Henao, O. (2001). Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas a algunos antibióticos de las bacterias aisladas de glándula mamaria bovina en San Pedro de los Milagros, Antioquia.

Ryan, E., Salat, O., Zangerl, P., Steiner, A., & Graber, H. U. (2016). Bovine *Staphylococcus aureus* : Subtyping , evolution , and zoonotic transfer, 515–528.

Sakwinska, O., Morisset, D., Madec, J., Waldvogel, A., Moreillon, P., & Haenni, M. (2011). Link between Genotype and Antimicrobial Resistance in Bovine Mastitis-Related *Staphylococcus aureus* Strains , Determined by Comparing Swiss and French Isolates from the Rho. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3428–3432. <https://doi.org/10.1128/AEM.02468-10>

- Schmidt, T., Kock, M. M., & Ehlers, M. M. (2017). Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis and Close Human Contacts in South African Dairy Herds : Genetic Diversity and Inter-Species Host Transmission, 8(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00511>
- Silva, N. C. C., Guimarães, F. F., Manzi, M. P., Budri, P. E., Gómez-Sanz, E., Benito, D., Torres, C. (2013). Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 96(11), 6856–6862.
- Smith, D. S., Siggins, M. K., Gierula, M., Pichon, B., Turner, C. E., Lynskey, N. N., Sriskandan, S. (2016). Identification of commonly expressed exoproteins and proteolytic cleavage events by proteomic mining of clinically relevant UK isolates of *Staphylococcus aureus*. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000049>
- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>
- Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2014). Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5275–5293. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7775>
- Veh, K. a. a, Klein, R. C. C., Ster, C., Keefe, G., Lacasse, P., Scholl, D., Malouin, F. (2015). Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 155–168.

<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8044>

- Vissio, C. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba , Argentina # Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy fa, *14*, 7–14.
- Wang, W., Lin, X., Jiang, T., Peng, Z., Xu, J., Yi, L., 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*.
- Waryah, C. B., Sunagar, R., Veeresh, H. B., Nuthanalakshmi, V., Preethirani, P. L., Sharada, R., Mukkur, T. K. (2015). Typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Australia and India, *93*(8). <https://doi.org/10.1111/avj.12349>
- Zadoks, R. N., & Middleton, J. R. (2011). Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans, *357–372*.
<https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>
- Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus* : Generalidades , patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomedica*, *25*(3), 129–143.