

Caracterización genotípica y fenotípica de cepas de *Streptococcus uberis* aisladas de mastitis bovina en fincas lecheras del departamento de Antioquia, Colombia.

Paola Andrea Ríos Agudelo ¹, Arley Caraballo Guzmán ², Julián Reyes Vélez ³, Martha Olivera Ángel ⁴, Adam Blanchard ⁵, Giovanni Torres Lindarte ⁶

1. Bacterióloga, Laboratorio Microbiología Industrial- Instituto Colombiano de Medicina Tropical-ICMT.
2. Bacteriólogo, MSc. Investigador Instituto Colombiano de Medicina Tropical-ICMT
3. Médico veterinario, MSc, PhD. Investigador Instituto Colombiano de Medicina Tropical-ICMT
4. Médica veterinaria, MSc, DSc. Investigadora grupo Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.
5. BSc (Hons) in Animal Science. PhD. Investigador Universidad de Nottingham
6. Bacteriólogo, MSc, DSc. Investigador Instituto Colombiano de Medicina Tropical-ICMT

RESUMEN. La mastitis bovina es la enfermedad del ganado que más pérdidas económicas genera a los productores de leche a nivel mundial. *Streptococcus uberis* es uno de los principales microorganismos responsable de la mastitis clínica y subclínica en bovinos. La variabilidad genotípica de *S. uberis* ha sido ampliamente demostrada en estudios realizados en diferentes países, a través de técnicas de tipificación molecular como lo es *Multilocus Sequence Typing-MLST*. Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones al momento de profundizar en la variabilidad genética de las cepas circulantes por los pocos genes que son analizados. Actualmente, la disponibilidad de las tecnologías para la secuenciación del genoma completo -*Whole Genome Sequencing-WGS*, ha permitido analizar la totalidad del genoma de *S. uberis*. En Colombia, *S. uberis* ha tomado importancia, siendo hoy en día uno de los principales microorganismos aislados de mastitis. Sin embargo, no se tiene información genotípica que refleje la capacidad de virulencia y resistencia de las cepas circulantes. Por tal motivo que el objetivo del estudio fue caracterizar genotípica y fenotípicamente cepas de *Streptococcus uberis*, aisladas de mastitis bovina en fincas lecheras en el departamento de Antioquia, Colombia. **MATERIALES Y MÉTODOS.** Se recolectaron muestras de leche de bovinos de fincas pertenecientes a municipios del norte y oriente de Antioquia, Colombia. Se analizaron 10 aislados de *S.uberis* a los cuales se les realizó análisis de susceptibilidad antimicrobiana, análisis de formación *In vitro* de biopelícula y secuenciación del genoma completo usando Illumina NovaSeq PE150. **RESULTADOS.** El tamaño del genoma de los aislados varió entre 1.902.784 bp a de 2.134.443 bp, con un pangenoma de 1629 genes. El análisis del MLST, mostró 10 ST diferentes y no reportadas anteriormente. El 60% de los aislados fue débil formador de biopelícula y solo un aislado fue fuerte formador de biopelícula. Fenotípicamente el 80% de los aislados presentó resistencia a clindamicina y un 20% presentó resistencia a eritromicina y tetraciclina, lo cual coincidió

con genes de resistencia que fueron encontrados: *tetO*, *tetM*, *ErmB* e *lnuC*. Se encontraron 36 factores de virulencia, 35 de estos identificados en todos los aislados; solo un aislado presentó uno un factor de virulencia diferente. Adicionalmente, se reportaron dos secuencias de inserción (*ISSag2* y *ISEnfa4*) previamente asociadas a factores de virulencia y resistencia en otras especies. **CONCLUSIÓN.** Este es el primer estudio realizado en Colombia donde se secuencian el genoma completo y se analiza en conjunto características fenotípicas de cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis bovina. Nuestros resultados muestran alta diversidad de las cepas circulantes, así como, características genotípicas y fenotípicas que le confieren virulencia y resistencia a antimicrobianos a las cepas evaluadas.

PALABRAS CLAVES: Mastitis bovina, *Streptococcus uberis*, WGS, MLST.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria, comúnmente originada por microorganismos, siendo las bacterias las principales causantes de la infección (1). La mastitis continúa siendo la enfermedad del ganado bovino que más pérdidas económicas genera a los productores de leche a nivel mundial (2). Las pérdidas anuales ocasionadas por la mastitis pueden sobrepasar los 30 billones de dólares en el mundo (3). Colombia, es el cuarto país productor de leche en América latina, produciendo más de 7.000 millones de litros anualmente (4). Las pérdidas económicas en Colombia señalan entre un 10 a 20% de las utilidades de los productores, debido a la leche descartada, los antibióticos aplicados y los costos veterinarios (5).

Streptococcus uberis es considerado uno de los principales microorganismos causantes de mastitis clínica y subclínica en el mundo (6–8). En países como Canadá, Estados Unidos y los Países Bajos, *S. uberis* causa entre un 14 a 26% de la mastitis clínica. En Nueva Zelanda y en el Reino Unido (UK) es el principal responsable de la enfermedad (9). En Antioquia, principal zona lechera de Colombia, de acuerdo con los estudios realizados por *Ramírez et al.* (2011 y 2014), *Calderon et al.* (2008) y *Trujillo et al.* (2010), (6,10–12) la prevalencia de *S. uberis*, causante de mastitis subclínica, no superó el 6%. Sin embargo, resultados de un laboratorio de diagnóstico de mastitis ubicado en Antioquia, al analizar las muestras que recibieron durante el año 2017, mostraron un incremento en la frecuencia de aislamiento en *S. uberis*. Para este año, esta bacteria fue recuperada en el 17% de las muestras procesadas, ubicándose entre los tres patógenos más frecuentes; incluso, desplazando a *Streptococcus agalactiae*, una de las bacterias que más casos generaba en el país. Para el año 2021 *S.uberis* continúa ocupando el tercer lugar de los principales microorganismos aislados para mastitis de este mismo laboratorio de Antioquia. (Datos no publicados).

Al menos tres características han sido reconocidas en *S. uberis* como causante de infecciones intramamarias. La primera, está relacionada con la ubicuidad de esta bacteria, pues es un habitante normal de la piel de la vaca y del ambiente, siendo capaz de adaptarse a diferentes nichos, contrario a lo que sucede con otras especies de *Streptococcus* (13,14). Esta condición permite su transmisión desde fuentes ambientales, es decir fuentes que se encuentran en el entorno del animal como lo es la materia fecal, el pasto, y los diferentes entornos de la vaca (15,16). La segunda, se encuentra relacionada con el no reconocimiento de la bacteria por parte de las células epiteliales de la glándula mamaria, conllevando a una respuesta inmune tardía (17). La tercera, está asociada a la presencia de algunos factores de virulencia

(Formación de cápsula y biopelículas, así como, moléculas de adhesión) que favorecen la persistencia de la bacteria al interior de la glándula mamaria (18,19).

La variabilidad genotípica de *S. uberis* ha sido ampliamente reconocida en estudios realizados en diferentes países, usando técnicas de tipificación molecular como lo es “*Multilocus Sequence Typing-MLST*”, estas tipificaciones han permitido identificar genotipos que se han asociado con la presencia de factores de virulencia (adhesión, formación de cápsula, formación de biopelículas, entre otros) que le confieren alta capacidad a *S. uberis* para generar infecciones intramamarias (20–22). Actualmente, la disponibilidad de nuevas técnicas para la Secuenciación del Genoma Completo -*Whole Genome Sequencing-WGS* han permitido que sea posible explorar y ampliar el conocimiento de la genética de las bacterias. Estudios recientes han analizado el genoma completo de *S. uberis* (14,23), permitiendo la comparación entre cepas y demostrando las altas capacidades metabólicas que tiene el microorganismo, lo cual le permite sobrevivir en diferentes ambientes (14).

En Colombia, específicamente en Antioquia, donde este microorganismo se ha convertido en uno de los principales causantes de infecciones intramamarias en bovinos, no se tiene información genotípica que ayude a entender la epidemiología de *S.uberis*, lo cual termina dificultando las estrategias de control implementadas.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue caracterizar genotípica y fenotípicamente cepas de *Streptococcus uberis*, aisladas de mastitis bovina en fincas lecheras del departamento de Antioquia, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo.

Consideraciones éticas

Este estudio es considerado que tiene riesgo mínimo para los animales que participaron. La investigación cuenta con el aval del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad CES. Dicho aval se encuentra refrendado e incluido en el acta de la sesión número 35 del CICUA del mes de mayo del año 2019.

Población de origen

La población de origen correspondió a bovinos en producción, pertenecientes a seis fincas lecheras especializadas de cinco municipios del norte, oriente y occidente (San Pedro, Santa Rosa de Osos, Entrerrios, San Jerónimo y La Ceja), del departamento de Antioquia.

Población de estudio

Esta consistió en una colección de 21 aislamientos de *S. uberis* que fueron provenientes de bovinos con infecciones intramamarias de seis fincas lecheras especializadas de municipios del norte, oriente y occidente (San Pedro, Santa Rosa de Osos, Entrerrios, San Jerónimo y La Ceja), del departamento de Antioquia.

Muestra

La muestra fue seleccionada a conveniencia. Solo 12 de los 21 aislados fueron seleccionados para ser analizados.

Criterios de inclusión

- Se incluyeron bovinos de fincas lecheras especializadas de Antioquia.
- Se incluyeron bovinos que estuvieran en producción.
- Se incluyeron bovinos con historial previo de mastitis.
- Se incluyeron cultivos puros o mixtos (máximo dos tipos de colonias diferentes).
- Se incluyeron cepas de *S. uberis*, aisladas de bovinos con infecciones intramamarias, pertenecientes a fincas lecheras especializadas del departamento de Antioquia, que por microbiología convencional eran presuntivas de *S. uberis* y fueron confirmadas por PCR.

Criterios de exclusión

- Se excluyeron bovinos de fincas donde el productor no haya aceptado participación en el estudio.
- Se excluyeron bovinos que se encontraran en tratamiento.
- Se excluyeron cultivos mixtos con más de tres tipos diferentes de colonias.
- Se excluyeron las cepas que al momento de la confirmación por PCR no correspondieron a *S. uberis*.
- Se excluyeron las cepas que después de haber secuenciado el genoma no estaban puras.

Recolección de muestra

Muestras de leche fueron recolectadas de bovinos en producción, que tuvieran un historial previo de mastitis y pertenecientes a seis fincas lecheras especializadas de cinco municipios

del norte, oriente y occidente del departamento de Antioquia, Colombia (San Pedro, Santa Rosa, Entreríos, San Jerónimo y La Ceja).

Las muestras fueron recolectadas por personal técnico capacitado, utilizando un recipiente estéril y con asepsia previa de los cuartos (24). La muestra obtenida incluyó leche de los cuatro cuartos (compuesta) y posteriormente, fueron enviadas debidamente refrigeradas, al Laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) para su aislamiento e identificación.

Aislamiento e identificación de *Streptococcus uberis*

Un total de 12 aislados de *S.uberis* pertenecientes a seis fincas lecheras de municipios del norte y oriente de Antioquia, fueron tenidos en cuenta para los análisis de este estudio. Los 12 aislados fueron identificados de la siguiente manera: m1,m2,m3,m4,m5,m6,m7,m8,m9,m10,m11 y m12.

Para la identificación, 10 uL de leche fueron sembrados en Agar Sangre Esculina y Agar Enterococosele (producidos en la planta de medios de cultivo del ICMT) (24). Posteriormente, las placas fueron incubadas en condiciones aeróbicas a 37°C durante 24-48 horas.

Inicialmente los aislados se clasificaron como *S. uberis* por técnicas microbiológicas convencionales. Se interpretó la hidrólisis de la Esculina en los medios sembrados, se realizó coloración de Gram y prueba de catalasa, siguiendo las recomendaciones del *National Mastitis Council* (NMC) (24). Se consideró que una cepa era inicialmente positiva a *S. uberis* si a la coloración de Gram se observaron cocos Gram positivos, si fueron catalasa positivos,

si se presentó hidrólisis de la esculina y que no haya habido crecimiento en el agar EnterococoseL. Las colonias características se almacenaron en Caldo Trypticase Soya con glicerol (producido en la planta de medios del ICMT) y se almacenaron a -80°C. Posteriormente, se reactivaron y se sembraron nuevamente en Agar Sangre para ser confirmadas mediante técnicas moleculares (PCR).

Extracción ADN y PCR

Se realizó PCR convencional en búsqueda de un fragmento específico del gen 16S rRNA de *S. uberis*. Una vez confirmados los aislamientos, estos se almacenaron en Caldo Trypticase Soya con glicerol para ser almacenadas a -80°C para posteriores análisis.

La extracción de ADN de cada muestra se realizó utilizando el kit de extracción GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, Lithuania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación y determinación de la pureza del material genético, se utilizó 1uL del ADN previamente extraído en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™).

La confirmación de *S. uberis* se realizó por PCR convencional teniendo como blanco el fragmento del gen 16S rRNA de *S. uberis*, utilizando los primers descritos por *Hassan et al.* (25) F: CGCATGACAATAGGGTACA / R: GCCTTTAACTTCAGACTTATCA.

Para el montaje de la PCR, se utilizó el Master Mix One Taq® 2x MM w/Standard Buffer M0482S (NEW ENGLAND-Biolabs) y se trabajó con un volumen final por reacción de 25 uL. La mezcla de reacción (25 uL) contenía 12,5 uL de Master Mix, 0,5 uL de cada primer, 6,5 uL de agua destilada y por último, 5 uL del ADN. Los parámetros usados para la

amplificación fueron: 94°C por 60 segundos 94°C por 60 segundos, 58°C por 90 segundos, 72°C por 90 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos, esto por 30 ciclos (25).

La presencia de productos de PCR fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel fue preparado al 1% y fue elaborado con Tampón de Electroforesis Tris acetato (TAE).

Como control positivo se utilizó la cepa de referencia de *S. uberis* ATCC 700407.

Análisis de susceptibilidad antimicrobiana

El análisis de la susceptibilidad antimicrobiana de cada cepa fue realizada bajo la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en el Laboratorio de la Clínica CES (Medellín, Antioquia, Colombia) con el equipo VITEK® 2 compact (Biomérieux), utilizando la tarjeta VITEK® 2 AST-GP67, donde se analizaron 13 antibióticos: ampicilina, penicilina, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, levofloxacin, linezolid, tetraciclina, vancomicina, tigeciclina y moxifloxacin. (Estos antibióticos son los incluidos en la tarjeta del equipo para bacterias Gram positivas tipo *Streptococcus*).

Ensayo de formación de biopelícula *In vitro*

Se determinó la capacidad de formar biopelícula *In vitro* de *S. uberis*, utilizando microplacas de poliestireno de 96 pozos, según lo descrito por *Dieser et al* (26) con mínimas modificaciones. Se realizó un cultivo previo de cada aislado en 6ml de Caldo Tripticasa Soya

y fueron incubados a 37°C por 24 horas. Se realizó una dilución 1:100 del caldo Trypticase Soya con los aislados que fueron previamente cultivados y se pasaron 10ul de estos a los pozos de la placa que ya tenían 190ul de caldo Trypticase suplementado con 0.5% de glucosa. Posteriormente, se incubó la placa a 37°C durante 24 horas y pasado el tiempo se retiró el caldo de las placas y se lavó cuidadosamente cada pocillo con PBS estéril por tres veces. La placa se puso a secar por una hora a 60°C y se le agregó a cada pozo 100ul de Cristal Violeta al 2%. Por último, se añadió 100ul de Etanol puro y se realizó lectura a 590 nm en el lector de Elisa xMark (Bio-Rad). El ensayo se hizo por triplicado y se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 como control positivo y como control negativo se utilizó Caldo Trypticase Soya más glucosa al 0.5%.

La densidad óptica (ODs) de cada aislado se obtuvo por la media aritmética de la absorbancia de los tres pocillos y este valor fue comparado con la absorbancia media de los controles negativos (ODnc). Se utilizó la siguiente clasificación para establecer las categorías de formación de biopelículas *In vitro*: sin producción de biopelículas ($ODs \leq ODnc$), producción débil de biopelículas ($ODnc < ODs \leq 2 ODnc$), producción moderada de biopelículas ($2 ODnc < ODs \leq 4 ODnc$) y fuerte producción de biopelículas ($4 ODnc < ODs$).

Secuenciación del genoma

El material genético extraído (ADN) de las 12 cepas, fue alicuotado en tubos Eppendorf de 1,5ml y fueron debidamente identificados y almacenados para su envío. El análisis de la

secuenciación fue realizado por Novogene Corporation INC (Sacramento, California). Las secuencias de los genomas fueron realizadas en la plataforma Illumina NovaSeq PE150.

Ensamble y anotación del genoma

Antes de realizar la secuenciación, las muestras fueron sometidas a un control de calidad. Las muestras que cumplieron con el control de calidad se sometieron a la preparación de las librerías. El ADN del genoma se cortó en fragmentos cortos. Estos fragmentos fueron reparados en los extremos para ser ligados con el adaptador de Illumina. Los fragmentos con los adaptadores se amplificaron por PCR para la preparación de la librería. La librería fue verificada con Qubit y PCR en tiempo real para su cuantificación. Posteriormente, se realizó la secuenciación con la plataforma Illumina NovaSeq PE150

El ensamble se realizó utilizando la cepa de referencia *S. uberis* 0140J usando SPAdes. Los genomas se anotaron utilizando RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology), una herramienta disponibles en PATRIC 3.6.12 (<https://patricbrc.org/>) (27).

Análisis del genoma

El análisis del pangenoma se realizó con las proteínas que tenían una función asignada en PATRIC 3.6.12 para cada genoma y se utilizó la metodología de diagrama de Venn, con la herramienta <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> (28). Los genomas fueron sometidos en busca de factores de virulencia, donde se utilizó el servicio de PATRIC 3.6.12

para genes especializados y se filtró por la opción “*Virulence Factor*” (27). Adicionalmente, se buscaron los genes de resistencia de los genomas en la base de datos “*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*” (CARD) <https://card.mcmaster.ca/> (27). El árbol filogenético se realizó con la herramienta “*Phylogenetic Tree*” , disponible en PATRIC 3.6.12, donde se incluyeron los genomas de este estudio más 23 genomas representativos de Nueva Zelanda, Canadá, Australia y el de la cepa de referencia *S. uberis* 0140J, todos depositados en PATRIC 3.6.12 (27) . El árbol fue editado y visualizado utilizando la herramienta iTol (<https://itol.embl.de/tree/>) (27).

Para la detección de plásmidos se utilizó la herramienta PlasmidFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (29). Para la identificación de bacteriófagos se utilizó el servidor web PHASTER (<https://phaster.ca/>) (30). Las secuencias de inserción y transposones se identificaron con la herramienta Mobile Element Finder v1.0.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>) (31). Adicionalmente, se comparó el porcentaje de identidad nucleotídica de los aislados frente a la cepa de referencia *S.uberis* 0140J con la herramienta (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#anib>) (32).

Multi-locus sequence typing (MLST)

Los genomas ensamblados y almacenados en formato FASTA fueron sometidos en PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-uberis>). Allí se les asignó la ST y los Complejos Clonales (CC).

Análisis estadístico:

Se elaboró una base de datos en el programa Microsoft® Excel® 2016, en la versión 16.16.1. Se realizó un análisis descriptivo univariado. A las variables se les calculó medidas de frecuencia absoluta y relativa.

RESULTADOS

Un total de 150 muestras de leche fueron recolectadas en este estudio. 25 cepas fueron presuntivas de *S. uberis* por microbiología convencional, 21 cepas fueron confirmadas por PCR como *S. uberis*. Se enviaron a secuenciar 12 cepas, pero solo 10 pudieron ser tenidas en cuenta ya que el resultado de la secuenciación evidenció que dos se encontraban contaminadas con *Enterococcus* spp. Los genomas fueron depositados en PATRIC 3.6.12 bajo la identificación (Genome ID): 218495.87 (m2), 218495.88 (m3), 218495.92 (m5), 218495.84 (m6), 218495.83 (m7), 218495.85 (m8), 218495.93 (m9), 218495.94 (m10), 218495.95 (m11) y 218495.96 (m12). Igualmente, se encuentran depositados en PubMLST bajo la identificación (ID): 2323 (m2), 2324 (m3), 2325 (m4), 2326 (m6), 2327 (m7), 2328 (m8), 2329 (m9), 2330 (m10), 2331 (m11) y 2332 (m12).

De las cepas analizadas un 30% (3/10) pertenecían a San Pedro, 20% (2/10) a Santa Rosa, 20% (2/10) a Entreríos, 20% (2/10) a La Ceja y 10% (1/10) a San Jerónimo. Los aislados m2 y m3 se ubicaron dentro de una misma finca (Finca 1), igualmente ocurrió con los aislados m5 y m11 (Finca 2), los aislados m6 y m9 pertenecían a la finca 3; m6 y m7 se aislaron de la

finca 4. m10 y m12 pertenecían a la finca 5 y 6, respectivamente. Los 10 genomas de *S. uberis* variaron en un tamaño mínimo de 1.902.784 bp y un máximo de 2.134.443 bp. Incluimos información del tamaño del genoma de la cepa de referencia *S. uberis* 0140J. (Tabla 1)

Tabla 1. Resumen de los aislados de *S. uberis* identificados en el estudio versus la cepa de referencia.

Aislado	Municipio	Finca	Tamaño del genoma bp	Contings
m2	La Ceja	Finca 1	1.953.684	35
m3	La Ceja	Finca 1	2.036.297	26
m5	San Pedro	Finca 2	1.952.255	42
m6	Entrerrios	Finca 3	2.134.443	102
m7	Santa Rosa	Finca 4	1.964.012	36
m8	Santa Rosa	Finca 4	2.053.252	77
m9	Entrerrios	Finca 3	1.967.434	45
m10	San Jerónimo	Finca 5	1.902.784	38
m11	San Pedro	Finca 2	1.956.456	38
m12	San Pedro	Finca 6	1.947.552	40
<i>S.uberis</i> 0140J	No aplica	No aplica	1.852.352	1

Ensayo de formación de biopelícula *In vitro*

El ensayo de formación de biopelícula *In vitro* mostró que, un 60% de las cepas (6/10) fueron débiles formadoras de biopelícula, un 30% (3/10) tuvieron una formación moderada y solo un 10% (1/10) fue fuerte formadora de biopelícula. (Tabla 2)

Tabla 2: Resultados cualitativos ensayo formación de biopelícula *In vitro*

Resultados cualitativos ensayo formación de biopelícula <i>In vitro</i>			
Aislado	Formación		
	Débil	Moderada	Fuerte
m2	X		
m3	X		
m5	X		
m6		X	
m7	X		
m8		X	
m9		X	
m10	X		
m11	X		
m12			X

Análisis de susceptibilidad antimicrobiana

El análisis de la CMI para evaluar la susceptibilidad a los antibióticos nos indicó que el 100% (10/10) de los aislados fueron sensibles a: ampicilina, cefotaxime, ceftriaxona, cloranfenicol, linezolid, tigeciclina, vancomicina, levofloxacin y moxifloxacin. Por el contrario, el 80% de los aislados presentaron resistencia a clindamicina, a excepción de los aislados m8 y m9 que fueron sensibles. El aislado m6 presentó adicionalmente, resistencia a eritromicina y tetraciclina. Así mismo, el aislado m2, fue resistente a la tetraciclina. Para el resto de aislados, frente a la eritromicina, un 60% presentaron una sensibilidad intermedia y solo los aislados m8,m9 y m10 fueron sensibles. Para la tetraciclina, el 80% de aislados restantes fue sensible. Para penicilina un 70% presentó sensibilidad intermedia (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis susceptibilidad antimicrobiana

Análisis de susceptibilidad antimicrobiana

Antibiótico	Aislado									
	m2	m3	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
Ampicilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Penicilina	S	S	SI	SI	S	SI	SI	SI	SI	SI
Cefotaxime	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Levofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Linezolid	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tigeciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Moxifloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
Eritromicina	SI	SI	SI	R	SI	S	S	S	SI	SI
Tetraciclina	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S

La letra “S” significa sensible y se encuentra resaltado en color verde, la letra “SI” sensibilidad intermedia y se encuentra resaltado en naranja y la letra “R” resistente y se encuentra resaltado en color gris.

Análisis del genoma

En la Tabla 4 se resumen los resultados del análisis de calidad del proceso de secuenciación. La calidad de la secuenciación estuvo buena, obteniendo buenos valores Phred Q20 y Q30, indicando que se presentaron pocos errores en la lectura de las bases (Tasa de error: 0,03%)

Tabla 4. Resumen resultados del análisis de calidad del proceso de secuenciación

Aislado	Profundidad (X)	Cobertura 4X (%)	Efectividad (%)	Error(%)	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
m2	833.37	92.75	99.9	0.03	97.6	92.99	36.77
m3	689.78	93.78	99.92	0.03	97.67	93.15	36.94
m5	913.36	92.63	99.88	0.03	97.51	92.79	37.02
m6	500.09	94.96	99.83	0.03	98.19	94.13	36.95
m7	660.17	92.97	99.84	0.03	97.98	93.61	36.77
m8	833.86	93.17	99.83	0.03	98.16	94.11	36.88
m9	450.94	93.38	99.87	0.03	97.17	91.94	36.75
m10	881.78	92.99	99.92	0.03	97.42	92.5	36.88
m11	775.93	93.19	99.83	0.03	98.04	93.83	36.88
m12	478.93	94.45	99.81	0.03	97.97	93.65	36.72
Promedio	707.82	93.42					

Multi-locus sequence typing (MLST):

Se asignaron 10 ST diferente para cada uno de los aislados de *S. uberis*. Todas las ST fueron consideradas nuevas, ya que no coincidieron con ninguna ST previamente reportada en la base de datos de MLST de *S. uberis* (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-uberis>). Solo fue asignado el Complejo Clonal (CC) 143 a los aislados m7 y m10 (Tabla 5).

Tabla 5: Secuencias Tipo (ST) asignada a los aislados de *S. uberis* y su distribución por finca.

Aislado	MLST ST	MLST-perfil							Complejo clonal (CC)	Número de aislados	Finca
		Genes									
		<i>arcC</i>	<i>ddl</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>tdk</i>	<i>tpi</i>	<i>yqil</i>			
m2	1426	6	1	3	2	42	52	3	1	Finca 1	
m3	1427	6	1	5	2	17	52	6	1	Finca 1	
m5	1428	1	1	3	1	42	52	6	1	Finca 2	
m6	1435	1	1	2	2	28	52	86	1	Finca 3	

m7	1429	6	1	28	2	17	3	3	143	1	Finca 4
m8	1430	1	1	3	2	130	52	6		1	Finca 4
m9	1431	1	1	28	2	28	52	3		1	Finca 3
m10	1432	1	1	3	2	17	52	3	143	1	Finca 5
m11	1433	6	1	3	2	131	52	86		1	Finca 2
m12	1434	1	1	3	2	26	52	3		1	Finca 6
Total										10	

Pangenoma

El análisis del pangenoma de los 10 aislados identificó un total de 1629 genes, con un genoma central compuesto por 1296 genes (79,5%), un genoma accesorio compuesto por 173 genes (10,6%) y un genoma único que comprende 160 genes (9,8%). Este análisis fue basado en las proteínas con función asignada, que están disponibles en PATRIC 3.6.12 al momento de visualizar el genoma de cada aislado. (Tabla 6)

Realizamos una comparación de nuestros genomas con el genoma de la cepa de referencia *S. uberis* 0140J, identificando que nuestros 10 genomas tienen 155 genes que no fueron encontrados en esta cepa.

Tabla 6. Resultados del análisis del pangenoma

Pangenoma	Genes	% pangenoma
Genoma central	1296	79,5%
Genoma accesorio	173	10,6%%

Genoma únicos	160	9,8%%
Total genes	1629	100%

Genes de resistencia

Un total de nueve genes de resistencia (*tetM*, *tetO*, *patB*, *lnuC*, *lnuA*, *IsaE*, y *ANT(6)-la*, *ErmB* y *cfr*) fueron encontrados en este estudio para los 10 aislados. Estos genes confieren resistencia a las tetraciclinas, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos y aminoglucósidos. Todos los aislados presentaron al menos dos genes de resistencia en sus genomas; el gen *lnuC* se encontró en el 80% (8/10) de los genomas. El gen *lnuA* en un 10% (1/10), confiriendo resistencia a los antibióticos pertenecientes a las lincosamidas. Este hallazgo concuerda con lo observado fenotípicamente, ya que la para la clindamicina se mostró resistencia en los aislados . Solo el genoma del aislado m11 no presentó ningún gen de resistencia a las lincosamidas.

La presencia de los genes *tetM* y *tetO*, estuvo presente en los genomas de los aislados m2 y m6 respectivamente; ambos aislados presentaron resistencia fenotípica a la tetraciclina. Igualmente, el aislado m6 presentó el gen *ErmB*, gen que confiere resistencia a la eritromicina. Este hallazgo concuerda con lo observado fenotípicamente.

El gen *cfr* es un gen que presenta multiresistencia (a fenicoles, lincosamidas, pleuromutilinas y estreptogramina A). Sometimos nuestros genomas en búsqueda de este gen porque encontramos la presencia de una secuencia de inserción relacionada con el. Solo en uno de nuestros aislados se identificó (el aislado m8). Este aislado fue en el análisis fenotípico de susceptibilidad fue sensible a la clindamicina (antibiótico del grupo de las lincosamidas).

Genes de resistencia

Gen	Aislado									
	m2	m3	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
<i>tetM</i>	X									
<i>tetO</i>				X						
<i>patB</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>lnuC</i>	X	X	X	X	X	X	X	X		
<i>lnuA</i>										X
<i>IsaE</i>				X					X	
<i>ANT(6)-la</i>				X					X	
<i>ErmB</i>				X						X
<i>cfr</i>						X				

Factores de virulencia

Se encontraron 36 genes de virulencia para los 10 aislados, utilizando el servicio de PATRIC 3.6.12. Los aislados m2, m3, m5, m6, m7, m8, m9, m10, m11 presentaron 35 genes, sólo el aislado m12 presentó 36 genes, con un único gen diferente (SP_0320). Los otros genes fueron iguales en todos los aislados. Entre los genes encontrados estaban: *purN*, *purH*, *purB*, *lepA*, *perR*, *leuS*, *vicK*, *sodA*, *cpsY*, así como *hasC* que ya han sido previamente descritos para *S. uberis*.

Pese a encontrar diferentes factores de virulencia, el análisis de las bases de datos de PATRIC 3.6.12 no mostró la presencia de algunos genes que han sido ampliamente descritos para *S. uberis* y que juegan un papel importante en la virulencia de este microorganismo. Estos genes son el gen *pauA*, *Sua*, *lbp*, *gapC*. Por esta razón, descargamos las secuencias en formato FASTA de cada gen y se sometieron a un BLAST, herramienta disponible en el “*National Center for Biotechnology Informatios-NCBI*” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con

cada uno de los 10 aislados del estudio. Los cuatro genes fueron encontrados en todos nuestros genomas.

Adicionalmente, pese a la presencia de una secuencia de inserción encontrada en los genomas, se buscó la presencia del gen de virulencia *lmb* (descrito en *Streptococcus agalactiae*), donde encontramos que el 100% de nuestros genomas lo presentaba.

Árbol filogenético

Con base en el análisis filogenético usando la herramienta “*Phylogenetic Tree*”, de PATRIC 3.6.12, se incluyeron los 10 genomas del estudio más 23 genomas representativos de Nueva Zelanda, Canadá y Australia que se encuentran depositados en en PATRIC, incluyendo la cepa de referencia *S. uberis* 0140J. En el análisis identificamos tres clados distintos de aislados que comparten más del 80% de similitud. Curiosamente, nuestros aislamientos se ubicaron en el clado II (m7 y m9) y el clado III (m2, m3, m5, m6, m8, m10, m11 y m12) , compartiendo características con aislamientos de Australia, Nueva Zelanda y Canadá. La mayoría de nuestros aislamientos se agruparon en el Clado III. (Figura 1)

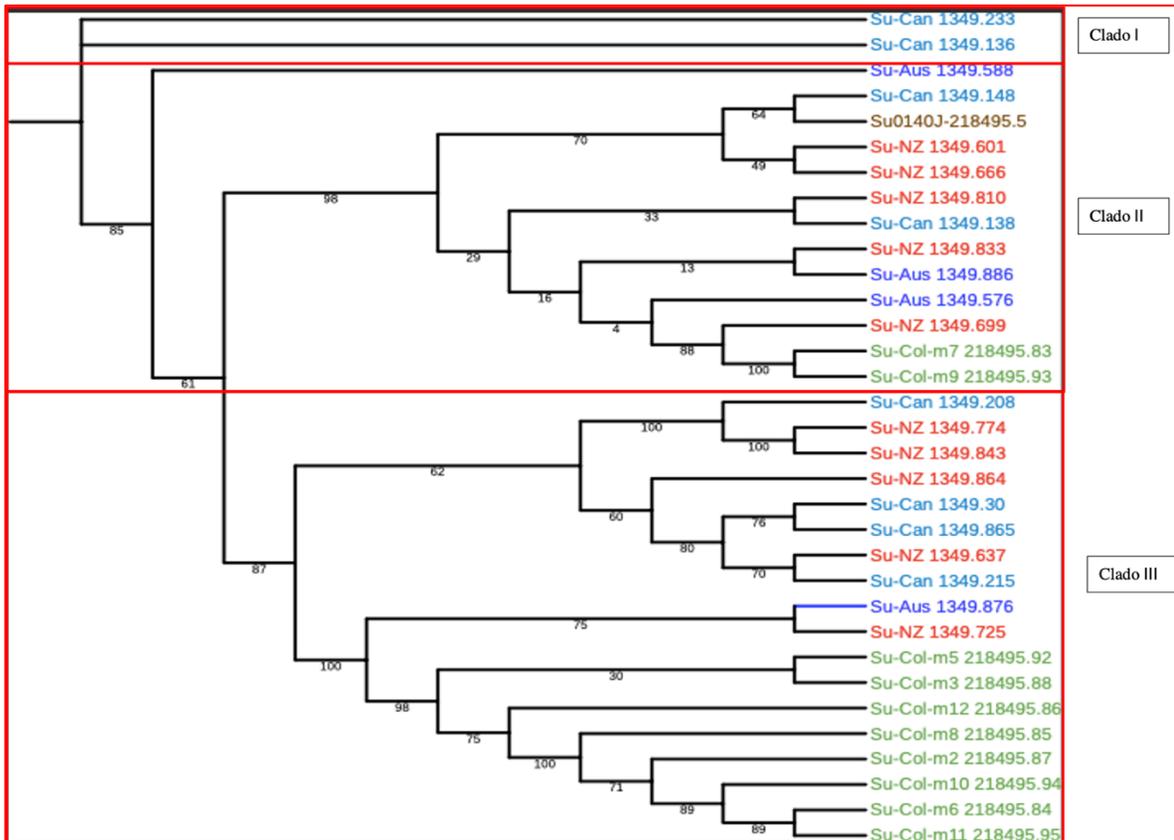


Figura 1: Árbol filogenético de los 10 genomas analizados. Identificadas en color verde se encuentran los genomas de este estudio (Colombia), en color rojo se encuentran los genomas analizados de Nueva Zelanda, en color azul los genomas de Canadá, en color morado los de Australia y en color café se encuentra el genoma de la cepa de referencia *S. uberis* 0140J. En recuadros rojos se enmarcan los clados identificados en el análisis.

Elementos Genéticos Móviles

No se identificaron plásmidos para ninguno de los 10 aislados. En el análisis de los bacteriófagos se encontró que solamente dos aislados presentaron una región intacta de

profagos. El aislado m3 tenía intacto el *Phage YMC*, el aislado m8 presentó intacto el *Phage 315.2*. Ninguno de los dos fagos se encontró asociado a genes de resistencia o de virulencia.

Se buscaron secuencias de inserción y transposones. Cuatro aislados (m2,m6,m11 y m12) no presentaron secuencias de inserción. Los aislados m3,m5,m7,m8,m9,m10 presentaron una Secuencia de Inserción (*ISSag2*). Adicionalmente, el aislado m7 presentó la secuencia de inserción (*ISStin10*). El aislado m8 fue el que mas secuencias de inserción presentó, mostrando otras dos secuencias más (*ISEfm2*, *ISEnfa4*). No observamos la presencia de transposones en nuestros genomas (tabla 7)

Tabla 7. Secuencias de inserción de los genomas.

Secuencia de inserción	Aislados									
	m2	m3	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
<i>ISSag2</i>		X	X		X	X	X	X		
<i>ISStin10</i>					X					
<i>ISEfm2</i>						X				
<i>ISEnfa4</i>						X				

DISCUSIÓN

En este estudio se observó alta diversidad genética, teniendo en cuenta el número de ST encontradas. En total se asignaron 10 ST, todas diferentes y reportadas por primera vez, una para cada aislado. Aunque, el número de cepas analizadas fue limitado, en cuatro de las seis fincas incluidas en el estudio, se encontró más de una ST. Las fincas pertenecen a municipios

distintos de Antioquia, lo que indica que, al menos, en cada uno de los municipios circulan diferentes ST de *S. uberis*.

La alta diversidad genética observada en este estudio, concuerda con estudios previos realizados en diferentes países. En Inglaterra, *Phuektes et al.* (33), demostró la alta diversidad de *S. uberis*, encontrando 62 ST diferentes de 138 cepas analizadas. Igualmente, un estudio realizado en Australia, en el año 2021 por *Vezina et al.* (34), encontró 21 ST distintas y nuevas en un grupo de 27 aislados de *S. uberis*. Por otro lado, estudios en el Reino Unido, Nueva Zelanda, China y Estados Unidos, utilizando MLST también han evidenciado la alta variabilidad de las cepas de *S. uberis* (13,21,35,36).

Los resultados encontrados en nuestro estudio podrían sugerir una transmisión ambiental de *S. uberis* (ya que la transmisión vaca-vaca también se puede dar), teniendo en cuenta que, en al menos tres de las fincas participantes, encontramos de a dos ST diferentes. Sin embargo, teniendo en cuenta el número de cepas analizadas no podemos concluirlo. Es necesario conocer a fondo las ST de *S. uberis* que se puedan encontrar circulando al interior de un mismo hato (entorno, otros animales) para poder conocer el origen de la transmisión.

Solo dos ST identificadas en este trabajo, fueron incluidas en el CC143, las otras no pudieron ser asignadas a algún CC previamente descrito. El CC143 es uno de los CC ampliamente reportado para *S. uberis* en países como Australia, Alemania, Italia (34,37,38). Este, junto con el CC5 y CC86 son considerados los más importantes para este patógeno. *Tomita et al.* (39) en su estudio realizado en Australia, indicó que las ST pertenecientes al CC143 fueron relacionadas con casos clínicos y subclínicos de mastitis, representando linajes de

aislamientos virulentos. Esta información es valiosa ya que puede indicarnos que nuestras cepas podrían compartir características con cepas de otros países,

El análisis del pangenoma, identificó un total de 1629 genes asociados a proteínas con función asignada y un genoma central compuesto por 1296 genes. Estos resultados difieren con otros análisis de pangenoma reportados. Por ejemplo, *Hossain et al.*, reportó un genoma central de 1550 genes utilizando 13 aislados de *S. uberis* (23). Igualmente, *Lang et al.*, reportó un genoma central de 1530 genes usando 21 aislados de *S. uberis* (40).

La comparación de nuestros genomas frente al genoma de la cepa de referencia, identificó que hay 155 proteínas con función asignada que no fueron encontradas en el genoma referencia. Este resultado concuerda con la variación en el tamaño de nuestros genomas con respecto a la cepa de referencia; encontrando que los nuestros superan en tamaño hasta un 18% al de la cepa de referencia.

Los resultados de la formación de biopelícula *In vitro* de este estudio demostraron que nuestros 10 aislados fueron formadores de biopelícula. El 60% fue débil, el 30% moderada y solo el 10% fuerte. Este dato concuerda con lo reportado en diferentes estudios, donde, al igual que en nuestro trabajo, se evidenció la capacidad de formar biopelícula de *S. uberis*. (26,41,42). *Dieser et al.* y *Moliva et al.* mostraron, que sus aislados de *S. uberis* presentaron un formación débil de biopelícula (26,42). Mientras que, *Fessia et al.*, demostraron que sus cepas tuvieron una formación de biopelícula moderada (41).

Solo uno de nuestros aislados (m12), presentó un factor de virulencia diferente, el SP_320. *Silva et al.*, en su estudio, encontraron que la presencia de este gen, junto con los genes *clpP*, *spY_1633*, *cpsY*, *sodA*, *SP_0916*, *SP_0829*, *vicK*, *SP_0095*, *luxS* y *ccpA*, (los cuales también

estuvieron presentes en todos nuestros aislados) fueron asociados con la recurrencia de mastitis clínica (36). Adicionalmente, el gen SP_0916 se ha asociado con la muerte y/o sacrificio de la vaca durante la lactancia (36).

En *S. uberis* han sido descritos varios genes de virulencia que juegan un rol importante en su patogenicidad. Entre estos genes se encuentran, el activador A del plasminógeno (*pauA*), la molécula de adhesión de *S. uberis* (*sua*), el gen que codifica para la formación de cápsula de ácido hialurónico (*hasC*) y la proteína de unión a la lactoferrina (*lbp*) (43–47). Todos estos genes fueron identificados en nuestros aislados, dato que coincide con lo reportado en diferentes estudios (14,35,48). Los resultados evidencian que nuestros aislados poseen factores de virulencia que confieren la capacidad al microorganismo de sobrevivir en la glándula mamaria (48,49).

Los genes de resistencia a antibióticos encontrados en este estudio, han sido previamente reportados por otros autores encontrados también en *S. uberis* (36,50,51).

El gen *lnuC*, confiere resistencia al grupo de las lincosamidas (52). Este gen es mediado por transposones y ha sido reportado comúnmente en cepas de *S. agalactiae* aisladas de humanos (53) Sin embargo, en Australia, en un estudio publicado en 2021, reportó que, una de sus cepas de *S. uberis* aislada de mastitis,(1/27) presentó este gen (34). En este estudio, identificamos el gen *lnuC* en el 80% (8/10) de los aislados, pero a nivel fenotípico solo observamos la resistencia en el 62% (5/8) de las cepas que tenían este gen. Estos hallazgos podrían sugerir transferencia de material genético entre especies como fue reportado por *Haenni et al.* en especies de *Streptococcus* (54).

En el análisis de elementos genéticos móviles identificamos que, el 60% de los aislados presentaron la secuencia de inserción *ISSag2*. Esta secuencia ha sido encontrada en un transposón donde está flanqueando el gen *lmb* (55). Este es un factor de virulencia que codifica para la proteína de unión a la laminina y ha sido ampliamente descrito en *S. agalactiae* (56,57). Dado este hallazgo, sometimos los genomas en búsqueda de este gen, donde fue identificado en la totalidad de los aislados con una identidad promedio de 99,7%, a pesar de no haber encontrado la secuencia de inserción *ISSag2* en la totalidad de las cepas, sugiriendo que la presencia del gen *lmb* no siempre está relacionada con la presencia de la secuencia de inserción encontrada.

El hallazgo del gen *lmb* es de interés, ya que nuestro grupo de estudio previamente realizó un ensayo de invasión en células epiteliales de la glándula mamaria bovina con cepas de *S. agalactiae* aisladas de mastitis portadoras del gen *lmb*. Los resultados mostraron que, las cepas portadoras del gen, presentaron dos veces más capacidad de invasión respecto a las no portadoras (datos no publicados).

De igual forma, un estudio de invasión realizado en células endoteliales de cerebro humano con cepas de *S. agalactiae*, donde alteraron el gen *lmb*, demostró una reducción en la capacidad de invasión hasta en un 64% frente a las cepas que no tenían el gen alterado (58). Esto podría explicar que, la presencia de este gen en las cepas de *S. uberis*, les confiere la capacidad de ser más invasivas, permitiendo una mayor invasión de la bacteria en las células epiteliales de la glándula mamaria bovina. Sin embargo, para comprobar esta hipótesis, es necesario estudios adicionales que permitan demostrar la capacidad de invasión de nuestros aislados.

Adicionalmente, se encontró la presencia de la secuencia de inserción *ISEnfa4* en el aislado m8. Esta secuencia ha sido reportada flanqueando el gen *cfr*, un gen que confiere multiresistencia y que se encuentra contenido en un plásmido (59). La presencia del gen *cfr* fue encontrada únicamente en el aislado m8. Estos resultados demuestran la capacidad que tiene *S. uberis* de recibir material genético externo que le confiere características específicas.

CONCLUSIÓN

Este es el primer estudio realizado en Colombia donde se secuencian el genoma completo y se analizan características fenotípicas de cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis bovina. Nuestros resultados muestran alta diversidad genética de las cepas circulantes, de acuerdo con los resultados encontrados.

Adicionalmente, encontramos elementos genéticos móviles que no habían sido reportados previamente en *S. uberis* y que dan cuenta de la capacidad de nuestras cepas de aceptar material genético incluso de otras especies.

Aunque no tenemos evidencia directa de la capacidad de invasión de las cepas de *S. uberis* portadoras del gen *lmb* como ocurre en *S. agalactiae*. Este hallazgo podría sugerir que la presencia de este gen podría sugerir uno de los mecanismos de evasión de este patógeno. Sin embargo, es necesario explorar la capacidad de invasión de las cepas de *S. uberis* portadoras de este gen.

Nuestros resultados pueden ser utilizados como referencia para comprender la epidemiología de *S. uberis* causante de infecciones intramamarias en Colombia. También, ayudará a futuros

estudios que estén dirigidos al desarrollo de nuevas estrategias de control y/o prevención de la mastitis causada por *S. uberis*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de la Universidad CES y al grupo Biogénesis de la Universidad de Antioquia por su colaboración en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Philpot WNelson Nickerson, Stephen C,. Ganando la lucha contra la mastitis. Naperville, IL; Oelde: Westfalia Surge, Inc. ; Westfalia; 2000.
2. Shim EH, Shanks RD, Morin DE. Milk Loss and Treatment Costs Associated with Two Treatment Protocols for Clinical Mastitis in Dairy Cows,. J Dairy Sci. agosto de 2004;87(8):2702-8.
3. Bedolla, CC; Ponce de León. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. Redvet. 4 de abril de 2008;IX(4):1-26.
4. Fedegan. Federación Colombiana de Ganaderos [Internet]. Fondo Nacional del Ganado. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/publicaciones-estadisticas>.
5. Fondo Nacional del Ganado. La ganadería Colombiana, grandes cifras. Cifras de referencia 2015 [Internet]. Fedegan; 2016. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/publicaciones-estadisticas>
6. Ramírez NF, Keefe G, Dohoo I, Sánchez J, Arroyave O, Cerón J, et al. 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.* julio de 2014;97(7):4141-50.

7. Odierno L, Calvinho L, Traverssa P, Lasagno M, Bogni C, Reinoso E. Conventional Identification of *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Argentinean Dairy Herds. *J Dairy Sci.* octubre de 2006;89(10):3886-90.

8. Scaramelli A, González Z. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. En: *Manual de ganadería doble propósito.* 2005. (Capítulo 1).

9. Verbeke J, Piepers S, Supré K, De Vliegher S. Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *J Dairy Sci.* noviembre de 2014;97(11):6926-34.

10. Ramírez Vásquez N, Arroyave Henao O, Cerón-Muñoz M, Jaramillo M, Cerón J, Palacio LG. Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Rev Med Vet.* 1 de diciembre de 2011;(22):31.

11. Calderón A, Virginia Rodríguez. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Rev Colomb Cienc Pecu.* diciembre de 2008;21(4):582-9.

12. Andres F Gallego Carlos M Trujillo, Nicolás Ramírez, Luis G Palacio. Prevalencia de mastitis en siete hatos lecheros del oriente Antioqueño. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2011;24:11-8.

13. Davies PL, Leigh JA, Bradley AJ, Archer SC, Emes RD, Green MJ. Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Clinical Mastitis in Dairy Herds: Strain Heterogeneity and Transmission. Fenwick BW, editor. *J Clin Microbiol.* enero de 2016;54(1):68-74.

14. Ward PN, Holden MT, Leigh JA, Lennard N, Bignell A, Barron A, et al. Evidence

for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. BMC Genomics. diciembre de 2009;10(1):54.

15. Rato MG, Bexiga R, Nunes SF, Cavaco LM, Vilela CL, Santos-Sanches I. Molecular Epidemiology and Population Structure of Bovine *Streptococcus uberis*. J Dairy Sci. diciembre de 2008;91(12):4542-51.

16. Wang L, Chen W, Zhang L, Zhu Y. Genetic diversity of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with subclinical mastitis in Southern Xinjiang Province, China. J Gen Appl Microbiol. 2013;59(4):287-93.

17. Günther J, Czabanska A, Bauer I, Leigh JA, Holst O, Seyfert H-M. *Streptococcus uberis* strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages. Vet Res. diciembre de 2016;47(1):13.

18. Notcovich S, deNicolo G, Williamson N, Grinberg A, Lopez-Villalobos N, Petrovski K. The ability of four strains of *Streptococcus uberis* to induce clinical mastitis after intramammary inoculation in lactating cows. N Z Vet J. 3 de julio de 2016;64(4):218-23.

19. Tassi R, McNeilly TN, Sipka A, Zadoks RN. Correlation of hypothetical virulence traits of two *Streptococcus uberis* strains with the clinical manifestation of bovine mastitis. Vet Res. diciembre de 2015;46(1):123.

20. Almeida RA, Dego OK, Headrick SI, Lewis MJ, Oliver SP. Role of *Streptococcus uberis* adhesion molecule in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. Vet Microbiol. septiembre de 2015;179(3-4):332-5.

21. Pullinger GD, López-Benavides M, Coffey TJ, Williamson JH, Cursons RT, Summers E, et al. Application of *Streptococcus uberis* Multilocus Sequence Typing: Analysis of the Population Structure Detected among Environmental and Bovine Isolates from New Zealand and the United Kingdom. Appl Environ Microbiol. febrero de

2006;72(2):1429-36.

22. Zouharova M, Nedbalcova K, Slama P, Bzdil J, Masarikova M, Matiasovic J. Occurrence of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine mastitis. *Veterinární Medicína*. 24 de enero de 2022;67(No. 3):123-30.

23. Hossain M, Egan SA, Coffey T, Ward PN, Wilson R, Leigh JA, et al. Virulence related sequences; insights provided by comparative genomics of *Streptococcus uberis* of differing virulence. *BMC Genomics*. 23 de abril de 2015;16(1):334.

24. National Mastitis Council. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Third. 2017.

25. Hassan AA, Khan IU, Abdulmawjood A, Lämmler C. Evaluation of PCR Methods for Rapid Identification and Differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *J Clin Microbiol*. abril de 2001;39(4):1618-21.

26. Dieser SA, Fessia AS, Ferrari MP, Raspanti CG, Odierno LM. *Streptococcus uberis* : In vitro biofilm production in response to carbohydrates and skim milk. *Rev Argent Microbiol*. octubre de 2017;49(4):305-10.

27. Wattam AR, Davis JJ, Assaf R, Boisvert S, Brettin T, Bun C, et al. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res*. 4 de enero de 2017;45(D1):D535-42.

28. Bioinformatics & Evolutionary Genomics. Calculate and draw custom Venn diagrams [Internet]. Disponible en: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

29. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. *In Silico* Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother*. julio de 2014;58(7):3895-903.

30. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 8 de julio de 2016;44(W1):W16-21.
31. Orozco-Arias S, Tobon-Orozco N, Piña JS, Jiménez-Varón CF, Tabares-Soto R, Guyot R. TIP_finder: An HPC Software to Detect Transposable Element Insertion Polymorphisms in Large Genomic Datasets. *Biology.* 9 de septiembre de 2020;9(9):E281.
32. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 de marzo de 2016;32(6):929-31.
33. Phuektes P, Mansell PD, Dyson RS, Hooper ND, Dick JS, Browning GF. Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* Isolates from Dairy Cows with Mastitis. *J Clin Microbiol.* abril de 2001;39(4):1460-6.
34. Vezina B, Al-harbi H, Ramay HR, Soust M, Moore RJ, Olchoway TWJ, et al. Sequence characterisation and novel insights into bovine mastitis-associated *Streptococcus uberis* in dairy herds. *Sci Rep.* diciembre de 2021;11(1):3046.
35. Zeng J, Wang Y, Fan L, Yang N, Pan J, Han Y, et al. Novel *Streptococcus uberis* sequence types causing bovine subclinical mastitis in Hainan, China. *J Appl Microbiol.* 26 de octubre de 2021;jam.15235.
36. Silva NCC, Yang Y, Rodrigues MX, Tomazi T, Bicalho RC. Whole-genome sequencing reveals high genetic diversity of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. *BMC Vet Res.* diciembre de 2021;17(1):321.
37. Käppeli N, Morach M, Zurfluh K, Corti S, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated From Bovine Mastitis. *Front Vet Sci.* 16 de julio de 2019;6:234.

38. Rosa NM, Duprè I, Azara E, Longheu CM, Tola S. Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Streptococcus uberis* Isolated from Sheep Milk. *Pathogens*. 16 de noviembre de 2021;10(11):1489.
39. Tomita T, Meehan B, Wongkattiya N, Malmö J, Pullinger G, Leigh J, et al. Identification of *Streptococcus uberis* Multilocus Sequence Types Highly Associated with Mastitis. *Appl Environ Microbiol*. enero de 2008;74(1):114-24.
40. Lang P, Lefébure T, Wang W, Zadoks RN, Schukken Y, Stanhope MJ. Gene content differences across strains of *Streptococcus uberis* identified using oligonucleotide microarray comparative genomic hybridization. *Infect Genet Evol*. marzo de 2009;9(2):179-88.
41. Fessia AS, Dieser SA, Renna MS, Raspanti CG, Odierno LM. Relative expression of genes associated with adhesion to bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus uberis*. *Res Vet Sci*. octubre de 2020;132:33-41.
42. Moliva MV, Campra N, Ibañez M, Cristofolini AL, Merkis CI, Reinoso EB. Capacity of adherence, invasion and intracellular survival of *Streptococcus uberis* biofilm-forming strains. *J Appl Microbiol*. 27 de noviembre de 2021;jam.15362.
43. Fang W, Almeida RA, Oliver SP. Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. *Am J Vet Res*. marzo de 2000;61(3):275-9.
44. Oliver SP, Almeida RA, Calvinho LF. Virulence Factors of *Streptococcus uberis* Isolated From Cows With Mastitis. *J Vet Med Ser B*. 12 de enero de 1998;45(1-10):461-71.
45. Ward PN, Field TR, Ditcham WGF, Maguin E, Leigh JA. Identification and Disruption of Two Discrete Loci Encoding Hyaluronic Acid Capsule Biosynthesis Genes *hasA*, *hasB*, and *hasC* in *Streptococcus uberis*. DiRita VJ, editor. *Infect Immun*. enero de 2001;69(1):392-9.

46. Reinoso EB, Lasagno MC, Odierno LM. Genetic patterns of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Rev Argent Microbiol.* abril de 2015;47(2):108-11.
47. Moshynskyy I, Jiang M, Fontaine MC, Perez-Casal J, Babiuk LA, Potter AA. Characterization of a bovine lactoferrin binding protein of *Streptococcus uberis*. *Microb Pathog.* noviembre de 2003;35(5):203-15.
48. Zhang H, Yang F, Li X, Luo J, Wang L, Zhou Y, et al. Detection of antimicrobial resistance and virulence-related genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from clinical bovine mastitis cases in northwestern China. *J Integr Agric.* noviembre de 2020;19(11):2784-91.
49. Fessia AS, Odierno LM. Potential factors involved in the early pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis: a review. *Folia Microbiol (Praha).* agosto de 2021;66(4):509-23.
50. Vélez JR, Cameron M, Rodríguez-Lecompte JC, Xia F, Heider LC, Saab M, et al. Whole-Genome Sequence Analysis of Antimicrobial Resistance Genes in *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* Isolates from Canadian Dairy Herds. *Front Vet Sci.* 22 de mayo de 2017;4:63.
51. Abd El-Aziz NK, Ammar AM, El Damaty HM, Abd Elkader RA, Saad HA, El-Kazzaz W, et al. Environmental *Streptococcus uberis* Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows: Virulence Traits, Antimicrobial and Biocide Resistance, and Epidemiological Typing. *Animals.* 22 de junio de 2021;11(7):1849.
52. Schmitt-van de Leemput E, Zadoks RN. Genotypic and Phenotypic Detection of Macrolide and Lincosamide Resistance in *Streptococcus uberis*. *J Dairy Sci.* noviembre de 2007;90(11):5089-96.
53. Achard A, Villers C, Pichereau V, Leclercq R. New *lnu* (C) Gene Conferring

Resistance to Lincomycin by Nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* UCN36. Antimicrob Agents Chemother. julio de 2005;49(7):2716-9.

54. Haenni M, Saras E, Bertin S, Leblond P, Madec J-Y, Payot S. Diversity and Mobility of Integrative and Conjugative Elements in Bovine Isolates of *S treptococcus agalactiae* , *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* , and *S. uberis*. Appl Environ Microbiol. 15 de diciembre de 2010;76(24):7957-65.

55. Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lämmler C, et al. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*: Horizontal gene transfer in streptococci. Mol Microbiol. 13 de enero de 2002;41(4):925-35.

56. Shabayek S, Spellerberg B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. Front Microbiol. 14 de marzo de 2018;9:437.

57. Sridharan U, Rangunathan P, Spellerberg B, Ponnuraj K. Molecular dynamics simulation of metal free structure of Lmb, a laminin-binding adhesin of *Streptococcus agalactiae* : metal removal and its structural implications. J Biomol Struct Dyn. 11 de febrero de 2019;37(3):714-25.

58. Tenenbaum T, Spellerberg B, Adam R, Vogel M, Kim K, Schrotten H. Streptococcus agalactiae invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. Microbes Infect. mayo de 2007;9(6):714-20.

59. Liu Y, Wang Y, Schwarz S, Li Y, Shen Z, Zhang Q, et al. Transferable multiresistance plasmids carrying *cfr* in Enterococcus spp. from swine and farm environment. Antimicrob Agents Chemother. enero de 2013;57(1):42-8.