



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES.**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS EN SALUD ANIMAL

**IDENTIFICACIÓN DEL FENOTIPO y GENOTIPO CAPSULAR 5 y 8 DE
Staphylococcus aureus Y SU CAPACIDAD DE SOBREVIVENCIA
INTRACELULAR EN NEUTRÓFILOS DE VACAS LECHERAS.**

T E S I S

**Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

P R E S E N T A:

MVZ. ANA MARÍA DE JESÚS GARCÍA GAMA

COMITÉ TUTORAL:

Director de Tesis

Dr. en C. Valente Velázquez Ordoñez

Asesores

**Dr. en C. Alberto Barbabosa Pliego
M en S. A. Benjamín Valladares Carranza**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México Agosto 2013.

DEDICATORIAS

Para:

Mis hijos Ruly y Andy

Mi esposo Raúl

Mi má Rosalinda

Los amo mucho.

Agradecimientos Institucionales

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca # 391968 otorgada para cursar los estudios de Maestría en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, dentro del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Al Consejo Mexiquense de la Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca de titulación otorgada.

Al proyecto de investigación: Caracterización genotípica de *Staphylococcus aureus* de tipo capsular en aislamientos obtenidos de hatos lecheros de producción familiar del Valle de Toluca. PROMEP: fortalecimiento de cuerpos académicos 2010 y al proyecto “Variación genética de aislamientos de *S. aureus* MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar”, ID 2582.

A mis asesores Dr. Valente Velázquez Ordoñez, Dr. Alberto Barbabosa Pliego, M en S.A. Benjamín Valladares Carranza, y al Dr. Hugo Castañeda Vázquez, miembro del sínodo de examen de grado, por el apoyo brindado y la confianza para la realización de este gran proyecto.

Al centro de investigación y estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA-FMVZ-UAEM), por las facilidades otorgadas en la realización del presente estudio.

A la Posta Zootécnica de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, las facilidades brindadas para la realización del presente estudio.

Agradecimientos Personales

A Dios: Por estar viva y permitirme haber llegado a dar el siguiente paso de mi carrera profesional... GRACIAS.

A mis hijos Andy y Ruly: Porque son mi motor, son mi fuerza, son mi todo, Gracias... los amo muchísimo.

A mi esposo Raúl: Por tu comprensión, por tu apoyo, por tu paciencia y por tu compañía. Gracias por apoyarme en este camino que he elegido. Te amo "The other side of my soul".

A mi Má Rosalinda: Te amo muchísimo, estoy bien agradecida contigo por el gran apoyo que he recibido siempre de ti en todas mis locuras y aventuras. Gracias Má eres la mejor del mundo.

A la familia Gama Vera: por su apoyo incondicional, por estar conmigo en todos los momentos de mi vida, por ser mi familia los amo muchísimo.

A mis asesores Dr. Valente Velázquez Ordoñez, Dr. Alberto Barbabosa Pliego y M en S.P. Benjamín Valladares Carranza: Gracias por su apoyo y dedicación para poder realizar este proyecto y sobre todo por transmitirme sus conocimientos y su entusiasmo. Fue un placer haber sido su tesista.

Dr. Valente gracias por creer en mí y por darme enseñanzas académicas pero sobre todo enseñanzas de la vida.

Dra. Uxúa gracias por su gran apoyo, paciencia y tiempo, el cual ha sido de mucha ayuda.

A mis amigos del CIESA por hacer muy agradable y divertida mi estancia, por su apoyo y comprensión GRACIAS.

A Mago y Nancy: Por que formamos un gran equipo y una gran amistad las quiero mucho.

Al personal del CIESA: Por todos los apoyos recibidos y haberme brindado su amistad y confianza.

Al personal de la Posta: por todas las facilidades brindadas, en especial al **MVZ Carlos Villeda** por su gran apoyo para el trabajo de campo.

A todos y cada uno que participo conmigo a lo largo de este gran proyecto...

G R A C I A S

Contenido

Lista de Cuadros	viii
Lista de figuras:	ix
Lista de abreviaturas.....	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Mastitis en las vacas lecheras	3
Mastitis por <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Biología del <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Regulación genética de los factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Polisacárido capsular de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Caracterización bioquímica de los serotipos capsulares 5 y 8 de <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Morfología de los <i>Staphylococcus aureus</i> capsulados.....	12
Producción de cápsula in vivo e in vitro de los serotipos capsulares 5 y 8 de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Importancia de los serotipos capsulares 5 y 8.....	14
Resistencia de la glándula mamaria y sobrevivencia intracelular de <i>Staphylococcus aureus</i> en la fagocitosis.....	15
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
MATERIAL	23
MÉTODOS.....	27
LÍMITE DE ESPACIO	34
LÍMITE DE TIEMPO.....	35
RESULTADOS	36

DISCUSIÓN.....	65
Conclusiones	73
LITERATURA CITADA	74
ANEXOS TÉCNICOS	88
Anexo 1	88
Tinción de Hiss	88
Anexo 2	89
Medio de agar blando (soft agar).....	89
Anexo 3	91
Tinción Giemsa – May Grunwald.....	91
Anexo 4	92
Preparación de reactivos para leer los productos amplificados de PCR	92

Lista de Cuadros

Cuadro 1: Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Cuadro 2: Esquema de Inoculación del antígeno	29
Cuadro 3: Cronograma de actividades	35
Cuadro 4: Tasa de positividad de aislamientos a <i>S. aureus</i>	38
Cuadro 5: Expresión de cápsula en el medio Columbia adicionado con NaCl (2%) y tinción de Hiss.	39
Cuadro 6: Expresión del tipo de cápsula en el medio suero de leche	40
Cuadro 7: Detección de los serotipos capsulares 5 y 8 de <i>Staphylococcus aureus</i> en vacas lecheras	41
Cuadro 8: Detección genotípica de la cápsula por medio de la identificación de los genes <i>Cap5</i> y <i>Cap8</i> por PCR	42
Cuadro 9: Cuadro comparativo entre los serotipos detectados por serología y por PCR	44
Cuadro 10: Conteo de la sobrevivencia intracelular de <i>S. aureus</i> en placa	45
Cuadro 11: Índice de Sobrevivencia intracelular <i>in vitro</i> en neutrófilos de los serotipos capsulare 5, 8, 5 y 8 de <i>S.aureus</i> por epifluorescencia	47

Lista de figuras:

Figura 1: A. Glándula mamaria con mastitis subclínica B. Vacas de la Posta Zootécnica de FMVZ	3
Figura 2: Rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño	5
Figura 3: Ciclo de infección del <i>S. aureus</i>	5
Figura 4: A. <i>S. aureus</i> en agar sal manitol B. <i>S. aureus</i> : Tinción de Gram	7
Figura 5: Ubicación de los factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	9
Figura 6: A. <i>S. aureus</i> capsular B. <i>S. aureus</i> no capsular C. Cápsula de <i>S. aureus</i> observada con tinción de blue ink	12
Figura 7: Regulación genética de los serotipos capsulares 5 y 8 de <i>Staphylococcus aureus</i> .	14
Figura 8: Posta Zootécnica y Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.	34
Figura 9: <i>S. aureus</i> en gelosa sangre y con tinción de Gram	38
Figura 10: <i>S. aureus</i> con tinción de Hiss	39
Figura 11: <i>S. aureus</i> con morfología difusa	40
Figura 12: Amplificación del serotipo capsular 5	42
Figura 13: Amplificación del serotipo capsular 8	43
Figura 14: Amplificación del serotipo capsular 336	43
Figura 15: Ensayo de fagocitosis y sobrevivencia intracelular de <i>S. aureus</i> en placa <i>in vitro</i>	45
Figura 16: Gráfica de la distribución de la sobrevivencia intracelular <i>in vitro</i> de <i>S. aureus</i> serotipos capsulares 5 y 8 en placa	46
Figura 17: Índice de sobrevivencia intracelular de <i>S. aureus</i> por epifluorescencia	47

Lista de abreviaturas

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
Cloruro de Sodio	NaCl
Recuento de Células Somáticas	RCS
Mililitro	mL
Litro	L
TCRS de factores de virulencia	Sistemas reguladores de dos componentes; sistema agr y SarA .
Cápsula	CP
serotipo capsular 5	CP5
serotipo capsular 8	CP8
Polimorfonucleares	PMNs
Agar Trypticase Soya	TSA
Agar Triple Hierro Azúcar	TSI
Agar/ Caldo Infusión Cerebro Corazón	BHI caldo/ agar
Oxígeno	O ₂
Dióxido de Carbono	CO ₂
Reacción de Cadena de la Polimerasa	PCR
Inmunoglobulina G e isotipos	IgG, isotipos IgG ₁ e IgG ₂
Índice de fagocitosis de neutrófilos bovinos	IFA
Potencial de Hidrogeno	pH
Gen tipo capsular 5 de <i>S. aureus</i>	<i>Cap5</i>
Gen tipo capsular 8 <i>S. aureus</i>	<i>Cap8</i>
2-acetamido-2-deoxi-D-manurónico ácido	ManNAcA
2-acetamido-2-desoxi-L-fucosa	L-FucNAc
2-acetamido-2-desoxi-D-fucosa	D FucNAc
Complejo Mayor de Histocompatibilidad	CMH
Enterotoxinas	SE
Estafilococos Coagulasa Positivos	ECP
Estafilococos Coagulasa Negativos	ECN

Conteo de Células Somáticas	CCS
Mastitis Clínica	MC
Mastitis Subclínica	MSC
Infección Intramamaria	IIM

RESUMEN

Identificación del fenotipo y genotipo capsular 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* y su capacidad de sobrevivencia intracelular en neutrófilos de vacas lecheras

García, G.A.M. de J.; Velazquez, O.V.; Barbabosa, P.A.; Valladares, C.B.

El *Staphylococcus aureus* es un patógeno causante de mastitis bovina, enfermedad infecciosa que afecta la producción de leche y su inocuidad de la misma al alterar los componentes físico-químicos y bacteriológicos, comprometiendo el bienestar animal. Debido a sus factores de virulencia que favorecen el desarrollo de la infección en la glándula mamaria y la severidad de la mastitis. El polisacárido capsular serotipos 5 y 8, contribuye a la persistencia de la infección glandular. Para determinar la presencia de los serotipos capsulares 5 y 8, la sobrevivencia intracelular *in vitro* en neutrófilos obtenidos de vacas lecheras. Se obtuvieron de una unidad de producción lechera, 116 muestras de leche de 29 vacas en línea de ordeño. El aislamiento e identificación de *S. aureus*, mediante un procedimiento de rutina bacteriológica. La expresión de cápsula se obtuvo en agar Columbia adicionado con NaCl al 2.0% p/v; la cápsula se identificó mediante tinción de Hiss. El tipo capsular se determinó en tubos de agar blando suplementado con suero de leche al 10% v/v. La identificación fenotípica de los serotipos capsulares 5 y 8 se llevó a cabo mediante la prueba de seroaglutinación en placa, con un antisuero policlonal de conejo. La expresión de los genes *Cap5* y *Cap8* en los aislamientos de *S. aureus* se confirmó mediante los productos de amplificación del PCR. La obtención de neutrófilos se realizó mediante la técnica de lisis hipotónica de eritrocitos. Se efectuó el ensayo de fagocitosis *in vitro* y sobrevivencia intracelular sobre placas de agar TSA y bajo el microscopio de epifluorescencia. Se obtuvo el 28.44% (33/116) de positividad a *S. aureus*. El 88.0% de las cepas aisladas expresaron cápsula el resto fue negativo, se corroboró por tinción de Hiss. El 88.0% expresaron el tipo capsular difuso y solo 12.0% el tipo compacto. En la prueba de seroaglutinación, el 6.0% correspondieron al serotipo capsular 5, 6.0% al serotipo capsular 8 y el 75.75% fueron tipificables a los serotipos 5/8 mostrando reacción cruzada (Serotipo capsular 336), 12.12 fueron NT, por el método ($p > 0.05$). Los serotipos capsulares 5 y 8 se corroboraron por la técnica de PCR, para los serotipos donde los NT mostraron características para el serotipo 5 y 8 aumentando a 88%

correspondió a un nuevo serotipo capsular 336. Se obtuvo una viabilidad de PMNs 2.7×10^6 , esta cantidad se ajustó a una concentración de 1.4×10^6 para el ensayo de fagocitosis y sobrevivencia intracelular en placa la frecuencia de distribución en la sobrevivencia fue amplia de 8.6 a 30.6, Los serotipos NT considerados 5 y 8 (336) tuvieron la mayor frecuencia y la menor frecuencia observó en el serotipo capsular 8. El total de bacterias fagocitadas por los serotipos capsulares 5, 8, 5 y 8; correspondieron a 1007, 664 y 762 respectivamente. El índice total de fagocitosis para los serotipos capsulares fue el siguiente: 41.38%, (5), 26.42% (8) y 31.31 (5 y 8).].

La identificación de los serotipos capsulares 5 y 8 de *S. aureus* y los resultados de sobrevivencia intracelular indican que tienen importancia clínica en la persistencia de infección de la glándula mamaria en las vacas además de constituir un riesgo importante a la salud pública.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, fenotipo, genotipo, serotipo capsular 5, serotipo capsular 8 y sobrevivencia intracelular

ABSTRACT

Identification of capsular 5 and 8 *Staphylococcus aureus* phenotype and genotype and its intracellular ability to survive in neutrophils from dairy cows García, G.A.M.

de J.; Velazquez, O.V.; Barbabosa, P.A.; Valladares, C.B.

Staphylococcus aureus causes bovine mastitis. This is an infectious disease which affects milk production and safeness by altering its physicochemical and bacteriological components and compromises animal welfare, due to its virulence factors, which favour the development and severity of mammary gland Infection. Capsular polysaccharide serotypes 5 and 8 contribute to the persistence of the glandular infection. To determine the presence of these serotypes, and the *in vitro* neutrophil intracellular survival in dairy cows, 116 milk samples were taken from 29 dairy cows in a dairy production unit. *S. aureus* identification and isolation were made using a routine bacteriology scheme. Capsule expression was obtained using Columbia agar with 2.0% NaCl w/v and identified using Hiss' stain. Capsular type was determined in soft agar with milk serum 10% v/v. Phenotypical identification of capsular serotypes 5 and 8 was undertaken by plate seroagglutination, using polyclonal rabbit antiserum. *Cap5* and *Cap8* genes expression in the *S. aureus* isolations was confirmed by PCR. Neutrophil obtention was undertaken by hypotonic erythrocyte lysis. *In vitro* phagocytosis and intracellular survival was made in TSA agar and observed using epifluorescence. There was an *S. aureus* positivity of 28.44% (33/116). 88.0% of the stains were classified as diffuse capsular type and only 12.0% in the compact type, proved by Hiss stain. By seroagglutination, 6.0% were capsular serotype 5, 6.0% capsular serotype 8 and 75.75% were serotype 5/8 (cross reaction, capsular serotype 336) and 12.12% were non typified using this method ($p>0.05$). Capsular 5 and 8 serotypes were confirmed by PCR. A viability of 2.7×10^6 neutrophils was obtained, and adjusted to 1.4×10^6 for the phagocytosis assay and intracellular survival, which was broad (8.6 to 30). According to the serotypes found, NT serotypes were the most frequent and the least was 8. The total number of phagotized bacteria according to capsular serotypes 5, 8 and 5/8 were: 1007, 664 and 762 respectively. The total phagocytosis index for the capsular serotypes were: 41.38%, (5), 26.42% (8) and 31.31 (5 y 8).

Capsular serotypes 5 and 8 identification and the intracellular survival results indicate that both are clinically important in *S. aureus* mammary gland infection persistence in dairy cows and may pose an important risk to public health.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, phenotype, genotype, capsular serotype 5, capsular serotype 8 and intracellular survival.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad infecciosa, que afecta la producción lechera y la calidad sus productos. Esta enfermedad produce pérdidas económicas importantes a la industria, al provocar una disminución de la producción láctea, alteraciones físico-químicas y bacteriológicas de la leche que afectan la productividad del hato, además de comprometer el bienestar animal (Makovec y Ruegg, 2001).

Dentro de los agentes patógenos que causan la mastitis bovina, el *Staphylococcus aureus* es el más frecuentemente aislado en los hatos. La infección intramamaria por *S.aureus* es de difícil eliminación, afecta, la síntesis y la capacidad secretora de la glándula mamaria, que provoca una disminución en la cantidad y la calidad de la leche (Seegers *et al.*, 2003).

La transmisión de *S. aureus* en los animales de producción, se favorece por las prácticas insuficientes de manejo e higiene durante el ordeño. A partir de la colonización de la piel de la ubre y su propagación, a través del ciclo de infección vaca – hombre – vaca (Velázquez *et al.*, 2005a), debido a que tiene capacidad para colonizar la glándula mamaria y desarrollar fácilmente la infección intraglandular (Sordelli *et al.*, 2000; Kampen *et al.*, 2005).

La diseminación de *S. aureus* en la población de vacas lecheras incrementa la presión de infección a la población y el riesgo de exposición de los animales y el hombre, la cual se relaciona con el nivel de infección del hato (Velázquez *et al.*, 2005b). Debido a las diferencias entre los sistemas de producción, el nivel tecnológico y la interacción con la agroindustria, la producción lechera al no tener adecuadas normas de bioseguridad es una de las más propensas a sufrir infecciones de la glándula mamaria, ya que la secreción de los cuarterones infectados, propicia la contaminación y diseminación por las manos de los ordeñadores siendo la principal vía de trasmisión (Ruegg y Tabone, 2000).

El *S. aureus* se adapta a diferentes medios por lo que es difícil de erradicar debido a sus diferentes factores de virulencia que favorecen el desarrollo de la infección en la glándula mamaria y la severidad de la mastitis (Sordelli *et al.*, 2000).

La patogenicidad de *S. aureus* depende de una acción combinada de más de cuarenta factores de virulencia que incluyen toxinas extracelulares, enzimas y proteínas de superficie celular (Arvidson y Tegmark, 2001).

El polisacárido capsular, es una capa que cubre a la pared bacteriana, su presencia confiere mayor virulencia al agente debido a que resiste a la fagocitosis, ocasionando que los anticuerpos no reconozcan la bacteria evitando que se active el complemento, (O'Riordan y Lee, 2004; Verdier *et al.*, 2007; Nickerson 1985). El exopolisacárido capsular está compuesto de polisacáridos y polialcoholes. De acuerdo con la composición y las variantes antigénicas se han identificado 11 serotipos capsulares, considerado de mayor importancia los serotipos capsulares 5 y 8 ya que estos causan una elevada virulencia (Sutra *et al.*, 1990).

En la resistencia de la glándula mamaria la fagocitosis es un mecanismo de defensa, en el cual participan los neutrófilos y macrófagos, después de la fagocitosis el *S. aureus* puede sobrevivir dentro de los leucocitos, los cuales contribuyen con la cronicidad de la infección, ya que las bacterias se encuentran protegidas contra la fagocitosis y antibióticos dentro de los leucocitos. El *S. aureus* produce capas de polisacáridos que evitan la fagocitosis y destrucción intracelular de la bacteria (Guidry *et al.*, 1994a).

Lo anterior indica la necesidad de conocer la patogenicidad de las cepas de *S. aureus* que presentan el exopolisacárido capsular 5 y 8, consideradas de mayor frecuencia, que favorecen la sobrevivencia de la bacteria a la fagocitosis.

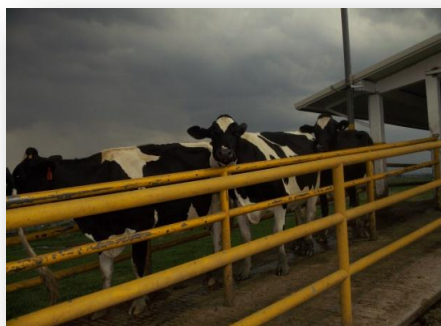
REVISION DE LITERATURA

Mastitis en las vacas lecheras

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria, ocurre en respuesta a una infección bacteriana intramamaria, aunque puede estar causada además por agentes fúngicos o daños de tipo traumático, térmico o químico (Zhao y Lacasse 2008). Se distinguen dos formas de presentación de mastitis: la clínica y la subclínica. La mastitis clínica se acompaña por signos visibles que incluyen cambio en la coloración de la leche e inflamación de la glándula mamaria, fiebre y en algunos casos severos anorexia y muerte. La mastitis subclínica puede pasar desapercibida, su diagnóstico precisa técnicas de laboratorio como es el conteo de células somáticas [Figura 1] (Shosahani *et al.*, 2000).

Durante la infección en la glándula mamaria se desarrolla un proceso inflamatorio, seguido de la colonización de la bacteria, dañando la actividad secretora del acini glandular produciendo una degeneración vacuolar de las células epiteliales, necrosis del tejido glandular y úlceras en el conducto excretor, microabscesos y abscesos. (Kluytmans *et al.*, 1997). Puede ocurrir mastitis gangrenosa a causa del efecto de la hemolisina que produce necrosis del endotelio vascular, trombosis capilar e isquemia de la ubre (Blood y Radostis 1986)

En el país existen numerosos reportes acerca de la incidencia de mastitis subclínica, en el Valle de México se reporta una incidencia del 69%, en Tlaxcala el 46% y en Hidalgo el 56%. (Gerlach *et al.*, 2009).



Figura

1: A. Glándula mamaria con mastitis subclínica

B. Vacas de la Posta Zootécnica de FMVZ

Mastitis por *Staphylococcus aureus*

La infección de la glándula mamaria por *S. aureus* constituye una de las principales causas de la mastitis infecciosa en el ganado lechero bovino, es una enfermedad de importancia en la industria lechera mundial, que afecta la productividad de la vacas en las diferentes etapas de producción (Sordelli *et al.*, 2000), el reservorio principal del *S. aureus* se encuentra en el interior de la glándula mamaria y se caracteriza por ser una infección de difícil eliminación, causando pérdidas permanentes en el tejido glandular que afecta la síntesis y la capacidad secretora de la glándula mamaria lo que disminuye la cantidad y la calidad de la leche (Blowey y Edmoson, 1995). Como resultado de la respuesta inflamatoria que se produce durante la mastitis se han observado alteraciones en los componentes como: proteína, grasa, caseína y lactosa debido a lesiones en las células alveolares (More, 2009).

El 70% de las pérdidas están asociadas con la disminución de la producción de leche, debido al daño que se produce en el tejido mamario (Oliver *et al.*, 2005). La glándula mamaria infectada produce un 5% menos de leche por cada incremento en 100.000 en el recuento de células somáticas (RCS) adicionales por mL de leche (Bedolla y Ponce de León, 2008). Algunos de los costos son atribuibles a la leche descartada, los reemplazos de vaca/año y los costos para los tratamientos médicos veterinarios (Nash *et al.*, 2003, Bedolla y Ponce de León, 2008).

El conocimiento de la epidemiología de la mastitis por *S. aureus* permite el diseño y aplicación de programas de control de esta enfermedad. El reservorio más importante de *S. aureus* es la glándula mamaria, la transmisión se lleva a cabo por medio de fomites como la ordeñadora, trapos y las manos del ordeñador, vacas enfermas no detectadas, no utilizar selladores o malos selladores y no recurrir a la terapia antimicrobiana durante el secado de la glándula mamaria [Figura 2] (Stanchi, *et al.*, 2005)

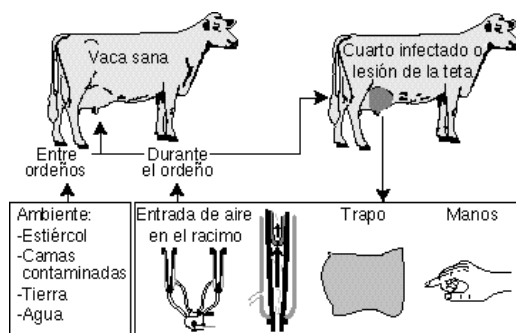
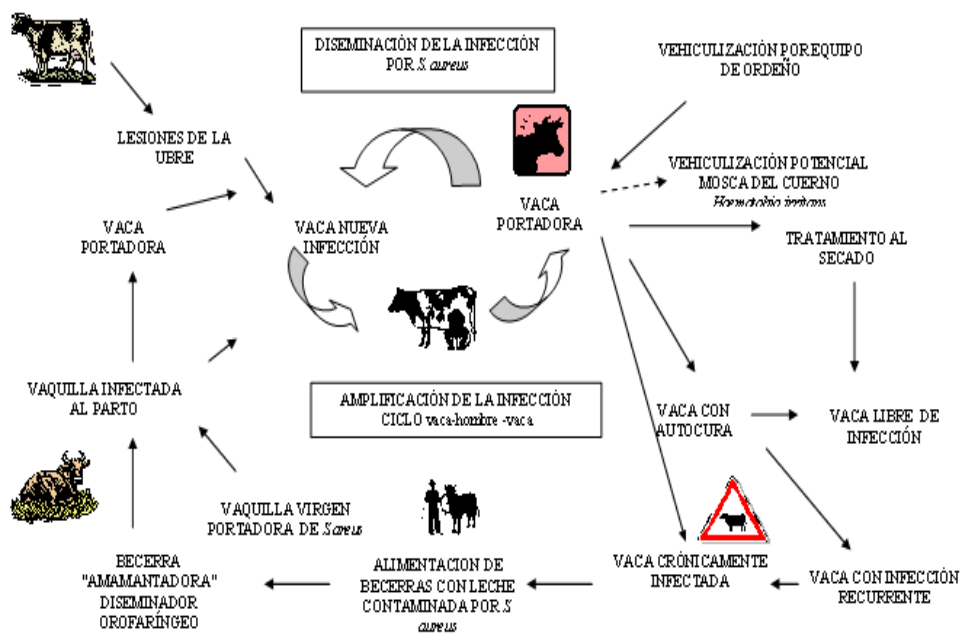


Figura 2: Rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño

Se ha aislado *S. aureus* de la piel de la teta, nariz, labios, ojos, vagina, recto, pecho y vientre, tanto de los animales como del humano (Roberson *et al.*, 1999). La transmisión se da por medio de la triada vaca – hombre – vaca (Velázquez *et al.*, 2005a) durante el ordeño [Figura 3] .



(Velázquez *et al.*, 2005a) Figura 3: Ciclo de Infección del *S. aureus*

La importancia de la mastitis desde el punto de vista epidemiológico se debe a que se considera de riesgo para la población humana cuando el manejo sanitario durante la ordeña es deficiente favoreciendo la contaminación de la leche en las explotaciones

lecheras (Middlenton *et al.*, 2002). El *S. aureus* puede ser un riesgo de infección humana por cepas exóticas de origen animal portadoras de factores de virulencia atípicos como las hemolisinas alfa y beta, en condiciones favorables producen enterotoxinas (SE) en los alimentos, las SE son estables al calor y almacenaje, pueden estar presentes en los alimentos aunque la bacteria no lo esté; estas condiciones establecen un vínculo potencial de riesgo epidemiológico entre la población animal y humana (LeBlanc *et al.*, 2006). Las vacas lecheras con mastitis subclínica causada por *S. aureus* pueden ser la fuente de contaminación en la leche (Jorgensen *et al.*, 2005).

La patogenicidad de las cepas de *S. aureus* se relaciona con los diferentes factores de virulencia del agente, considerados primarios para el desarrollo de la infección de la glándula mamaria (Camussone y Calvino, 2013)

El nivel de infección en el hato se relaciona con la prevalencia en el ganado, en tanto que la dinámica de infección en la población depende de los factores de virulencia del agente y los riesgos de transmisión entre la población animal y la humana (Velázquez *et al.*, 2012).

Biología del *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* es un saprófito del medio ambiente, es un habitante normal de la piel y mucosas, lesiones profundas; en menor grado del tubo digestivo y genital, pertenece a la familia *Staphylococcaceae* observado por primera vez por Koch y Pasteur, etimológicamente se denominan *staphyle* = racimo y *kokkos* = granos. Se reconocen 32 especies de *Staphylococcus* y varias subespecies pero solo algunas tienen importancia clínica (Vadillo, 2002).

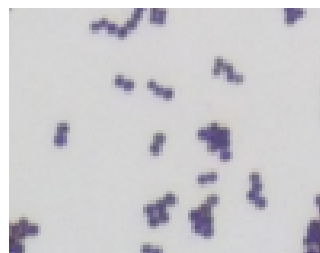
Son cocos esféricos e inmóviles, Gram positivos, catalasa y coagulasa positivos, producen fosfatasa y lecitinasa, aerobios o anaerobios facultativos, microscópicamente aparece en forma de racimos de uva, con un diámetro variado de 0.5 a 1.5 μ , no produce esporas, produce cápsulas, resiste al calor (hasta 80°C), desecación y a la congelación por varios periodos (Stanchi *et al.*, 2005). Es capaz de crecer hasta con un 20 % de sal común, presenta hemólisis en medios con sangre (Fuelle, 2005). Su característica bioquímica más importante es la fermentación de varios azúcares, entre ellos, el manitol

para producir ácido láctico. Su pared está compuesta por peptidoglicano asociado con ácido teicoico mediante el aminoácido L-lisina, N- glucosamina, ácido N-acetilmurámico de los cuales se deriva la cápsula (Yazdankhah y Olsen., 1998; García *et al.*, 2005). Otros componentes importantes de la pared celular del estafilococo son los ácidos teicoicos, unidos covalentemente al peptidoglucano (Figuroa *et al.*, 2002). La proteína A se considera que actúa como adhesina, la cual tiene propiedades antifagocíticas que están basadas en la capacidad de unión a la porción Fc de las inmunoglobulinas (Hurtado *et al.*, 2002).

La principal característica que diferencia a *S. aureus* de los demás estafilococos es la producción de la enzima coagulasa (coagula el plasma citratado), clasificadas como: estafilococos coagulasa positivos (ECP) y estafilococos coagulasa negativos (ECN). Hay una correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de la bacteria, por lo que los ECP son más patógenos y los ECN no lo son, sin embargo hay algunas especies de ECN que se han relacionado con procesos patológicos tanto en el hombre como en los animales (Hernández, 2005).



Figura 4: A. *S. aureus*: agar sal manitol



B. *S. aureus*: Tinción de Gram.

Fuente: <http://www.sochipe.cl/subidos/noticias2/fotos/Staphylococcus.jpg>

El *S. aureus* crece bien en todos los medios ordinarios de laboratorio con un mayor desarrollo en los cultivos que contienen sangre o suero. Los medios de cultivo selectivos, que contiene un elevado porcentaje de cloruro de sodio (NaCl) tales como agar Sal y manitol y agar Vogel Jhonson, el crecimiento de otras bacterias se inhibe mientras que las colonias de *S. aureus* crecen y fermentan el manitol, produciendo un pigmento dorado, blanquecino fácilmente identificado (Figura 4). Las colonias en el agar son redondas, lisas, brillantes, opacas bajas, convexas, amorfas y de un borde neto, en caldos de crecimiento producen turbidez uniforme y sedimento polvoriento (Stanchi *et al.*, 2005).

El material genético de *S. aureus* se encuentra en un solo cromosoma, el tamaño del genoma del *S. aureus* se encuentra en un rango de 2000 a 3000 Kb, representado por un cromosoma circular situado en el citoplasma dentro del nucleóide junto con el ARN. Los genes responsables de la virulencia y de la resistencia a los antimicrobianos se hallan en el cromosoma y en los elementos extracromosomales. Estos genes pueden ser transferidos entre las diferentes cepas de estafilococos a diferentes especies y también entre otras bacterias gram positivas mediante elementos extracromosómicos (Hurtado *et al.*, 2002).

El *S. aureus* produce una gran cantidad de factores de virulencia que comprenden productos de secreción, componentes estructurales y mecanismos que contribuyen con la habilidad de la bacteria para sobrevivir en el hospedador y causar mastitis (Kerro *et al.*, 2002). La patogenicidad de *S. aureus* depende de una acción combinada de los factores de virulencia que incluyen toxinas extracelulares, enzimas y proteínas de superficie celular (Arvidson y Tegmark, 2001).

Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

Biológicamente *S. aureus* posee una gran variedad de factores de virulencia (tabla 1 y figura 4), que justifican su capacidad patogénica y de invasión sobre los mecanismos de defensa del hospedero y de resistencia a los antimicrobianos utilizados en la clínica (Camussone y Calvino, 2013). Estos factores se han clasificado en componentes superficiales (de pared bacteriana), toxinas y enzimas (Tabla 1).

Se han clasificado de la siguiente forma:

Tabla 1: Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Componentes	Factores de virulencia
Componentes superficiales	Polisacárido capsular, polisacárido extracelular y proteínas superficiales (Proteínas de unión a colágeno [Cna], Proteínas de unión a fibronectina [FnBPA y FnBPB], Proteínas de unión a fibrinógeno [ClfA y ClfB], Proteína A [Spa], Clumping factor y Ácidos teicoicos y lipoteicoicos.).
Toxinas	Toxinas con actividad sobre membranas (toxinas o hemolisinas α , β , γ , δ , y leucocidina) y toxinas con actividad de superantígenos (enterotoxinas [A-E y G-J], toxina del síndrome del choque tóxico [TSST-1] y toxinas epidermolíticas o exfoliativas [A y B])
Enzimas	Estafiloquinasa, coagulasa, hialuronidasa, lipasas, proteasas. ADNasa termoestable o termonucleasa, catalasa, colagenasa, fosfatasa, elastasa, betalactamasa e hidrolasa

(Martínez, 2005)

La localización de los factores de virulencia se relaciona con la pared bacteriana y sus productos metabólicos (Figura 5).

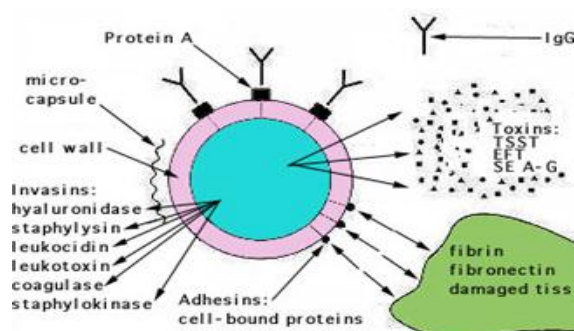


Figura 5: Ubicación de los factores de virulencia de *S. aureus*

Fuente: <http://mecanismosmolecularesneumoniadani.blogspot.mx/2012/01/el-estafilococo-aureus-produce.html>

Basándose en su actividad biológica, se han propuesto tres categorías funcionales:

Factores que median la adhesión de la bacteria a la célula hospedadora.

Factores que promueven el daño y la diseminación tisular.

Factores que protegen a la bacteria del sistema inmune del hospedador.

Algunos factores pueden ser englobados en varias categorías funcionales (Kerro *et al.*, 2002).

Regulación genética de los factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.

La expresión de los factores de virulencia de *S. aureus* se da en respuesta a diversas señales medio ambientales durante la infección, esto se debe a que varios reguladores actúan de forma independiente o interaccionando entre sí. Se han descrito dos grandes familias de reguladores globales en *S. aureus*: los sistemas reguladores de dos componentes (TCRS), de los cuales el más conocido es el sistema agr, y la familia de proteínas homólogas a SarA. Se ha descrito que SarA promueve la síntesis de las proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina, α , β - y δ -toxinas y cápsula, mientras que reprime la de las proteínas de unión a colágeno, proteína A y proteasas uniéndose directamente a los promotores de los genes diana, o indirectamente, por su efecto sobre otros reguladores (Novick, 2003; Cheung *et al.*, 2004).

Polisacárido capsular de *Staphylococcus aureus*.

El polisacárido capsular es una capa que cubre a la bacteria, que se encuentran fuera de la pared celular rígida con borde definido, son capas discretas de material viscoso, formada por una serie de polímeros orgánicos que en las bacterias se deposita en el exterior de su pared celular, generalmente contiene glicoproteínas y un gran número de polisacáridos diferentes, incluyendo polialcoholes y aminoazúcares, cuando se observa por la luz de un electromicroscopio con la presencia de tinta china aparece como un halo blanco que rodea a la bacteria (O' Riordan y Lee.,2004; Sompolinsky *et al.*, 1985).

La mayoría de los *S. aureus* presentes en el ambiente, están desprovistos de cápsula, pero aislados directamente de IIM [Infecciones Intramamarias] (Sutra y Poutrel, 1990), o de leche, muestran una clara expresión de la cápsula de polisacáridos, lo que sugiere que la producción de estos se inicia *in vivo* cuando la bacteria se está multiplicando en la leche *S. aureus* produce cápsula (CP) *in vivo* o en condiciones definidas de cultivo (Lee *et al.*, 1993).

Se han descrito diferentes tipos capsulares de acuerdo al tipo de polisacáridos; la producción de cápsula por *S. aureus* fue descrita por primera vez en 1931 por Gilbert. Las cepas fuertemente encapsuladas, tipificadas como cepas M y Smith difusas, producen colonias mucosas, resisten la fagocitosis y son más virulentas, producen colonias mucosas en medios sólidos y son raramente aisladas en animales, y generalmente se aíslan más en seres humanos (Hochkeppel *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1993).

Karakawa y colaboradores (1985), reportaron que la mayoría de las cepas de *S. aureus* eran capsuladas y describieron 8 serotipos capsulares en donde predominaron los serotipos capsulares 5 (CP5) y los serotipos capsulares 8 (CP8). A las cepas M y Smith difusas, les fueron asignados los serotipos 1 y 2, respectivamente. Posteriormente, Sompolinsky en 1985, agrega 3 serotipos más, aisladas de diferentes fuentes tanto en animales como en humanos, llegando hasta 11 serotipos. Sin embargo, solamente se han y caracterizado químicamente 4 de estos serotipos (Karakawa *et al.*, 1985; Sompolinsky *et al.*, 1985; Mc Kenney *et al.*, 2000; O’Riordan y Lee, 2004).

Caracterización bioquímica de los serotipos capsulares 5 y 8 de *Staphylococcus aureus*.

Las cápsulas han sido parcialmente caracterizadas (Wilkinson, 1983). Éstas contienen ácidos hexosaminurónicos. La caracterización bioquímica de polisacáridos ha sido realizada solamente en 4 de los 11 serotipos capsulares (Lee *et al.*, 1993; Kampen *et al.*, 2005).

Los serotipos 5 y 8 son trisacáridos similares que contienen ácido manosaminurónico difieren solamente en el lugar de unión entre los azúcares y en el sitio de acetilación O de los residuos del ácido manosaminurónico: 2-acetamido-2-deoxi-D-manurónico ácido (ManNAcA), 2-acetamido-2-desoxi-L-fucosa (L-FucNAc) y 2-acetamido-2-desoxi-D-fucosa (D FucNAc). La estructura del CP4 no ha sido dilucidada, aunque un serotipo CP4 de la cepa 7007 ha mostrado reacción con anticuerpos para CP5 (Watts *et al.*, 2005; O’Riordan y Lee, 2004).

Morfología de los *Staphylococcus aureus* capsulados.

Se describe que hay variaciones en el tipo de la cápsula. Unas se presentan de forma más mucoide que otras, llamándolas mucoides (altamente capsuladas) y no mucoides (microcápsula)(Karakawa *et al.* 1985). Las cepas capsuladas de *S. aureus* producen colonias de morfología difusa en forma de cometa de color blanco al adicionar suero libre de anticuerpos anticapsulares y complemento (forma mucoide). Las cepas no capsuladas poseen un mecanismo que induce la expresión de la cápsula, la cual se expresa bajo ciertas condiciones de cultivo, además se ha observado que las cepas no capsuladas tienen morfología compacta (forma no mucoide) [Figura 6] (Baselga *et al.*, 1994).

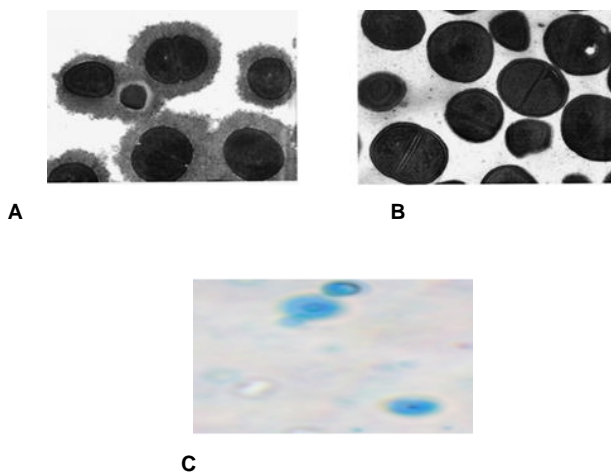


Figura 6: **A.** *S. aureus* capsular; **B.** *S. aureus* no capsular; **C.** Cápsula de *S. aureus* observada con tinción blue ink el halo se presenta de color blanquecino y el cuerpo de la bacteria en azul.

La morfología mucoide o difusas presentan los serotipos CAP5 y CAP8, se distingue de las cepas no mucoides o compactas (Albus *et al.*, 1991).

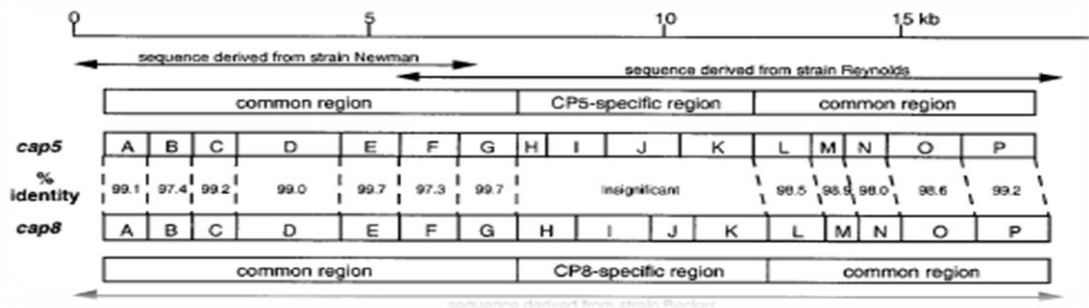
Producción de cápsula in vivo e in vitro de los serotipos capsulares 5 y 8 de *Staphylococcus aureus*.

La expresión de CP5 y CP8 es sensible a señales del entorno y del ambiente, las condiciones de crecimiento bacteriano, tal como el medio de cultivo, han demostrado tener una influencia muy importante en la producción de polisacáridos capsulares, estos eran muy difíciles de aislar y del cultivar *in vitro* (Dassy *et al.*, 1993; Poutrel *et al.*, 1995).

El crecimiento de *S. aureus* bajo concentraciones limitantes de Fe y en medio sólido aumenta la producción de CP8 (Lee *et al.*, 1993). El incremento en la producción del CP5 fue observado en condiciones de elevada tensión de O₂, pero se redujo bajo condiciones alcalinas de crecimiento (Dassy *et al.*, 1993; Herbert *et al.*, 1997). La producción de cápsula *in vitro* se incrementa con el crecimiento de las bacterias en leche (Sutra y Poutrel, 1990) o en medios suplementados con un 2% de NaCl (Pohlmann-Dietze *et al.*, 2000). Una pequeña cantidad de cápsula se produce en la fase logarítmica de crecimiento mientras que la máxima producción ocurre durante el período post exponencial de la fase de crecimiento (Poutrel *et al.*, 1995; Dassy y Fournier, 1996; Pohlmann-Dietze *et al.*, 2000).

Se ha determinado que el CO₂ regula la expresión del CP5 tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque CP5 fue expresado bajo condiciones normales de O₂, el crecimiento de CP5, fue inhibido por presencia de medios suplementado con levaduras, o con 1 a 5 % de CO₂. El CO₂ mostró afectar la expresión del gen *Cap5* a nivel transcripcional. En contraste, la detección del CP8 cultivadas en presencia de CO₂ dio resultados variables de crecimiento, algunas cepas crecieron mientras que otras se inhibieron (Herbert *et al.*, 1997).

En la expresión genética de los serotipos capsulares de *Staphylococcus aureus* 5 y 8, intervienen los genes que codifican para cada uno. El serotipo capsular 5 y 8 comprenden un loci alélico de 17.5 Kb en la región de los cromosomas, cada uno contiene 16 genes estrechamente relacionados, que se transcriben en una orientación de *Cap5A* (*Cap8A*) a través de *Cap5P* (*Cap8P*), ya que ambos se componen de los mismos tres residuos de azúcar, ManNAcA, L-FucNAc y D FucNAc. Por lo tanto, 12 de los 16 genes en los dos grupos son casi idénticos [Figura 7] (Sau *et al.*, 1997; Ouyang *et al.*, 1999).



(Lee y Lee, 1999) Figura 7: Regulación genética de los serotipos capsulares 5 y 8 de *Staphylococcus aureus*.

Los principales mecanismos responsables de la falta de expresión de *S. aureus* capsular son mutaciones puntuales en el gen *Cap5* en la parte del promotor o en uno de los 11 genes esenciales para la producción de cápsula. Otras mutaciones son en los genes que regulan los factores de virulencia para la expresión de cápsula, tales como *agr* o SARA (Cocchiari *et al.*, 2006; Loung *et al.*, 2002; Lee y Lee, 1999).

Importancia de los serotipos capsulares 5 y 8.

Los serotipos CP5 y CP8 son predominantes en *S. aureus*, aislados de infecciones en seres humanos, vacas, cabras, conejos, cerdos, caballos y gallinas, siendo su frecuencia de aislamiento muy variable en las diferentes regiones geográficas estudiadas (Poutrel y Sutra, 1993; Guidry *et al.*, 1997; Sordelli *et al.*, 2000; Tollersrud *et al.*, 2000).

La función de la cápsula en etapas tempranas de la infección, podría inhibir la adherencia a las células endoteliales (Pohlmann-Dietze *et al.*, 2000). El complemento y los anticuerpos dirigidos hacia los componentes de la pared celular de *S. aureus* se depositan en la pared bacteriana debajo de la capa capsular (Wilkinson, 1983). La cápsula impide la interacción entre el complemento y la inmunoglobulina, con los receptores en las células fagocíticas. Como resultado la bacteria evade la fagocitosis. En presencia de anticuerpos específicos para la cápsula, el C3b y los anticuerpos IgG₂ son depositados a lo largo de la matriz capsular y sobre la superficie bacteriana, haciéndolas disponibles para el reconocimiento por parte de los receptores de los fagocitos (Verbrugh *et al.*, 1982; Arizono *et al.*, 1991).

La cápsula aumenta la virulencia microbiana por incrementar la resistencia bacteriana a la fagocitosis, ya que los anticuerpos no la reconocen y evitan que se active el complemento. La presencia de la capsula hace que el *S. aureus* sea difícil de eliminar (O'Riordan y Lee, 2004; Verdier *et al.*, 2007; Nickerson 1985).

Resistencia de la glándula mamaria y sobrevivencia intracelular de *Staphylococcus aureus* en la fagocitosis.

La glándula mamaria está protegida por dos mecanismos: la inmunidad innata y la inmunidad específica o adaptativa. La primera que predomina durante los primeros estadios de la infección, es inmediata, inespecífica y no tiene memoria, al ser mediada por la barrera física que se encuentra en el conducto del pezón, así como por macrófagos, neutrófilos, células NK (*natural killer*) y ciertos factores solubles si este mecanismo defensivo funciona adecuadamente la mayoría de los patógenos son eliminados rápidamente (Sordillo y Streicher, 2002).

El agente patógeno al ser opsonizado por el sistema defensivo innato, a través de la presentación del antígeno por macrófagos se desencadena la segunda respuesta inmune adaptativa o específica, la cual reconoce determinantes antigénicos de los patógenos, lo que favorece su opsonización selectiva. Debido a la memoria inmunológica de los linfocitos T y B, este tipo de inmunidad, aumenta frente a sucesivas exposiciones a los agentes patógenos. La respuesta inmune específica solo puede ocurrir si los antígenos se combinan con moléculas del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) en la superficie de ciertas células, un proceso conocido como presentación de antígenos. El reconocimiento de los agentes es esencial para su eliminación posterior iniciada por macrófagos, ciertas poblaciones de linfocitos e inmunoglobulinas y anticuerpos (Monks *et al.*, 2002; Sordillo y Streicher, 2002; Beutler, 2004).

La incidencia de mastitis aumenta cuando se dañan los mecanismos de defensa de la glándula mamaria. El ganado lechero se expone a numerosos factores genéticos, fisiológicos y medioambientales que comprometen la inmunidad del hospedador y aumenta la incidencia de mastitis. La severidad de la respuesta inflamatoria en la glándula

mamaria puede variar por el agente presente en la infección (Hopster *et al.*, 1998; Persson-Waller 2003; Sordillo y Streicher, 2002).

La inflamación de la glándula mamaria en la vaca lechera, constituye un mecanismo de resistencia natural a la infección en el desarrollo de la mastitis, caracterizada por el aumento del CCS (Conteo de Células Somáticas) y alteraciones físico-químicas de la leche (Epperson *et al.*, 1993). Diversos autores coinciden en señalar que el CCS está influido directamente por el nivel de infección del hato, la edad de la vaca, la etapa de lactación y la época del año. Así mismo las condiciones de estrés de producción a la que se encuentra sometida la vaca influyen considerablemente para que ocurra la mastitis (Harmon y Heald, 1994).

Al evaluar el CCS en las vacas lactantes, los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) son las células predominantes en la leche. Estas constituyen la primera barrera de defensa celular de la glándula mamaria frente a la infección intraglandular. Sin embargo el CCS elevado tiene un impacto negativo sobre la producción láctea y la calidad de la leche, indicando una tasa mayor de MSC en el hato, tiene efecto negativo en la economía de la producción debido, a la baja en la producción láctea (Cameron y Anderson, 1993). Cuando la enfermedad ocurre al inicio y al final de la lactación las pérdidas ocasionadas representan más del 20% del total de la leche equivalente a 850kg (Lescourret y Coulon, 1994).

La glándula mamaria sana contiene una baja concentración de inmunoglobulinas y complemento, una vez que hay infección de la glándula mamaria, los PMNs aumentan, también las concentraciones de IgG, en este proceso solo hay un control parcial de la infección evolucionando a una enfermedad crónica como en la MSC, forma en la que se refleja un equilibrio entre la multiplicación de las bacterias y los mecanismos de defensa de la glándula. La baja eficacia de la fagocitosis mediada por los PMNs se debe a que fagocitan caseína y grasa, estos componentes cuando son ingeridos por células fagocíticas inhiben la actividad bactericida de las células PMNs, los leucocitos en la leche no fagocitan tan eficientemente como los de la sangre. (Sutra y Poutrel, 1990; Velazquez *et al.*, 2008). Una alta concentración de PMNs en la leche son necesarios para prevenir la infección (9×10^5 PMNs/mL) cuando la glándula mamaria está infectada la

concentraciones de PMNs disminuyen ($\leq 1 \times 10^5$) disminuyendo la protección de la glándula de las infecciones por *S. aureus* (Guidry *et al* 1994a).

La fagocitosis de los leucocitos en la glándula mamaria muestra diferencia en la fagocitosis *in vitro*. La actividad bactericida en los macrófagos en vacas no lactantes es significativamente menor, comparada con una mayor actividad desarrollada por los neutrófilos en presencia de suero de leche en el sustrato (Mullan *et al.*, 1985).

Al evaluar la actividad funcional de los neutrófilos y macrófagos obtenidos de la secreción glandular en la vacas lactante y en la no lactantes entre los 7 y 14 días antes del secado, la actividad de fagocitosis de los macrófagos fue del 44.22%, similar a la que puede ocurrir al inicio del secado. Los neutrófilos en las primeras semanas muestran un índice de fagocitosis del 24.7%. Durante el periodo de observación de los neutrófilos fueron más activos que los macrófagos en su actividad fagocítica frente a *S. aureus* (Epperson *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1994).

La caracterización de diferentes antígenos de superficie presente en los neutrófilos detectado mediante el uso de anticuerpos monoclonales, ha permitido confirmar que estos antígenos intervienen en la quimiotaxis, la fagocitosis y la activación de la explosión respiratoria de los neutrófilos, poniendo en evidencia el polimorfismo antigénico de los sitios funcionales de los fagocitos y su participación potencial para modular la fagocitosis (Horan *et al.*, 1982; Salgar *et al* 1994).

En forma natural las vacas con MSC tienden a mostrar una actividad de fagocitosis elevada por los neutrófilos de la glándula mamaria (Riedel-Caspari, 1993), contrastando con la baja actividad funcional mostrada por los neutrófilos al parto, la que supone un incremento en la susceptibilidad a la infección en las primeras etapas de lactación (Gilbert *et al.*, 1994). Al evaluar diferentes parámetros de la actividad de fagocitosis y la producción láctea, se obtuvo una correlación negativa (MacDonald *et al.*, 1994).

Al ocurrir la infección por *S. aureus* por el conducto del pezón y evadir los mecanismos inmunológicos, los macrófagos y los PMNs, que se encuentran en la leche fagocitan a las bacterias incrementando la quimiotaxis (Paape *et al.*, 1979).

La presencia de la cápsula brindada por el *S. aureus* causa mayor virulencia bacteriana ya que hace que la bacteria sea resistente a la fagocitosis, ya que los anticuerpos no la reconocen evitan que se active el complemento (O' Riordan y Lee, 2004; Verdier *et al.*, 2007; Lattar *et al.*, 2009).

La estructura natural de la cápsula es un factor importante que inhibe la opsonización (Guidry *et al.*, 1991). Los *S. aureus* capsulares son ineficazmente opsonizadas por el complemento, en ausencia de anticuerpos específicos las cápsulas impiden la activación del complemento a través de la vía alternativa (Perterson *et al* 1978).

Los receptores de los PMNs no se unen específicamente a los componentes de la superficie de la bacteria a través de las interacciones lectina – carbohidratos por la cual se da el reconocimiento de la bacteria y se da la activación de los PMNs, ya que la producción de esta capa evita la opsonización de los anticuerpos, IgG y del complemento, por los componentes de la superficie de *S. aureus* como el peptidoglicano o el ácido teicoico, así mismo da una baja respuesta a las células T de memoria y células T dependientes, por lo que se convierten en anticuerpos transitorios por lo que hacen que la producción de opsoninas disminuyan (Guidry *et al.*, 1991).

La resistencia a la fagocitosis de las cepas capsuladas de *S. aureus* se debe a la propiedad hidrofílica de superficie, comparada con las cepas, que mostraron una capacidad hidrofóbica (Guidry *et al.*, 1991). La presencia de la cápsula de *S. aureus* inhibe la opsonización de la pared celular por anticuerpos IgG₂, que favorece la opsonización y fagocitosis de los neutrófilos de la glándula mamaria de bovinos (Baselga *et al.*, 1994).

Al estimular la respuesta inmune de la glándula mamaria en la vaca frente a cepas capsuladas de *S. aureus*, con la aplicación de antígeno capsular en el ganglio linfático supramamario de las vacas la producción de anticuerpos IgG₁ e IgG₂ se incremento significativamente. En comparación la aplicación intramamaria del antígeno estimuló la producción de los isotipos IgM e IgG₁. En este estudio mostró que declinaron al parto, mientras que la concentración de IgG₁ permaneció constante. Al realizar los ensayos *in vitro* de fagocitosis, los isotipos IgG₁ e IgM disminuyeron la actividad de fagocitosis. La

opsonización de las cepas con cápsula difusa y de tipo compacto mostraron una reacción cruzada en la opsonización (Guydry, 1991).

Un número reducido de *S. aureus* después de ser opsonizados y fagocitados *in vitro* causan la muerte de los neutrófilos, las bacterias pueden no ser afectadas de forma significativa sobrevivir dentro de los leucocitos, los cuales contribuyen con la cronicidad de la infección. Es posible que este efecto aumente la sobrevivencia intracelular y sea capaz de provocar fallas en la terapia antibiótica (Craven y Williams, 1985).

La gravedad de la infección producida por *S. aureus* así como la evolución clínica de la mastitis afecta considerablemente la funcionalidad de la glándula mamaria, por lo que en la MSC y la cronicidad de la infección pueden ser relacionada con la supervivencia intracelular del *S. aureus* (Kerro *et al.*, 2002).

Durante las infecciones crónicas hay baja actividad bactericida por el bajo funcionamiento de los PMNs, aunado a lo anterior el factor de virulencia de la cápsula de polisacárido le confiere protección evitando que sea fagocitada (Dosogne *et al.*, 2003).

La importancia de la cápsula en la infección por *S. aureus* en la glándula mamaria en las vacas lecheras; determina la necesidad de identificar los serotipos capsulares 5 y 8 en las unidades lecheras y determinar la sobrevivencia *in vitro* en los PMNs en las vacas lecheras.

JUSTIFICACIÓN

El *S. aureus* es el agente principal causante de mastitis bovina, originando bajas en la producción láctea, alteraciones físicoquímicas de la leche, constituye un riesgo a la salud pública. Se han identificado cepas portadoras de factores virulencia altamente patógenas para el hombre y los animales, cuando se presenta el *S. aureus* portador del polisacárido capsular 5 y 8, estas cepas favorecen la sobrevivencia de la bacteria a la fagocitosis.

Se desconoce cuáles son los tipos capsulares prevalentes en los hatos lecheros en el Valle de Toluca y la proporción los serotipos capsulares 5 y 8.

Es por ello que se necesita identificar fenotípicamente y molecularmente los genes *Cap5* y *Cap 8* para determinar la evaluación de la sobrevivencia intracelular. Esto permitirá diseñar programas de prevención contra la enfermedad ocasionada por el *S. aureus*.

HIPÓTESIS

El 50% de aislamientos de *Staphylococcus aureus* identificados fenotípicamente y genotípicamente corresponden a los serotipos capsulares 5 y 8 que contribuyen a la sobrevivencia intracelular en los neutrófilos de vacas lechera.

OBJETIVOS

General:

Identificar el fenotipo y el genotipo capsular 5 y 8 de *S. aureus* y su capacidad de supervivencia en neutrófilos, de vacas lecheras.

Específicos:

Identificar la frecuencia de *S. aureus*, en leche de vacas de la unidad de producción.

Identificar la expresión fenotípica y genotípica de la cápsula 5 y 8 de *S. aureus*.

Determinar la supervivencia intracelular de *S. aureus* serotipos capsulares 5 y 8 en neutrófilos de vacas lecheras.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. Biológico

Muestras de leche

Suero de leche

Suero de conejo

Sangre de vacas con anticoagulante

Suero de vacas

Cepas control:

Staphylococcus aureus (ATCC 25923, Seattle).

Staphylococcus aureus serotipo capsular 5 (ATCC25904, Newman).

Staphylococcus aureus serotipo capsular 8 (ATCC 49525, Wright).

Staphylococcus aureus sin cápsula (ATCC10832, Wood 46).

Staphylococcus epidermidis (ATCC12228, Evans).

2. Material de Muestreo

Refrigerantes

Caja de poliuretano

Desinfectante yodado 500 ppm

Etiquetas autoadheribles

Hojas de registro

Gradilla metálica

Marcador

Guantes de látex

Toallas desechables

Torundas con alcohol etílico al 70%

Tubos de plásticos de muestreo con tapón de rosca 30 mL (Evergreen)

Agujas vacutainer

Camisa vacutainer

Tubos con EDTA

3. Material de laboratorio

Medios de cultivo:

Agar Sal y Manitol (Bioxon, México).

Agar soya tripcaseina (Bioxon, México).

Cloruro de Sodio (J.T.Baker, USA)

Caldo Infusión cerebro – corazón (Bioxon, México).

Agar infusión cerebro – corazón (Bioxon, México).

Sulfato de Cobre (J.T.Baker, USA)

Agar Columbia (Bioxon, México).

Cristalería:

Cajas petri de vidrio y plástico 15 x 100 mm.

Matraces erlenmeyer de 250 y 500 mL.

Portaobjetos de 26 x 62 mm.

Cubreobjetos 18 mm

Probetas graduadas de 500 mL

Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13 x 100 mm.

Placa de aglutinación

4. Equipo

Asa bacteriológica de 10 μ l.

Autoclave

Baño María de 0 a 80°C (Riossa)

Estufa bacteriológica a 37°C (Riossa)

Microscopio óptico (Carl – Zeiss)

Microscopio óptico (Olympus BH-2-Japan)

Microscopio de para epifluorescencia (Zeizz-West Germany)

Centrifuga (Solbat, México)

Balanza Granataria (Ohaus, USA)

Gradillas metálicas

Refrigerador (Nieto)

Vortex (Thermolyne / Maxi mix II)

Micropipetas 10 a 100 μ L, 100 a 1000 μ L (Boeco, Alemania).

Puntas micro 10 a 100 μ L, 100 a 1000 μ L (Costar, México).

Viales de 1.0 a 2.0 mL (CLP, México)

Aglutinoscopio

5. Reactivos y sustancias

Reactivo de Catalasa

Reactivo de KOH

Tinción de Gram (Sigma, México)

Tinción May - Grunwald (Sigma, México)

Tinción de Azul de tripan (Sigma, México)

Tinción de Giemsa (Sigma, México)

Lysostaphin (Sigma, USA).

Naranja de Acridina (Sigma, USA).

Glicerol (J.T. Baker, México)

Agua destilada

Extrán

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4

Filtros de 0.45 mm. (Gelman Sciences)

6. Material de Extracción de ADN y PCR

Equipo y material plástico

Kit de extracción de DNA (MO – BIO Ultra Clean).

Nanodrop (Quawell,USA)

Cámara de electroforesis (Bio-Rad, USA)

Termociclador (Lab-Net, USA)

Transluminador y fotodocumentador (Bio- Imagin, System, Israel)

Microcentrifuga (Eppendorf, Germany).

Micropipetas 0.5 a 10 µL, 10 a 100 µL, 100 a 1000 µL. (Boeco,Germany)

Puntas micro de 0.5 a 10 µL, 10 a 100 µL, 100 a 1000 µL.(CLP, México)

Viales y microviales (CLP, México)

Campana de flujo laminar (Labconco, USA).

Reactivos

Agarosa 1.5% (CLP, México).

TAE 10 X (Promega, USA).

Agua libre de nucleasas (Promega, USA).

Buffer Green (Promega, USA).

Cloruro de Magnesio (Promega, USA).

Mezcla de DNTPS (Promega, USA).

Taq polimerasa (Go taq) (Promega, USA).

Iniciadores serotipo capsular 5:

F: 5-GTCAAAGATT ATGTGATGCTACTGAG-3

R: 5-CTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATACAG-3

Iniciadores del serotipo capsular 8:

F: 8-GCCTTATGTTAGGTGATAAACC-3

R: 8-GGAAAAACACTATCATAGCAGG-3

Marcador de peso molecular de bajo rango (25 a 700 pbs) (Fermentas, USA)

Bromuro de etidio (Promega, USA).

MÉTODOS

El tipo de estudio que se realizó correspondió a un experimental descriptivo.

Las muestras se tomaron a través de un muestreo no probabilístico por conveniencia obtenido de la unidad de producción de la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Se realizó un estudio piloto preliminar para montaje de técnicas con aislamientos diferentes regiones de Toluca, conservados en el CIESA – FMVZ – UAEM.

1. Obtención y conservación de las muestras de leche.

Se obtuvieron muestras de leche por conveniencia de vacas en línea de ordeño de diferentes edades y etapas de producción de la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, recolectadas asépticamente después del lavado y secado de la ubre; previa desinfección de los pezones, con una solución yodada 500 ppm. Finalmente se realizó el embrocado del pezón con alcohol etílico al 70% v/v, se eliminaron los tres primeros chorros de leche de cada cuarto, depositando la leche en tubos de plástico de muestreo de 30 mL, la cual fue mantenida a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento bacteriológico (NMC, 2005).

2. Aislamiento e identificación bacteriológica del *S. aureus*.

El aislamiento y la identificación bacteriológica del *S. aureus* se efectuaron teniendo como cepas control al *S. aureus* ATCC 25923 (Seattle). Para la detección del *S. aureus* se siguió la siguiente rutina bacteriológica: las muestras de leche se incubaron previamente a una temperatura de 37°C en baño María con agitación orbital, se homogenizaron y posteriormente se procedió a la inoculación directa en placas, se inocularon 0.010 mL de leche sobre placas de agar sangre y agar sal manitol, incubadas a 37°C en anaerobiosis durante 24 h. Las unidades formadoras de colonias (UFC), se identificaron mediante la tinción de Gram, tipo de hemólisis presente sobre las placas de agar sangre, la pruebas de catalasa, KOH y coagulasa en tubo, fermentación anaerobia de manitol y fermentación aerobia de la maltosa sí como también las pruebas bioquímicas de TSI y sal manitol anaerobio (Cohen, 1977; Boerlin *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2013).

3. Preparación de medio para la expresión de la cápsula y tinción de Hiss

Una vez obtenidos los aislamientos bacteriológicos se procedió a cultivar en el medio para la expresión de cápsula (agar Columbia adicionado con NaCl al 2%) incubados en estufa bacteriológica por 24 horas a 37 ° C (Watts *et al.*, 2005).

Después se realizó la tinción de Hiss para después observarla en el microscopio a 100X con aceite de inmersión [ver anexo 1] (Hanson y Jr., 1905).

4. Expresión del tipo capsular

La expresión del tipo capsular se obtuvo en tubos de agar suero de leche al 10%. El cual se preparó de la siguiente manera: se obtuvo suero de leche, se filtro en filtros de 0.45 mm para garantizar su esterilidad, una vez obtenido el suero de leche se preparo el medio infusión cerebro corazón en tubos de vidrio de 10 x 13 mm y se le adicionó agar bacteriológico al 3%, se esteriliza el medio al 121 ° C por 15 minutos, una vez esterilizado el medio se le agregó 10% de suero de leche, se procede a la inoculación de la bacteria con un asa de nicromel 0.010 mL y se agitó levemente para homogenizar la bacteria, se metió en la estufa bacteriológica por 24 horas a 37 ° C y se procedió a la lectura [ver anexo 2] (Sutra y Poutrel, 1990).

5. Prueba fenotípica de seroaglutinación en placa para la detección de los serotipos capsulares 5 y 8.

Los serogrupos capsulares 5 y 8 se identificaron mediante aglutinación en placa, con un antisuero policlonal, obtenido en conejos de raza Nueva Zelanda. Bajo el procedimiento siguiente.

5.1. Preparación de los antígenos capsulares

Se prepararon los antisueros bacterianos de las cepas control ATCC 25904 (Newman), cepa serotipo capsular 5, ATCC 49525 (Wright) cepa serotipo capsular 8 y ATTCC 10832 (Wood 46) cepa acapsular. Las cepas se cultivaron en agar Columbia adicionado con 2,5% NaCl a 37°C durante 18 hrs, los inóculos se cosecharon e inactivaron con una solución de Formol al 3 % y 5% para obtener una absorbancia de 0.6 a 550 nm [6x10⁶UFC] (Karakawa *et al.*, 1985)

5.2.-Esquema de Inoculación del antígeno

Con cada cepa control fue inmunizado un conejo de raza neocelandesa con un peso aproximado de 2.7 Kg. conservando un conejo control. El esquema de inmunización fue el siguiente:

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Subcutáneo	0.2			
Intramuscular		0.4		
Intramuscular			0.8	
Intravenosa				1.6

A la 5 semana se extrajo el suero y se tituló mediante diluciones decuples [10^{-1}](Karakawa *et al.*, 1985).

EL uso y manejo de animales de laboratorio se realizó bajo los criterios institucionales de bioética y bienestar animal, en correspondencia con la NOM-062-ZOO-1999.

5.3 Preparación de las bacterias.

Las bacterias de campo se sembraron en caldo BHI, posteriormente se ajustaron a una concentración de McFarland (1.5×10^8 UFC) con BHI para la prueba de seroaglutinación empleando controles positivos y negativos de la prueba

5.4. Prueba de aglutinación

La prueba de aglutinación se realizó de la siguiente manera: se colocaron 20 μ L de los diferentes sueros (tipo capsular 5, 8 y a capsular) y 20 μ L de bacteria en la placa se mezclaron y a los 30 segundos se toma la lectura.

La prueba positiva muestra aglutinación y prueba negativa sin aglutinación.

6. Conservación de las cepas

Los aislamientos bacteriológicos obtenidos se conservaron en caldo infusión de cerebro corazón adicionado con 25% de glicerol v/v, mantenidos en crioviales a una temperatura de -70°C (Tollersrud *et al.*, 2000).

7. Detección de los tipos capsulares 5 y 8 por medio de la Reacción en Cadena la Polimerasa (PCR).

7.1. Extracción de ADN

Se realizó de acuerdo a las instrucciones del Kit de extracción de ADN (MO – BIO Ultra Clean).

7.2. Preparación de la reacción para la detección del serotipo capsular 5 y 8.

Para la amplificación de PCR la mezcla de reacción (25 µL) contenía 1.0 µL de iniciador F y 1.0 µL de iniciador R, (10 pm/ µL), 1.0 µL de DNTPs (10 mM/L), 5 µL de flexi buffer 10x (Promega®), 2.5 µL de MgCl₂ (25 mM/µL Promega®), 0.25 µL de Go-taq polimerasa (5 U/µL Promega®), 11.25 µL de agua libre de nucleasas y 3 µL de ADN a una concentración de 25 ng.

Se realizó la misma reacción para el serotipo capsular 8.

7.3. Cepas control utilizadas.

ATCC 25904 cepa tipo capsular 5, ATCC 49525 cepa capsular 8, ATTCC 10832 cepa acapsular.

7.4. Iniciadores utilizados

Serotipo capsular 5:

Cap5 F: k1 (5-GTCAAAGATT ATGTGATGCTACTGAG-3)

Cap5 R: k2 (5-ACTTCGAATATAAACTTG AATCAATGTTATACAG-3)

Serotipo capsular 8:

Cap8 k1 (5-GCCTTATGTTAGGTGATAAACC-3)

Cap8 k2 (5-GGAAAAACACTATCATAGCAGG-3)

(Verdier, 2007).

7.5. Reacción de PCR

La amplificación del ADN nuclear se llevó a cabo en un termociclador (Lab-Net, USA®) bajo las siguientes condiciones: iniciación 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de 30 ciclos durante 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de elongación a 55°C y 1 min de extensión a 72°C, con un paso de extensión final a 72°C durante 5 min.

7.6. Observación de los productos de amplificación.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Sigma®, Francia) en una cámara de electroforesis a 77 voltios durante 90 min (Bio-Rad, USA®) se utilizó un marcador de peso molecular de bajo rango de 25 a 700 pbs (Fermentas®). Los fragmentos de los productos del PCR de los genes *Cap5* y *Cap8*, de los aislamientos de *S. aureus* corresponden a los descritos por Verdier *et al.* (2007), y observados en las cepas control ATCC 25904 tipo capsular 5 y ATCC 49525 tipo capsular 8 y *S. aureus* acapsular ATCC 10832.

Obteniendo el producto de amplificación de 361 pb para *Cap 5* y 173 pb para *Cap8* (Verdier *et al.* 2007).

8. Grupo de animales donadores

El grupo de animales donadores de sangre se integró por 3 vacas clínicamente sanas, del lote de vacas de la unidad de producción, en la primera de lactación, con un periodo posparto no mayor a 60 días, el criterio de inclusión fueron reacciones negativas a prueba de California. Durante el estudio las vacas se mantuvieron en condiciones adecuadas de aislamiento de acuerdo con la NOM-050-ZOO.1997.

9. Obtención de Polimorfonucleares de los animales donadores

Se colecto sangre de vena yugular con tubos vacutainer con EDTA, previa limpieza de la zona con una torunda con alcohol al 70%. Se tomaron 2 mL de sangre en los tubos vacutainer estériles, posteriormente la sangre recolectada de los bovinos se procesó en el laboratorio por medio de la técnica de lisis de eritrocitos que se realizó de la siguiente manera:

Se llenaron los tubos de ensayo con 4 mL de solución A (Solución salina con una concentración de 1.19 g de NaCl/100 mL) se agregaron 2 mL de sangre de forma lenta, después se le adiciono la solución B (solución salina con una concentración de 9.6 g de NaCl/100 mL de agua destilada) se mezclaron los tubos y se centrifugaron a 900 rpm durante 2: 30 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregó solución de lavado (2 veces), se realizó la tinción con azul de tripán y se observó bajo microscopio 40X para el conteo de células PMNs con un 95% de viabilidad de células (Velázquez *et al.*, 2008)

10.- Ensayo de sobrevivencia intracelular en placa

El ensayo *in vitro* se realizó en una proporción de 1:10 (neutrófilo- bacteria), contenida en la suspensión final de células en los microtubos.

El ensayo se realizó adicionando 0.8 mL de PMNs ajustados a una concentración de 1.4×10^6 (Lin *et al.*, 1995) suspendidos en PBS (pH 7.4), 0.1 mL de *S. aureus* vivos aislados de campo en BHI ajustado a una concentración de McFarland (1.5×10^8 UFC) y 0.1 mL de suero bovino, después a los 30 minutos se le adicionó Lisostaphin al 5% como solución de lisis, después de 1 hora de incubación, se realiza la tinción May Grunwald-Giemsa para comprobar que los neutrófilos hallan fagocitado (Sutra y Poutrel, 1990).

Después se centrifuga el sobrenadante se decanta y se realiza un lavado con 1000 μ L de PBS, después se centrifuga y se le agrega 1000 μ L de agua destilad estéril a -20°C, una vez hecho se procede realizar una tinción de May Grunwald- Giemsa [ver anexo 3] (Salgar *et al.*, 1994) para corroborar que las células se hayan lisado. Posteriormente se realizan diluciones decuples (10^{-1}) en tubos de ensaye con 9mL de BHI se le agregaron 1000 μ L del lisado de células, se realizan las diluciones 1:9 hasta la dilución 6, y se siembra en cajas petri con agar TSA, agregándose 1000 μ l del BHI inoculado, se mezcla,

se deja enfriar y se incuba por 18 horas a 37°C para proceder con la lectura del conteo de UFC (Anderson y Williams, 1985).

11. Índice de sobrevivencia intracelular con epifluorescencia.

Después de la obtención de PMNs se realizó el ensayo de sobrevivencia en tubos estériles en el cual se utilizó *in vitro* una concentración de 5×10^6 células viables /mL dispersadas en alícuotas en tubos de cultivo celular en una concentración de 5×10^8 UFC/mL, en una proporción neutrófilo bacteria 1: 10. Se incubaron durante 60 minutos, posteriormente las células se tiñeron usando fluorescencia de naranja de acridina y bromuro de etidio.

Se preparó 100 µg/mL naranja de acridina y 100 µg/mL de bromuro de etidio.

Ambas soluciones se mezclan en PBS, con un pH de 7.4.

Una vez hecha la mezcla se agrega 8% a las células que están a una concentración de 5×10^6 y se colocan 50 µL en un portaobjetos con un cubreobjetos para su lectura.

Las células viables se tiñen de verde por la naranja de acridina y las células no viables se tiñen de rojo por el bromuro de etidio y se realiza el conteo *S. aureus* que están vivos dentro de los neutrófilos (McGahon *et al.*, 1995).

12. Evaluación de resultados

Los resultados se evaluaron por medio de estadística descriptiva no paramétrica a través de χ^2 con una ($p < 0.05$), se presentaron en cuadros simples (Steel, 1990).

LÍMITE DE ESPACIO

La recolección de muestras se realizó en la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México ubicada en cerrillo piedras Blancas, Toluca, Edo. de México. CP 50090.

El procesamiento de las muestras se realizó en el área de bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México ubicado en el Km 15.5 de la carretera Panamericana Toluca – Atlacomulco, encontrándose a los 19°42'16" latitud norte y 99°39'38" latitud oeste del meridiano de Greenwich y una altitud de 2630 msnm, con una temperatura media anual de 13.6oC con una máxima de 25oC y una mínima de 3oC con una precipitación pluvial de 800 a 1200 m predominando el clima templado frio (García, 1988).



Figura 8: Posta Zootécnica y Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

LIMITE DE TIEMPO

El proyecto se realizó de acuerdo con el siguiente cronograma de actividades.

Periodo Actividades	1 Semestre						2 Semestre					3 Semestre					4 Semestre									
	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	E		
Revisión de literatura	█																									
Protocolo aceptado	█																									
Muestreo							█																			
Estandarización de técnicas							█																			
Pruebas de laboratorio												█														
Resultados Discusión																	█									
Artículo concluido																					█					
Tesis concluida																					█					

RESULTADOS

Se muestrearon un total de 29 vacas lecheras de las cuales se obtuvieron 116 muestras de leche de las vacas; con una tasa de positividad al aislamiento de *S. aureus* del 28.44% (33/116), los aislamientos de *S. aureus* presentaron hemólisis (Cuadro 4 y Figura 9).

El 88% de los aislamientos de *S. aureus* fueron positivos para la expresión de la cápsula en el medio Columbia adicionado con NaCl (2%); el 12 % no expresaron la cápsula, confirmada por la tinción de Hiss (Cuadro 5 y Figura 10).

De los 33 aislamientos obtenidos, en el medio agar suero de leche; el 88% (29/33) expresaron el tipo capsular difuso y el 12%(4 /33) el tipo capsular compacto (Cuadro 6 y Figura 11).

Del total de cepas capsuladas de tipo difuso, el 6.06% (2/33) fueron positivas al serotipo capsular 5 y el 6.06% (2/33) al serotipo capsular 8. El resto de las cepas capsuladas difusas reaccionaron a los serotipos 5 y 8, 75.75% (25/33) y el 12.12% 4/33 fueron No Tipificables (NT) por el antisuero policlonal de conejo ($p < 0.05$). (Cuadro 7).

Por medio de la reacción de PCR, se genotipificaron el 100% de los aislamientos de *S. aureus*, la distribución de los genes *Cap5* y *Cap8* en el agente fue la siguiente forma: el 6.06% (2/33) de las cepas capsuladas fueron positivas al gen *Cap5*, el 6.06% (2/33) al gen *Cap8*, el 88.8% (29/8) presentaron los dos serotipos de genes capsulares 5 y 8 considerado el serotipo capsular 336 (Cuadro 8). Observándose los amplicones a 361pbs para el gen *Cap5* (Figura 12), 173 pbs para el gen *Cap8* (Figura 13) y ambos para los NT (5 y 8, serotipo capsular 336) [Figura 14].

En un cuadro comparativo de los resultados obtenidos por seroaglutinación y por PCR, encontramos que los 4 serotipos NT expresaron genéticamente los serotipos capsulares 5 y 8 correspondiente con el serotipo 336 descrito por Han y colaboradores (2000) [Cuadro 9].

En el cuadro 10 se aprecia la distribución de la sobrevivencia intracelular en placa del *S. aureus*, la frecuencia de distribución en la sobrevivencia fue amplia de 8.6 a 30.6, la

frecuencia fue alta para los serotipos NT considerados 5 y 8 (336), mediante la técnica de PCR. La menor frecuencia del índice de fagocitosis se observó en el serotipo capsular 8 (Figura 15 y 16).

El total de bacterias fagocitadas de las observaciones bajo microscopio de epifluorescencia fue de 2433 bacterias fagocitadas en los ensayos realizados con el total de aislamientos de *S.aureus* (n 33) serotipos capsulares 5, 8, 5 y 8; correspondientes 1007, 664 y 762 respectivamente. El índice total de fagocitosis para los serotipos capsulares fue el siguiente: 41.38%, (5), 26.42% (8) y 31.31 (5 y 8); La sobrevivencia intracelular estimada como el porcentaje de bacterias vivas por epifluorescencia para los serotipos evaluados fue la siguiente: 5 (43.39), 8 (44.72%), NT (41.99%) [Cuadro 11].

Al considerar el total de bacterias fagocitadas (2433), la sobrevivencia general estimada para los serotipos capsulares fue mayor para el serotipo capsular 5 con 17.93%, 13.15% para el serotipo 5 y 8, la menor fue para el serotipo capsular 8 con un 11.83% [Figura 17].

Cuadro 4: Tasa de positividad de aislamientos a *S. aureus*

	Número	%
Aislamientos de <i>S.aureus</i>	33	28.44%
Aislamientos negativos	53	45.68%
Otros agentes	30	25.86%
Total de cuartos glandulares	116	100%



A B

Figura 9: **A.** Aislamiento de *S. aureus* en gelosa sangre, observándose la hemólisis de las colonias **B.** Tinción de Gram

Cuadro 5: Expresión de cápsula en el medio Columbia adicionado con NaCl (2%) y tinción de Hiss.

	Cápsula en Columbia con NaCl(2%)		Tinción de Hiss	
	Número	%	Número	%
Aislamientos positivos	29	88%	29	88%
Aislamientos negativos	4	12%	4	12%
Total de aislamientos de <i>S.aureus</i>	33	100%	33	100%

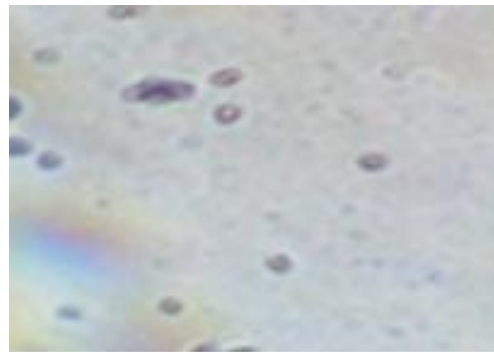


Figura 10: *S. aureus* con tinción de Hiss, el cuerpo de la bacteria se presenta de color rojo y la cápsula en color azul

Cuadro 6: Expresión del tipo de cápsula en el medio suero de leche

Tipo capsular	Número	%
Difuso	4	12%
Compacto	29	88%
Total de aislamientos de <i>S.aureus</i>	33	100%



Figura 11: Medio agar blando morfología de las colonias en forma de cometa característica del tipo capsular difuso

Cuadro 7: Detección de los serotipos capsulares 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras

Serotipo capsular	Número	%
5	2	6.06%
8	2	6.06%
NT*	25	75.75%
NT**	4	12.12%
Total de aislamientos de <i>S.aureus</i>	33	100%

NT*: No Tipificables serotipo capsular 336 (serotipo capsular 5 y 8, descrito por Han y col, (2000)

NT**: No Tipificables

Cuadro 8: Detección genotípica de la cápsula por medio de la identificación de los genes *Cap5* y *Cap8* por PCR

Genotipo capsular	Número	%
5	2	6.06
8	2	6.06
NT	29	88.0
Total de aislamientos de <i>S.aureus</i>	33	100

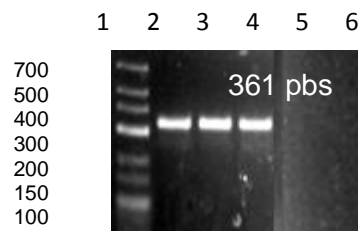


Figura 12. Amplificación de Cápsula 5. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: control positivo *Cap5* (ATTCC 25904 tipo capsular 5); carril 3: muestra Sa 11b, carril 4: muestra Sa 11c, carril 5: muestra Sa 12d y carril 6: control negativo (*S. aureus* ATTCC 10832).



Figura 13. Amplificación de Cápsula 8. Carril 1: Marcador de Peso molecular; carril 2: control positivo *Cap8* (ATCC 49525); carril 3: muestra Sa12d, carril 4: muestra Sa11b, carril 5: control negativo (*S. aureus* ATCC 10832).

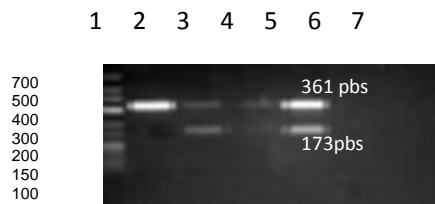


Figura 14. Amplificación de Cápsula NT (serotipo 5 y 8)336: control positivo *Cap5* (ATCC 25904 tipo capsular 5); carril 3: muestra Sa 15b , carril 4: muestra Sa 16a, carril 5: muestra Sa 17c , carril 6: muestra Sa 12d , carril 7: control negativo (*S. aureus* ATCC 10832).

Cuadro 9: Cuadro comparativo entre los serotipos detectados por serología y por PCR

	Fenotipos capsulares Serotipos		Genotipos capsulares <i>Cap</i>	
	Número	%	Número	%
5	2	6.0	2	6.06
8	2	6.0	2	6.06
5 y 8	25	75.75	29	88.0
NT	4	12.12	0	0
Total	33	100%	33	100%

Cuadro 10: Distribución de la sobrevivencia intracelular *in vitro* de *S. aureus* serotipos capsulares 5 y 8 en placa

Intervalo De Sobrevivencia	Serotipo capsular 5	Serotipo capsular 8	NT
8.6 – 10.6			11
10.7 – 12.7		2	8
12.8 – 14.8	1		1
14.9 – 16.9			0
17.0 – 19.0	1		1
19.1 – 21.1			3
21.2 – 23.2			2
23.3 – 25.3			1
25.4 – 27.4			0
27.5 – 29.5			1
29.6 – 31.6			1
Total	2	2	29

n 33 aislamientos

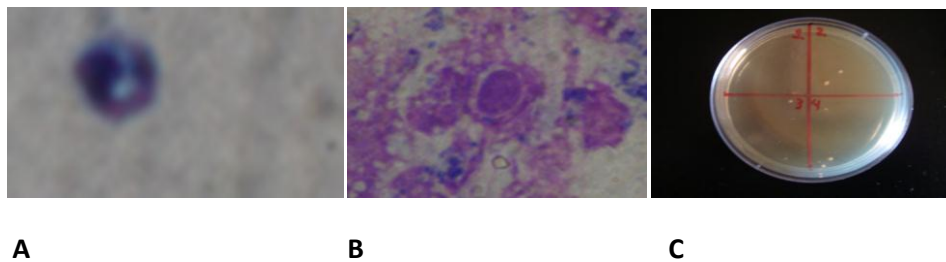
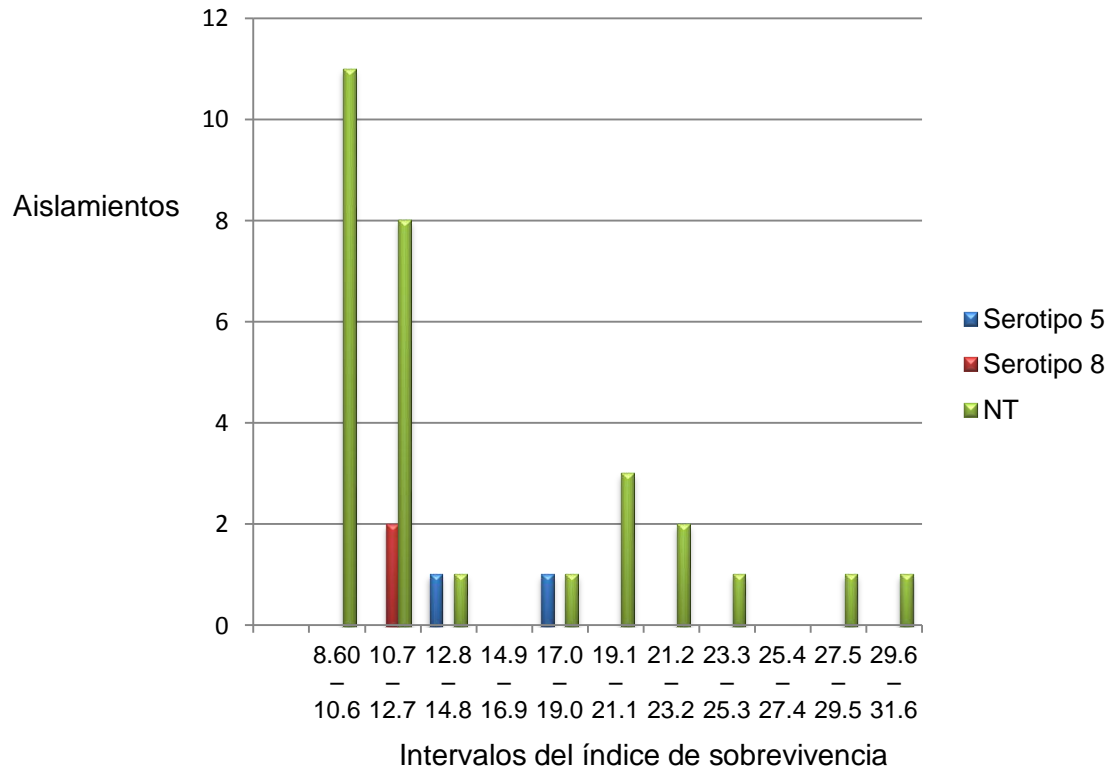


Figura 15: Ensayo de fagocitosis y sobrevivencia intracelular en placa. **A** . Fagocitosis del *S.aures* por un neutrófilo. **B**. Lisis de Neutrófilos. **C**. Sobrevivencia de *S.aureus*, crecimiento en placa.

Figura 16: Distribución de la sobrevivencia intracelular *in vitro* de *S. aureus* serotipos capsulares 5 y 8 en placa



Cuadro 11: Índice de Sobrevivencia intracelular *in vitro* en neutrófilos de los serotipos capsulare 5, 8, 5 y 8 de *S. aureus* por epifluorescencia

Bacterias fagocitadas	Número de <i>S. aureus</i> fagocitado					
	Serotipo capsular 5 ^A		Serotipo capsular 8 ^B		Serotipo capsular NT ^C	
	No.	%	No.	%	No.	%
Vivas	437	43.39	288	44.72	320	41.99
Muertas	570	56.60	356	53.61	442	58.00
Total	1007	100	644	100	762	100

A=n2 *Cap5*; B=n2 *Cap8*; C= n29, NT (5 y 8)[336*]

*Serotipo capsular 336 (Han *et al.*, 2000)

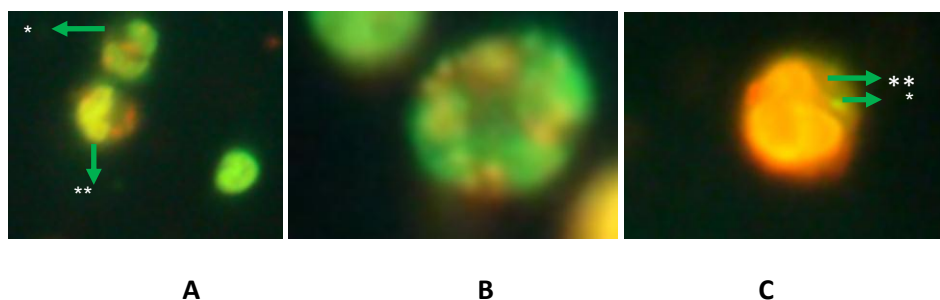


Figura 17: Índice de fagocitosis por epifluorescencia. **A** y **B**. Neutrófilos vivos fagocitando *S. aureus* bacterias vivas color verde* y bacterias muertas color naranja**. **C**. Neutrófilo muerto fagocitando *S. aureus* bacterias vivas color verde* y bacterias muertas color naranja**.

2144596245103992 Distribution of Staphylococcus aureus capsular serotypes 5 and 8 i... Página 1 de 1

2144596245103992 Distribution of Staphylococcus aureus capsular serotypes 5 and 8 in family dairy herds from municipal regions of Toluca Valley, Mexico.

Irish Veterinary Journal Editorial [editorial@irishvetjournal.org]

Enviado el: miércoles, 24 de julio de 2013 10:49 p.m.

Para: Valente Velázquez Ordoñez

CC: Ana María de Jesús García-Gama [gamaana15@yahoo.com.mx]; Benjamin Valladares-Carranza [bervac2004@yahoo.com.mx]; Alonso Fresco María Urua; Felix Salazar-García [folsag64@yahoo.com.mx]; Salvador Lagunas Bernabe; Alberto Barbabosa-Pilego [albarbosa@yahoo.com.mx]; Valente Velázquez Ordoñez

Article title: Distribution of Staphylococcus aureus capsular serotypes 5 and 8 in family dairy herds from municipal regions of Toluca Valley, Mexico.

MS ID : 2144596245103992

Authors : Ana María de Jesús García-Gama, Benjamin Valladares-Carranza, María Urua Alonso-Fresco, Felix Salazar-García, Salvador Lagunas-Bernabe, Alberto Barbabosa-Pilego and Valente Velázquez-Ordoñez

Journal : Irish Veterinary Journal

Dear Dr Velázquez-Ordoñez

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.irishvetjournal.org/imedia/2144596245103992_article.pdf (1130K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.irishvetjournal.org/imedia/1691688212103992_corment.pdf

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within 6 weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@irishvetjournal.org. We would also welcome feedback about the online submission process, which can be sent to info@biomedcentral.com.

Best wishes,

The Irish Veterinary Journal Editorial Team

e-mail: editorial@irishvetjournal.org

Web: <http://www.irishvetjournal.org/>

Distribution of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes 5 and 8 in family dairy herds from municipal regions of Toluca Valley, Mexico.

Ana María de Jesús García-Gama^{1*}, Benjamín Valladares-Carranza^{1*}, María Uxúa Alonso-Fresán^{1*}, Félix Salazar-García^{2*}, Salvador Lagunas-Bernabé^{1*}, Alberto Barbabosa-Pliego^{1*}, Valente Velázquez-Ordoñez^{1§}

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Km 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. C.P. 50200

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. El Cerrillo, Piedras Blancas. ZC 50090

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses:

AMGG: gamaana15@yahoo.com.mx

BVC: benvac2004@yahoo.com.mx

MUAF: muaf@uaemex.mx

FSG: felixsg64@yahoo.com.mx

SLB: slagunasb@uaemex.mx

ABP: abarbabosa@yahoo.com.mx

VVO: vvo@uaemex.mx

Abstract

Background:

Staphylococcus aureus which express 5 and 8 exopolysaccharides are considered the most virulent and frequent in dairy cows' mastitis. To determine their distribution in Toluca Valley, 322 milk samples were taken from 23 family dairy herds in the following municipalities: Almoloya de Juárez, Zinacantepec, Temoya, Toluca and Lerma. *Staphylococcus aureus* isolation and identification were undertaken using routine bacteriological procedures. Capsular expression was obtained in Columbia agar supplemented with 2.0% NaCl and capsule was identified using Hiss stain. Capsular type was determined in soft agar supplemented with 10% milk whey. Capsular serotypes 5 and 8 were identified by plate seroagglutination using policlonal rabbit antisera. *Cap5* and *Cap8* gene expression was confirmed by PCR.

Results:

All isolations expressed diffuse capsule. By seroagglutination, 63.33% were identified as capsular serotype 5 and 22.22% as 8. 14.44% could not be typified by this method. Serotype capsular distribution within the herds was similar ($p>0.05$). Both capsular serotypes were confirmed by PCR.

Conclusion:

S. aureus 5 and 8 capsular serotype identification in dairy cows have clinical importance in mammary gland infection persistence and may establish a possible risk regarding veterinary public health.

Key words: *Staphylococcus aureus*, capsule, capsular serotypes 5 and 8, dairy cows, family dairy herds

Background:

Mastitis caused by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a disease which affects dairy production by altering the physicochemical properties and somatic cell count of milk as well as its nutritional quality and safety (1). *S. aureus* is a contagious pathogen of economic and sanitary importance in worldwide dairy herds (2). Its transmission within cows in herds is given through inadequate management and poor hygiene practices during milking, which favours the infection cycle cow-human-cow (3). Herd infection level may

increase *S. aureus* dissemination with possible risk for human health, through non pasteurized milk and dairy products consumption (4).

The persistence of intraglandular mammary infection contributes to the severity of the clinical cases of mastitis due to several pathogen's virulence factors (5,6). Their expression suggests the possibility of geographical variation in *S. aureus* patotype distribution (7), thus contributing to the risk in cross infection among animals and humans (8,9).

S. aureus capsule is a virulence factor that increases its hydrophilic capacity interfering with neutrophil phagocytosis (10, 11). It also decreases complement activation. In addition, there are low IgG₂ levels in milk in the course of the infection (12, 13, 14).

The exopolysaccharide from the capsule contains glycoproteins and polysaccharides including polyalcohols and aminocarbohydrates (15). Eleven capsular serotypes have been identified according to their polysaccharide composition, from which serotypes 5 and 8 have been identified in animals and humans (16, 17, 18). Due to the capsule importance regarding neutrophil *in vitro* phagocytosis, as well as *S. aureus* infection persistence in mammary gland, it is necessary to identify these two capsular serotypes in cows suffering subclinical mastitis in family dairy herds in Toluca Valley municipalities.

Methods

Samples

Using a random stratified sampling method, a dairy cow population was studied, from which 322 milk samples were obtained from 23 herds located in the central region of the State of Mexico in the following Toluca Valley municipalities: Almoloya de Juárez, Zinacantepec, Temoya, Toluca and Lerma. The cows were sampled during milking and had different ages and lactation periods. Inclusion criteria were: cows from smallholders (1 to 15 cows), in the milking period, with no evident clinical signs of mastitis and a positive reaction to California mastitis test (18).

Teats were disinfected using cotton balls and 70% ethylic alcohol, and 25 ml of milk were manually drained in sterilized plastic tubes and preserved at 4°C for transportation and later bacteriological analysis (19).

Bacteriological procedures and plate seroagglutination test

Bacteriological isolations were obtained by inoculating 0.010 ml of milk on blood agar and manitol salt agar and incubated at 37°C during 18 to 24 h. Colony forming units (CFU) were identified by observing the type of hemolysis on blood agar and the yellow or white colour of the CFU in manitol salt agar. The following tests were performed: Gram stain characteristics, catalase activity tube test for coagulase using human/bovine plasma, Voges Proskauer and nitrate broth testing, anaerobic fermentation of manitol and aerobic fermentation of maltose (20, 21, 22). *S. aureus* ATCC25923 and *S. epidermidis* ATCC12228 were used as bacteriological controls.

Capsule expression was observed by inoculating *S. aureus* isolations in Columbia agar supplemented with 2.0% NaCl (23). CFU were stained using Hiss to observe the capsule in clear field optic microscopy (100X) (24). Capsular type (compact or diffuse) was identified in soft agar (brain and heart broth with 3% bacteriological agar and supplemented with 10% whey milk), incubated at 37°C for 18 to 24 h (25). Every *S. aureus* isolation was tested by plate seroagglutination using policlonal rabbit antisera, obtained in New Zealand rabbits by inoculating ATCC 25904 capsular type 5, ATTCC 49525 capsular type 8 and non capsular *S. aureus* ATTCC 10832. These were used as test controls (16). Laboratory animals were treated under institutional bioethics and animal welfare criteria in correspondance to NOM-062-ZOO-1999 (26).

PCR

Cap5 y *Cap8* genes were identified by polimerase chain reaction (PCR) according to Verdier (2007). *Cap5* initiators were: k1(5-GTCAAAGATT ATGTGATGCTACTGAG-3) and *Cap5* k2 (5-ACTTCGAATATAAACTTG AATCAATGTTATACAG-3) [GenBank:FR712927.1] for capsular type 5 and for capsular type 8 *Cap8* k1 (5-GCCTTATGTTAGGTGATAAACC-3) and *Cap8* k2 (5-GGAAAAACACTATCATAGCAGG-3) [GenBank:CP003194.1] located in genes *Cap5* and *Cap8* respectively, obtaining the amplification products of 361 bp for *Cap5* and 173 bp for *Cap8* (12). PCR amplification reaction mixture (25 µl) contained 1.0 µl of F and R initiators, (10 pmol/µl), 1.0 µl of deoxinucleotide triphosphates or dNTPs (10 mmol/l), 5 µl of taq polimerase buffer (Go taq Promega®), 2.5 µl of MgCl₂ (25 mmol/µL Promega®), 0.25 µl of taq polimerase (5 U/µl Go taq Promega®), 11.25 µl of nuclease free water (Promega®) and 3 µl of DNA (25 ng).

DNA nuclear amplification was performed in a thermocycler (Lab-Net, USA®) under the following conditions: an initial denaturalization for 5 min at 94°C, 30 cycles for 30 seconds for denaturalization at 94°C, 30 seconds for elongation at 55°C and 1 min for extension at 72°C, with a final step at 72°C during 5 min. PCR products were analysed in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma®, France) in an electrophoretic chamber at 77 V for 90 min (Bio-Rad, USA®). A low molecular range weight marker of 25 to 700 bp was used (Fermentas®, USA). Control strains ATCC 25904 capsular type 5, ATTCC 49525 capsular type 8 and non capsular *S. aureus* ATCC 10832 were run. PCR products for genes *Cap5* and *Cap8* in *S. aureus* isolations corresponded to those described by Verdier (2007).

Statistical analysis

Results were analyzed by descriptive statistics using frequency tables and graphs. Capsular type frequencies and municipal distribution were compared using the hypothesis proportion test (26).

Results

Ninety *S. aureus* isolations and a positivity rate of 27.95% were obtained in family dairy herds in different municipalities located in Toluca Valley. All isolations expressed diffuse capsule in Columbia agar, confirmed by Hiss stain. No compact capsule was found.

63.33% (57/90) isolations were positive to serotype 5, 22.22% (20/90) to serotype 8 and 14.44% (13/90) could not be typed by seroagglutination ($P < 0.05$). A similar municipality distribution for both capsular types was found ($P > 0.005$). In Almoloya de Juárez region a high prevalence of capsular seotypes was found (31.11% for serotype 5 and 4.4% for serotype 8). In Toluca municipality, 1.75% *S. aureus* serotype 5 was found with absence of serotype 8 (Table 1).

By using PCR, 85.56% (77/90) of *S. aureus* isolations were typified. Example amplicon PCR products can be observed for *Cap5* gene (361 bp) in isolations Sa135, Sa 177, Sa 211, Sa 264, Sa 298 (Figure 1) and for *Cap8* gene (173 bp) in isolations Sa 128, Sa 227, Sa 258, Sa 275, Sa 286 (Figure 2).

Discussion

In this study, *S. aureus* infection prevalence in family dairy herds municipalities was 27.95%. This finding has a coincidence with studies in dairy cows from Northern Africa, with an *S. aureus* infection rate of 40%, in Sudan 50% and in Sweden less than 30% (28). Many studies point out the fact that *S. aureus* infection in mammary gland produces a considerable reduction in milk production and severe deterioration in mammary gland tissue due to chronic infection (29). Studies in some countries indicate a possible elimination of mammary gland infection by implementing prevention and control programmes against *S. aureus* (30, 31).

The prevalence of the agent seriously compromises mammary gland health as well as dairy herd productivity (32). *S. aureus* mastitis sets up a possible veterinary public health risk, due to non pasteurized milk and dairy product contamination (33). In the Mexican central plateau, the predominant dairy system is based on family dairy herds, which contributes to regional sustainability and socioeconomic development (34). These generally undergo deficient management and hygiene conditions (35). In the dairy herds in the Toluca Valley, sanitary risk conditions were identified which favour subclinical mastitis in the cows, thus affecting the quality and food safety of the milk. In this study by Manjarrez *et al.* (2012) *S. aureus* biotypes A, C and E were determined, suggesting the possibility of human-cow cross infection in family dairy herds in the central region of Mexico (36).

S. aureus capsular types 5 and 8 in this study were related to diffuse capsule (25). The capsule in *S. aureus* increases the intracellular survival in neutrophil phagocytosis, by evading immune response (15).

These serotypes were predominant in the sampled herds, demonstrating the importance of mammary gland infection in dairy cows. The frequency of serotypes 5 and 8 in this study differs from the reported in France for example, in which 70% of the strains were classified as such (12). Sompolinsky (1985) in Israel denotes 17% of strains typed as 5 and 8 in isolations from bovine mastitis (17). In Norway (2000) 95% of the isolations were type 8, meanwhile in the United States 42% were positive to both serotypes (37,38). The same year in Argentina in 22 different regions, only 14% were classified in both serotypes (39).

Verdier (2007) found that 42% of the isolations were serotype 5, 45% serotype 8 and 13% could not be typed (13). A similar situation was found in this study in which 14% of the strains could not be typed as well.

PCR in the study allowed the identification of *Cap5* and *Cap8* genes confirming the serotype results using policlonal anticapsular antisera 5 and 8 (13, 16).

It is possible that *S. aureus* isolations from dairy cows in family production units may carry other virulence factors that could compromise animal and man health (40, 41).

Conclusion

In Toluca Valley, subclinical mastitis caused by *S. aureus* capsular types 5 and 8 prevails, phenotypically and genotypically tested. Therefore, this pathogen is considered important for mammary gland health in family dairy herds.

Competing interests:

The authors declare no competing interests.

Authors' contributions:

AMGG carried out the sampling and bacteriological procedures, BVC carried out the seroagglutination tests, MUAF participated in drafting and critically revising the intellectual content of the manuscript, FSG participated in the design of the study and performed the statistical analysis, SLB participated in the standarization of bacteriological procedures, ABP participated in conducting the PCR tests, VVO concieved the study, participated in its design and coordination, helped to draft the manuscript and critically revisint the intellectual content of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for scholarship number 391968 given to obtain the Masters' degree in Posgrado de Ciencias Agropecuarias y Recursos

Naturales in Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

This study was undertaken with partial fundings for Fortalecimiento de Cuerpos Académicos 2010 (cuerpo académico en Salud Animal) from SEP PROMEP in the research project: “Caracterización genotípica de *Staphylococcus aureus* de tipo capsular en aislamientos obtenidos de htos lecheros de producción familiar del Valle de Toluca”, and fundings from Universidad Autónoma del Estado de México in the research project: “Variación genética de aislamientos de *S. aureus* MRSA obtenidos de vacas lecheras en unidades de producción familiar”, ID 2582.

To the dairy smallholders which contributed in the study and the personnel from Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

References

1. More SJ. **Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry.** *Ir Vet J* 2009, **62**:5-14.
2. Aarestrup FM, Dangler CA, Sordillo LM. **Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis.** *Can J Vet Res* 1995, **59**:124-128.
3. Velázquez-Ordoñez V, Pescador-Salas N, Saltijeral-Oaxaca J, Gorodezky-Laufferman C. **Epidemiología, prevención y control de la mastitis por *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras.** In *Enfermedades de importancia económica en Producción Animal*. 1st edition. Edited by Roger Iván Rodríguez Vivas. Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 2005: 355-377.
4. Velázquez-Ordoñez V, Valladares-Carranza B, Gutiérrez-Castillo AC Talavera-Rojas M, Pescador-Salas N, Valdés RS. **Milk production and Safety Food.** In *Nutritional Insights and Food Safety*. 1st edition. Edited by Jaroslava Švarc-Gajić. USA: Nova Science Publishers; 2011: 335-359.
5. Boutonnier A, Nato F, Bouvet A, Lebrun L, Audurier D, Fournier JM. **Direct Testing of Blood Cultures for Detection of the Serotype 5 and 8 Capsular Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Microbiol* 1989, **27**:989-993.

6. Risley AL, Loughman A, Cywes-Bentley C, Foster TJ, Lee JC. **Capsular Polysaccharide Masks Clumping Factor A-Mediated Adherence of *Staphylococcus aureus* to Fibrinogen and Platelets.** *J Infect Dis* 2007, **196**:919–927.
7. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. **Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-Activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:4060–4067.
8. Buzzola FR, Quelle MI, Gomez M, Catalano L, Steele-Moore D, Berg E, Gentilini G, Denamiel DO, Sordelli FALTA. **Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina.** *Epidemiol Infect* 2001, **126**:445-452.
9. Kerro Dego O, Van Dijk JE, Nederbragt H. **Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: A review.** *Vet Quarterly* 2002, **24**:181-198.
10. Guidry AJ, Bernin LM, Hambleton C.N. **Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes.** *J Dairy Sci* 1994, **76**:1285-1289.
11. Guidry AJ, O'Brien CN, Oliver SP, Dowlwn HH, Douglass LW. **Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule.** *J Dairy Sci* 1994 **77**:2965-2974.
12. Poutrel B, Gilbert FB, Lebrun M. **Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1995, **2**:166–171.
13. Verdier I, Durand G, Bes M, Taylor KL, Lina G, Vandenesch F, Fattom AI, Etienne J. **Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:725-729.
14. Nickerson SC. **Immune mechanisms of the bovine udder: An overview.** *J Am Vet Med Assoc* 1985, **187**:41-45.
15. O' Riordan K, Lee JC. ***Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides.** *J Clin Microbiol Reviews* 2004, **17**:218–234

16. Karakawa WW, Fournier JM, Vann WF, Schneerson RS, Robbins JB. **Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Microbiol* 1985, **22**:445-447.
17. Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa W, Vann WF, Schneerson MZ. **Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types.** *J Clin Microbiol* 1985, **22**:828-834.
18. Blowey RP, Edmonson P. *Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche: Guía práctica ilustrada.* Zaragoza, España: Editorial Acribia; 1995.
19. NMS. National Mastitis Council. *Laboratory handbook on Bovine Mastitis.* Madison, USA: National Mastitis Council Inc; 2005.
20. Cohen G. *Microbiología y Biología molecular.* Barcelona, España: Colección Métodos; 1977.
21. Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. **Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:767-771.
22. Cottral GE. *Manual de métodos estandarizados en microbiología veterinaria.* México: Prensa Médica Mexicana; 1978.
23. Watts AK, Wang QP, Nicholson-Weller A, Lee JC. ***Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence.** *Infect and immun* 2005, **73**:3502–3511.
24. Hanson HP: **Contribution to the physiological differentiation of pneumococcus and streptococcus, and to methods of staining capsules.** *J Exp Med* 1905, **6**:317-345.
25. Sutra L, Rainard P, Poutrel B. **Phagocytosis of Mastitis Isolates of *Staphylococcus aureus* and Expression of Type 5 Capsular Polysaccharide Are Influenced by Growth in the Presence of Milk.** *J Clin Microbiol* 1990, **28**:2253-2258.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.* México; 6 de Diciembre de 1999. NOM-062-ZOO-1999.

27. Steel RGD, Torrie JH. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. México: McGraw-Hill; 1990.
28. Saidi R, Khelef D, Kaidi R. (2013): **Subclinical mastitis in cattle in Algeria: Frequency of occurrence and bacteriological isolates**. *J S Afr Vet Assoc*. <http://dx.doi.org/10.4102/jsava.v84i1.929>
29. Zecconi AR, Piccinini R, Fox LK. **Epidemiological study of non-contagious intramammary infections in nine commercial dairy herds following a *Staphylococcus aureus* control programme**. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004, **51**:333-336.
30. Giannechini B, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno JL. **Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay**. *Acta vet Scand* 2002; **43**:221-230.
31. Zadoks RN, Fitzpatrick JL. **Changing trends in mastitis**. *Ir Vet J* 2009, **62**:59-70.
32. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. **Production effects related to mastitis economics in dairy cattle herds**. *J Vet Res* 2003, **34**:475-491.
33. FIRA. Fideicomisos Instituidos en Relación a la Agricultura. Oportunidades de desarrollo de la leche en México. *Boletín informativo*. No. 294. Vol. XXIX. México; 1997.
34. Bernal ML, Rojas GM, Vázquez FC, Espinoza OA, Estrada FJ, Castelán OO. **Determinación de la calidad físico-química de la leche cruda producida en sistemas campesinos en dos regiones del estado de México**. *Vet Mex* 2007, **38**:395-407.
35. Kelly PT, O'Sullivan K, Berry DP, More SJ, Meaney WJ, O'Callaghan EJ, O'Brien B. **Farm management factors associated with bulk tank somatic cell count in Irish dairy herds**. *Ir Vet J* 2009, **62**:45-51
36. Manjarrez-López AM, Díaz-Zarco S, Salazar-García F, Valladares-Carranza B, Gutiérrez-Castillo AC, Barbabosa-Pliego A, Talavera-Rojas M, Alonso-Fresán MU, Velázquez-Ordoñez V. ***Staphylococcus aureus* biotypes in cows presenting subclinical mastitis from family dairy herds in the Central-Eastern State of Mexico**. *Rev Mex Cienc Pecu* 2012, **3**:265-274.

37. Tollersrud T, Kenny K, Caugant DA, Lund A. **Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway.** *APMIS* 2000, **108**:565-572.
38. Tollersrud T, Kenny K, Reitz AJ, Lee JC. **Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:2998-3003.
39. Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T. **Capsule Expression by Bovine Isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: Genetic and Epidemiologic Analyses.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:846–850.
40. Oliveira L, Rodrigues AC, Hulland C, Ruegg PL. **Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* recovered from milk of cows with subclinical mastitis.** *Am J Vet Res* 2011, **72**:1361-1368.
41. Smith K, Gould KA, Ramage G, Gemmell CG, Lang S. **Influence of Tigecycline on Expression of Virulence Factors in Biofilm-Associated Cells of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**:380–387.

Table 1. *Staphylococcus aureus* isolation proportions of capsular serotypes 5 and 8 in cow milk in different municipal regions from Toluca Valley.

Municipal región	Cows n	<i>S. aureus</i> isolations n	Capsular serotypes								
			C5		C8		Non typed				
			n	DE	n	DE	n	DE			
Almoloya de Juárez	153	35	28	0.18 ^{ns}	4.75	4	0.026 ^{ns}	1.71	3	0.01 ^{ns}	1.23
Temoaya	77	21	12	0.15 ^{ns}	3.13	5	0.064 ^{ns}	2.14	4	0.05 ^{ns}	1.91
Lerma	49	18	8	0.16 ^{ns}	2.56	7	0.140 ^{ns}	2.42	3	0.06 ^{ns}	1.66
Zinacantepec	28	12	8	0.28 ^{ns}	2.30	4	0.140 ^{ns}	1.83	0	0.00	0.00
Toluca	15	4	1	0.06 ^{ns}	0.90	0	0.000	0.00	3	0.20 ^{ns}	1.50
Total	322	90 (0.28)	57	0.177 ^a	6.85	20	0.062 ^a	4.30	13	0.04 ^a	3.52

ns= Proportion per region does not differ from general proportion according to capsular serotype (column $p > 0.05$)

a= Equal letters in rows mean no difference in proportion in between capsular serotypes ($p > 0.05$)

Figure 1.- PCR *Cap5* gene identification.

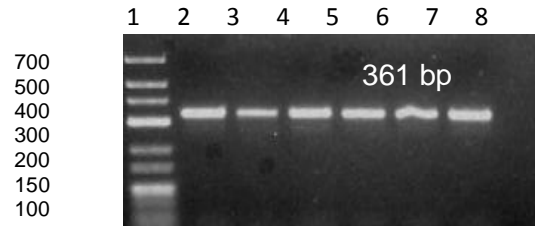


Figure 1. Capsule 5 amplification. Lane 1: Molecular weight marker; lane 2: *Cap5* positive control (*S. aureus* ATCC 25904 capsular type 5); lanes 3-7: samples.

Lane 3: Sa 135, lane 4: Sa 177, lane 5: Sa 211, lane 6: Sa 264, lane 7: Sa 298 and lane 8: negative control (*S. aureus* ATCC 10832).

Figure 2.- PCR *Cap8* gene identification.

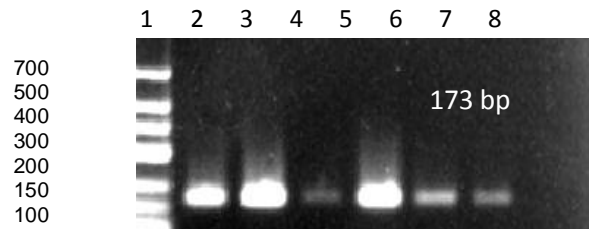


Figure 2. Capsule 8 amplification. Lane 1: Molecular weight marker; lane 2: *Cap8* positive control (*S. aureus* ATCC 49525); lanes 3-7: samples.

Lane 3: Sa128, lane 4: Sa227, lane 5: Sa258, lane 6: Sa275, lane 7 Sa286 and lane 8: negative control (*S. aureus* ATCC 10832).



M.C. ANA MARIA DE JESUS GARCIA GAMA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO
P R E S E N T E

Estimado(a) M.C. Ana María de Jesús García Gama:

Por este medio me permito informarle que su trabajo titulado "Identificación del fenotipo y genotipo capsular 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* y su capacidad de sobrevivencia intracelular en neutrófilos de vacas lecheras" fue ACEPTADO para participar en la modalidad PONENCIA dentro del Tercer Congreso Internacional "La Investigación en el Posgrado" que se llevará a cabo los días 17, 18 y 19 de Octubre del presente año en la Unidad de Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Le informamos que se ofrecerán talleres sin costo con cupo limitado, por lo que le sugerimos estar al pendiente para que pueda registrarse con tiempo. Los talleres son:

- Redacción Científica
- Estrategias Docentes
- Investigación Cualitativa
- Uso y Manejo del SPSS en la investigación Científica

Sin más por el momento me despido de usted, aprovechando la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, 30 de Agosto de 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando Jaramillo Juárez', written over a horizontal line.

DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ
DIRECTOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

De: website@reunionesnacionales.org.mx [website@reunionesnacionales.org.mx]

Enviado el: viernes, 13 de julio de 2012 08:47 p.m.

Para: Valente Velázquez Ordoñez

CC: reneria.jose@reunionesnacionales.org.mx; fernandez.salvador@reunionesnacionales.org.mx

Asunto: Confirmación de envío de resumen a las Reuniones Nacionales 2012 (1008)

Confirmación de Envío de Resumen a las Reuniones Nacionales 2012 (1008)

Se ha recibido el archivo del resumen y ha sido registrado en nuestra base de datos con la siguiente información:

Folio: 1008

Archivo: PqGarciaGA2.docx

Bytes: 19907

Título: IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS CAPSULARES 5 Y 8 DE *Staphylococcus aureus* POR PCR Y AGLUTINACIÓN EN PLACA EN AISLAMIENTO

Sub-Sector: P) Pecuario

Sección: q) Salud Animal, diagnóstico, control y epidemiología

Presentación: Oral

Autores:

Dr. Valente Velázquez Ordoñez

MVZ Ana María de Jesús García Gama

Dr. Alberto Barbabosa Pliego

M en SA benjamin Valladares Carranza

Dra. María Òxua Alonso Fresán

MVZ José Antonio Zepeda

Nombre: Valente Velázquez Ordoñez

Estado: Estado de México

Institución: Centro de Investigación en Estudios Avanzados en Salud Animal

Correo: vvo@uaemex.mx

Confirmar:

El siguiente enlace sirve para descargar el archivo desde la base de datos.

http://www.reunionesnacionales.org.mx/2012/resumen_envio.php?accion=resumen&uid=ec895e0185beec50ba45010e8dbd995e

DISCUSIÓN

La mastitis por *S. aureus* constituye un riesgo a la salud pública, al afectar la inocuidad de la leche, por la contaminación de la leche y sus derivados no pasteurizados, siendo una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero (Seegers *et al.*, 2003; Kelly *et al.* 2009). Afecta la industria lechera ocasionando pérdidas económicas importantes a todos los productores de leche en el mundo, perdiéndose de un 10 a un 25 % de la producción total dependiendo el grado de inflamación (Bedolla y Ponce de León, 2008; Han *et al.*, 2000a).

El nivel de infección de *S. aureus* en la unidad de producción lechera estudiada se consideró alta, comprometiendo la salud de la glándula mamaria y la productividad del hato lechero, generando pérdidas económicas importantes y riesgos a la salud animal e inocuidad alimentaria de la leche (Giannechini *et al.*, 2002).

El nivel de infección por *S. aureus* correspondió al que existe en otros países del mundo, concordando con las frecuencias establecidas en estudios realizados en poblaciones de vacas lecheras en el Norte de África que indican una frecuencia de infección *S. aureus* del 40%, en Sudán del 50% contrastando con la reportada en Suecia que reporta una tasa de infección por *S. aureus* menor al 30% (Saidi *et al.*, 2013). La mayoría de estudios coinciden en señalar que debido a la infección por *S. aureus* en la glándula mamaria se produce una reducción considerable de la producción láctea y severo deterioro a la salud de glándula mamaria, debido a la cronicidad de la infección glandular (Gilot *et al.*, 2002), emergiendo la urgente necesidad de implementar programas de prevención y control de la mastitis (Velázquez *et al.*, 2005).

En México un estudio reciente reportó el 23.04% de mastitis subclínica por *S. aureus*, un poco menor a lo que se obtuvo en este estudio, la infección por *S. aureus* biotipos A, C y E, indica la posibilidad de una infección cruzada hombre-vaca, en los hatos lecheros de producción familiar en la región centro del Estado de México (Manjarrez *et al.*, 2012), lo que sugiere que puede favorecer una infección cruzada hombre-vaca, de acuerdo con diversos estudios que sugieren que la transferencia de *S. aureus* entre humanos y vacas

puede ser posible al indicar que el hombre es una fuente potencial de *S. aureus* para la ocurrencia de IIM en el ganado lechero (Velázquez *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que el mal ordeño, manual y mecánico, además de la mala higiene contribuyen significativamente al desarrollo de IIM por *S. aureus* y otros agentes de importancia clínica en la mastitis (Ávila y Gutiérrez, 2002), no existir una terapia al momento del secado aumenta la posibilidad de infección por *S. aureus*, en este momento la glándula mamaria puede actuar como reservorio y es fuente de infección para las demás vacas (Roberson *et al.*, 199). La contaminación de la leche puede ocurrir a través de los microorganismos presentes en la glándula mamaria y la contaminación de los utensilios y equipo de ordeño (Fagundes y Fernández, 2004).

La infección por *S. aureus* aumenta el riesgo epidemiológico afecta la salud pública y la inocuidad alimentaria, además de representar una fuente posible de infección y diseminación de *S. aureus* entre los animales y humanos debido a los factores de virulencia del agente, causante de intoxicaciones alimentarias en todo el mundo (Jaramillo, 1999; Dinges *et al.* 2000; Dosagne *et al.*, 2000; Tollersrud *et al.*, 2000). La leche favorece el crecimiento de *S. aureus* y la producción de enterotoxinas que conserva su actividad biológica incluso después de la pasteurización (Dosagne *et al.*, 2000)

La enterotoxina afecta principalmente a niños, mujeres embarazadas y ancianos. El *S. aureus* se manifiesta pocas horas después del consumo y el cuadro clínico es severo, propiciado por la insalubre manipulación de alimentos como carnes, embutidos y lácteos por parte del personal en fábricas, guarderías, negocios de alimentos son factores de riesgo para la diseminación del agente (Mejía *et al.*, 2009).

En México, la red hospitalaria de vigilancia epidemiológica notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre el 5 y 70 % y que los porcentajes de mortalidad atribuibles pueden ser elevados (50%). En el periodo 1997-2003 este patógeno ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto en mortalidad. Una revisión retrospectiva de 23 años, sobre las infecciones intrahospitalarias en un hospital pediátrico en Guadalajara, México, reconoce que actualmente *S. aureus* tiene una prevalencia de 36 % en esas infecciones (Velázquez, 2005).

El efecto alto de infección por *S. aureus* en el hato lechero estudiado de producción, tiene un resultado negativo sobre la producción lechera. Al haber un CCS elevado en leche, incrementa los costos individuales de producción, al disminuir la curva de lactancia. La producción total de leche se reduce entre 0.7 y 9% relacionado con una ligera elevación del CCS. Pérdidas económicas mayores se producen con un CCS elevado, contrastando con la presencia de la MC que provoca pérdidas entre el 40 y 60 % del volumen total de la leche. El control de la MSC en el ganado mejora la eficiencia productiva del hato lechero hasta en un 35% dependiendo de su prevalencia, en contraste el desecho de vacas infectadas crónicamente mejora solamente la productividad entre el 4.9 y 7.4% (Allore y Jones, 1995).

Estudios realizados en Italia, indican que es posible la eliminación de la infección glandular mamaria, al instrumentar programas de prevención y control para el *S. aureus* (Zecconi *et al.*, 2004).

La persistencia de la IIM por *S. aureus* y la severidad en los cuadros clínicos de mastitis, se relaciona con la patogenicidad del agente, sugiriendo una variación en la distribución geográfica de los patotipos de *S. aureus* asociada a un factor de virulencia (Zadoks *et al.*, 2009; Risley *et al.*, 2007), los cuales contribuyen al riesgo de transmisión de cepas de *S. aureus* de origen entre la población animal y humana (Buzzola *et al.*, 2001; Kerro *et al.*, 2002).

La presencia de cápsula en el *S. aureus*, aumenta la sobrevivencia intracelular en la fagocitosis por neutrófilos, evadiendo la respuesta inmune (O' Riordan y Lee., 2004).

La presencia de la cápsula de polisacáridos en *S. aureus* en los aislamientos de la unidad de producción lechera estudiada fue evidenciada a través de la observación de las UFC en el medio de Columbia y la tinción de Hiss (Watts *et al.*, 2005).

La expresión de cápsula en el medio Columbia fue muy favorable ya que todas las cepas expresaron cápsula al confirmarse con la tinción de Hiss, sin embargo (Lattar *et al.*, 2009) menciona que también se expresan favorablemente en el medio de TSA (Agar tripcaseína soya) creciendo en colonias homogéneas.

La tinción de cápsula desarrollada por Hanson y Jr, en 1905, permitió la identificación la cápsula de *S. aureus*, esta tinción también es utilizada en otras bacterias gram positivas y gram negativas, observándose la cápsula de color azul y el cuerpo de la bacteria de color rojo intenso ya que reaccionan con el sulfato de cobre y la violeta de genciana. Existen otras tinciones que permiten observar la cápsula como la de tinta china de color azul y la tinta china de color negro de cápsula las cuales también evidencian la presencia de cápsula, aunque es más difícil de observar debido al choque de carga de la tinta con la bacteria (O' Riordan y Lee, 2004).

El medio agar blando adicionado con 10% de suero de leche favorece la expresión morfológica de las cápsulas, en el presente estudio la morfología de las cápsulas en las vacas lecheras, se observó en mayor número el tipo capsular difuso y en escasa proporción del tipo capsular compacto, las cuales no excluyen la encapsulación (Han *et al.*, 2000b). Sutra y Poutrel, en 1990, en un estudio donde aisló 193 *S. aureus* de vacas, caprinos y ovinos obtuvo el 85% de expresión capsular difusa, resultado muy similar al obtenido en este estudio, Opdebeeck (1988) obtuvo una proporción similar.

La expresión de la morfología capsular 5 y 8 en los aislamientos estudiados está relacionada con el tipo capsular difuso, no hay diferencias en la morfología difusa entre los tipos capsulares 5 y 8, la cápsula está influenciada por factores medioambientales y por las condiciones de crecimiento bacteriano (Sutra y Poutrel, 1990). La conversión de cápsula compacta a difusa es posible debido a que la expresión de la cápsula está influenciada por factores ambientales *in vivo* como *in vitro* incluyendo la anaerobiosis, condiciones alcalinas, la presencia de lactosa y las concentraciones de NaCl en el medio, se ha estudiado en animales como en humanos en medios de rutina (Han *et al.*, 2000b).

El 90% de los aislamientos de *S. aureus* producen cápsula. Se han descrito 11 serotipos capsulares, el 80% de los aislamientos provenientes animales y humanos presentan los serotipos CP5 y CP8 (O' Riordan y Lee., 2004).

Los serotipos CP5 y CP8 fueron identificados por la prueba fenotípica de seroaglutinación en los aislamientos de *S. aureus* obtenidos de las vacas en la unidad de producción estudiada. Los estudios coinciden con la prevalencia de los serotipos capsulares 5 y 8

identificados mediante la prueba de aglutinación en placa, denotando la importancia en la infección de la glándula mamaria de las vacas lecheras. La prueba de seroaglutinación resulta una prueba muy útil para la identificación de los serotipos capsulares de *S. aureus* aislados de leche ya que muestra los factores virulencia de superficie cuya expresión depende de las condiciones de cultivo (Sutra y Poutrel, 1990; Poutrel *et al.*, 1987).

Diversos estudios han demostrado que los serotipos 5 y 8 varían considerablemente en su frecuencia de acuerdo a las distintas zonas geográficas (Kampen *et al.*, 2005); Poutrel, en 1987 obtuvo el 73% (51.4% CP5 y 18%CP8) de serotipos capsulares CP5 y CP8 de 299 aislamientos cabras y bovinos obtenidos de diferentes regiones de Francia. En otro estudio hecho por Poutrel y Sutra, (1993) en animales domésticos el 92% resulto positivo a los serotipos capsulares 5 y 8. En Noruega, Suecia, Islandia, Dinamarca y Finlandia en el año 2000 de 86 aislamientos obtenidos de *S. aureus* de vacas con mastitis subclínica el 95% presentaron serotipo capsular 8, mientras que en Estados Unidos de 362 aislamientos obtenidos de diferentes regiones del país, el 42% fue positivo a los serotipos capsulares 5 y 8 (Tollersrud *et al.* 2000; Tollersrud *et al.* 2000). En Israel en un estudio hecho por Sompolsky, (1985) de 18 aislamientos provenientes de mastitis bovina, el 17% fue tipificable para los serotipos 5 y 8. Naidu en 1991 aisló el 70% de 100 aislamientos bovinos. En Argentina en el año 2000 se evaluaron 195 cepas de *S. aureus* procedentes de vacas con mastitis bovina de 22 regiones del país, se encontró que solo el 14% eran tipificables con antisueros contra el serotipo capsular 5 y 8; mientras que 168 cepas no fueron tipificables (Sordelli *et al.* 2000). De 195 aislamientos de *S. aureus* obtenidos en Francia su distribución de los serotipos capsulares fue 42% del serotipo capsular 5, 45% el serotipo capsular 8 y el 13% de los aislamientos fueron no tipificables (Verdier *et al.*, 2007).

Las cepas que no reaccionan frente a los anticuerpos para los serotipos capsulares 5 y 8, son consideradas como NT. Estudios recientes demostraron que muchas cepas NT pueden tener la capacidad genética para producir los CP (Tollersrud *et al.*, 2000).

En el estudio realizado en algunas cepas no reaccionaron frente a los anticuerpos para los serotipos capsulares 5 y 8, consideradas como no tipificables con el método de serotipificación. El método de PCR permitió la genotipificación de *Cap5* y *Cap8*, que confirmó los hallazgos obtenidos en la serotipificación con el antisuero policlonal

anticapsular 5 y 8 (Verdier *et al.*, 2007; Karakawa *et al.*, 1985) Además se corroboró que las cepas no tipificables por la prueba de aglutinación portaban los genes capsulares 5 y 8.

El método de PCR permitió la genotipificación de *cap5* y *cap8*, del fenotipo capsular 5 y 8. La disparidad entre genotipo-fenotipo podría indicar una restricción en la expresión fenotípica debido a las diferencias entre las condiciones de cultivo *in vivo* versus *in vitro*.

En el presente estudio fueron usadas condiciones de crecimiento favorables para la producción de cápsula; sin embargo, hay que señalar que no todos los factores involucrados en la expresión de CP durante las IIM naturales son conocidos (O’Riordan y Lee, 2004). De hecho, se ha observado variabilidad en la expresión de CP entre aislamientos bajo diferentes condiciones, e incluso entre clones de un mismo aislamiento (Poutrel *et al.*, 1995, Poutrel *et al.*, 1997). Otra explicación para la disparidad genotipo fenotipo está basada en el hecho de que algunos aislamientos pueden llevar genes *cap*, pero la falta de expresión de cápsula puede deberse a mutaciones dentro de los genes que codifican para la cápsula (Cocchiaro *et al.*, 2006).

En la unidad de producción estudiada se encontró una mayor prevalencia del serotipo capsular 5/8, actualmente este serotipo capsular es identificado como otro tipo de serotipo capsular llamado 336, sin embargo su estructura química no ha sido caracterizada y se ha demostrado recientemente que aislamientos que expresan el polisacárido capsular de superficie expresa los genes capsulares *Cap5* o *Cap8*, por lo que puede haber una reacción cruzada con los serotipos capsulares 5 y 8. (Han *et al.*, 2000b; Camussone y Calvino, 2013). En un estudio hecho por Han encontró una alta frecuencia del serotipo 336 de sus cepas no tipificables se tipificaron como serotipo 336, 90,9% (50/55). En este estudio se encontró una prevalencia del 88%, resultado muy similar al obtenido por Han (2000b).

En la resistencia natural de la glándula mamaria, destaca la participación de los neutrófilos, como la primera línea de defensa celular para limitar el desarrollo de la infección bacteriana en la glándula mamaria, mediante la fagocitosis (Leitner *et al.*, 2000). En las células somáticas la proporción de neutrófilos presentes en la leche se considera un indicador sensible en la respuesta de la glándula mamaria a la infección glandular, con elevados CCS durante el desarrollo de la infección (Guidry *et al.*, 1994b).

En los estudios de fagocitosis *in vitro* realizados para evaluar la actividad funcional de los neutrófilos de las vacas lecheras en primera etapa de lactación, el menor IFA se observa en los neutrófilos obtenidos de leche que los obtenidos de sangre debido a que los PMNs ingieren los propios componentes de la leche como caseína, glóbulos de grasa y detritus celulares, disminuyendo la actividad y la vida media de los neutrófilos (Dosogne *et al.*, 2003; Sladek y Rysanek, 2000).

Es posible que el estadio de lactación de las vacas estudiadas también haya favorecido la obtención de los leucocitos, debido que durante esta etapa se encuentra una mayor proporción de neutrófilos en la glándula mamaria sana, las vacas muestreadas se encontraban en la primera etapa de lactación (Leitner *et al.*, 2000). Los estimadores de fagocitosis obtenidos de los estudios *in vitro* permitieron la evaluación de la actividad funcional de los neutrófilos de la sangre, considerada una fuente importante para concentrar los fagocitos que pueden ser utilizados en otros estudios *in vitro* (Kampen *et al.*, 2005).

El aislamiento de los neutrófilos obtenidos mediante lisis hipotónica de los eritrocitos, es un procedimiento útil para concentrar los leucocitos PMNs a partir de sangre, este método utilizado en este estudio es similar al realizado por Carlson y Kaneco (1973), el cuál es muy fácil de instrumentar en el laboratorio ya que se puede obtener una fracción rica de neutrófilos, en comparación con otros protocolos de aislamientos de PMNs (Dosogne *et al.*, 2003).

Al evaluar la actividad de fagocitosis de los neutrófilos mediante el IFA, se puede obtener indicadores de la inmunidad innata, mediante la fagocitosis por neutrófilos que pueden permitir evaluar la resistencia natural de las vacas a la mastitis (Kelm *et al.*, 1997; Piccini *et al.*, 1999).

En la actualidad existe una tendencia para mejorar los estimadores orientados a la selección genética de las vacas lecheras, para buscar la resistencia natural a la mastitis bovina, al elegir progenie por los datos estimados de CCS y el índice de heredabilidad, dentro de los cuáles se evalúa la actividad de fagocitosis de leucocitos y su capacidad potencial. Estos hallazgos indican la necesidad de establecer asociaciones potenciales de fagocitosis por neutrófilos y la incidencia de mastitis en las vacas (Peterson *et al.*, 1978)

En condiciones *in vitro*, la presencia del suero de leche en los medios de cultivo favorece la producción de cápsula en las cepas de *S. aureus*, incrementando la resistencia a la fagocitosis *in vitro* de los neutrófilos bovinos (Sutra y Poutrel 1990, Sutra *et al.*, 1991).

La sobrevivencia intracelular está relacionada con microorganismos denominados MOS (microorganisms survival), determinados por las características entre bacterias gram negativas y gram positivas asociadas con los factores de virulencia entre ellos la cápsula de polisacáridos que hace que haya persistencia de la IIM de la mastitis ya que evita que sea fagocitada (Hattie *et al.*, 2000).

En el estudio se observó una diferencia en la sobrevivencia intracelular de los serotipo capsulares 5 con respecto al serotipo capsular 8, esto confirma que la cápsula afecta la fagocitosis a través de inhibir la opsonización por su capacidad hidrofílica al evitar el reconocimiento de PMNs y los sitios de unión antígeno-anticuerpo en la pared bacteriana, consecuentemente la inhibición de complemento (Cunnion *et al.*, 2001).

Es posible que la sobrevivencia intracelular de CP5 y CP8 pueda estar relacionada con el estallido respiratorio y la posible inducción de la apoptosis y necrosis de los neutrófilos al ocurrir la infección de la glándula mamaria en el ganado lechero (Kampen *et al.*, 2005)

Por otra parte el aumento en la resistencia del *S. aureus* a los antimicrobianos y la presencia de cápsula y otros factores de virulencia en los aislamientos obtenidos en el hatos lecheros, se propone la búsqueda de alternativas orientadas a mejorar los sistemas de prevención, control y monitoreo de la mastitis por *S. aureus* en las vacas lecheras para mejorar la calidad e inocuidad de la leche y la economía de la empresa lechera.

Conclusiones

1. En la unidad de producción estudiada la frecuencia de infección por *S. aureus* fue del 27.95% .
2. Los tipos capsulares de *S. aureus* correspondieron al capsular difuso relacionado con los serotipos capsulares 5, 8 y NT.
3. Las cepas NT genéticamente correspondieron a los serotipos capsulares 5 y 8 (serotipo 336).
4. Los serotificación capsular identificada correspondió al los genotipos capsulares *Cap 5* y *Cap 8*.
5. En los aislamientos de *S. aureus* estudiados en la unidad de producción, predominó el serotipo capsular 5 y 8 (336).
6. Se observaron diferencias entre la sobrevivencia intracelular en neutrófilos en el serotipo capsular 5 con respecto al serotipo capsular 8, el serotipo 5 y 8 (336).

LITERATURA CITADA

- Albus, A., Arbeit, R.D., Lee, J.C. (1991). Virulence of *Staphylococcus aureus* mutants altered in type 5 capsule production. *Infect. Immun.* 59: 1008-1014.
- Allore, H.G. Jones, L.R.(1995). An approach to summarize and somatic cells score trends for a data-driven, decision support system. *J Dairy Sci.* 78(6):1377-1381.
- Anderson, J. C. and Williams M. R.(1985). The contribution of a capsule to survival of *Staphylococci* within bovine neutrophils. *J. Med. Microbiol.* 20 (1985): 317-323.
- Arizono, T., Umeda, A., Amako, K. (1991). Distribution of capsular materials on the cell wall surface of strain Smith diffuse of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol.* 173:4333-4340.
- Arvidson, S., Tegmark, K. (2001). Regulation Of Virulence Determinants In *S. aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 29:159-170.
- Ávila, T.S., Gutiérrez, C.A. (2002). Comparación del estado de la ubre y la calidad sanitaria de la leche de vacas ordeñadas manual o mecánicamente. *Veterinaria México.* 33: 387-394.
- Baselga, R., Albizu, Y., and Amore, B. (1994). *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet Microbiol.* 39(3-4).195-204.
- Bautista-Trujillo GU, Solorio-Riveran JL, Rentería-Solorzano I, Carranza-Germán SI, Bustos-Martínez JA, Arteaga-Garibay RI, Baizabal-Aguirre V M, Cajero-Juárez M, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ: Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Medic Microbiol* 2013, 62: 369–376.
- Bedolla, C.C., Ponce de León, M.E.R. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *RedVet.* 9(4).
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40:845-859.
- Blood, D.C., Radostis, O.M. (1992). *Medicina Veterinaria.* 7ed;Mc Graw Hill,Londres.

Blowey, R., Edmoson, P. (1995). Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche, Guía práctica ilustrada, 1ª ed., Acribia, Zaragoza, España.

Boerlin P, Kuhnert P, Hüsey D, Schaellibaum M. (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol 2003,41:767-771.

Cameron, A.R. and Anderson, G.A. (1993). Relationship between milk production and somatic cells count dairy cows in Est Gippsland. Aus Vet J.70(1):13-17.

Camussone, C.M. y Calvino, L.F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. Rev Argent Microbiol. 2013;45(2):119-130

Carlson, G.P. and Kaneko, J.J. (1973). Isolation of leukocytes from bovine peripheral blood. Proc Soc Exp Biol Med 142:853-856.

Cheung, A. L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H. Xiong, J.Q. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. 40: 1- 9.

Cocchiaro, J. L., Gomez, M. I., Risley, A., Solinga, R., Sordelli, D. O., Lee, J. C. (2006): Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology .59(3): 948–960.

Cohen G: Microbiología y Biología molecular. 2nd ed. Barcelona, España: Colección Métodos. 1977.

Craven, N., Williams, M.R. 1985. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancements. Vet. Immunol. Immunopathol. 10: 71– 127.

Cunnion, K. M., Lee, J. C. and Frank, M. M. (2001). Capsule Production and Growth Phase Influence Binding of Complement to *Staphylococcus aureus*. Infect and Immun. 69 (11): 6796–6803

Dassy, B. Fournier, J.M.(1996). Respiratory activity is essential for postexponential-phase production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 64: 2408-2414.

Dassy, B., T. Hogan, T. J. Foster, and J. M. Fournier. (1993). Involvement of the accessory gene regulator (*agr*) in expression of type-5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 139:1301–1306.

Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev.13:16-34.

Dosogne, H., F. Vangroenweghe., J. Mehrzad., A.M. Massart-Leen & C. Burvenich. (2003). Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. J Dairy Sci 86:828-834.

Epperson, W.B., Hoblet, K.H., Smith, K.L., Hogan, J. S. Todhunter, D.(1993). A of abnormal uterine discharge with new intramammary infection in the early post partum period in multiparus dairy cows. J. am vet med assoc. 202 9:1461-1464.

Fagundes H, Fernández OC. Infecções intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. Ciencia Rural, Brasil; 2004 34(004): 1315-1320.

Figueroa, G, Navarrete, W.P., Caro, C.M., Troncoso, H.M., Faúndez, Z .G. (2002). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos Rev Méd Chile; 130: 859-864

Fuello, M.J. (2005). *Frecuencia* y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes antígenos: relacionados con tipos genéticos. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

García, S., Acevedo, C.A., Bennani (2005). Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el laboratorio de microbiología clínica. Asociación Española de Farmacéuticos Analistas Modesto Lafuente, 3 – 28010 Madrid Actualidades.

Gerlach, B.F., Ayala, A.F., Denogean, B.F., Moreno, M.S., Gerlach, B.L. (2009). Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista Mexicana de Agronegocios* 13(024): 794-796.

Gianneechini, B., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., Moreno, J.L. (2002). Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta vet Scand*, 43: 221-230.

Gilbert, F.B., Poutrel, B., Sutra, L. (1994). Immunogenicity in cows of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide-ovoalbumin conjugate. *Vaccine*. 12:369-374

Gilbert, I.(1931):Dissociation in an encapsulated *Staphylococcus*. Department of Pathology and Bacteriology, Johns Hopkins Medical School, Baltimore, Maryland Received for publication August 20, 1930.

Gilot, P., Lina, G., Cochard, T., Poutrel, B. (2002) Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-Activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol*. 40 (11): 4060–4067

Guidry, A. J., Berning, L.M., Hambleton, C.N. (1994a). Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes. *J Dairy Sci*. 76(5):1285-1289.

Guidry, A. J., O'Brien, C.N., Oliver, S.P., Dowlen, H.H., Douglass, L.W. (1994b). Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. *J. Dairy Sci* 77(10): 2965-2974.

Guidry, A.J., Oliver, S.P., Squiggins, K.E., Erbe, E. F., Dowlen, H.H., Hambleton, C.N., Berning, L.M. 1991. Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci*. 74(10): 3360-3369.

Han, H. R., Pak, S. I., Kang, S. W., Jong, W. S., Youn, C. J. (2000a): Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine developmen. I. capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains. *J Vet Sc*.1(1): 53–60

Han, H. R., Pak, S. I. and Guidry, A. (2000b). Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Vet Med Sci. 62(12):1331-1333.

Hanson HP, Jr MD: Contribution to the physiological differentiation of pneumococcus and streptococcus, and to methods of staining capsules. J Exp Med 1905,6: 317–345.

Harmon, R.J. Heald, C.W. (1982). Migration of polymorphonuclear leukocytes into bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. Am. J. Vet. Res. 43:992.

Hattie, D., Gresham, J. H., Lowrance, T. E., Caver, B. S., Wilson, A. L. and Frederik P. L. (2000). Survival of *Staphylococcus aureus* Inside Neutrophils Contributes to Infection. J Immunol. 164:3713-3722.

Herbert, S., Newell, S. W., Lee, C., Wieland, K-P., Dassy, B., Fournier, J.M., Wolz, C., Ring, G. (1997). Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides by CO₂. J Bacteriol. 183(15): 4609–4613.

Hernández, B.O. (2005). Plasma equino como sustituto del plasma humano en la identificación del en los laboratorios de microbiología. Rev Cubana Invest Biomed, 24 (2).

Hochkeppel, K.F., Braun, D.G., Vischer, W., Imm, A., Sutter, S., Staeubli, U., Guggenheim, R., Kaplan, E. L., Boutonnier, A., Fournier, J. M. (1987). Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. J Clin Microbiol. 25 (3):526 – 530.

Horan, T.D., English, D. and Mc Pherson, T.A. (1982). Association of neutrophil chemiluminescence with microbicidal activity. Clin Immunol Pathol. 22(2):259-269

Hopster, H., Van Der Werf, J.T., Blokhuis, H.J. (1998). Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 66:83-97.

Hurtado, M.P., de la Parte, M.A., Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revision of the mechanisms of pathogenicity and physiopathology of staphylococcal infections. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.22 n.2 Caracas jul. In *S. aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 29:159-170.

Jorgensen, H.J., Mork, T., Rorvik, L.M. (2005). The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. J. Dairy Sci. Association, 88: 3810-3817.

Jaramillo JA. (1999). Factores de riesgo asociados a infecciones subclínicas producidas por los biotipos humano y bovino de *Staphylococcus aureus* en la glándula mamaria de vacas en lactancia. Revista Veterinaria y Zootecnia de Caldas. 11(1).

Kampen, A.H., Tollersrud, T., Lund, A. 2005. *Staphylococcus aureus* Capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils in vitro. Infect and immun. 73 (3): 1578–1583.

Karakawa, W.W., Fournier, J. M., Vann, W.F., Schneerson, R. S., Robbins, J. B. (1985). Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 22(3): 445-447.

Kelly, P.T., O'Sullivan, K., Berry, D.P., More, S.J., Meaney, W.J., O'Callaghan, E.J., O'Brien, B. (2009). Farm management factors associated with bulk tank somatic cell count in Irish dairy herds. Ir J Vet 62: 45-51

Kelm, S.C., Detilleux, J.C., Freeman, A.E. Kehrli Jr, M. E., Dietza, A.B., Fox, L.K., Butler J.E., Kasckovics, I. and Kelly, D.H.(1997). Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. J Dairy Sci 80:1767-1775.

Kerro, D. O., Van Dijk, J.E., Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. Vet Quarterly A review. 24(4):181-198.

Kluytmans, J., Belkum V., A., Verbrugh, H. (1997). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. J Clin Microbiol Reviews, 10(3): 505–520.

Lattar, S. M., Tuchscher, L. P., Caccuri, R. L., Centro, N., Becker, K., Alonso, C. A., Barberis, C., Miranda, G., Buzzola, F. R., Sordelli, D. (2009). Capsule expression and genotypic differences among *staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic or acute osteomyelitis. *Infect and immun.* 77 (5): 1968–1975

LeBlanc, S.J., Lissemore, K.D., Kelton, D.F., Duffield, T.F., Leslie, K.E. (2006). Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89:1267–1279

Lee, J.C., and Lee C.Y.(1999). Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*, p. 185–205. *In* J. B. Goldberg (ed.), *Genetics of bacterial polysaccharides*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Lee, J.C., Takeda, S., Livolsi, P.J. Paoletti, L.C. (1993). Effects of *in vitro* and *in vivo* growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 61: 1853-1858.

Leitner, G., Shoshani, E., Krifucks, O., Chaffer, M. and Saran, A. (2000). Milk leukocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47:581-589.

Lescourret, F. and Coulon, J.B. (1994). Modelins the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *J Dairy Sci.* 77(8):2289-2301.

Lin, Y., L. Xia., J.D. Turner & X. Zhao. (1995). Morphological observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium *in vitro*. *Am J Vet Res* 56:203-207.

Loung, T., Sau, S., Gomez, M., Lee, J. C., Lee, C. Y. (2002). Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide expression by *agr* and *sarA*. *Infection and immunity.* 70(2): 444–450 vol. 70, no. 2

MacDonald, E. A., Xia, L., Monardes, H. and Turner, J.D. (1994). Neutrophil function *in vitro*: diapedesis and phagocytosis. *J Dairy Sci.* 77(2):628-638.

Makovec, J.A. and Ruegg, P.L.(2001). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J dairy Sci* 86 (11):3466-3472

Manjarrez, L.A., Díaz, Z.S., Salazar, G.F., Valladares, C.B., Gutiérrez, C.A., Barbabosa, P.A., Talavera, R.M., Alonso, F.M., Velázquez, O.V. (2012). Identificación de los biotipos de *Staphylococcus aureus*, en vacas lecheras de producción familiar con mastitis subclínica en la región centro – este del Estado de México. Rev Mex Cienc Pecu 3:265-274

Martínez, P. S. (2005). Influencia de la catalasa y de la β -toxina en la patogénesis de *Staphylococcus aureus*. Tesis. Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. N° pág. 127. ISBN: 84-669-2854-5.

McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Yufang Shi, A. M., Mogil, R. J., Nishioka, W. K. and Green, D. R. (1995). The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in Vitro*. Methods In Cell Biology, 46:153-193.

Mc Kenney, D., Pouliot, K.L., Wang, Y., Murthy, V., Ulrich, M., Doring, G., Lee, J.C., Goldmann, D.A., Pier, G.B. (2000). Vaccine potencial of poly-1-6 B-D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. J.Biotechnol. 83: 37-44.

Mejía, N.M., Murillo, A.S., Suazo, H., Campos, J.C., Rodríguez, E., Espinal O., Avelar, G. (2009). Brote por *Staphylococcus aureus* en una guardería infantil en Choluteca, Honduras Rev Med. 9;77(2): 57-98

Middlenton, J.R., Fox, L.K., Gay, J.M. and Tyler, J.W. (2002). Influence of *Staphylococcus aureus* strain- type of mammary quarter milk somatic cell count and N-acetyl (beta) D-glucosaminidase activity in cattle from eight dairies. J Dairy Sci. 85(5): 1133.

Monks, J., Geske, F., Lehman, L., Fadok, V.A. (2002). Do inflammatory cells participate in mammary gland involution? J. Mammary Gland Biol Neop. 7:163-176.

More SJ: Global trends in milk quality: implications for the irish dairy industry. Ir Vet J 2009, 62:5-14.

Mullan, N. a., Carter, e. A. and Nguyen, K. A. (1985). Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non- lactating mammary glads. Res Vet Sci. 38(2):160-166.

NMS. National Mastitis Council. (2005). Laboratory handbook on Bovine Mastitis. Madison, USA: National Mastitis Council Inc.

Nash, D. L., Rogers, G.W., Cooper, J. B., Hargrove, G.L., Keown, J. F. (2003). Heritability of Intramammary Infections at First Parturition and Relationships with Sire Transmitting Abilities for Somatic Cell Score,Udder Type Traits, productive Life, and Protein Yield. J Dairy Sci. 86:2684-2695.

Nickerson, S.C. 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: An overview. J Am Vet Med Assoc. 187(1): 41-45.

NOM-050-ZOO-1995: Norma Oficial Mexicana: Características y especificaciones zoosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de unidades de producción controlada para ganado bovino.17 de Marzo de 1997.

NOM-062-ZOO-1999: Norma Oficial Mexicana: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. México, 1999.

Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Mol. Microbiol. 48: 1429-1449.

O' Riordan, K., Lee, J.C. (2004) *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. J. Clin Microbiol Reviews. 17 (1): 218–234

Oliver, S.P., Jayarao, B.M., Almeida, R.A. (2005). Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. Foodborne Pathog Dis. 2 (2): 115-129.

Opdebeeck, J. P., O'Boyle D. A., and Frost, A. J. (1988).Encapsulated *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. Aust. Vet. J. 65:194-195.

Ouyang, S., Sau, S. and Lee, C. Y. (1999). Promoter analysis of the *cap8* operon, involved in type 8 capsular polysaccharide production in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 181:2492–2500.

Paape, M.J., Wergin, W.P., Guidry, A.J., Pearson, R. E. (1979). Leukocytes – Second line of defense against invading mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 62: 135–153.

Persson - Waller, K., Golditz, I.G., Lun, S., Ostensson, K. (2003). Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. Res Vet Sci. 74:31-36.

Peterson, P.K., Wilkinson, B.J., Kim, Y.K., Schmeling, D., Quie, P. (1978): Influence of encapsulation on Staphylococcal opsonization and phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. Infect and Immun. 19(3): 943-949.

Piccinini, R., Bronzo, V., Moroni, P., Luzzago, C., and Zecconi, A. (1999). Study on relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. J Dairy Res 66:501-510.

Pohlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K.B., Doring, G., Lee, J.C., Fournier, J.M., Botzenhart, K., Wolx C. (2000). Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells. Influence of the capsular polysaccharide, the global regulator agr, and the bacterial growth phase. Infect. Immun. 68:4865-4871.

Poutrel, B., A. Boutonnier, L. Sutra, and J. M. Fournier. (1988). Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. J Clin Microbiol. 26:38-40.

Poutrel, B. and L. Sutra. (1993). Type 5 and type 8 capsular polysaccharides are expressed by *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits, poultry, pigs, and horses. J. Clin. Microbiol. 31: 467-469.

Poutrel, B., Rainardad, P. and Sarradin, P. (1997). Heterogeneity of cell associated CP5 expression on *Staphylococcus aureus* strains demonstrated by flow cytometry. Clin Diag Lab Immunol. 4: 275-278.

Poutrel, B., Gilbert, F.B., Lebrun, M. (1995) Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. Clin Diagn Lab Immunol. 2(2):166–171.

Roberson, J.R. Tech, V., Virginia, B. (1999). The epidemiology of *Staphylococcus aureus* on dairy farms. National Mastitis Council 38 th Annual Meeting: 38.

Ruegg, P.L. and Tabone, T.J. (2000). The relationship between antibiotic residue violations and somatic cells counts in Wisconsin dairy herds. J dairy Sci. 83(12):2805-2809.

Riedel-Caspari, G. (1993).The influence of colostral leucocytes on the course of and experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. Vet Immunol Immunopathol. 35(3-4):275-288

Risley, A.L., Loughman, A., Cywes-Bentley, C., Foster, T.J., Lee, J.C. (2007) Capsular Polysaccharide Masks Clumping Factor A–Mediated Adherence of *Staphylococcus aureus* to Fibrinogen and Platelets. *J Infect Dis.* 196:919–927.

Saidi, R., Khelef, D., Kaidi, R. (2013). Subclinical mastitis in cattle in Algeria: Frequency of occurrence and bacteriological isolates. J S Afr Vet Assoc 84(1).

Salgar, S.K., Paape, M.J., Alstom-Mills, B. and Peters, R.R.(1994).Modulation of bovine neutrophil fuctions by monoclonal antibodies. Am J Vet Res. 55 (2):1763-1782.

Seegers, H., Fourichon, C., Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis economics in dairy cattle herds. J Vet Res. 34(5):475-491.

Shosahani, E Leitner, G., Hanishi, B., Saran, A. (2000). Mamary infection with *Staphilococcus* in cows: progerss from inoculation to chronic infection and its detection. J Dairy Res 67(2):155-169

Sladek, Z and Rysanek, D. (2000). Morphology of apoptosis of polymorphonuclear leukocytes isolated from mammary glands of unbread heifers. Vet Med Czech 3: 71-81.

Sompolinsky, D., Samra, Z., Karakawa, W., Vann, W.F., Schneerson, M.Z.(1985). Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J. Clin. Microbiol.* 22(5):828-834

Sordelli, D. O. Buzzola, F. R., Gomez, M. I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Catalano, M., Reitz, A. J., Tollersrud, T., Denamiel, G., Jeric, P., Lee, C. (2000). Capsule expression by bovine isolates of *staphylococcus aureus* from argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J Clin Microbiol.* 38(2):846–850

Sordillo, L.M. and Streicher, K.L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neop.* 7:135-146.

Stanchi, N.O., Martino, P.E., Gentilini, E., Reinoso, E.H., Echeverria, M.G., Leardini, N. (2005). *Microbiología Veterinaria*. 1° ed., Inter Medica, Argentina. pp 263 – 269

Steel, R.G.D., Torrie, J.H. (1990). *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2a ed. México: McGraw-Hill.

Sau, S.N., Bhasin, E. R., Lee, J.C; Foster, T.J and Lee, C.Y. (1997). The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiol.* 143:2395–2405

Sutra, L., Mendiola, C., Rainard, P., Poutrel, B. (1989). Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitic milk: relationship between capsular polysaccharide types 5 and 8 and colony morphology in serum-soft agar, clumping factor, teichoic acid, and protein A. *J Clin Microbiol.* 28(3):447-451.

Sutra, L., Rainard, P., Poutrel, B. (1990). Phagocytosis of Mastitis Isolates of *Staphylococcus aureus* and Expression of Type 5 Capsular Polysaccharide Are Influenced by Growth in the Presence of Milk. *J Clin Microbiol.* 28(10): 2253-2258.

Tollersrud, T., Kenny, K., Caugant, D.A., Lund, A. (2000). Characterisation of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. *APMIS.* 108(9):565-572.

Tollersrud, T., Kenny, K., Reitz, A.J., Lee, J.C. (2000). Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and

other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. J Clin Microbiol. 38(8):2998-3003.

Vadillo, S., Piriz, S., Mateos, E. (2002). Manual de Microbiología Veterinaria. Mc Graw Hill Interamericana.

Velázquez, M. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meicilinorresistente. Salud Pública de México, 47(005): 381-387.

Velázquez OV, Saltijeral JO, Alonso FMU, Lagunas BS, Enríquez E (2004). Phenotypical expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors isolated from dairy cows with subclinical mastitis. International Society for Animal Hygiene.

Velázquez O. V.; Pescador S. N.; Saltijeral O. J.; Gorodezky L. C. (2005a): Epidemiología, prevención y control de la mastitis por *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rogers, V.I. McGraw-Hill Interamericana, México D.F. pp. 325-331

Velázquez V.O., Vázquez, C.J., Pescador, S.N., Saltijeral, O.J. (2005b). Nivel de células somáticas en leche y resistencia de las vacas lecheras a la mastitis. Revista de producción animal. 20(207): 15-23.

Velázquez, O.V., Pescador, S.N, Gorodezky, C., Saltijeral, J. Oaxaca. (2008). In vitro differential neutrophil phagocytosis activity on *Staphylococcus aureus* when obtained from blood and milk of dairy cows in early lactation period. Rev Lat Microbiol.50(3-4):66-71.

Velázquez OV, Valladares CB, Gutiérrez CAC, Talavera RM, Pescador SN, Valdés RS. (2012). Milk Production an Safety Food: Nutritional Insigths and Food Safety .. Jaroslava Svarc Jajic. Nova Science Publisher Inc. New York, USA. Pp 1245

Verbrugh, H.A., Peterson, P.K., Nguyen, B.Y., Sisson, S.P., Kim, Y. (1982). Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus*: the role of specific antibody and complement. J Immunol. 129:1681-1687.

Verdier, I., Durand, G., Bes, M., Taylor, K.L., Lina, G., Vandenesch, F., Fattom, A.I., Etienne, J. 2007. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. J Clin Microbiol. 45(3):725-729.

Watts, A.K., Wang, Q.P., Nicholson-Weller, A., Lee, J.C. (2005). *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. Infect and immun. 73(6):3502–3511.

Wilkinson, B.J. (1983). Staphylococcal capsules and slime, p.481-523. In. C. Easmon and C. Adlam (ed), Staphylococci and staphylococcal infections, vol. 2 Academic Press, London, England.

Yazdankhah, S.P., Olsen, E. (1998). Simple and direct detection of *Staphylococcus aureus* in milk by a tube coagulase test. Letters in Applied Microbiology, 27, 111–115

Zadoks R.N., Fitzpatrick, J.L. (2009). Changing trends in mastitis. Ir Vet J, 62:59-70.

Zecconi, A.R., Piccinini, L.K., Fox. (2004). Epidemiological study of non-contagious intramammary infections in nine commercial dairy herds following a *Staphylococcus aureus* control programme. J Vet Med B 51: 333 - 336.

Zhao, X., Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Cause and control. J Anim.Sci. 1: 57

ANEXOS TÉCNICOS

Anexo 1

Tinción de Hiss

Objetivo: Observar las cápsulas bacterianas, las cápsulas se ven con un halo color azul y el cuerpo de la célula se ve de color rojo

Material

Solución 1: 5cc de violeta de genciana en 95 cc cúbicos de agua de destilada

Solución 2: Sulfato de cobre al 20% (20 gr/100mL de agua destilada) se calienta y se filtra.

Método

Preparación del frotis en seco; Cubrir el frotis con solución 1, calentar unos segundos hasta la emisión de vapores y posteriormente lavar con solución 2. Secar sin lavar a temperatura ambiente.

Observar bajo microscopio óptico a 100x.

Anexo 2

Medio de agar blando (soft agar)

Objetivo: Observar la expresión morfológica de las cápsulas, tipo compacto (no mucoide) aparecen en forma de puntos blanquecinos suspendidos en el medio y la forma difusa o mucoide aparece en forma de cometa.

Obtención de suero de leche:

Material

500mL de leche entera a 37 °C

Cuajo liquido

Tela de gasa

Filtros de 0.45 mm

Método

A los 500 mL de leche, se le agregan 3 gotas de Cuajo liquido se deja enfriar hasta que la leche cuaje, una vez cuajada la leche se corta en cubos y los cubos se colocan en la tela de gasa, se realizan varios filtrados hasta eliminar la parte sólida.

Una vez más el suero se vuelve a filtrar finalmente con los filtros millipore de 0.45 mm, para así obtener un suero estéril. Se realizó prueba de esterilidad en placas de agar TSA por 24h a 37°C.

Medio soft agar

Material

Suero de leche

Agar bacteriológico al 3%

Caldo Infusión cerebro corazón (BHI)

Matraz Erlenmeyer

Tubos de vidrio

Se prepara el caldo infusión cerebro corazón de forma habitual y se le agrega el 3% de agar bacteriológico se mete a esterilizar por 15 minutos a 121 °C.

Una vez esterilizado se a tempera a temperatura ambiente y se le agrega el 10% de suero de leche y se vacía 3 mL a los tubos de ensaye previamente estériles, después se inoculan 10µL de la bacteria previamente cultivada en BHI, se agita lentamente para homogenizar la mezcla y se mete a la estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

Después de la 24hrs se procede a la lectura visual

Anexo 3

Tinción Giemsa – May Grunwald

Objetivo: observación de los neutrófilos, neutrófilos fagocitados y lisis de neutrófilos

Material

PMNs suspendidos en PBS, obtenidos de la solución de lisis hipotónica de eritrocitos

Tinción de Giemsa

Tinción May Grunwald

Agua destilada

Portaobjetos

Métodos

Se coloca en el portaobjetos 50µL de PMNs suspendidos en PBS y se le agrega la tinción de May Grunwald por 3 minutos se lava con agua destilada y se le agrega la tinción de Giemsa por 15 minutos se lava con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente para su posterior lectura.

Anexo 4

Preparación de reactivos para leer los productos amplificados de PCR

Preparación de TAE 1x (Solución Buffer Tris, ácido acético y EDTA)

Material

TAE 10x

Agua destilada

Método

Se agrega 900mL de agua destilada y 100 mL de TAE 10x para obtener una concentración final de 1 X.

Preparación de la agarosa

Material

100 mL de TAE AL 1X

Agarosa

Método

A 100 mL de TAE al 1X, se le agrega 1.5% de Agarosa se disuelven calentándose y se le agrega 5% de bromuro de etidio a la solución, una vez disuelta la mezcla se vacía en el carrito de la cámara de electroforesis y se deja fraguar para después colocar las muestras en cada carril.