



ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Genes codificadores para enterotoxinas de aislamientos de estafilococos coagulasa negativos y coagulasa positivos a partir de muestras de mastitis bovina

Coding genes for enterotoxins of isolated coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci from bovine mastitis samples

Genes codificadores de enterotoxinas em isolados de estafilococos coagulase positivo em amostras com mastite bovina

Maritza Angarita-Merchán^{1*}, Nuri Andrea Merchán-Castellanos¹

¹ Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia

*Correspondencia: Dirección: Carrera 2a Este N° 64-169, Tunja, Colombia

Teléfono: 745-0000, extensión 1202. Correo electrónico: mangarita@uniboyaca.edu.co

Fecha de recibido: 12-13-2017

Fecha de aceptación: 05-13-2018

Citar este artículo así:

Angarita-Merchán M. Merchán-Castellanos NA. Genes codificadores para enterotoxinas de aislamientos de estafilococos coagulasa negativos y coagulasa-positivos a partir de muestras de mastitis bovina. Revista Investig Salud Univ Boyacá. 2018;5(2):205-218 doi: <https://doi.org/10.24267/23897325.267>



RESUMEN

Introducción. La mastitis bovina es la inflamación de glándulas mamarias y tejidos secretores. El género *Staphylococcus* es el agente causal más importante, por su capacidad de producir diferentes factores de virulencia. Las enterotoxinas estafilocócicas son un grupo importante de toxinas que permiten al microorganismo invadir células y tejido huésped, son diseminadas por medio de productos alimenticios y son responsables de graves intoxicaciones alimentarias en el mundo.

Objetivo. Determinar la presencia de genes codificadores para las enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal Enterotoxins*, SE) SEA, SEB, SEC, SED y SEE, en cepas de *Staphylococcus* spp. asociadas con mastitis bovina.

Materiales y métodos. Se trata de un estudio cuantitativo, descriptivo y transversal. Se identificaron especies por medio de la amplificación de la región r16S. Los genes SEA, SEE, SEC, SED y SEE se detectaron mediante la amplificación por PCR convencional, usando iniciadores específicos para cada gen, y se evidenciaron los amplicones con electroforesis.

Resultados. Hubo predominio del grupo *Staphylococcus* coagulasa positivo (65,2 %) sobre el grupo coagulasa negativo (37,5 %). *Staphylococcus aureus* fue la cepa más frecuente (88,5 %). El gen SEA (1,7 %) se detectó en *S. sciuri*, el gen SEB (3,6 %), en *S. pasteurii* y *S. warneri*, y el gen SEC (3,6 %), en *S. sciuri* y *S. saprophyticus* SEC. No se detectaron los genes SED y SEE en ninguna de las cepas evaluadas.

Conclusiones. Los resultados apoyan que la mastitis bovina también es causada por *Staphylococcus* coagulasa negativo, lo cual indica la posibilidad de que este grupo adquiera atributos genéticos, como enterotoxinas y factores de virulencia, por transferencia horizontal.

Palabras clave: *Staphylococcus*, gen, enterotoxinas, mastitis, reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Introduction: Bovine mastitis is an inflammation of mammary glands and secretory tissues. *Staphylococcus* gender is the main causal agent, due to its capacity to produce different virulence factors. Staphylococcal enterotoxins are a main group of toxins which permit the microorganism to spread in cells and guest tissue, which are disseminated through food products, being responsible of serious food poisoning cases around the world.

Objective: To determine the presence of coding genes for staphylococcal enterotoxins (SE); SEA, SEB, SEC, SED and SEE, in *Staphylococcus* spp. strains related to bovine mastitis.

Materials and methods: Quantitative study, descriptive and cross-sectional. It was made an identification of species through. They were identified 57 *Staphylococcus* spp. strains at specie level by amplification of r16S region. The detection of SEA, SEE, SEC, SED, y SEE genes was made through conventional PCR, using specific primers for each gene, they were evinced amplicons through electrophoresis.

Results: It was evinced predominance of coagulase-positive *Staphylococcus* group (65.2%), being *Staphylococcus aureus* the strain with the highest presence (88.5%), whereas coagulase-negative *Staphylococcus* group was 37.5%. SEA gene was detected in *S. sciuri* (1.7%); SEB in *S. pasteurii* and *S. warneri* (3.6%); SEC was identified in *S. sciuri* and *S. saprophyticus* (3.6%); they were not detected SED y SEE genes in any of the researched strains.

Conclusions: The results support that the development of bovine mastitis is also caused by coagulase-negative *Staphylococcus*, indicating the possibility that this group acquires genetic attributes as enterotoxins and virulence factors by horizontal gene transfer.

Key words: *Staphylococcus*, Gene, Enterotoxins, Mastitis, Polymerase Chain Reaction

RESUMO

Introdução. A mastite bovina é a inflamação das glândulas mamárias e dos tecidos secretórios. O gênero *Staphylococcus* é o agente causador mais importante, devido à sua capacidade de produzir diferentes fatores de virulência. As enterotoxinas estafilocócicas são um importante grupo de toxinas que permitem que o microorganismo invada as células e tecidos do hospede, são disseminadas através de produtos alimentícios e são responsáveis por intoxicações alimentares graves no mundo.

Objetivo. Determinar a presença de genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal Enterotoxins*, SE) SEA, SEB, SEC, SED e SEE, em cepas de *Staphylococcus* spp. associada à mastite bovina.

Materiais e métodos. Estudo quantitativo, descritivo e transversal. As espécies foram identificadas por amplificação da região r16S. Os genes SEA, SEE, SEC e SED foram detectados por amplificação PCR convencional utilizando primers específicos para cada gene, e os amplicons foram evidenciados com eletroforese.

Resultados. Houve predomínio do grupo *Staphylococcus* coagulase positivo (65,2%) sobre o grupo negativo da coagulase (37,5%). *Staphylococcus aureus* foi a cepa mais frequente (88,5%). O gene SEA (1.7%) foi detectado em *S. sciuri*, o gene SEB (3.6%) em *S. pasteurii* e *S. warneri*, SEC (3.6%) em *S. sciuri* e SEC em *S. saprophyticus*. Os genes SED e SEE não foram detectados em nenhuma das cepas avaliadas.

Conclusões. Os resultados confirmam que a mastite bovina também é causada por *Staphylococcus* coagulase-negativo, o que indica a possibilidade de que este grupo adquira atributos genéticos, como enterotoxinas e fatores de virulência, por transferência horizontal.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, gene, enterotoxinas, mastite, reação em cadeia da polimerase.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, que reduce el volumen de leche, altera el sabor, las características físicas y químicas, aumenta el número de células somáticas y eleva la carga bacteriana normal. Entre las manifestaciones clínicas más importantes, se reportan calor, dolor, tumefacción y endurecimiento de la glándula mamaria (1).

La etiología bacteriana es la primera causa del desarrollo de la enfermedad. Los principales microorganismos involucrados incluyen cepas *Staphylococcus* coagulasa negativas, las cuales tienen gran capacidad de permanencia en la glándula mamaria y se han considerado tradicionalmente como microbiota normal, por su presencia en varias partes del bovino, diferentes a la glándula mamaria. Este grupo de bacterias lo componen más de 50 especies y subespecies, y las más comunes son *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus* y *S. sciuri* (2,3). Otro grupo implicado en esta enfermedad es *Staphylococcus* coagulasa positivo, siendo *S. aureus* el principal agente causal de mastitis dentro de estos dos grupos, debido a la expresión de factores de virulencia relacionados con la capacidad de adherencia a la matriz extracelular y a la célula huésped (4,5). Además, produce enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal Enterotoxins*, SE)

involucradas en la reacción inmunológica del huésped. Se han reportado varias enterotoxinas estafilocócicas, desde SEA a SEE, de SEG a SEJ, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO, y otras implicadas en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , y las hemolisinas β , γ y δ (6).

Las enterotoxinas estafilocócicas tienen la capacidad de resistir al calor y al ácido, por lo que no son completamente desnaturalizadas por la cocción suave de alimentos contaminados; son pirogénicas, inducen gastroenteritis, superantigenicidad y son resistentes a la inactivación por proteasas gastrointestinales que incluyen pepsina, tripsina, renina y papaína. Se estima que, aproximadamente, el 5 % de las intoxicaciones alimentarias ocurren por enterotoxinas estafilocócicas (7).

En la actualidad, la identificación molecular de genes que codifican para los factores de virulencia de *Staphylococcus* sp. en aislamientos de cepas causantes de mastitis bovina, han contribuido al conocimiento de la posible circulación de genes determinantes en la presentación de la enfermedad. Con esta técnica, muchas variantes de estos genes han sido reportadas (7). La información obtenida a partir de estos estudios ayuda al genotipado de estafilococos coagulasa positivos para estudios epidemiológicos; igualmente, es útil para evaluar la posible aparición de genes para enterotoxinas estafilocócicas en cepas de

Staphylococcus coagulasa negativas y prevenir la aparición de posibles brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, cuya principal causa es el consumo de alimentos que contengan una o varias de estas enzimas o toxinas (8).

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de los genes *SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED* y *SEE* en cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de mastitis bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 57 cepas bacterianas aisladas de estudios anteriores e identificadas fenotípicamente como *Staphylococcus* spp. (9). Se llevaron a cabo la identificación molecular a nivel de especie, y la detección de genes que codifican para las enterotoxinas *SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED* y *SEE*.

Para la extracción del ADN, las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a 37 °C y 150 rpm durante 18 horas. Después de este periodo, el ADN se extrajo utilizando el KitWizard Genomic DNA Purification™ (Promega), siguiendo las condiciones que describe el fabricante. Cerca de 100 ng/μl de ADN fueron usados para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La concentración y pureza del ADN fueron medidas mediante el equipo Nanonrop (MaestroGen).

Las especies de *Staphylococcus* fueron identificadas mediante la amplificación de la región r16S por PCR convencional, usando iniciadores específicos para amplificar *S. aureus* e, iniciadores universales, para *Staphylococcus* spp. (tabla 1). La amplificación de esta región se hizo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 94 °C por 5 minutos, anillamiento 54 °C por 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 10 minutos por 30 ciclos (10).

En la detección de los genes que codifican para las enterotoxinas estafilocócicas, se empleó el ADN purificado de las cepas de *Staphylococcus* spp. La amplificación se llevó a cabo usando cinco pares de iniciadores específicos (tabla 1), de acuerdo con las condiciones descritas en la tabla 2. Como controles positivos, se emplearon las cepas de *S. aureus* ATCC29213, ATCC 29737, ATCC 25923 y 6538. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis, empleando gel de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 1X. Los amplicones correspondientes a los tamaños esperados de cada gen, fueron purificados usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System™ (Promega).

Todos los productos de PCR fueron secuenciados; la identificación de las especies de *Staphylococcus* sp. y la de la presencia de los genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, se hicieron comparando las secuencias con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabla 1. Iniciadores utilizados

Gen	Secuencia 5' - 3'	Tamaño (pb)	T° m
Enterotoxina A	F: 5'ATTAACCGAAGTTCTGTAGA3' 5'TTGCGTAAAAAGTCTGAATT3'	582	52 °C
Enterotoxina B	F: 5'TTTTCTTTGTCGTAAGATAA3' R: 5'CCAACGTTT TAGCAGAGAAG3'	732	52 °C
Enterotoxina C	F: 5'TAAGTTCCCAT TATCAAAGTG3' R: 5'CCAACGTTT TAGCAGAGAAG3'	403	52 °C
Enterotoxina D	F: 5'TAATGCTATATCTTATAGGG3' R: 5'TTGCGTAAAAAGTCTGAATT3'	251	52 °C
Enterotoxina E	F: 5'TAAACCAAATTTCCGTG3' R: 5'TTGCGTAAAAAGTCTGAATT3	474	52 °C
16s S. aureus	F:5'TTGCTTCTCTGATGTTAGCG3' R:5'AATCATTGTCCCACCTTC3'	1412	55 °C
16s universal	27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3	1470	50 °C

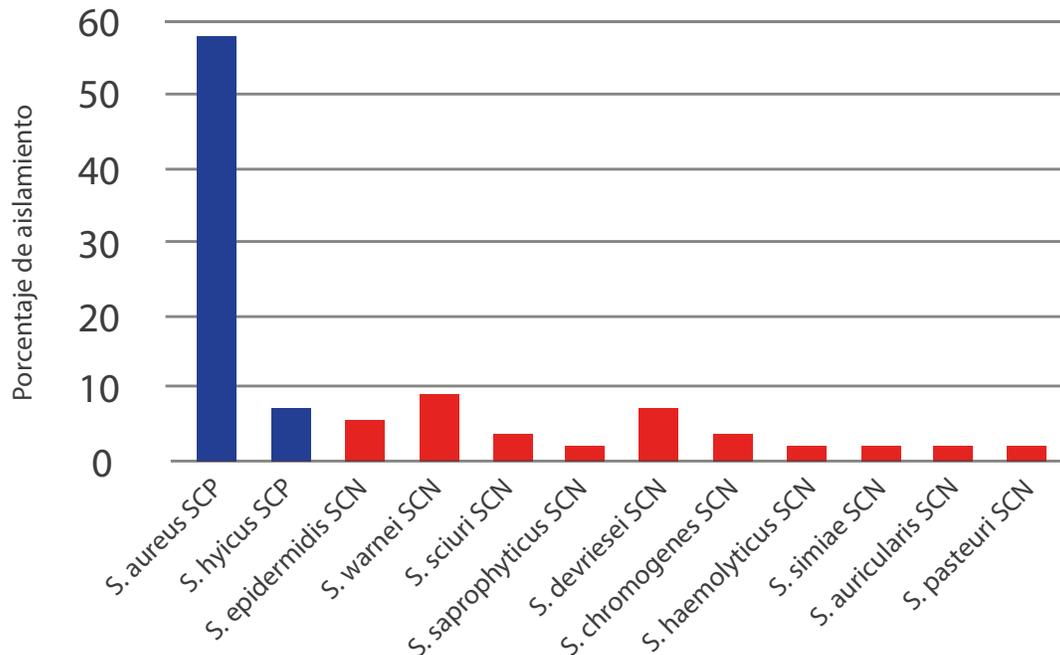
Tabla 2. Condiciones de amplificación de PCR

Gen	Desnaturalización	Anillamiento (Tm)	Extensión	Ciclos
SEA	95 °C por 5 minutos	58,1 °C por 1 minuto	72 °C por 10 minutos	35
SEB	95 °C por 5 minutos	53,3 °C por 1 minuto	72 °C por 10 minutos	35
SEC	94 °C por 5 minutos	58,1°C por 1 minuto	72 °C por 10 minutos	35
SED	95 °C por 5 minutos	50 °C por 30 segundos	72 °C por 10 minutos	35
SEE	95 °C por 5 minutos	52,8°C por 1 minuto	72 °C por 10 minutos	35

RESULTADOS

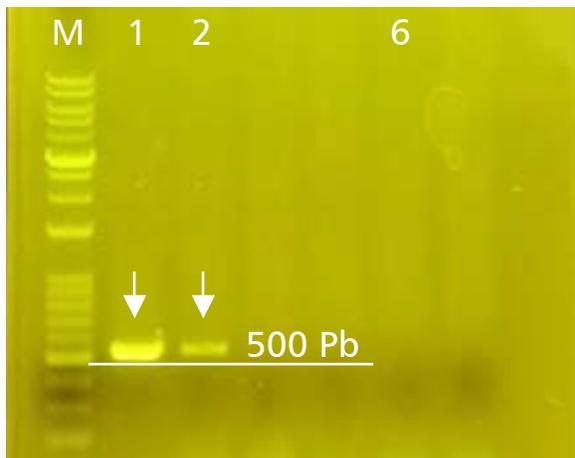
En la caracterización genotípica de las 57 cepas aisladas, predominó el grupo *Staphylococcus* coagulasa positivo, con 65,2 % (n=35), siendo *S. aureus* (n=31; 88,5 %) la cepa con mayor presencia dentro de este grupo, seguida por *S. hyicus* (n=4; 11,4 %); además, se detectó la presencia de cepas coagulasa negativas en el 37,5 % (n=21), incluyendo *S. warneri*, *S. epidermidis* y *S. devriesei*, entre otros (figura 1).

Figura 1. Distribución de microorganismos aislados e identificados por secuenciación de la región r16S



Con relación a la detección de las enterotoxinas estafilocócicas, se encontraron en cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativo. De las 57 cepas analizadas, el gen codificador para la SEA se encontró en *S. sciuri* (n=1, 1,7 %) (figura 2), el gen para la SEB, se detectó en *S. warneri* (n=1, 1,7 %) y *S. pasteurii* (n=1, 1,7 %), y para la SEC, en un 3,4 % correspondiente a *S. sciuri* (n=1, 1,7 %) y *S. saprophyticus* (n=1, 1,7 %). Por su parte, SED y SEE no se encontraron en ninguna cepa bacteriana estudiada (tabla 3).

Figura 2. Perfil de migración en gel de agarosa de los fragmentos amplificados de enterotoxina A mediante PCR



M: marcador de peso molecular 1 kb; 1: control positivo *S. aureus* ATCC 29213; 2: muestra de *S. sciuri*; 6: control negativo.

Tabla 3. Detección por PCR de genes que codifican para enterotoxinas y factores de virulencia en cepas de *Staphylococcus*

Especie	sea	seb	sec
<i>S. aureus</i>	-	-	-
<i>S. warneri</i>	-	1	-
<i>S. hyicus</i>	-	-	-
<i>S. sciuri</i>	1	-	1
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	1
<i>S. devriesei</i>	-	-	-
<i>S. chromogenes</i>	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-
<i>S. simiae</i>	-	-	-
<i>S. auricularis</i>	-	-	-
<i>S. pasteurii</i>	-	1	-
<i>S. devriesei</i>	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-

DISCUSIÓN

Este estudio proporciona datos sobre la presencia de especies de estafilococos y genes codificados para enterotoxinas estafilocócicas, en leche obtenida de animales con mastitis subclínica, provenientes de fincas lecheras del departamento de Boyacá.

De acuerdo con la caracterización molecular, se evidenció la presencia de cepas de estafilococos tanto positivas como negativas para coagulasa. Aunque este último grupo se presentó en baja proporción, los resultados respaldan los hallazgos que demuestran que las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativas se han convertido en importantes agentes patógenos en la enfermedad en bovinos (11). Tradicionalmente, este grupo etiológico ha sido considerado como microbiota bacteriana normal de poca relevancia clínica, que se comporta como oportunista. Más de 20 especies de cepas *Staphylococcus* coagulasa negativas han sido aisladas de leche bovina, y cinco de ellas (*S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. epidermidis*) son consideradas las principales especies (12,13); sin embargo, en este estudio, *S. epidermidis*, *S. warnei* y *S. devriesei* fueron identificadas como las especies dominantes entre las cepas negativas para coagulasa. Lo anterior sugiere que la distribución de las principales cepas coagulasa negativas pueden ser diferentes entre las fincas lecheras o rebaños.

La identificación molecular por ADN r16S también deja de manifiesto la presencia en un gran porcentaje de *S. aureus* en ganado del departamento de Boyacá. Este resultado es concurrente con un estudio previo, en el cual, por medio de técnicas fenotípicas, se detectó una prevalencia del 26 % de esta bacteria en 214 muestras evaluadas (9). Igualmente, estudios realizados a nivel mundial, confirman a *S. aureus* como el agente etiológico más frecuente e importante en casos de mastitis bovina (14,15). Esta bacteria es de gran importancia clínica por su amplia capacidad de adquirir resistencia a los antimicrobianos, haciendo que los tratamientos con antibióticos sean cada vez más difíciles, costosos y sin éxito. Es un microorganismo patógeno contagioso que se encuentra ampliamente en el ambiente y que, gracias a sus características de virulencia y resistencia a los antibióticos, facilita una rápida diseminación entre los bovinos (16). La confirmación molecular de este agente etiológico indica que se deben reforzar y mejorar las estrategias de prevención y control usadas en la eliminación de esta enfermedad; la inclusión de estudios de circulación de este microorganismo ayudará a entender mejor la dinámica de cambio medioambiental que estas bacterias han sufrido con el paso de los años.

Por otra parte, la presencia de genes que codifican para SEA, SEB y SEC, se ha reportado en *Staphylococcus* coagulasa positivos aislados a partir de leche desnatada en polvo, en queso y

en otros productos alimenticios (11,17,18,19); sin embargo, la presencia de estos genes en *Staphylococcus* coagulasa negativos ha sido poco reportada (20,21). *Staphylococcus sciuri* hace parte del grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativos, la detección del gen *sea* en este microorganismo resulta relevante, debido a que su producción se le atribuye principalmente a *S. aureus*; la posible causa de la presencia de este gen en *S. sciuri* puede ser su localización en elementos genéticos móviles (plásmido, fagos) (22) los cuales pueden ser transferidos horizontalmente entre bacterias, adquiriendo este tipo de atributos genéticos.

De igual manera, la presencia de los genes *seb* y *sec* que codifican para las enterotoxinas SEB y SEC, respectivamente, en dos microorganismos coagulasa negativos, apoya la evidencia de que las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativas pueden tener un papel importante en la etiología de la mastitis. Es importante destacar que algunas de las especies negativas para coagulasa encontradas en este estudio (portando genes que codifican para enterotoxinas), han sido reportadas como agentes patógenos frecuentes de enfermedades humanas y pueden ser transmitidos por medio de la leche no pasteurizada (23).

En estudios anteriores se ha informado la prevalencia de los genes que codifican para enterotoxinas en microorganismos negativos para coagulasa. En Brasil, el 66 % (n=85) de todos los microorganismos

negativos para coagulasa aislados de leche bovina, presentaron algún gen relacionado con la producción de enterotoxinas, mientras que solo el 35 % de los microorganismos positivos para coagulasa revelaron algún tipo de gen; los genes SEB y SEC fueron detectados en *S. warnei* (24). La detección molecular de los genes *SEE*, *SEG*, *SEH* y *SEI*, se observó en el 32,2 % de *Staphylococcus* para coagulasa negativos en muestras clínicas, en microorganismos como *S. epidermidis* y *S. warnei* (23) *SEG*, *SEH* and *SEI* en cepas de *S. aureus* (en cursiva) y *Staphylococcus* (en cursiva) coagulasa negativos (CNS). Igualmente, el gen *SEA* se detectó en *S. epidermidis*, *S. xyloso* y *S. hominis* aislados a partir de diferentes derivados de repostería, y el gen *SEC* se detectó en *S. xyloso* aislado de pastel de frutas (23,24).

No se detectó el gen *SEE* en los microorganismos evaluados, posiblemente debido a la inexistencia de una transferencia horizontal del gen *SEE* en ellos. Asimismo, ninguna de las cepas identificadas como *S. aureus* presentó bandas correspondientes a los genes que codifican para enterotoxinas *SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED* y *SEE*, resultado similar al de Freitas, et al., en cuyo estudio aproximadamente el 64,4 % de aislamientos coagulasa negativos mostraron la presencia de genes *SEA*, *SEB*, *SEC* y *SED*, mientras que en *S. aureus* apenas fue del 32,2 % (24).

CONCLUSIONES

Este estudio apoya la evidencia de que el desarrollo de la mastitis bovina no solamente está asociado con *Staphylococcus* coagulasa positivo, sino que también están involucradas cepas negativas. La detección de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC en este último grupo, indica que posiblemente se adquieren estos atributos genéticos por transferencia horizontal, por medio de plásmidos, islas de capacidad patógena y bacteriófagos. Lo anterior se evidenció en la detección del gen SEA en *S. sciuri*, anteriormente descrito como un grupo de microorganismos con poca probabilidad de producir las principales enterotoxinas estafilocócicas; por lo tanto, es un grupo con potencial para adquirir estos atributos genéticos que puede ser determinante en el desarrollo de mastitis bovina en el departamento de Boyacá.

FINANCIACIÓN

La financiación de este proyecto contó con el aporte de la Universidad de Boyacá.

CONFLICTOS DE INTERESES

Se manifiesta que el artículo de investigación no presenta conflictos de interés entre investigadores para su elaboración y publicación.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Microbiología y Epidemiología Molecular, de la Universidad de Boyacá.

REFERENCIAS

1. Calderón A, Rodríguez VC. Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Rev Colomb Cienc Pec.* 2008;21:582-589.
2. Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 1996;79:1021-6. doi: 10.3168/jds. S0022-0302(96)76454-8.
3. Taponen S. Coagulase-negative *Staphylococci* as cause of bovine mastitis, Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol.* 2009;134:29-36. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.011.
4. De Freitas Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, de Figueiredo Pantoja JC, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 2013;96:2866-72. doi: 10.3168/jds.2012-5864.

5. Smith MA. The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in orthopaedics. *Orthop Nurs*. 2015;34:128-35. doi: 10.1097/NOR.0000000000000141.
6. Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Biomédica*. 2006;17:287-305.
7. Richardet M, Castro S, Tirante L, Vissio C, Larrriestra A. Magnitud y variación de la mastitis clínica y sus costos asociados en rodeos lecheros de Argentina. *Arch Med Vet*. 2016;48:153-8. doi: org/10.4067/S0301-732X2016000200004.
8. Da Costa L, Rajala-Schultz P, Hoet A, Seo K, Fogt K, Moon B. Genetic relatedness and virulence factors of bovine *Staphylococcus aureus* isolated from teat skin and milk. *J Dairy Sci*. 2014;97:6907-16. doi: 10.3168/jds.2014-7972.
9. Barrera JCH, Merchán MA, Sánchez DAB, Quiroga CFP. Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *ISUB*. 2015;2:162-76.
10. Velandia DP, Torres MI. Protocolo N°008 Determinación de la región r16S. Laboratorio de Epidemiología Molecular. Universidad de Boyacá. 2015; 1-6.
11. Jia Xu, Xiao Tan, Xinyu Zhang, Xiaoli Xia, Huaichang Sun. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microb Pathog*. 2015;88:29-38. doi: org/10.1016/j.micpath.2015.08.004.
12. W. Vanderhaeghen, S. Piepers, F. Leroy, E. Van Coillie, F. Haesebrouck, S. De Vliegher. Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *J. Dairy Sci*. 2014;97:5275-93. doi: org/10.3168/jds.2013-7775.
13. Piessens V, van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, van Nuffel A, et al. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J Dairy Sci*. 2011;94:2933-44. doi: org/10.3168/jds.2010-3956.
14. Camussone CM, Calvino LF. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45:119-30. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70011-7](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70011-7).
15. Salaberry SRS, Saidenberg ABS, Zúñiga E, Melville PA, Santos FGB, Guimaraes EC, et al. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis.

- Microb Pathog. 2015;85:35-9. doi: 10.1016/j.micpath.2015.05.007..
- 2013;163:34-40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005.
16. Zendejas-Manzo GS, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Biomédica. 2014;25:129-43.
17. Borelli BM, Lacerda ICA, Vianna CR, Ferreira MC, Gomes FCO, Carmo LS, et al. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2011;63:481-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000200028>.
18. Moghassem Hamidi R, Hosseinzadeh S, Shekarforoush SS, Poormontaseri M, Derakhshandeh A. Association between the enterotoxin production and presence of *Coa*, *Nuc* genes among *Staphylococcus aureus* isolated from various sources, in Shiraz. Iran J Vet Res. 2015;16:381-4.
19. Bianchi D, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. Lett Appl Microbiol. 2014;58:190-6. doi: 10.1111/lam.12182.
20. Podkowik M, Park J, Seo K, Bystroń J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative *Staphylococcus*. Int J Food Microbiol. 2013;163:34-40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005.
21. Rall V, Miranda E, Castilho I, Camargo C, Langoni H, Guimarães F, et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. J Dairy Sci. 2014;97:829-37. doi: 10.3168/jds.2013-7226.
22. Da Silva Sdo S, Cidral TA, Soares MJdS, de Melo MCN. Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. from food handlers in a university restaurant. Foodborne Pathog Dis. 2015;12:921-5. doi: 10.1089/fpd.2015.1941.
23. Argudín M, Mendoza M, Rodicio M. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins. 2010;2:1751-73. doi: 10.3390/toxins2071751.
24. Siqueira AK, Salerno T, Lara GHB, Condas LAZ, Pereira VC, Riboli DFM, et al. Enterotoxin genes, multidrug resistance, and molecular typing of *Staphylococcus* spp. isolated from organic bovine milk. Braz J Vet Res Anim Sci. 2017;54:81-7. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.109171.
20. Podkowik M, Park J, Seo K, Bystroń J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative *Staphylococcus*. Int J Food Microbiol.



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional