

76696

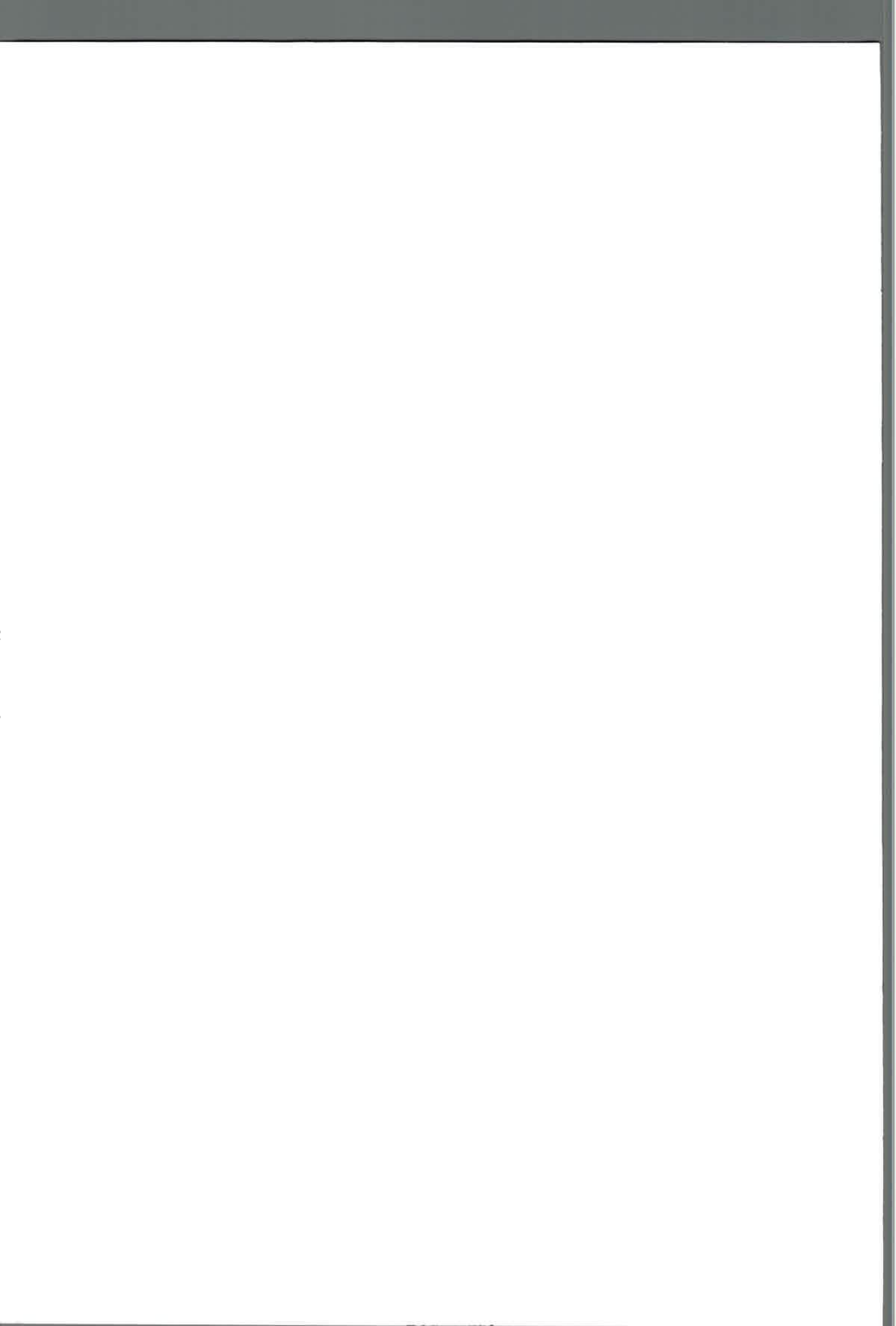
DONACION

Don: Don. El Autor

Autor: Ortiz, Maria Eugenia

Exp:

Inv N: 76696





UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de
Magister en Inocuidad y Calidad de Alimentos

**MASTITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR *STAPHYLOCOCCUS*
COAGULASA NEGATIVO EN CABRAS**

Méd. Vet. María Eugenia Ortiz

2016

DIRECTORA: Dra. Mirta Lasagno


CODIRECTORA: Dra. Claudia Raspanti

Río Cuarto, Diciembre 2016

76696

NFN:
Clasif:
T - 1126

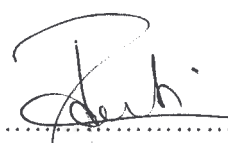
**MASTITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR STAPHYLOCOCCUS
COAGULASA NEGATIVO EN CABRAS**



.....
Méd. Vet/ María Eugenia Ortiz
Tesista




.....
Dña. Mirta Cristina Lasagno
Directora




.....
Dra. Claudia Gabriela Raspanti
Codirectora

Tribunal evaluador



.....
Mgr. Fabián Schiferli



.....
Dr. Matías Santiago Pellegrino



.....
Dr. José María Raviolo

DEDICATORIA

A mis dos amores, Juan y Joaquín.

AGRADECIMIENTOS

A Mirta por su paciencia y dedicación en el desarrollo de la tesis, por enseñarme cada detalle del trabajo en laboratorio, por todo su afecto.

A Claudia por el apoyo y confianza en todas las etapas.

A Vale, amiga y compañera de trabajo que me acompañó a la par en cada momento de este proceso.

A Leo por ayudarme en cada problema que surgía incondicionalmente.

A Claudina, Raúl y César que colaboraron con mucha dedicación en el desarrollo experimental a campo.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	i
Índice de figuras.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumen en español.....	iii
Resumen en inglés.....	iv

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. Introducción.....	1
1.1 Riesgos y peligros en los productos lácteos.....	2
1.2 Puntos de control en la elaboración de productos lácteos.....	2
1.3 Mastitis Bovina.....	2
1.4 Mastitis Caprina.....	3
1.5 Impacto económico.....	4
1.6 Agentes etiológicos.....	5
1.7 Mastitis bovina debido a <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos.....	5
1.8 Factores de patogenicidad de <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos.....	7
1.9 Estudio de patogenicidad bacteriana en Modelos animales.....	8
1.10 Mastitis experimental a SCN.....	10
1.11 Antecedentes en el tema.....	10

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis.....	12
2.2 Objetivos.....	12
2.2.1 Objetivo General.....	12
2.2.2 Objetivos Específicos.....	12

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales.....	13
3.2.1 Cepa de <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo.....	13
3.2.2 Selección de dosis bacteriana desafiante.....	14
3.2.3 Preparación del inóculo.....	14
3.3 Diseño del experimento.....	14
3.4 Análisis de leche.....	15
3.4.1 Recuento de células somáticas.....	15
3.4.2 Recuento de <i>S. chromogenes</i>	16
3.5 Análisis de sangre.....	16
3.6 Examen clínico.....	16
3.7 Muestras de tejidos para examen bacteriológico.....	16
3.8 Muestras de tejido para histopatología.....	17
3.8.1 Histopatología.....	17
3.9 Análisis Estadístico.....	18

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Animales.....	19
4.2 Observaciones clínicas.....	19
4.3 Cambios de la secreción láctea.....	21
4.4 Recuento de células somáticas.....	21
4.5 Recuento de <i>S. chromogenes</i> en leche.....	22
4.6 Análisis de sangre. Recuento de glóbulos blancos y determinación de la fórmula leucocitaria.....	24
4.7 Relación entre RCS en leche de la glándula inoculada y recuento de glóbulos blancos totales.....	27
4.8 Relación entre recuento bacteriano en muestras de leche y glóbulos blancos totales en sangre.....	28
4.9 Examen bacteriológico de muestras de tejidos.....	28
4.10 Patología.....	29

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	32
--------------------------------------	-----------

APÉNDICE.....	34
----------------------	-----------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
--	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Signos clínicos locales y sistémicos en cabras inoculadas con <i>S. chromogenes</i> RC10-31.....	20
TABLA 2: Recuento celular somático y recuento de <i>S. chromogenes</i> RC10-31 en leche de cabras.....	23
TABLA 3: Recuento total y diferencial de glóbulos blancos en sangre periférica.....	26
TABLA 4: Recuento bacteriano en leche y en glándula mamaria de cada cabra en el momento de la mastectomía.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS 1: Recuento de células somáticas en leche de GI y GNI.....	22
FIGURAS 2: Media del RCS y media del Recuento de <i>S. chromogenes</i> en leche de GI.....	24
FIGURAS 3: Recuento de leucocitos en sangre.....	25
FIGURAS 4: Recuento de leucocitos en sangre y recuento de células somáticas en leche de GI.....	27

ABREVIATURAS

µg: microgramo

µl: microlitro

µm: micrómetro

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATS: agar tripticase soya

cél: células

CTS: caldo tripticase soya

ETA: Enfermedades Transmisibles por los Alimentos

g: gramo

GI: Glándula Inoculada

GNI: Glándula no Inoculada

hs: horas

IIM: Infecciones intramamarias

ml: mililitro

mm³: milímetro cubico

pi: post inoculación

PMN: Polimorfonucleares

RCS: Recuento de Células Somáticas

SCN: *Staphylococcus* coagulasa negativo.

SE: error estándar

SF: Solución Fisiológica

Sm^R: resistencia a estreptomycin

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

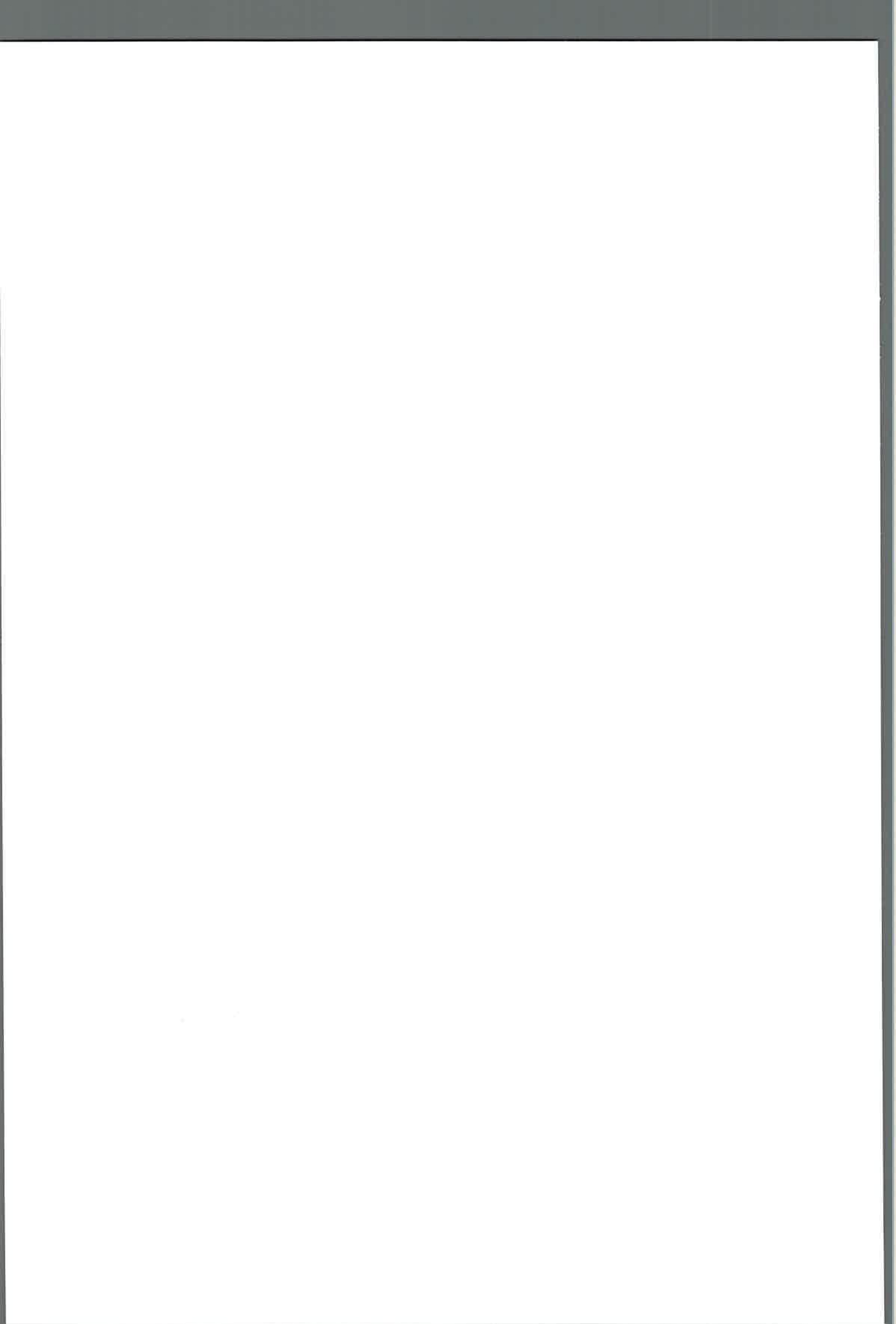
UHT: Ultra Alta Temperatura

RESUMEN

Los *Staphylococcus* coagulasa-negativos (SCN) están emergiendo como potenciales bacterias responsables de infecciones intramamarias bovinas en las explotaciones lecheras modernas. El objetivo del presente estudio fue investigar la respuesta inflamatoria a la mastitis inducida experimentalmente en cabras lactantes por *S. chromogenes*, mediante el empleo de una cepa aislada de mastitis subclínica capaz de expresar *in vitro* distintos factores de virulencia. Un inóculo de 1×10^7 UFC/ml de la cepa *S. chromogenes* RC10-31 fue administrado por vía intramamaria en la glándula derecha (GI) en 6 cabras de la raza Saanen. La glándula izquierda inoculada con solución fisiológica se usó como control (GNI). Durante la experiencia los animales fueron examinados clínicamente cada 4 h durante 24 h. En cada tiempo se recolectaron muestras de leche y sangre. A partir de las 8 h post inoculación (pi) se practicó la extirpación de GI y GNI a una cabra cada 4 h para efectuar estudios bacteriológicos e histopatológicos. A partir de las muestras de leche se determinó el recuento celular somático (RCS) y recuento bacteriano. De las muestras de sangre se efectuó el recuento leucocitario total y fórmula relativa leucocitaria. Entre las 4 y 24 h pi se logró un aumento de 95 veces en el RCS con respecto al inicio de la experiencia y una caída en el recuento de las UFC/ml desde $2,3 \times 10^6$ hasta 2×10^3 UFC/ml. Se observó una reducción en la media del número de neutrófilos segmentados a las 4 h pi, aunque no hubo variaciones con respecto a los valores de referencia. La disminución de los glóbulos blancos totales de sangre periférica se correlacionó con un aumento del RCS en leche de las GI. Entre las 12 y 16 h pi se registró una intensa acumulación de polimorfonucleares (PMN) en los acinos de la GI. A partir de las 20 h pi una intensa infiltración periacinar de PMN y al cabo de 24 h pi leve infiltrado neutrofílico en la luz de los acinos pero intensa infiltración periacinar tanto en glándula como en cisterna. El incremento del RCS sustentado por los cambios histopatológicos específicos de inflamación observados en las GI llevarían a no desestimar la importancia de los SCN y en particular de la especie *S. chromogenes*, como agente causal de mastitis bovina y a valorizar este modelo experimental en el estudio de la respuesta del huésped a mastitis causada por las principales especies del SCN.

ABSTRACT

Coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) became emerging as potential bacteria responsible for bovine intramammary infections in modern dairy farms. The aim of this study was to investigate the inflammatory response to experimentally induced mastitis in lactating goats by *S. chromogenes*, by using a strain isolated from subclinical mastitis capable of expressing in vitro several virulence factors. An inoculum of 1×10^7 CFU / ml of strain *S. chromogenes* RC10-31 intramammary was administered via the right gland (GI) in 6 Saanen goats. The left gland inoculated with saline was used as control (GNI). During the experience the animals were examined clinically every 4 h for 24 h. In each time milk and blood samples were collected. From 8 h post inoculation (pi), GI and GNI were removed aseptically for bacteriological and histopathological studies. From samples of milk somatic cellular count (SCC) and bacterial count it was determined. Blood samples of the total white blood cellular count and relative leucocyte formula were made. A 95-fold increase in SCC was achieved between 4 and 24 h pi with respect to the onset of experience and a decrease in bacterial count from 2.3×10^6 to 2×10^3 CFU/ml. A reduction was observed in the mean number of segmented neutrophils at 4 h pi, although there were no variations with respect to the reference values. The decrease in total peripheral blood white blood cellular were correlated with a increase in milk SCC GI. An intense accumulation of polymorphonuclear neutrophils (PMN) was observed in the acini of the GI between 12 and 16 h pi and a periacinar location from 20 pi. The increase of SCC supported by specific histopathological changes observed in the GI inflammation lead to not underestimate the importance of the CNS and in particular of the species *S. chromogenes*, as a causative agent of bovine mastitis. This study supports the importance of this experimental model for the study of mastitis caused by different species of CNS.



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Riesgos y peligros en los productos lácteos

Los consumidores de hoy en día tienen más conciencia de la salud y demandan productos de alta calidad. La leche por su aporte nutricional es uno de los alimentos de mayor importancia en muchos países del mundo, no obstante ésta y/o los productos lácteos pueden contener una variedad de microorganismos y ser una importante fuente de patógenos transmitidos por alimentos. La presencia de microorganismos patógenos es debida al contacto directo con fuentes contaminadas en el ambiente del tambo o por la excreción desde la ubre de animales infectados. La mayor parte de la leche se consume en forma pasteurizada, no obstante la industria láctea debe preocuparse por la calidad microbiológica de la leche de tanque por varias razones:

- Brotos de ETA (enfermedades de transmisión alimentaria) han sido relacionados al consumo de leche sin pasteurizar.

- Un gran segmento de la población elabora diversos tipos de quesos con leche sin pasteurizar.

- Acceso de microorganismos patógenos desde la leche a la máquina ordeñadora o a la planta procesadora y persistencia de los mismos mediante la formación de biofilms.

- Una pasteurización inadecuada o defectuosa puede no destruir todos los patógenos presentes, por lo tanto bacterias tales como *Listeria monocytogenes* pueden sobrevivir.

Lo antes mencionado supone un riesgo para los consumidores por la exposición directa a los patógenos transmitidos por productos lácteos sin pasteurizar, así como los productos que se vuelven a contaminar después de la pasteurización. La glándula mamaria puede ser un reservorio de bacterias patógenas (Oliver y col., 2005). Por lo tanto la sanidad de ubres, es uno de los principales factores que afectan a la calidad de la leche, incidiendo directamente en la calidad de producto final obtenido en el tambo.

1.2 Puntos de control en la elaboración de productos lácteos

El control en origen de la materia prima empleada, la leche, así como un uso adecuado de antibióticos en el ganado, contribuye a mejorar la seguridad de los lácteos. Los principales puntos de control en la elaboración de productos lácteos son los relativos a la revisión inicial de las materias primas (la leche) y los tratamientos térmicos a los que la leche puede ser sometida (Roig Sagués, 2004). El control de las materias primas es fundamental para eliminar los peligros químicos, como la presencia de antibióticos o de micotoxinas, cuya eliminación no puede ser garantizada por ninguna etapa posterior del proceso, al ser en general sustancias resistentes a las altas temperaturas. Pero esta etapa, a su vez, es muy importante para garantizar la eficacia de los tratamientos térmicos posteriores frente a los peligros biológicos, ya que ésta depende en gran parte de la carga inicial y del tipo de microbiota presente en la leche. Considerando que los tratamientos térmicos aplicados en la actualidad son seguros y eficaces, en la mayoría de los casos de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) descritos por consumo de productos lácteos elaborados a partir de leche pasteurizada deberemos buscar la causa de la presencia de agentes patógenos en contaminaciones cruzadas posteriores al tratamiento térmico. No obstante, en las ETA causadas por *Staphylococcus spp.*, las bacterias pueden haber producido enterotoxinas termoestables con anterioridad, como lo demuestra el hecho que en muchos de los brotes descritos no se aisló el microorganismo, aunque sí se detectó la enterotoxina en las muestras (Ikeda y col., 2005). En este caso es fundamental el control de las temperaturas de conservación de la leche previas al tratamiento térmico.

1.3 Mastitis Bovina

La mastitis bovina, como su nombre lo indica, constituye una reacción inflamatoria de la glándula mamaria bovina que usualmente es causada por microorganismos (Philpot y Nickerson, 1992; National Mastitis Council, 2004; 2009). La leche proveniente de vacas con mastitis se caracteriza por un incremento en células somáticas, seguido por un incremento en proteasas endógenas y cambios en el tejido mamario, y como consecuencia cambios físicos, químicos y microbiológicos en la leche y en los productos lácteos (Ma y

col., 1999). Cuando el recuento de células somáticas (RCS) es mayor a 10^5 cél/ml la plasmina, principal proteasa de la leche degrada la caseína de la leche ocasionando inconvenientes en la elaboración de quesos. Además se retarda la formación del cuajo y se detectan cambios en el sabor y aroma generando efectos negativos en el rendimiento de los quesos y en la textura. Otra consecuencia de los altos valores de RCS en leche mastítica, es la presencia de sustancias antimicrobianas liberadas por las células somáticas. Estas sustancias tienen influencia en el crecimiento y en el metabolismo de las bacterias iniciadoras usadas en la elaboración de los quesos, lo que conduce a una menor aceptación por parte de los consumidores, de los quesos elaborados con leche con alto RCS (Klei y col., 1998). Numerosos estudios han demostrado que el aumento en el RCS en la leche bovina resulta en una disminución de la producción de leche y afecta a la composición de la misma, lo que provoca una reducción en la capacidad de producir queso y disminuye el tiempo de conservación de la leche de consumo. Hachana y col. (2010) establecen que el RCS y la carga bacteriana de la leche influyen en la conservación de leche sometida a ultra alta temperatura (UHT). Si se elabora con elevado RCS (1×10^6 cél/ml) y alto recuento bacteriano total (mayor a 2×10^6 UFC/ml) desarrolla sabor y aroma desagradable a los 30 y 60 días, respectivamente.

Quesos elaborados a partir de leche con elevados RCS presentan mayor tiempo de coagulación. Además se determinó un mayor nivel de proteólisis y contenido de humedad en quesos elaborados con leche con alto RCS, lo cual estuvo asociado con defectos en la textura y en el sabor, factores que contribuyeron a la poca aceptación de estos quesos (Vianna y col., 2008). Los resultados obtenidos por Wedholm y col. (2008) indican que catepsinas y elastasas son las enzimas responsables de la proteólisis observada en leche con elevados recuentos de células somáticas.

1.4 Mastitis Caprina

Por otra parte, elevados valores de células somáticas en leche de cabra tiene un fuerte impacto en la lipólisis de la leche, incrementando los ácidos grasos libres, causantes de defectos en el aroma y en la textura de los quesos, independientemente si se elaboran con leche cruda o pasteurizada (Sánchez Macías, 2013; Chen y col., 2010). La leche

proveniente de cabras con mastitis tiene importancia, no sólo porque está alterada su capacidad industrial y reducido su valor nutricional, sino que además resulta peligrosa para la salud humana debido al riesgo de la transmisión del patógeno o a la contaminación con sus toxinas (Akineden y col., 2008).

1.5 Impacto económico

La mastitis bovina ocasiona grandes pérdidas económicas debido a la disminución en la producción de leche (Welleberg y col., 2002; Rabello y col., 2005), al aumento en el número de tratamientos de casos clínicos, pérdidas por eliminación de leche contaminada con antimicrobianos y al desecho temprano de animales (Saran y Chaffer., 2000; Nash y col., 2003; Larriestra y Vissio, 2012).

A nivel mundial, las pérdidas causadas por mastitis bovina son de aproximadamente 35 mil millones de pesos anuales y representa el 70 % de los gastos totales para los ganaderos lecheros (Philpot y Nickerson, 1992; Dos Santos y col., 2002; Welleberg y col., 2002; De Vlieghe y col., 2012; Fabres-Klein y col., 2014).

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina (2015), los valores de RCS en leche, en un total de 6.229 tambos con una producción promedio mensual de aproximadamente 557 millones de litros de leche en enero del 2015, fue de 446.400 cél/ml, teniendo en cuenta que las pérdidas económicas corresponden al 5% del total de la leche producida, se puede calcular una disminución anual aproximada de 334 millones de litros.

El impacto económico directo de valores elevados de RCS difiere considerablemente entre países. Los requerimientos de calidad para leche cruda en nuestro país establecen que recuentos <250.000 cél/ml presentan el mayor porcentaje de bonificación por calidad higiénico-sanitarios (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina, 2015).

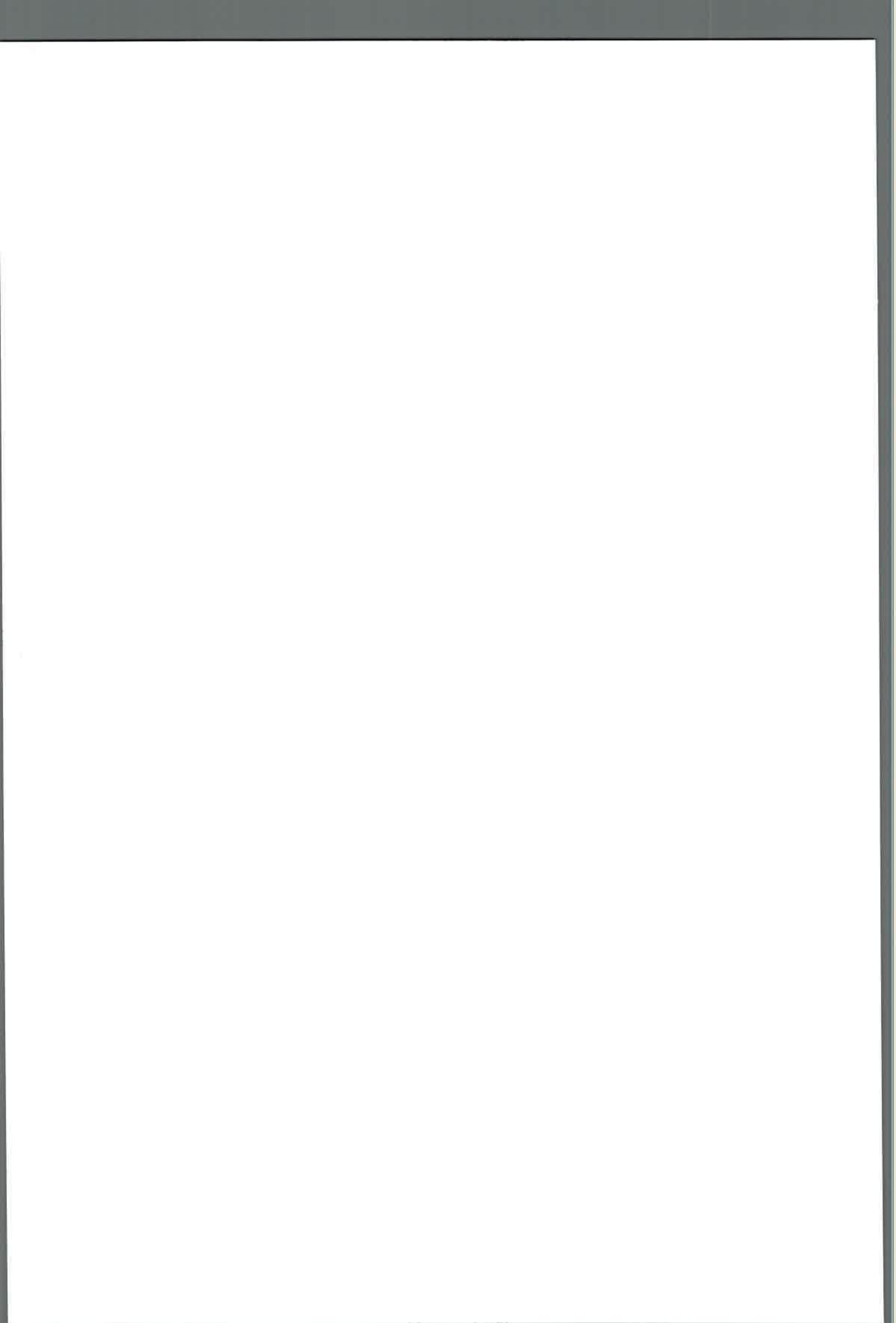
1.6 Agentes etiológicos

La mastitis puede ser causada por muchas especies bacterianas diferentes. En Argentina, las especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* son las más prevalentes en infecciones clínicas y subclínicas (González y col., 1980; Rivero y col., 1984; Calvino y col., 1991; Calvino y Tirante 2005; Gentilini y col. 2012; Dieser y col., 2014). Dentro del género *Staphylococcus*, las especies caracterizadas como coagulasa negativas (SCN) están emergiendo como potenciales bacterias responsables de infecciones intramamarias (IIM) en las explotaciones lecheras modernas (Taponen, 2008; Pyörälä y Taponen, 2009; Sansano, 2010; Vanderhaeghen y col., 2014). En nuestro país estudios llevados a cabo en establecimientos lecheros del centro de la provincia de Córdoba (Rampone y col., 1993; Dieser y col., 2014), en la cuenca lechera santafesina (Delgado y col., 1998) y en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos y la Pampa (Gentilini y col., 2012) muestran una alta prevalencia de SCN en leche proveniente de vacas con mastitis clínica y subclínica. Dada la creciente importancia de los SCN como agentes causales de IIM bovinas, varios estudios han sugerido considerarlos patógenos emergentes causantes de mastitis bovina (Davidson y col., 1992; Pyörälä y Taponen, 2009; Paradis y col., 2010; Hosseinzadeh y Saei, 2014).

La descripción de la patogenicidad de este grupo bacteriano no se encuentra del todo claro, ya que puede causar mastitis clínica como subclínica e incluso algunos autores han informado acerca de un efecto benéfico de estos microorganismos a la ubre, debido a que impide la colonización de patógenos mayores (Nickerson y Boddie, 1994; De Vlieghe y col., 2003; 2004; Taponen y col., 2007; Schukken y col., 2009).

1.7 Mastitis bovina debido a *Staphylococcus coagulasa negativos*

Se ha planteado que el adecuado manejo higiénico-sanitario de los rodeos lecheros, ha llevado a una reducción de la incidencia general de la mastitis contagiosa debida a patógenos mayores, y a que patógenos oportunistas, como los SCN, sean en la actualidad la principal causa de mastitis subclínicas o clínicas leves (Tenhagen y col., 2006; Taponen y Pyörälä, 2009; Ruegg, 2009; Gillespie y col., 2009; Sampimon y col., 2009; Schukken y



col., 2009; Paradis y col., 2010; Piepers y col., 2010; Waller y col., 2011; Supré y col., 2011; Park y col., 2012; Kalmus y col., 2013; Vanderhaeghen y col., 2014; De Visscher y col., 2016). Además, dada su habilidad para eludir el sistema inmune, persisten en la glándula por un largo periodo de tiempo (Piessens y col., 2011; Supré y col., 2011). Esto se asocia con un incremento en el nivel de conteo de células somáticas y cambios en el patrón de leucocitosis indicando que los SCN causan una inflamación mamaria crónica similar a la causada por *S. aureus* (Timms y Schultz, 1987; Hogan y col., 1987; Oliver y Jayaro, 1995; Chaffer y col., 1999; Taponen y Pyörälä, 2009; Gillespie y col., 2009; Piepers y col., 2010; Paradis y col., 2010; Tomazi y col., 2015). Además, la prevalencia de SCN que albergan genes que codifican toxinas y resistencia a antimicrobianos los ubica como potenciales causantes de esta enfermedad (Zhang y Maddox, 2000; Rall y col., 2010; De Oliveira Calsolari y col., 2011; Park y col., 2011).

La incidencia de infecciones por SCN es al principio del periodo seco, cuando la piel del pezón no está expuesta a los desinfectantes. El porcentaje de cuartos afectados por SCN es mayor en vaquillonas en el periparto y durante su primera lactancia, que en vacas de mayor edad (McDougall y col., 2007; Fox, 2009; Piepers y col., 2010; De Vlieghe y col., 2012).

En lo referente a reservorios de SCN en rodeos lecheros existen especies mejor adaptadas a la glándula mamaria, como *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* frecuentemente aisladas de leche y del canal del pezón, mientras que otras especies están mejor adaptadas al entorno del animal como *S. xylosum*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* y *S. cohnii*, las cuales son frecuentemente aisladas del aire, suelo, aserrín o arena de las camas (Piessens y col., 2011).

Staphylococcus chromogenes es la especie aislada con mayor prevalencia en muestras de leche (Trinidad y col., 1990; Matthews, 1992; Todhunter y col., 1993; Chaffer y col., 1999; Rajala-Schultz y col., 2006; Taponen y col., 2006; Taponen y Pyörälä, 2009; Sampimon y col., 2009; Vanderhaeghen y col., 2014; Ruegg y col., 2015; Raspanti y col., 2016).

La identificación de las distintas especies de *Staphylococcus* es importante ya que proporciona un valor predictivo sobre si el microorganismo aislado tiene importancia clínica o si se trata de un contaminante. Además aumenta el conocimiento de la patogénesis

de las especies estafilocócicas, información que resulta de utilidad para estudios epidemiológicos (Jarp, 1991; Waage y col., 1999). La identificación basada en reacciones fenotípicas es insuficiente, ya que siempre queda un porcentaje de cepas que están en una ubicación intermedia, debido a la variable expresión de las características fenotípicas de muchas especies de *Staphylococcus*, por ello se han propuesto métodos alternativos basados en características moleculares.

1.8 Factores de patogenicidad de *Staphylococcus* coagulasa negativos

La patogenicidad de las especies de *Staphylococcus* está asociada con la presencia de distintos factores de virulencia. Estos incluyen:

- Componentes de la pared celular: cápsula de polisacárido y slime, que permiten evadir los mecanismos de defensa del huésped como la fagocitosis.
- Proteínas de superficie: reconocen moléculas adhesivas de la matriz que promueven la adhesión al tejido del huésped, y la posible internalización tal como: proteína de unión a fibrinógeno y proteína de unión a fibronectina.
- Proteínas secretadas como superantígenos.
- Citotoxinas.
- Enzimas que degradan tejido del huésped: proteasas, lipasas, hialuronidasas, colagenasas que promueven la invasión y la propagación bacteriana al tejido (Haveri y col., 2007; Fournier y col., 2008).

La conjunción de los distintos factores de virulencia contribuyen a que la bacteria patógena evada las defensas del huésped, facilite su adherencia a las células epiteliales mamarias y colonice el tejido favoreciendo su persistencia y supervivencia, garantizando así el éxito para instalarse y mantenerse en el tejido huésped (Silva y col., 2003; Coelho y col., 2011). Algunas especies de SCN son más capaces que otras a causar IIM persistente, la diferencia puede atribuirse a determinados factores de virulencia, a la adaptación al desarrollo en la ubre o ambos (Thorberg y col., 2009).

Las distintas especies de SCN pueden producir varias toxinas y enzimas, como α -hemolisina, desoxirribonucleasa termoestable (TNAse), leucocidina, lipasas, proteasas, DNase, elastasa, exobiopolímeros (biofilm), proteínas de unión a fibronectina, cápsula,

toxinas semejantes a la β y δ hemolisina y a los superantígenos (enterotoxinas pirogénicas) de *S. aureus* (Scheifele y col., 1987; Watts y Owens, 1987; Beddi-Madani y col., 1998; Zhang y Maddox, 2000; Kuroishi y col., 2003; Cunha y col., 2006; Türkyilmaz y Kaya 2006; Park y col., 2011), que inducen respuestas inflamatorias o daño tisular y contribuyen a su virulencia (Janda, 1986; Scheifele y col., 1987; Watts y Owens, 1987; Valle y col., 1990; Beddi-Madani y col., 1998; Dziewanowska y col., 1999; Zhang y Maddox, 2000; Brouillette y col., 2003; Otto, 2004; Cunha y col., 2006; Türkyilmaz y Kaya, 2006). El potencial patogénico también está asociado con las funciones bioquímicas que pueden considerarse como factores de virulencia, esto incluye la producción de *slime* o adherencia a sustrato (Christensen y col., 1985; Davenport y col., 1986; Otto, 2004; Simojoki y col., 2012; Xu y col., 2015; Zuniga y col., 2015).

1.9 Estudio de patogenicidad bacteriana en modelos animales

Para develar la base de la interacción, hospedador-patógeno se han desarrollado varios modelos animales en función de sus ventajas experimentales, es decir, bajo costo, facilidad de mantenimiento y similitud al hospedador natural. Estos modelos intentan reproducir el medio ambiente específico encontrado en el hospedador, y representan una alternativa para el estudio de los factores de virulencia de las bacterias patógenas.

Desde comienzos del decenio de 1960 los conejos, ratas y ratones han sido utilizados para determinar diversos aspectos de las características fisiopatológicas, y de las respuestas inmunológicas durante las infecciones estafilococales en diferentes órganos y sistemas (García-Lara y col., 2005).

El modelo murino ha sido usado para el estudio de mastitis experimental a *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Chandler, 1970; Brouillette y col., 2004).

Si bien estos modelos animales reproducen patologías como la mastitis, en apariencia similar a las registradas en bovinos, todas las conclusiones de las experimentaciones deben ser interpretadas con precaución y sin realizar extrapolaciones rápidas a la infección en el hospedador natural (Brouillette y col., 2004).

La infección intramamaria por *S. aureus* ha sido estudiado en vacas lactantes por varios autores (Schukken y col., 2009; Alluwaimi y col., 2003; Atalla y col., 2009). También han sido informados ensayos de mastitis experimental en bovino inducida por SCN (Simojoki y col., 2011; Piccart y col., 2015) y por *Streptococcus uberis* (Oliver y col., 2003; Khazandi y col., 2015; Notcovich y col., 2016).

A pesar de las incuestionables ventajas en el uso de los mamíferos para los estudios de patogénesis, el modelo bovino no resulta un modelo accesible. El uso de un gran número de vacas es difícil por razones logísticas, éticas y financieras, y un número adecuado es crítico a nivel estadístico para superar la variabilidad intrínseca de los modelos *in vivo* (García-Lara y col., 2005).

El modelo caprino ha sido empleado para el estudio de mastitis considerando que estudios genómicos han demostrado que la especie caprina está estrechamente relacionada con la especie bovina (Schibler y col., 1998). Obviamente que la clave para que un huésped califique como modelo para el estudio de la patogénesis bacteriana es que responda al agente infeccioso de igual manera en este caso que la vaca.

La inducción de mastitis experimental en cabras por patógenos menores, *Chlamydia psittaci*, *Nocardia asteroides*, *Mycoplasma agalactiae* ha sido publicada por varios autores (Koul y col., 1993; Bassam y Hasso, 1997; Castro-Alonso y col., 2010). Un estudio realizado por Lasagno y col. (2012) puso en evidencia que las cabras representan un modelo valioso, para el estudio de la patogenia de la mastitis causada por *S. uberis*. El modelo caprino también ha sido empleado para el estudio de mastitis experimental por *S. aureus*, (Cremonesi y col., 2012; Brenaut y col., 2014; Fasulkov y col., 2015).

Así, la cabra constituye un modelo alternativo adecuado para provocar una infección experimental, dado que es menor el costo comparado con un modelo experimental bovino y además permite el estudio de proteínas de la leche y del suero, y la interacción del patógeno con células mamarias del hospedador y con los componentes inmunes presentes ó reclutados durante la infección. Además, el canal del pezón y la glándula mamaria de las cabras presentan la ventaja de ser más grandes con relación a la de los ratones (Brouillete y Malouin, 2005).

1.10 Mastitis experimental a SCN

La mastitis ocasionada por SCN ha sido estudiada en diversos modelos experimentales. Amorena y col., (1991) realizaron un ensayo con *Staphylococcus chromogenes* y *Staphylococcus hyicus* en conejos. Recientemente hay registro de ensayos con SCN en glándula mamaria de ratones (Breyne y col., 2015). Sin embargo, la glándula mamaria de una vaca lechera se diferencia considerablemente de la de los pequeños animales de experimentación.

Simojoki y col., (2011) y Piccart y col., (2015) llevaron a cabo ensayos de mastitis experimental en bovinos con *Staphylococcus simulans* y *Staphylococcus epidermidis*, mientras que otros investigadores (Mavrogianni y col., 2004) indujeron una mastitis experimental con *S. chromogenes* en ovejas. Este huésped también ha sido usado para estudiar la dinámica de la mastitis causada por *S. epidermidis* (Winter y col., 2003). De acuerdo a lo estudiado no hay referencias bibliográficas de ensayos de mastitis experimental en cabras por SCN.

1.11 Antecedentes en el tema

En el transcurso del año 2007 se llevó a cabo el relevamiento de 51 tambos de la cuenca lechera central de Argentina. Este estudio evidenció un elevado porcentaje (52%) de cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativos (SCN) a partir de muestras de leche compuesta (Dieser y col., 2014). La identificación genotípica reveló una importante proporción de aislamientos para *S. chromogenes* (46.6%) (Raspanti y col., 2016). Este resultado fue coincidente con aquellos reportados por otros autores donde *S. chromogenes* fue la especie predominante de SCN aislada de leche de bovinos (Trinidad y col., 1990; Matthews, 1992; Todhunter y col., 1993; Chaffer y col., 1999; Rajala-Schultz y col., 2006; Taponen y col., 2006; Taponen y Pyörälä; 2009; Sampimon y col., 2009; Vanderhaeghen y col., 2014; Ruegg y col., 2015).

En varios estudios, diferentes especies de SCN han mostrado contener uno o algunos de los diferentes factores de virulencia mencionados, pero una descripción coherente de qué

especies pueden ser más virulentas y por cuáles factores, no está descrito aun (Vanderhaeghen y col., 2014).

Estudios preliminares “*in vitro*” llevados a cabo con las cepas de SCN aisladas de la cuenca lechera central de Argentina, indican a *Staphylococcus chromogenes* como una de las especies de SCN con mayor potencial patogénico dada la prevalencia y distribución de factores de virulencia asociados a la misma (Bonetto, 2014; Filipuzzi y col., 2015). El 94,6%, 70,2%, 64,8% y 59,7% de las cepas de *S. chromogenes* presentaron actividad proteolítica, lipolítica, sinergismo de hemólisis y de desoxirribonucleasa, respectivamente.

Sobre la base de todo lo expuesto se plantean la siguiente hipótesis y objetivos.

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Se podría hipotetizar que una cepa de *Staphylococcus chromogenes* productora de proteasa, lipasa, enolasa, sinergismo hemolítico y biofilm induce inflamación de la glándula mamaria de cabras lactantes.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una mastitis experimental en cabras lactantes con una cepa de *Staphylococcus chromogenes* productora de distintos factores de virulencia.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria ocasionada por *Staphylococcus chromogenes*.
- Evaluar los cambios histopatológicos inducidos por la invasión del microorganismo inoculado.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS



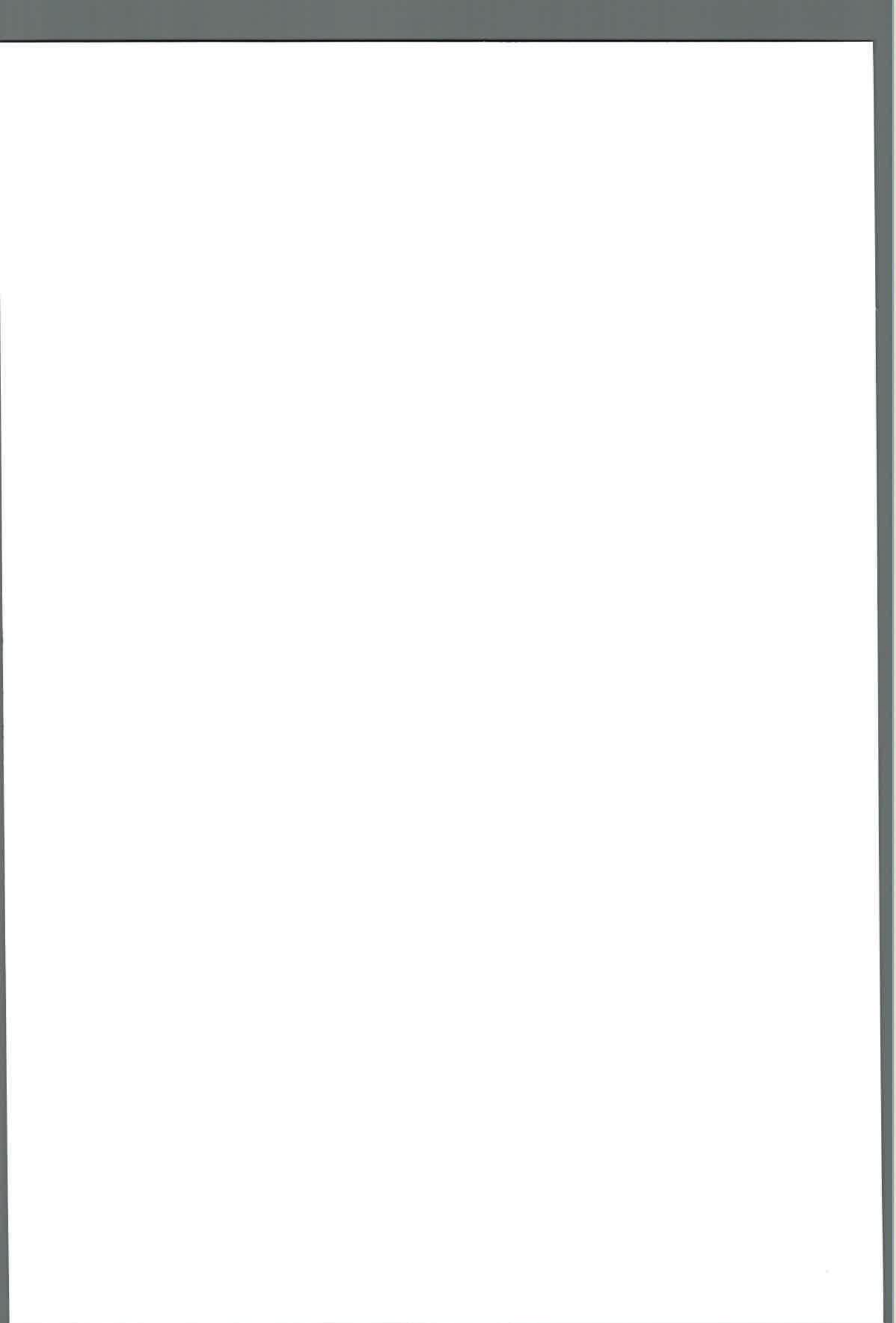
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales

Los animales usados para el ensayo de mastitis experimental pertenecen a un tambo caprino situado en la Estancia Yucant a 30 kilómetros de Pampayasta Sud en el departamento San Martín, Córdoba. A los efectos de seleccionar cabras libres de infección intramamaria se determinó el RCS y la presencia de microorganismos por 3 días consecutivos previos al ensayo en muestras de leche de cada cuarto en 21 cabras de la raza Sannen de primera parición y en lactancia media. Este esquema se desarrollo teniendo en cuenta que el número de pariciones y mes de lactación son factores de variación del RCS de origen no infeccioso en leche de cabra (Sánchez y col., 1999). De las cabras bacteriológicamente negativas y con menos de 250.000 células somáticas/ml, según criterio establecido por Pisoni y col., (2010) y Cremonesi y col. (2012), se seleccionaron 6 cabras. Las mismas fueron alimentadas con una ración diaria de 1 kg de maíz molido/cabra y tuvieron libre acceso a fardos y al agua.

3.2.1 Cepa de *Staphylococcus coagulasa negativo*

La cepa de SCN seleccionada, designada RC10-31, corresponde a un aislamiento de mastitis subclínica bovina obtenido durante el relevamiento de tambos pertenecientes a la cuenca lechera central de Argentina (Dieser y col., 2014). La cepa, identificada a nivel de especie por PCR-RFLP del gen *groEL* (Bonetto, 2014) y confirmada por PCR-RFLP del gen *gap* y espectrometría de masas *MALDI-TOF* (Conesa y col., 2016), pertenece a la especie *S. chromogenes* y presenta el siguiente perfil de virulencia: producción de biofilm, proteasas, lipasas, DNAsa y sinergismo de hemólisis con una cepa β -hemolítica de *S. aureus* (Filipuzzi, 2015). Se seleccionó una mutante con resistencia espontánea a estreptomycin de la cepa motivo de estudio, a efectos de corroborar la identidad de la cepa aislada luego de la mastitis experimental con la cepa inoculada. Para ello se cultivó la cepa de *S. chromogenes* RC10-31 en caldo tripticase soya (CTS) en agitación toda la noche. El *pellet* obtenido de la centrifugación de 2 ml de cultivo se resuspendió en 100 μ l del mismo cultivo y se sembró



por diseminación en superficie con espátula de Drigalsky en una placa de agar tripticase soya (ATS) con 100 µl /ml de estreptomina. La cepa salvaje y la mutante espontánea resistente a estreptomina obtenida, fueron repicadas en presencia del antibiótico para corroborar la estabilidad de la mutación. A continuación se corroboró que la cepa mutante conservara los factores de virulencia antes mencionados.

3.2.2 Selección de dosis bacteriana desafiante

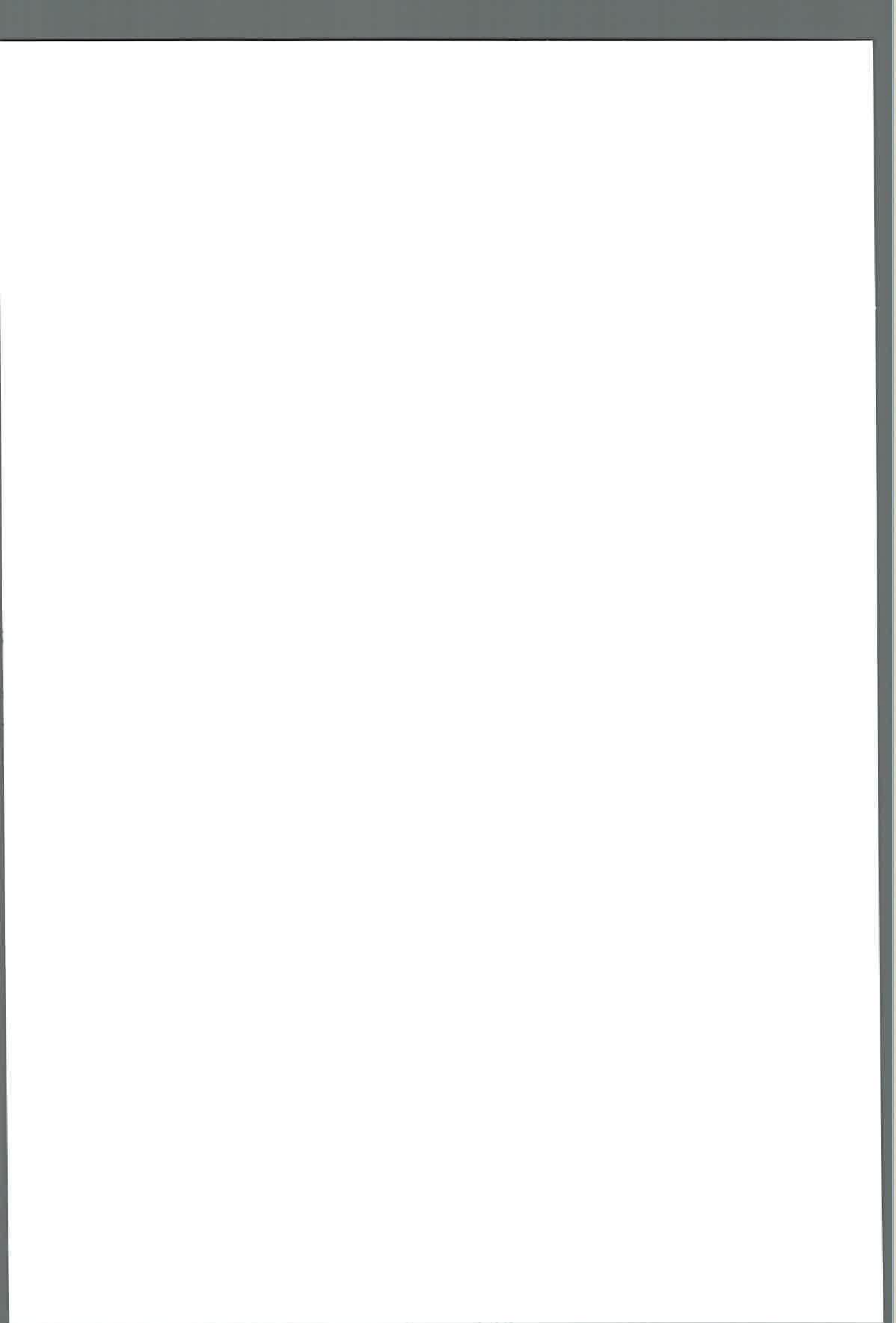
De acuerdo a la búsqueda bibliográfica del presente trabajo no se encontró reportes previos de mastitis experimental en cabras por SCN, por ello fue necesario determinar, en un ensayo preliminar, la dosis bacteriana capaz de inducir una mastitis experimental en esta especie animal. Se probaron las siguientes dosis: 1×10^4 y 1×10^7 UFC/ml para este ensayo de mastitis experimental. La dosis elegida fue de 1×10^7 UFC/ml, dado que mostró cambios en el RCS dentro de un período de 24 h.

3.2.3 Preparación del inóculo

A partir de diez colonias de la cepa SCN RC10-31 (Sm^R) crecidas en ATS, se realizó un precultivo en 5 ml de CTS durante 18 h. Posteriormente, se efectuó una dilución 1/200 y se incubó durante 5 h, hasta alcanzar una concentración de 1×10^7 UFC/ml. El recuento de células viables del inóculo se determinó por siembra de diluciones seriadas en ATS. Se realizaron ensayos preliminares para corroborar que la conservación ($4^\circ C$ durante 3 horas) hasta el momento de la inoculación en el corral mantuviera la concentración establecida.

3.3 Diseño del experimento

Seis cabras fueron inoculadas luego del ordeño de la mañana, previo lavado y desinfección con alcohol de los pezones. Un volumen de 1 ml de la cepa *S. chromogenes* RC10-31 con un recuento de 1×10^7 UFC/ml fue inoculado por vía intramamaria en la cisterna de la glándula derecha, GI (Glándula Inoculada), con una aguja estéril de extremo romo. Posteriormente se efectuaron masajes para favorecer el movimiento ascendente del



inóculo. La glándula izquierda inoculada simultáneamente con 1 ml de solución fisiológica estéril fue considerada control negativo, GNI (Glándula No Inoculada).

Durante la experiencia al tiempo 0, 4 y 8 h se recolectaron muestras de leche de glándula derecha e izquierda, muestras de sangre y se examinaron clínicamente las 6 cabras. A las 12, 16, 20 y 24 h se recolectaron muestras de leche (glándula derecha e izquierda) y sangre y se examinaron clínicamente de 5, 4, 3 y 2 cabras respectivamente.

Para efectuar la recolección de leche, los pezones fueron lavados y desinfectados con alcohol. Luego de eliminar el primer chorro, se recogió un volumen de 40 ml de cada glándula en envases separados con y sin azidol para RCS y bacteriano, respectivamente. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su procesamiento, dentro de las 24 h de recolección. Para la toma de muestras de sangre se extrajo un volumen de 2 ml de la vena yugular con anticoagulante (sal sódica del ácido diaminotetraacético).

A partir de las 8 h post inoculación (pi) se practicó la extirpación de la glándula mamaria a una cabra cada 4 h para efectuar estudios bacteriológicos e histopatológicos. Se conservaron a 4°C secciones de la zona distal, central y proximal de glándula mamaria derecha e izquierda y ganglio linfático para su posterior análisis. Las 6 cabras fueron sometidas a tratamiento con cloxacilina y penicilina para su recuperación y cura bacteriológica.

3.4 Análisis de leche

3.4.1 Recuento de células somáticas

Una característica que define a la glándula mamaria caprina y la diferencia de la secreción en el ganado bovino, es su predominante carácter apocrino. Así, durante el mecanismo normal de secreción, las células epiteliales pierden parte de su citoplasma aportando una gran cantidad de partículas citoplasmáticas a la leche, de tamaño similar a los leucocitos pero que carecen de ácido nucleico. Este tipo de secreción láctea condiciona el uso de una determinada técnica, que cuenta solamente las células presentes, a través de la unión de un fluorocromo al ADN permitiendo diferenciar adecuadamente entre partículas citoplasmáticas y células epiteliales (Contreras y col., 1997). Por lo tanto, para el realizar el

RCS se empleó el método de Fluorocitometría Laser recomendado por la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF 148A:1995). Las muestras conservadas con azidiol fueron procesadas en un lapso no mayor a 24 h en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de Villa María con un equipo Bentley Somacount 300^R. Inicialmente la muestra de leche fue colocada en un baño María a 40°C, luego homogeneizada con un agitador incorporado al equipo para la posterior determinación de RCS. Los resultados fueron registrados como cél/ml x1000.

3.4.2 Recuento de *S. chromogenes*

El recuento de *S. chromogenes* RC10-31 se realizó mediante el método de dilución en placas conteniendo estreptomicina 100µl/ml en las muestras de leche colectadas con una frecuencia de 4 h de las glándulas inoculadas de cada cabra. La identidad de la cepa aislada se confirmó por su resistencia a estreptomicina.

3.5 Análisis de sangre

Se extrajo una muestra de sangre de la vena yugular de las cabras en cada tiempo del ensayo. El recuento leucocitario total y fórmula relativa leucocitaria se realizó en el laboratorio de Diagnóstico Veterinario de Villa María, mediante Citometría de Flujo, con un equipo automático Mindray BC 2800^R.

3.6 Examen clínico

Durante la experiencia, las cabras fueron examinadas clínicamente por inspección visual, palpación de la ubre y medición de la temperatura rectal en cada tiempo.

3.7 Muestras de tejidos para examen bacteriológico

Las muestras constituidas por 5 g de tejido de glándula mamaria derecha e izquierda fueron obtenidas luego de la extirpación de las mismas, y conservadas a -20°C. Para

determinar el número de células viables las muestras fueron pesadas y homogeneizadas en 3 ml de solución fisiológica (SF) con la ayuda de un mortero. De la suspensión obtenida se realizó siembra en superficie sobre ATS (Sm 100µl/ml) de diluciones decimales en SF para su posterior recuento de células viables por gramo de tejido.

3.8 Muestras de tejido para histopatología

Las muestras para los estudios histopatológicos se obtuvieron por mastectomía bilateral, obteniéndose especímenes de aproximadamente 1 cm³ de las siguientes locaciones, canal del pezón, cisterna, tejido glandular de las zonas distal, medial y proximal. La muestra de linfonódulos inguinal superficial, derecho e izquierdo se obtuvo mediante resección quirúrgica.

Cada muestra (1 cm³) fue fijada con formaldehído al 10%. Se realizó la deshidratación con alcohol en gradación creciente (50% a 100%). Se colocaron luego las muestras en moldes de parafina.

3.8.1 Histopatología

Una vez solidificado los bloques, se efectuaron cortes de 10 µm de grosor, los que se extendieron sobre un portaobjetos. Se desparafinaron con xilol 100% y se rehidrataron con alcohol en gradación decreciente (100% a 70%). Se usó la coloración Hematoxilina-Eosina, para ello se cubrió el tejido fijado al portaobjetos con hematoxilina por 5 min. Se eliminó el exceso de colorante y viró con agua corriente. Después ésta última coloración se deshidrató mediante pasajes rápidos en alcohol de gradación creciente, paso seguido se eliminó alcohol con xilol 100% y se adhirió el cubreobjeto utilizando Entellán^R como medio de montaje.

Los preparados se observaron con microscopio óptico con aumento de 10X y se seleccionaron 5 campos al azar. Cada campo seleccionado fue examinado a diferentes aumentos para caracterizar los tipos celulares presentes (4X, 10X, 40X y 100X).

3.9 Análisis Estadístico

Los datos de leche y sangre fueron analizados con un test no paramétrico de Kruskal–Wallis.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Animales

Las seis cabras seleccionadas para el ensayo de mastitis experimental estaban libres de IIM con *S. chromogenes* y otros patógenos mamarios ya que no se observó crecimiento bacteriano en las muestras de leche recolectadas 24, 48 y 72 h antes de la inoculación por vía intramamaria de la cepa *S. chromogenes* RC10-31. Estos resultados están acordes a los obtenidos por Bagnicka (2011), quien a partir de un estudio de 487 muestras de leche de cabra no aisló patógenos en el 65% de las mismas, mientras que los SCN y otros patógenos mayores se detectaron en un 25% y 9,8% respectivamente.

4.2 Observaciones clínicas

En la inspección visual, para investigar la respuesta clínica provocada por la cepa RC10-31 durante la experiencia, no se observaron signos de edema en las glándulas inoculadas. Sólo dos cabras (cabra CR y cabra 890) presentaron un leve aumento de temperatura rectal (40,6°C y 40,5°C respectivamente) a las 8 h post-inoculación (pi), considerando que la temperatura normal de las cabras está entre 38,6-40°C (Tabla 1).

Tabla 1. Signos clínicos locales y sistémicos en cabras inoculadas con *S. chromogenes* RC10-31

Tpo Hs pl	CABRA 253				CABRA CR				CABRA 53				CABRA 58				CABRA67				CABRA 890			
	T° C	EDEMA	CALOR	DOLOR	T° C	EDEMA	CALOR	DOLOR	T° C	EDEMA	CALOR	DOLOR	T° C	EDEMA	CALOR	DOLOR	T° C	EDEMA	CALOR	DOLOR	T° C	EDEMA	CALOR	DOLOR
0	39,1	-	-	-	39,1	-	-	-	38,6	-	-	-	38,9	-	-	-	38,9	-	-	-	39,9	-	-	-
4		-	-	-		-	-	-	38,9	-	-	-	39,5	-	-	-	39,6	-	-	-	40	-	-	-
8	39,8	-	-	-	40,6	-	-	-	39,7	-	-	-	39,6	-	-	-	39,9	-	-	-	40,5	-	-	-
12	mastectomía					-	-	-	38,7	-	-	-	38,7	-	-	-	39,6	-	-	-	39	-	-	-
16					mastectomía				38,1	-	-	-	39,2	-	-	-	38,9	-	-	-	39,3	-	-	-
20									mastectomía				39	-	-	-		-	-	-	38,7	-	-	-
24													mastectomía				38,2	-	-	-	38,6	-	-	-

Los resultados obtenidos en este estudio difieren a los informados por otros autores (Pisoni y col., 2010; Cremonesi y col., 2012), quienes investigaron la patogénesis temprana en cabras luego de la inoculación de 1×10^3 UFC/ml de la cepa *S. aureus* DV137 aislada de un caso de mastitis caprina crónica, por un período de 30 y 96 h, respectivamente. Si bien, la especie animal fue idéntica a la empleada en nuestro ensayo, se debe destacar que el microorganismo y la dosis utilizada fueron diferentes. Pisoni y col., (2010) informaron signos sistémicos (fiebre) durante las primeras 24 h, y sensibilidad a la palpación. No hubo signos ni síntomas en la GNI. Por otra parte Cremonesi y col., (2012) informaron valores de temperatura rectal de 40,2-40,7°C, a las 30 h pi.

Los valores se asemejan a los obtenidos por Simojoki y col. (2009), en una mastitis experimental inducida en otra especie animal, con la misma especie bacteriana, y dosis de inóculo semejante ($2,1 \times 10^6$ cél/ml) al del presente estudio. Los autores informaron que la temperatura corporal fue normal durante el período del estudio (96 h), y los animales presentaron signos clínicos leves.

4.3 Cambios de la secreción láctea

En este ensayo no se detectaron cambios (coágulos, sangre) en las características de la secreción láctea. Sólo hay registro en el trabajo de Simojoki y col. (2009) con cambios en la leche (coágulos y cambio de color) a las 22 h pi, en uno de los animales usados en el ensayo.

4.4 Recuento de células somáticas

La determinación del RCS a partir de las muestras de leche recolectadas de las GI y GNI en seis cabras a las 0, 4 y 8 h pi y debido al diseño experimental, en 5, 4, 3 y 2 cabra a las 12, 16, 20 y 24 h respectivamente, reveló un incremento significativo en la GI ($p < 0,0001$) a partir de las 4 h con respecto al valor inicial (Tabla 2). Asimismo la diferencia entre GI y GNI también fue significativa ($p < 0,0001$) en el mismo período de tiempo (Figura 1). Este resultado permite inferir una estimulación de la respuesta inflamatoria en las glándulas inoculadas.

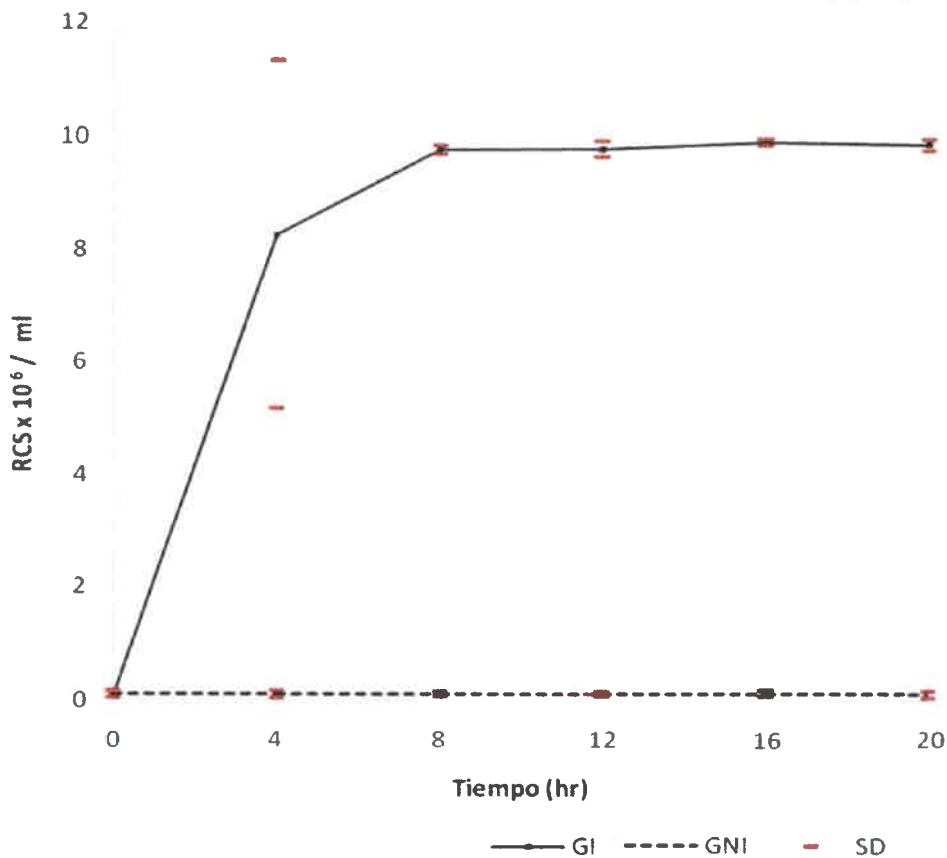


Figura 1. Recuento de células somáticas, expresado como Media \pm Error Standard (SE) en leche de glándula inoculada (GI) y glándula no inoculada (GNI).

4.5 Recuento de *S. chromogenes* en leche

El recuento de *S. chromogenes* RC10-31 a partir de las muestras de leche colectadas cada 4 h de cada glándula, por el método de dilución en placas de ATS, permitió conocer el comportamiento de la cepa luego de la infección experimental. La cepa RC10-31 obtenida en cultivo puro de cada muestreo fue confirmada como idéntica a la inoculada mediante su resistencia a estreptomycin (100 μ g/ml).

En leche de GI se determinó un valor promedio máximo de $2,3 \times 10^6$ UFC/ml a las 4 h pi, con recuentos de $4,7 \times 10^5$ UFC/ml a las 8 h pi, y alcanzando valores en el orden de 2×10^3 UFC/ml a partir de las 20 h pi. Las muestras de leche de GNI dieron cultivos invariablemente negativos a lo largo de toda la experiencia (Tabla 2).

Tabla 2. Recuento celular somático y Recuento de *S. chromogenes* RC10-31 en leche de cabra

Cabras*	Horas pi**	RCS x 10 ³ (cél/ml)***		<i>S. chromogenes</i> x10 ³ (UFC/ml) ***	
		Media (Rango)		Media (Rango)	
		GI	GNI	GI	GNI
6	0	106 (34-179)	110 (12-192)	0	0
6		8262 (2058-9879)	114 (45-199)	2291 (200-9100)	0
6		9780 (9657-9876)	113 (48-189)	467 (70-830)	0
5	12	9798 (9567-9879)	115 (54-179)	73 (4.7-213)	0
4		9924 (9859-9976)	119 (65-197)	9 (2.7-16.7)	0
3	20	9888 (9789-9999)	116 (54-184)	2 (1.1-4.6)	0
2		9487 (9431-9543)	127 (76-177)	2 (0.9-2.1)	0

* Número de cabras evaluadas. **pi: post inoculación. ***: Los recuentos corresponden a la Media de los valores. GI: Glándula Inoculada; GNI: Glándula No Inoculada.

Si bien los resultados del recuento bacteriano en leche obtenidos en nuestro estudio mostraron una marcada disminución desde $2,2 \times 10^6$ UFC/ml a las 4 h pi a aproximadamente 9×10^3 UFC/ml a partir de las 16 h pi, se mantuvo el aislamiento de bacterias en leche hasta el final del ensayo. Resultados semejantes fueron obtenidos por Lasagno y col., (2012), luego de la inoculación de 1×10^8 UFC/ml de *S. uberis* en cabras, quienes detectaron una reducción de bacterias en leche de aproximadamente 4 log a las 24 h pi.

El presente estudio demostró que a las 8 h pi en cabras, se logró un aumento del RCS en el orden de $9,8 \times 10^6$ cél/ml y una caída en el UFC/ml ($2,3 \times 10^6$ a 2×10^3) entre las 4 y 24 h pi, respectivamente (Tabla 2, Figura 2). Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Simojoki y col. (2009; 2010; 2011), quienes observaron que la respuesta inflamatoria en una infección intramamaria bovina inducida experimentalmente por distintas especies de SCN, incluida *S. chromogenes*, juega un rol importante en la resolución de la infección.

Cabe mencionar que partículas citoplasmáticas también podrían contribuir al elevado RCS observado. A pesar que la mayoría de éstas son anucleadas, según Dulin y col.

(1982), el 1% de ellas contienen fragmentos nucleares y podrían haber sido contadas con el método de fluorometría laser empleado en el RCS.

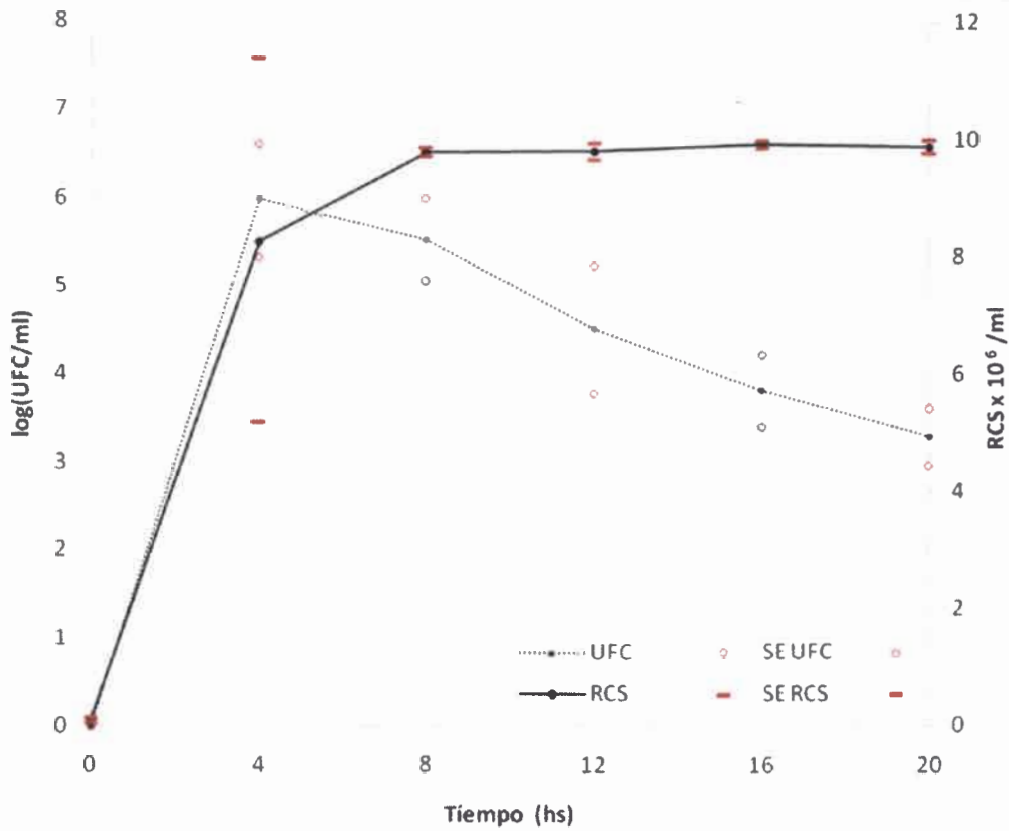


Figura 2. Media \pm Error Standard (SE) del Recuento de Células Somáticas (RCS x 10⁶/ml) y media del Recuento de *S. chromogenes* (Log UFC/ml) en muestras de leche de GI (Glándula inoculada).

4.6 Análisis de sangre. Recuento de glóbulos blancos y determinación de la fórmula leucocitaria

El recuento de glóbulos blancos y la fórmula leucocitaria a partir de las muestras de sangre periférica de cada cabra, permitió conocer los cambios en el número total de glóbulos blancos y de los distintos tipos celulares durante la infección experimental. Los resultados muestran una disminución del número de leucocitos con relación al obtenido al inicio del ensayo (Figura 3). La Tabla 3 presenta los valores de la media del recuento total de glóbulos blancos y de los distintos tipos celulares determinados en cada tiempo. A pesar de la

reducción en la media del número de neutrófilos segmentados a partir de de las 4 h pi hasta el final de la experiencia, no se observaron variaciones con respecto a los valores de referencia (Weiss y Wardrop, 2010), en ninguna de las líneas leucocitarias, en los distintos tiempos post inoculación.

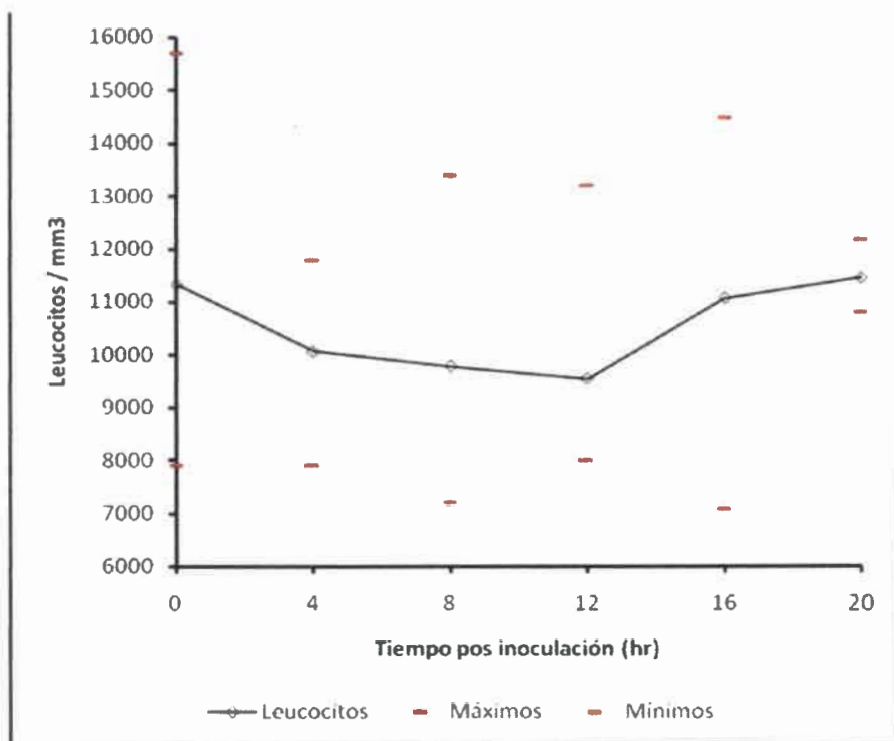


Figura 3. Recuento de Leucocitos (cél/mm³) en sangre, expresado como la Media \pm Error Standard.

Tabla 3. Recuento total y diferencial de glóbulos blancos en sangre periférica

Horas pi**	Leucocitos (cél/ul)	Neutrófilos en cayado(%)	Neutrófilos segmentados(%)	Linfocitos(%)	Monocitos(%)	Eosinófilos(%)
0	11333,3	1	44,8	47,8	5,2	1,2
4	10066,7	1,2	35*	57,3*	5,7	0,8
8	9783,3	1	41	51	5,5	1,5
12	9560	1,2	41,2	52,6	4,6	0,4
16	11075	1,3	41,8	51,5	5	0,5
20	11466,7	1	47,7*	44,3*	6	1
24	9700	1,5	41	52,5	4	1
VN	4000-13000	raros	30-48	50-70	0-4	1-8

**pi: post inoculación, VN: Valor normal; *: diferencias significativa entre tiempos.

La respuesta sistémica a la infección intramamaria se caracterizó por una disminución en el recuento leucocitario total en sangre a las 12 h pi de $9,5 \times 10^3$ cél/ ul en contraposición a los resultados obtenidos por Cremonesi y col., (2012) realizado en cabras, quienes obtuvieron una disminución significativa en el recuento total de leucocitos en sangre a las 18 h pi con valores de 11,5 a $13,7 \times 10^3$ cél/ ul, después de inocular *S. aureus*, mientras que los valores más bajos fueron determinados a las 30 h pi.

En el presente estudio se detectó una disminución en el valor de neutrófilos segmentados, con diferencias significativas ($p < 0,05$), desde un 45% a un 35% entre las 0 y 4 h pi respectivamente. Resultados semejantes han sido informados por Cremonesi y col., (2012).

4.7 Relación entre RCS en leche de la glándula inoculada y recuento de glóbulos blancos totales

Los resultados de esta investigación muestran un aumento en el RCS en leche de las glándulas inoculadas a partir de las 4 h, acompañado por una disminución del número de glóbulos blancos totales de sangre periférica (Figura 4).

Los resultados obtenidos sugieren la migración de los neutrófilos segmentados desde la circulación hacia los tejidos mamarios, para contribuir a la fagocitosis de las bacterias como primer evento en el marco de los mecanismos inespecíficos de defensa (Paape y Capuco, 1997).

El marcado incremento en el RCS observado a partir de las 4 h pi, se puede atribuir en parte a la migración de neutrófilos segmentados desde la circulación. Cabe mencionar según Paape y col. (2007) que otros factores tales como, estación del año y rendimiento en la producción de leche podrían contribuir a los elevados valores observados en las cabras.

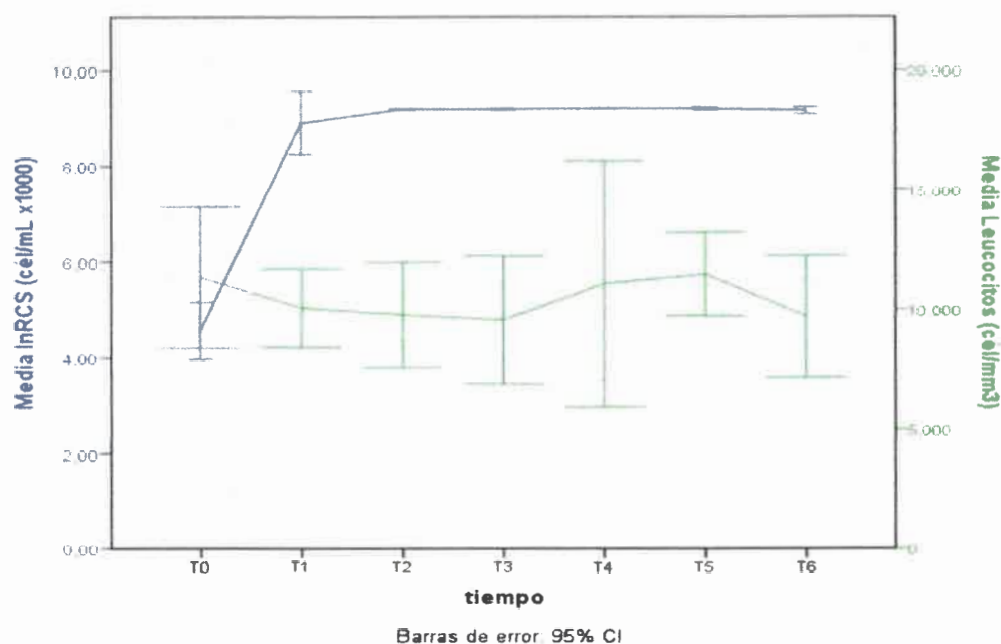


Figura 4. Recuento de leucocitos (cél/mm³) en sangre (verde) y recuento de células somáticas (cél x10³/ml) (azul) en leche de glándulas inoculadas. Valores expresados como Media ± ES de las cabras evaluadas.

4.8 Relación entre recuento bacteriano en muestras de leche y glóbulos blancos totales en sangre

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un elevado número de células de *S. chromogenes* RC10-31 detectadas en leche de la glándula inoculada a las 4 h pi (Tabla 2), y como consecuencia promueve la rápida migración de los neutrófilos segmentados desde la sangre hacia los tejidos de la glándula.

4.9 Examen bacteriológico de muestras de tejidos

El recuento de *S. chromogenes* RC10-31 de tejido de glándula mamaria derecha e izquierda, permitió investigar la capacidad de la cepa para colonizar e invadir el tejido mamario.

Tabla 4. Recuento bacteriano en leche y en glándula mamaria de cada cabra en el momento de la mastectomía

Cabra	Horas pi	GI		GNI	
		Tejido	Leche	Tejido	Leche
		<i>S. chromogenes</i> 10 ³ UFC/gr	<i>S. chromogenes</i> 10 ³ UFC/ml	10 ³ UFC/gr	10 ³ UFC/ml
1	8	0,081	94,5	NC	NC
2	12	0,290	213	NC	NC
3	16	0,094	12,2	NC	NC
4	20	0,180	1,1	NC	NC
5	24	0,055	2,1	NC	NC

pi: post-inoculación; NC: No Crecimiento; GI: glándula inoculada; GNI: glándula no inoculada.

La cepa RC10-31 inoculada en la glándula derecha de cada animal fue aislada en cultivo puro por siembra de tejido mamario. Las cepas recuperadas fueron idénticas a la utilizada en la inoculación, por su resistencia a estreptomycin (100 µg/ml).

En este estudio la administración de 1×10^7 UFC/ml por vía intramamaria en la glándula derecha permitió la recuperación de $9,45 \times 10^4$ UFC/ml en leche obtenida de esta

glándula a las 8 h pi, coincidente con el incremento en el RCS. La disminución de bacterias en leche de la glándula inoculada continuó hasta alcanzar $2,1 \times 10^3$ UFC/ml a las 24 h (Tabla 4).

El recuento de células de *S. chromogenes* RC10-31 determinado en el tejido de la glándula derecha de la cabra a las 8 h pi fue de $0,081 \times 10^3$ UFC/ml. Los valores encontrados fueron menores en los animales durante el curso de la infección hasta alcanzar $0,055 \times 10^3$ UFC/ml en la cabra a las 24 h. En la GNI, los cultivos de tejido dieron resultados invariablemente negativos.

A pesar que el recuento de *S. chromogenes* en tejido y en leche de cada cabra no refleja la dosis inoculada, cabe mencionar que cepas de ésta especie aisladas de infecciones intramamarias presentan un elevado porcentaje de adherencia e internalización en células de epitelio mamario bovino (Souza, 2016).

4.10 Patología

El estudio histopatológico de muestras de cisterna, canal del pezón, región proximal, central y distal de ambas glándulas y linfonódulos mamario derecho e izquierdo cada 4 h a partir de las 8 h pi, permitieron investigar la patogénesis temprana inducida por *S. chromogenes* en cabras.

Los resultados obtenidos de las cabras a los distintos tiempos son presentados a continuación.

En la glándula mamaria proximal se observó a partir de las 8 h pi exudación de PMN en el intersticio glandular y entre las 12 y 16 h pi una intensa acumulación de PMN en los acinos glandulares. A partir de 20 h pi en adelante se registró una leve a moderada exudación de PMN, además de una intensa infiltración periacinar de PMN (Figura I, Apéndice). A igual que la sección proximal, los cortes a nivel de glándula medial y distal presentaron un cuadro semejante (Figuras II y III, Apéndice). Es de destacar la severa lesión observada en glándula mamaria distal a las 24 hs pi (Figura III, F), en la cual se detecta pérdida de células epiteliales. El foco de necrosis, a nivel de los alvéolos, se debe al daño tisular ocasionado por enzimas lisosomales liberadas por PMN; neutrófilos.

Cabe mencionar que células del tipo PMN, neutrófilos se presentan frente a infecciones bacterianas causadas por gérmenes Gram positivos, tal es el caso de *S. chromogenes*.

En la cisterna se observó de moderada a intensa exudación de PMN en la luz e intersticio desde las 8 hasta las 12 h pi., mientras que a partir de las 16 h pi se registró un intenso infiltrado periacinar. A las 20 h pi se observó una marcada exudación PMN en acinos glandulares. Mientras que a las 24 h pi disminuyó la exudación de PMN en luz y se detectó intensa infiltración periacinar (Figura IV, Apéndice).

Mientras que en el canal del pezón se observó una leve a moderada infiltración de PMN en intersticio periacinar a partir de las 8 h pi, donde a las 16 h se intensificó la infiltración de PMN y a las 24 h pi se observó una escasa infiltración PMN en intersticio periacinar (Figura V, Apéndice).

La respuesta sistémica está reflejada por trastornos a partir de las 16 hs pi., ya que en los linfonódulos, se registró abundante cantidad de PMN en senos medulares, entre los cordones medulares a partir de las 16 h pi, permaneciendo hasta el final de la experiencia (Anexo figura VI, Apéndice).

Por lo tanto se puede afirmar que el análisis histopatológico muestra cambios en la ubre específicos de inflamación.

Mavrogianni y col (2004) estudiaron la respuesta en ovejas lecheras a la inoculación en la cisterna de la glándula mamaria de una cepa patógena de *S. chromogenes* y posterior sacrificio a los 7, 15, 30, 45 y 80 días post inoculación. Los autores informaron como principal hallazgo histopatológico, infiltración neutrofílica de particular intensidad debajo de la mucosa de la cisterna de la glándula y de la pared de los conductos en el animal sacrificado a los 7 días post infección. El diseño experimental presentado por los autores difiere del presente estudio, no obstante se puede correlacionar con lo observado en la cabra lactante sacrificada a las 24 h, en cuanto a la presencia de una intensa infiltración periacinar de PMN.

Por otra parte Breyne y col. (2015) realizaron un estudio piloto en un modelo de mastitis murina a los efectos de evaluar la patogenicidad de diversas especies de SCN, *Staphylococcus fleuterii* y *S. chromogenes*. La evaluación histológica al cabo de 28 h post inoculación permitió observar con todas las cepas ensayadas un influjo de PMN en el

lumen alveolar de la glándula de los ratones inoculados por vía intramamaria. Dichos resultados están acordes con los obtenidos en el presente estudio ya que a las 24 h pi se observó de moderada a leve exudación neutrofílica en los acinos.

Es de considerar que el grado de inflamación producido en la glándula mamaria caprina, según el estudio histopatológico aquí informado se asemeja en gran medida con lo informado en otro estudio llevado a cabo en la misma especie animal desafiada con un patógeno mayor como *S. aureus* (Fasulkov y col 2015), donde el examen histopatológico mostró presencia de exudado seroso conteniendo neutrófilos en la luz de los conductos glandulares del parénquima de la ubre colectada a las 96 h pi y cambios a nivel intersticial dado por la presencia de linfocitos mononucleares.

A pesar de que SCN han sido tradicionalmente considerados patógenos menores, los resultados aquí obtenidos se corresponden con una vasta revisión bibliográfica (Taponen y Pyörälä, 2009), que lleva a considerar a los SCN, y en especial a la especie *S. chromogenes*, patógenos de mastitis, dado que los mismos están adquiriendo cada vez mayor participación en las infecciones de los rebaños lecheros, siendo frecuentemente los más aislados, sumado a la capacidad de persistir en la glándula mamaria, provocar cambios histopatológicos y causar incremento del RCS.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Dada la creciente importancia de los SCN como agentes causales de infecciones intramamarias bovinas y debido a que la patogenicidad de este grupo bacteriano no se encuentra del todo claro, el modelo animal caprino representa una alternativa para el estudio de este grupo de bacterias potencialmente patógenas.
- Considerando la susceptibilidad del ganado caprino a *Staphylococcus* spp. y su condición de animal rumiante permitió su selección para investigar la patogénesis temprana de las mastitis a *S. chromogenes*.
- La cepa *S. chromogenes* RC10-31, dado su perfil de virulencia *in vitro*, resultó adecuada para analizar el potencial grado de patogenicidad de esta especie de SCN en la glándula mamaria caprina.
- Los elevados valores de *S. chromogenes* RC10-31 detectados en leche a partir de las 4 h pi se correlacionó con la rápida migración de neutrófilos segmentados desde la sangre hacia los tejidos de la glándula mamaria y el aumento en el RCS.
- Si bien entre las 12 h y 20 h se detectaron lesiones histológicas en los tejidos mamarios, no se evidenció un progreso en los cambios histológicos hacia el final del ensayo. Estos resultados podrían sugerir una resolución de la infección.
- El elevado RCS provocado por la infección con *S. chromogenes* RC10-31, permite inferir que una mastitis a SCN afectaría negativamente la calidad de los productos lácteos en el tambo.
- El incremento del RCS sustentado por los cambios histopatológicos específicos de inflamación observados en las GI llevarían a no desestimar la importancia de los SCN y en particular de la especie *S. chromogenes*, como agente causal de mastitis bovina y a valorizar este modelo experimental en el estudio de la respuesta del huésped a mastitis causada por las principales especies del SCN.

Perspectivas futuras

Las distintas especies de SCN pueden producir varias toxinas y enzimas que inducen respuestas inflamatorias o daño tisular y contribuyen a su virulencia. Se ha detectado la producción de enterotoxinas estafilocócicas en diferentes especies de SCN. Estas toxinas son termoestables, por lo que soportan los tratamientos térmicos utilizados en los procesos de elaboración de los productos lácteos. Cuando estafilococos enterotoxigénicos proliferan en los alimentos, pueden producir suficiente toxina para causar intoxicación alimentaria después que la comida se ingiere.

Por lo antes expuesto se propone en futuros estudios investigar la producción de enterotoxinas en leches provenientes de mamíferos domésticos (de vaca, principalmente, pero también de cabra) que presenten aislamiento de *Staphylococcus coagulasa negativa*.

APÉNDICE



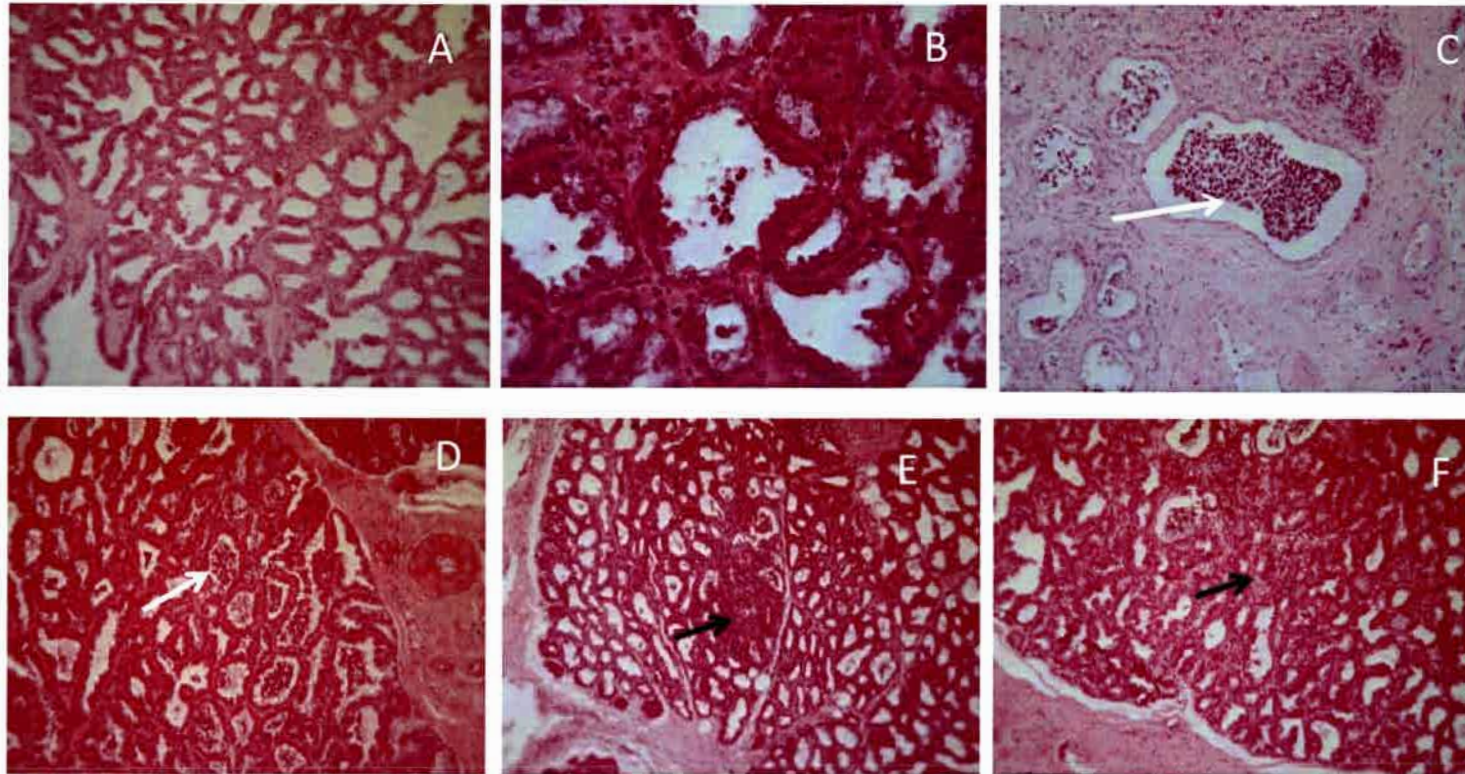


Fig I. Glándula mamaria proximal.

A: control (10X), **B:** 8 hs pi (40X); **C:** 12 hs pi (20X); **D:** 16 hs pi (10X); **E:** 20 hs pi (10X); **F:** 24 hs pi (10X).

Presencia de PMN, en los alvéolos (flecha blanca), en el intersticio (flecha negra).

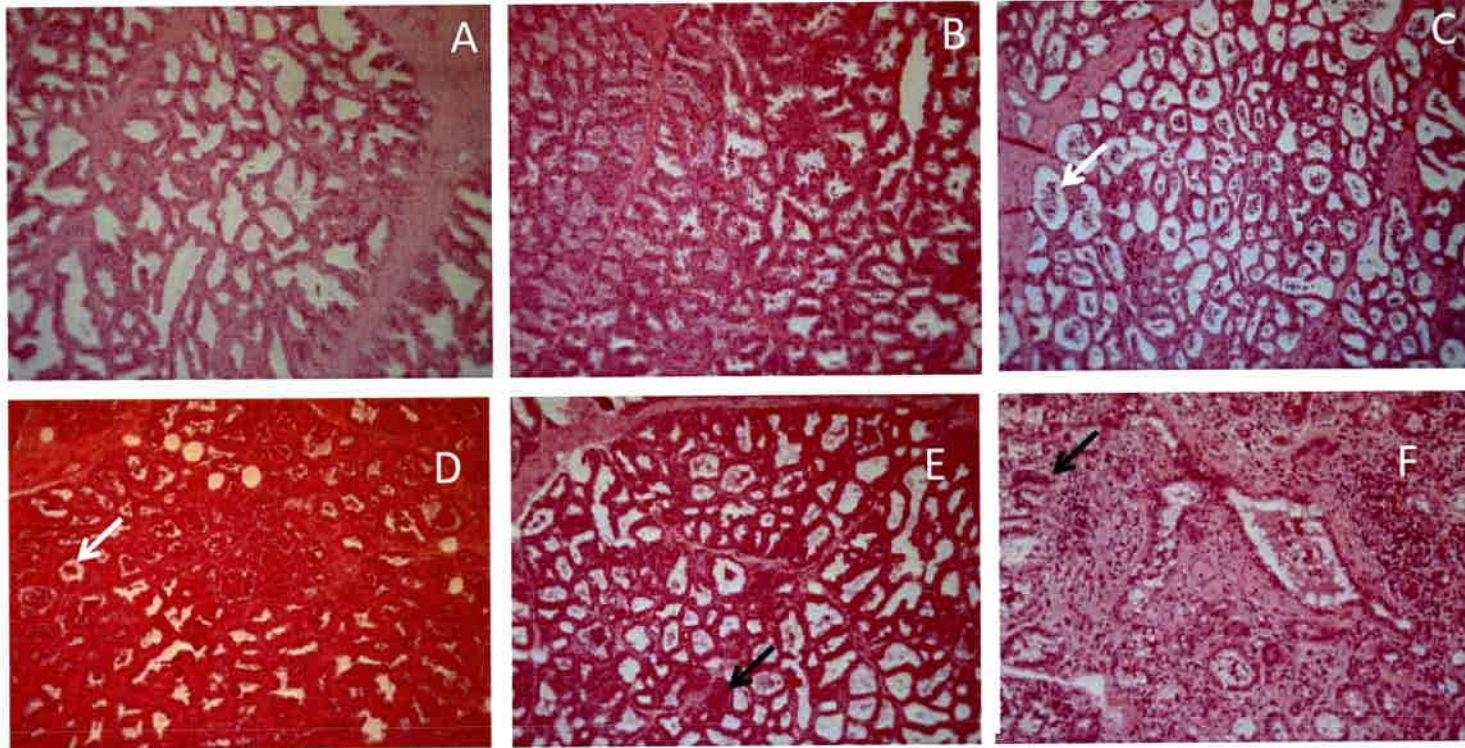


Fig. II. Glándula mamaria medial.

A: control (10X), **B:** 8 hs pi (10X); **C:** 12 hs pi (10X); **D:** 16 hs pi (10X); **E:** 20 hs pi (10X); **F:** 24 hs pi (20X).
Presencia de PMN, en los alvéolos (flecha blanca), en el intersticio (flecha negra).

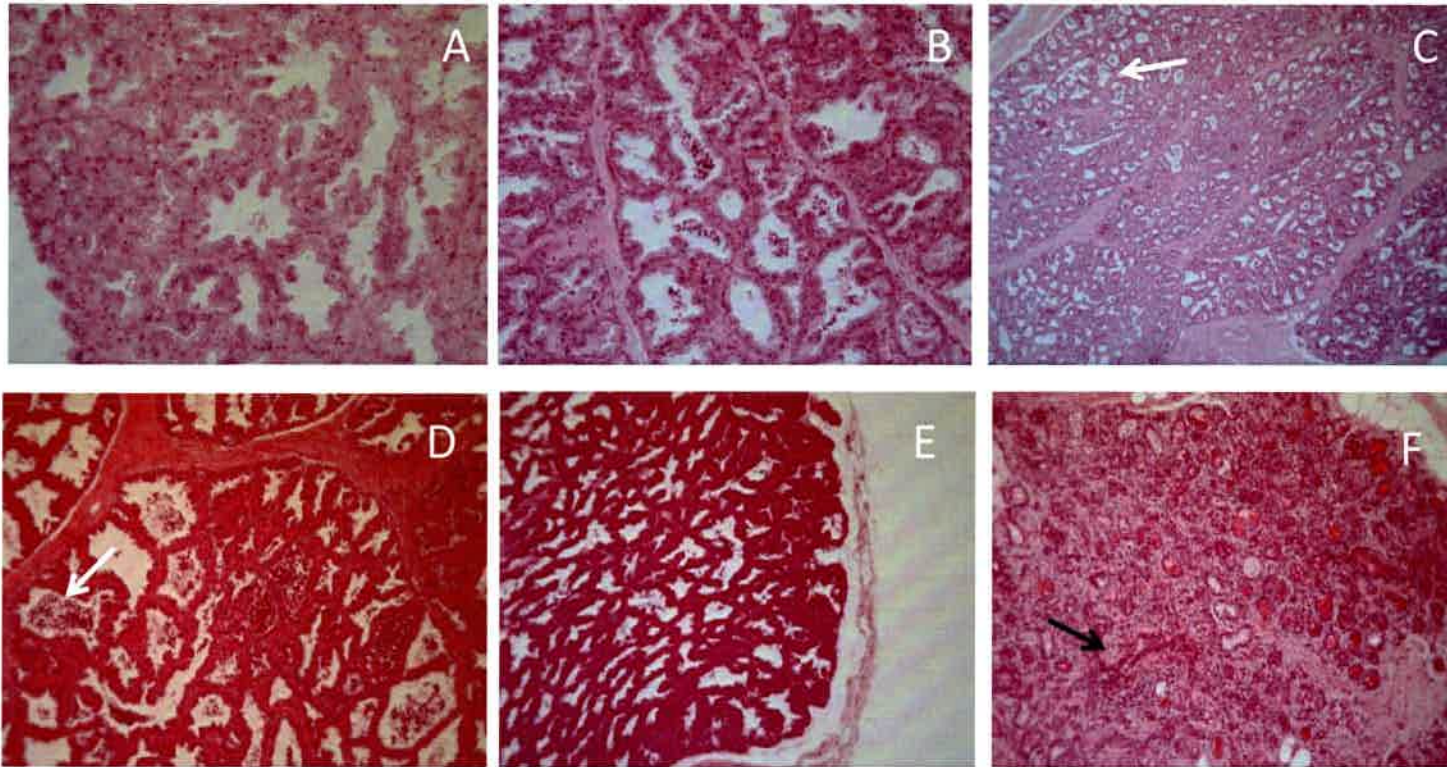


Fig. III. Glándula mamaria distal.

A: control (20X), **B:** 8 hs pi (20X), **C:** 12 hs pi (4X), **D:** 16 hs pi (10X), **E:** 20 hs pi (10X), **F:** 24 hs pi (10X).
Presencia de PMN, en los alvéolos (flecha blanca), en el intersticio (flecha negra).

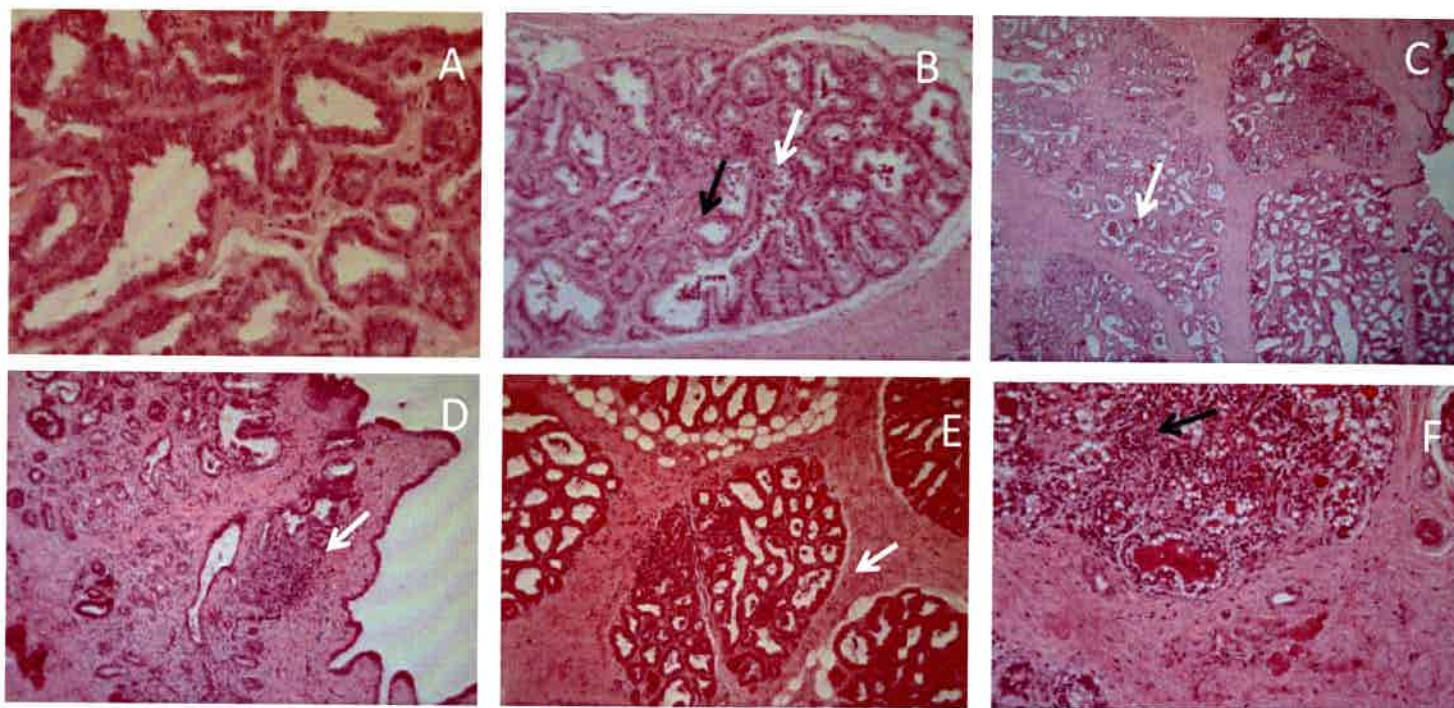


Fig. IV. Cisterna.

A: control (10X), **B:** 8 hs pi (20X), **C:** 12 hs pi (4X), **D:** 16 hs pi (10X), **E:** 20 hs pi (10X), **F:** 24 hs pi (20X).
Presencia de PMN, en los alvéolos (flecha blanca), en el intersticio (flecha negra).

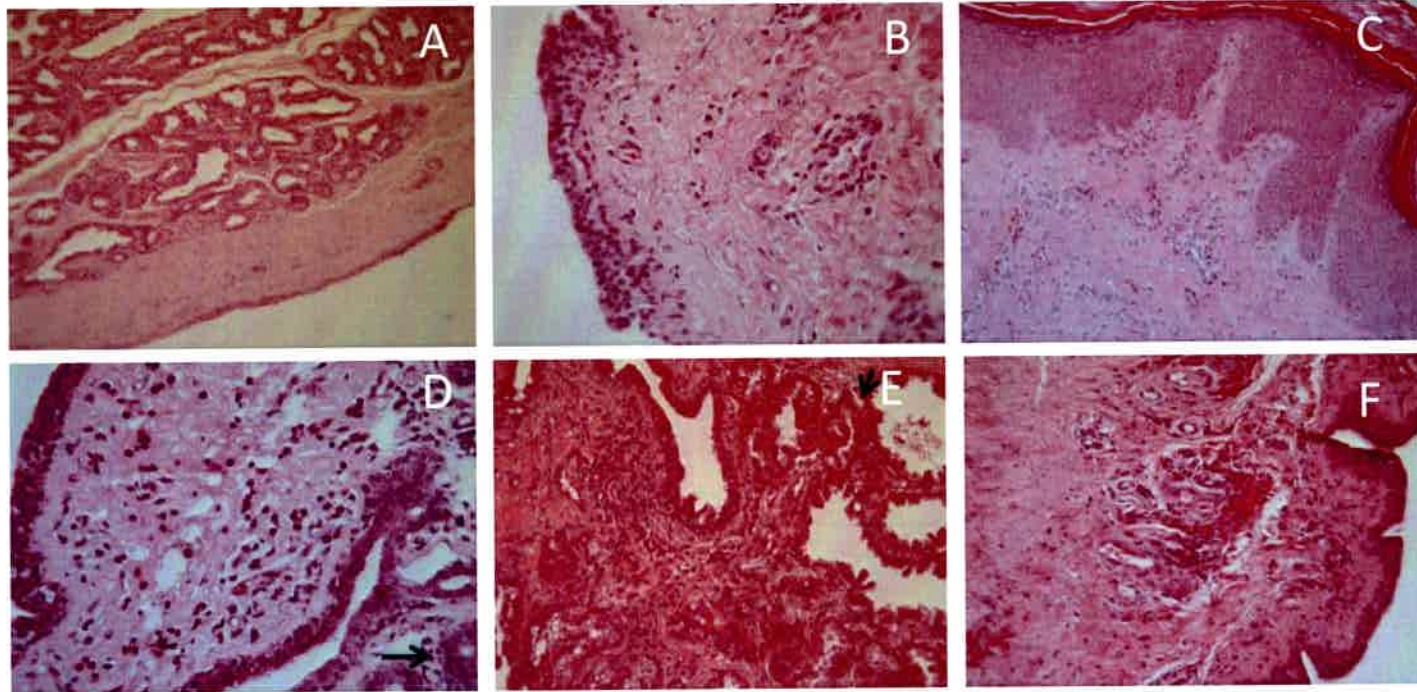


Fig. V. Canal del pezón de glándula inoculada.

A: control (10X), **B:** 8 hs pi (20X), **C:** 12 hs pi (20X), **D:** 16 hs pi (40X), **E:** 20 hs pi (20X), **F:** 24 hs pi (20X).
Presencia de PMN en el intersticio (flecha negra).

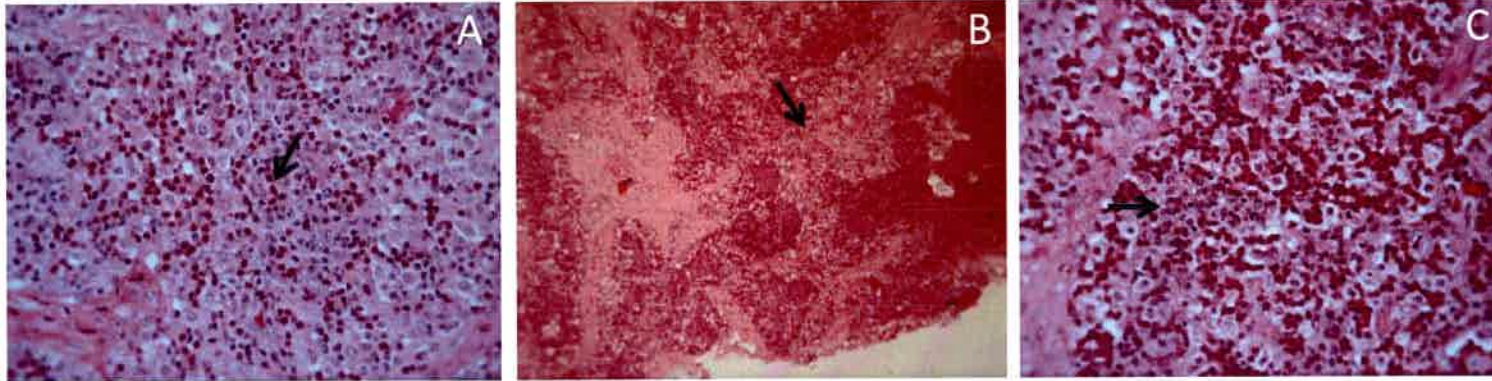


Fig. VI. Linfonódulos de glándulas infectadas.
A: 16 hs pi (40X); **B:** 20 hs pi (10X); **D:** 24 hs pi (40X).
Presencia de PMN en el intersticio (flecha negra).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



BIBLIOGRAFIA

Akineden , Ö; Hassan, A; Schneider, E; Usleber, E. 2008. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology. 124: 211-216.

Alluwaimi, A; Leutenegger, C; Farver, T; Rossitto, P; Smith, W; Cullor, J. 2003. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 50 (3): 105-11.

Amorena, B; García de Jalón, J; Baselga, R; Duchá, J; Latre, M; Ferrer L ; Sancho, F; Månsson, I; Krovacek, K; Farisa, A. 1991. Infection of rabbit mammary glands with ovine mastitis bacterial strains. J Comp Pathol. 104: 289-302.

Atalla, H; Gyles, C; Wilkie, B; Leslie, K; Mallard, B. 2009. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. Vet Microbiol. 137 (3-4): 326-34.

Bagnicka, E; Winnicka, A; Jóźwik, A; Rzewuska, M; Strzałkowska, N; Kościuczuk, E; Prusak, B; Kaba, J; Horbańczuk, J; Krzyżewski, J. 2011. Relationship between somatic cell count and bacterial pathogens in goat milk. Small Ruminant Research. Vol 100 (1): 72-77.

Bassam, L. and Hasso, S. 1997. Mastitis in goats caused by *Nocardia asteroides*. Small Ruminant Research. 26 (3): 287-290.

Beddi-Madani, N; Greenland, T; Richard, Y. 1998. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats milk. Veterinary Microbiology. 59: 139-145.

Bonetto, C. 2014. Mastitis bovina causada por *Staphylococcus* coagulasa negativos. Tesis de posgrado Doctorado en Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Brenaut, P; Lefèvre, L; Rau, A; Laloč, D; Pisoni, G; Moroni, P; Bevilacqua, C; Martin, P. 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res.* 45:16.

Breyne, K; De Vliegher, S; De Visscher, A; Piepers, S; Meyer, E. 2015. Technical note: A pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.* 98: 1090-1100.

Brouillette, E; Grondin, G; Shkreta, L; Lacasse, P; Talbot, B. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microbial Pathogenesis.* 35: 159-168.

Brouillette, G; Grondin, G; Lefebvre, B. 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 101: 532.

Brouillette, E. y Malouin, F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus* induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and Inf.* 7: 560-568.

Calvinho, L; Vitulich, C; Zurbriggen, M; Canavesio, V; Tarabia, H. 1991. Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. *Therios.* 10: 188-196.

Calvinho, L. y Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev. FAVE, Sección Ciencias Veterinarias.* 4: 29-40.

Castro-Alonso, A; De la Fe, C; Espinosa de los Monteros, A; Rodríguez, F; Andrada, M; Poveda, J; Herráez, P. 2010. Chronological and immunohistochemical characterization of the mammary immunoinflammatory response in experimental caprine contagious agalactia. *Vet Immunol Immunopathol.* 136 (1-2): 43-54.

Chaffer, M; Leitner, G; Winkler, M; Glockman, A; Krifucks, O; Ezra, E; Saran, A. 1999. Coagulase-negative Staphylococci and mammary gland infections in cows. *Journal of Veterinary Medicine.* 46: 707-712.

Chandler, R. 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J Med Microbiol.* 3 (2): 273-82.

Chen, S; Wang , J; Van Kessel, J; Ren, F; Zeng, S. 2010. Effect of somatic cell count in goat milk on yield, sensory quality, and fatty acid profile of semisoft cheese. *J. Dairy Sci.* 93: 1345-1354.

Christensen,G; Simpson, W; Younger, J; Baddour, L; Barrett, F; Melton, D; Beachey, E.1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology.* 22: 996-1006.

Coelho, S; Pereira, I; Soares, L; Pribul, B; Souza, M. 2011. Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science.* 94: 3305-3310.

Conesa, A; Raspanti, C; Bohl, L; Isaac, P; Bonetto, C; Odierno, L; Porporatto, C. 2016. Formación de biofilm por distintas especies de *Staphylococcus coagulasa* negativos aislados de animales con mastitis bovina. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Argentino de Microbiología. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Contreras, A; Corrales, J; Sanchez, A. 1997. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 80: 2815-819.

Cremonesi, P; Capoferri, R; Pisoni, G; Del Corvo, M; Strozzi, F; Rupp, R.; Caillat, H; Modesto,P; Moroni, P; Williams, J; Castiglioni, B; Stella, A. 2012. Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BMC Genomics.* 13: 540.

Cunha, M; Rugolo, L; Lopes, C. 2006. Study of virulence factors in coagulase negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101: 661-668.

Davenport, D; Massanari, R; Pfaller, M; Bale, M; Streed, S; Hierholzer, W. 1986. Usefulness as a test for slime production as a marker for clinically infections with coagulase negative staphylococci. *The Journal of Infectious Diseases.* 153: 332-339.

Davidson, T; Dohoo, I; Donald, A; Hariharan, H; Collins, K. 1992. A cohort study of coagulase negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince-Edward-Island. Canadian journal of veterinary research. 56: 275-280.

De Oliveira Calsolari, R; Pereira, V; Aroujo Junior, J; De Souza da Cunha, M. 2011. Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. Microbiology and Immunology. 55: 394-407.

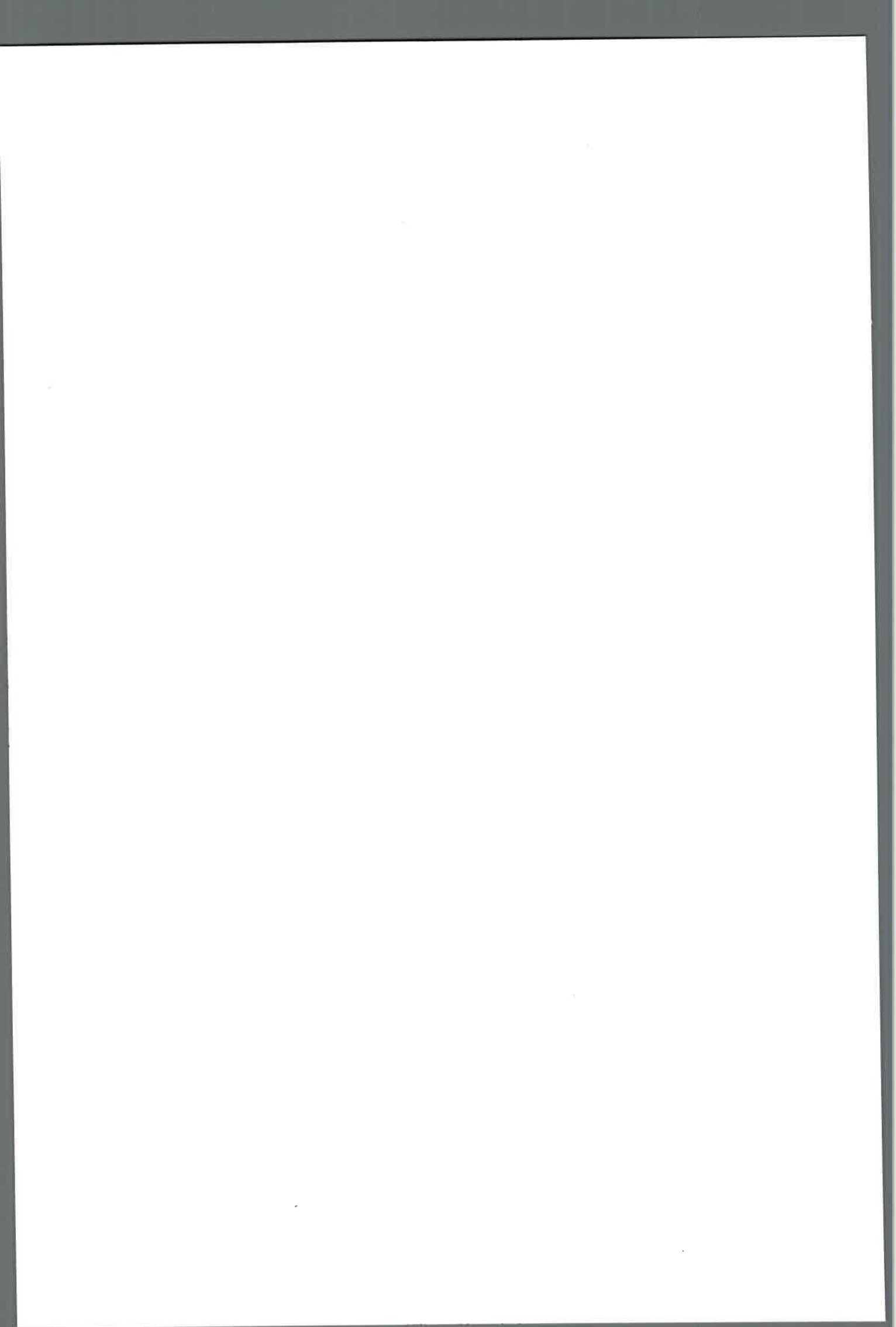
De Visscher A, Piepers S, Haesebrouck F, De Vlieghe S. 2016. Intramammary infection with coagulase-negative staphylococci at parturition: Species-specific prevalence, risk factors, and effect on udder health. J Dairy Sci. 99 (8): 6457-69.

De Vlieghe, S., Laevens, H., Devriese, L., Opsomer, G., Leroy, J., Barkema, H., de Kruif, A. 2003. Prepartum teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell counts in early lactation. Veterinary Microbiology. 92: 245-252.

De Vlieghe, S; Opsomer, G; Vanrolleghem, A; Devriese, L; Sampimon, O; Sol, J; Barkema, H; Haesebrouck, F; de Kruif, A. 2004. In vitro growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. Veterinary Microbiology. 101: 215-221.

De Vlieghe, S; Fox, L; Piepers, S; McDougall, S; Barkema, H. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. Journal of Dairy Science. 95: 1025-1040.

Delgado, C; Aubagna, B; Russi, F; Aguirre, S; Rejf, J; Calvinho, G. 1998. Identificación y sensibilidad a antibióticos de *Staphylococcus coagulasas negativos* aislados de mastitis bovina en la cuenca lechera Santafecina. Avances en ciencias veterinarias. Vol. 13 (2).



Dieser S; Vissio C; Lasagno M; Bogni C; Larriestra A; Odierno L. 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pakistan Veterinary Journal*. 34: 124-126.

Dos Santos, J; Netto dos Santos, K; Gentilini, E; Sordelli, D; de Freire Bastos, M. 2002. Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 85: 133-144.

Dulin, A; Paape, M; Wergin, W. 1982. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food Prot.* 45: 435-439.

Dziewanowska, K; Patti, J; Deobald, C; Bayles, K; Trumble, W; Bohach, G. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and Immunity*. 67: 4673-4678.

Fabres-Klein, M; Aguilar, A; Silva, M; Silva, D; Ribon, A. 2014. Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 33: 2095-2104.

Fasulkov, I; Karadaev, M; Vasilev, N; Simeonov, R; Urumova, V; Mladenovada, E. 2015. Ultrasound and histopathological investigations of experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis in goats. *Small Ruminant Research*. 129: 114-120.

Filipuzzi, L; Bonetto, C; Challier, E; Pellegrino, M; Bogni, C; Odierno, L; Raspanti, C. 2015. Coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with subclinical bovine mastitis: virulence factors. *Biocell* 39 (Suppl. 5), A209.

Filipuzzi, L. 2015. Especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos asociadas a mastitis bovina subclínica: prevalencia y distribución de factores de virulencia. Tesis de grado para optar al título de Microbióloga. UNRC.

Fournier, C; Kuhnert, P; Frey, P; Miserez, R; Kirchholfer, M; Kaufmann, T; Graber, H. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Research in Veterinary Science*. 85: 439-448.

Fox, L. 2009. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Veterinary Microbiology*. 134: 82-88.

García-Lara, J; Needham, A; Foster S. 2005. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host pathogen interaction. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 43: 311-323.

Gentilini, E; Denamiel, G; Betancor, A; Rebuelto, M; Rodriguez Fermepin, M; De Torre, R. 2012. Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative *Staphylococci* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina *J. Dairy Sci.* 85: 1913-1917.

Gillespie, B; Headrick, S; Boonyayatra, S; Oliver, P. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Veterinary Microbiology*. 134: 65-72.

González, R; Giraudo, J; Busso, J. 1980. Investigación de mastitis subclínicas: II Agentes etiológicos bacterianos. *Medicina Veterinaria*, 61: 225-234.

Hachana, Y; Kraiem, K; Paape M. 2010. Effect of plasmin, milk somatic cells and psychrotrophic bacteria on casein fractions of ultra high temperature treated milk. *Food Sci. Technol. Res.* 16: 79-86.

Haveri, M; Roslof, A; Rantala, L; Pürölä, S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 993-1000.

Hogan, J; White, D; Pankey, J. 1987. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*. 70: 873-879.

Hosseinzadeh, S. y Saei, H. 2014. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2: 27-34.

Ikeda, T; Tamate, N; Yamaguchi, K; Makino S. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol*. 71: 2793-5.

Janda, J. 1986. Elastolytic activity among staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 24: 945-946.

Jarp, J. 1991. Classification of coagulase negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Veterinary Microbiology*. 27: 151-158.

Kalmus, P; Simojoki, H; Pürölä, S; Taponen, S; Holopainen, J; Orro, T. 2013. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl-b-D-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *Journal of Dairy Science*. 96: 3662–3670.

Khazandi, M; Eats, P; Trott, D; Ebrahimie, E; Perry, J; Hickey, E; Page, S; Garg, S; Petrovski, K. 2015. Development of an improved *Streptococcus uberis* experimental mastitis challenge model using different doses and strains in lactating dairy cows. *J Dairy Res*. 82(4): 470-7.

Klei, L; Yun, J; Sapru, A; Lynch, J; Barbano, D; Sears, P; Galton, D. 1998. Dairy foods. Effects of Milk Somatic Cell Count on Cottage Cheese Yield and Quality. *J Dairy Sci*. 81: 1205-1213.

Koul, S; Singh, J; Dhingra, P; Khatra, G. 1993. Studies on experimental chlamydial mastitis in goat histoenzymology. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 16 (4): 307-16.

Kuroishi, T; Komine, K; Kai, K; Itagaki, M; Kobayashi, J; Ohta, M; Kumagai, K. 2003. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory

response to the intramammary inoculation of these toxins. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 65: 899-906.

Larriestra, A. y Vissio, C. 2012. Mastitis: pérdidas económicas, frecuencia y variantes de la enfermedad. *Cuántos \$\$ se lleva la mastitis? Producir XXI Bs. As.* 20: 28-32.

Lasagno, M; Vissio, C; Reinoso, E; Raspanti, C; Yaciuk, R; Larriestra, J; Odierno, L. 2012. Development of an experimentally induced *Streptococcus uberis* subclinical mastitis in goats. *Veterinary Microbiology*. 154: 376–383.

Ma, Y; Ryan, C; Barbano, D; Galton, D; Rudan, M; Boo, K. 1999. Effects of somatic cell count of quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*. 83: 264-274.

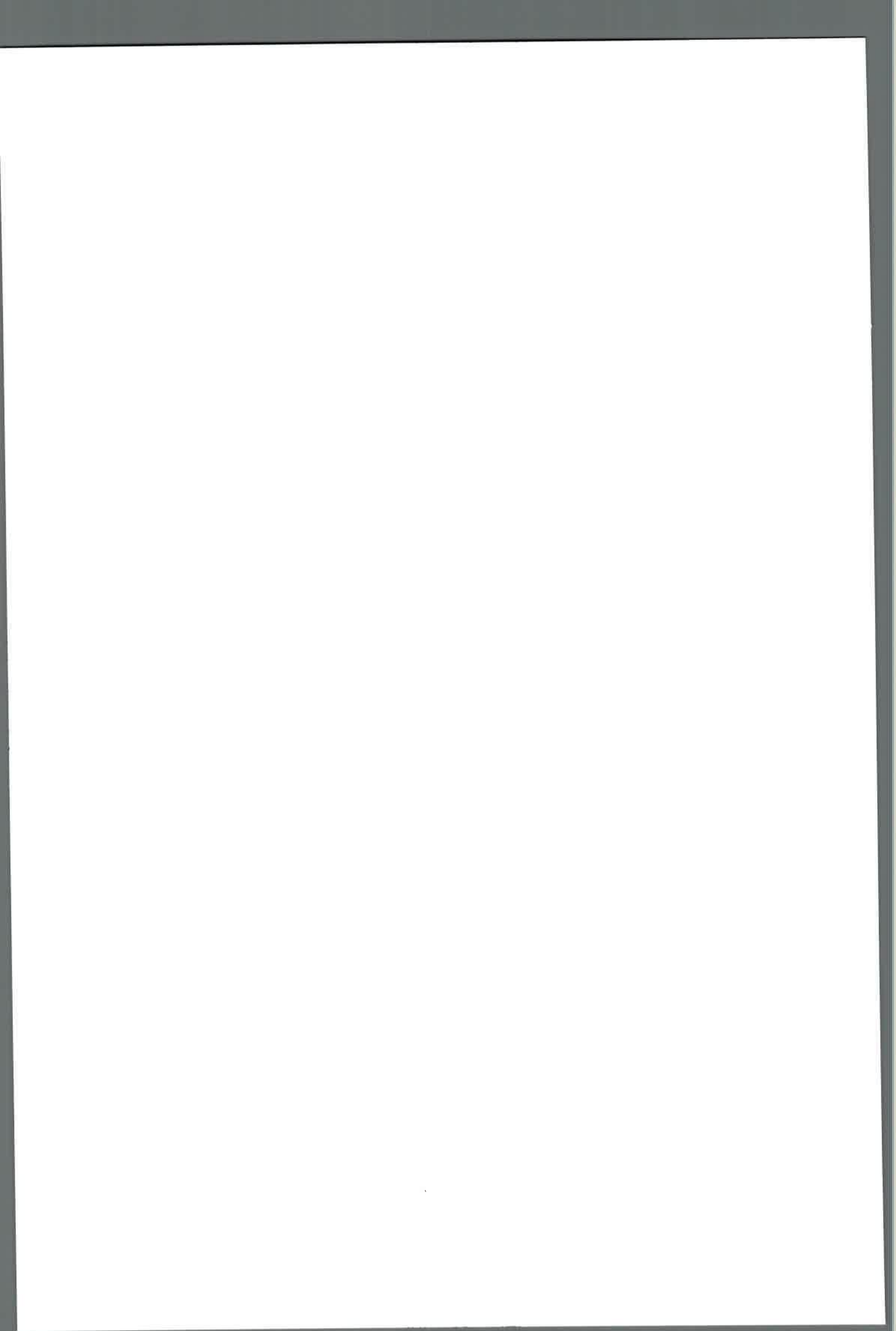
Matthews, K. 1992. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*. 75: 1835-1839.

Mavrogianni, V; Fthenakis, G; Burriel, A. 2004. Experimentally induced teat stenosis in dairy ewes: clinical, pathological and ultrasonographic features. *J Comp Path*. 130:70-74.

McDougall, S; Arthur, D; Bryan, M; Vermunt, J; Weir, A. 2007. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. *New Zealand Veterinary Journal*. 55: 161-70.

Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. 2015. Subsecretaría de lechería, precio al productor. Recuperado en agosto de 2015 en http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/index.php

Nash, D; Rogers, G; Cooper, J; Hargrove, G; Keown, J. 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. *Journal of Dairy Science*. 86: 2684-2695.



National Mastitis Council. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. National Mastitis Council. (pp. 1-47). Inc Arlington, VA, USA. 4th Edition.

National Mastitis Council. Madison, W. 2009. Recommended mastitis control program, National Mastitis Council Inc. Recuperado en Julio de 2015 en <http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf>.

Nickerson, S. y Boddie, R. 1994. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. 77: 2526-2536.

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

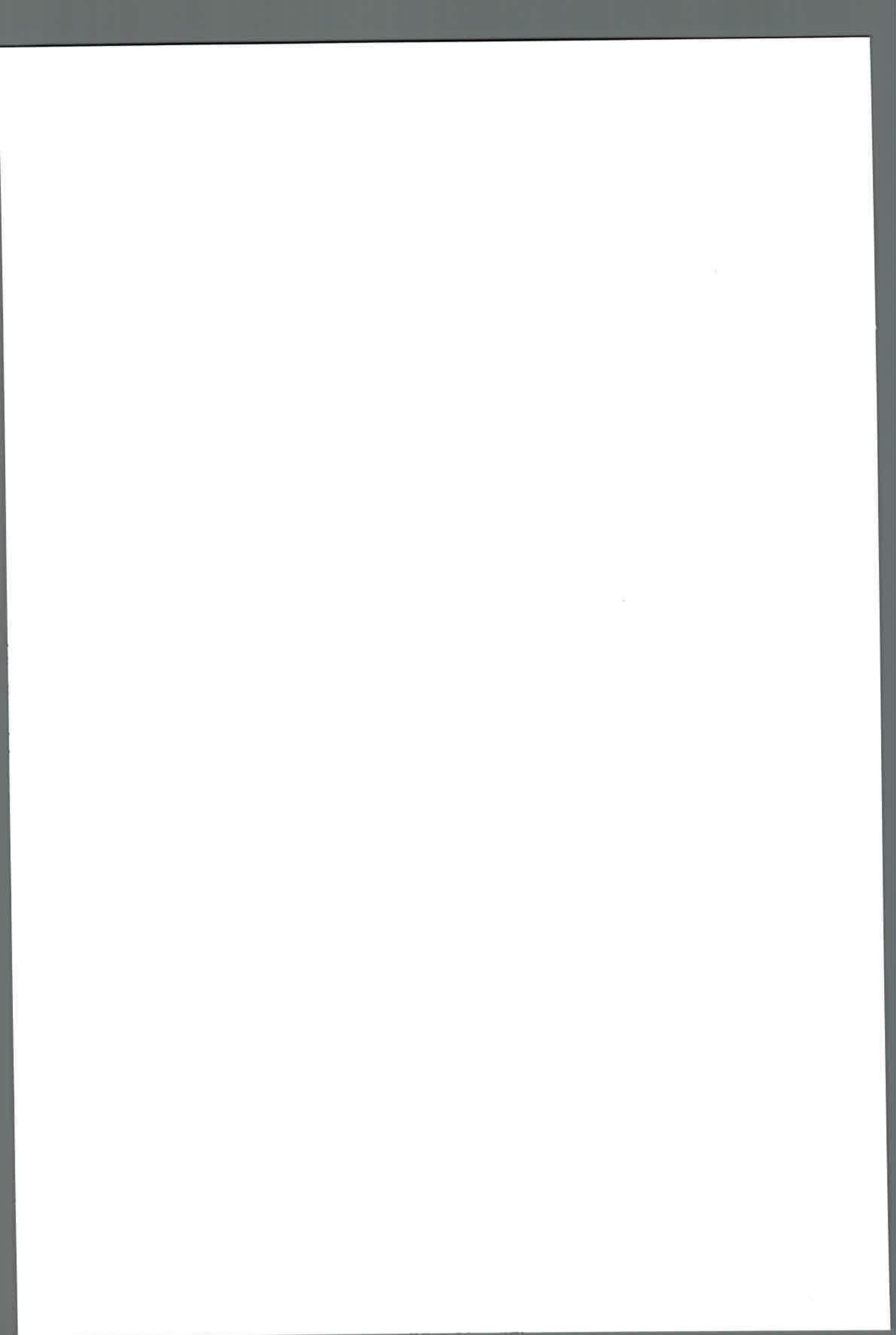
Oliver, S. y Jayaro, B. 1995. Coagulase negative *Staphylococcus* species intramammary infections in heifers and cows during the nonlactating and perpartum periods. *National Mastitis Council*.43: 161-166.

Oliver, S; Almeida, R; Gillespie, B; Ivey, S; Moorehead, H; Lunn, P; Dowlen, H; Johnson, D; Lamar, K. 2003. Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced *Streptococcus uberis* intramammary infections in lactating dairy cattle. *Vet Ther*. 4 (3): 299-308.

Oliver, S; Jayaro, B; Almeida, R. 2005. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. Review. *Foodborne pathog dis*. Vol 2 (2): 115-129.

Otto, M. 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in Bioscience*. 9: 841-863.

Paape, M. y Capuco, A.1997. Celular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *J. Anim. Sci*. 75: 556-565.



Paape, M.; Wiggans, G; Bannermana, D; Thomas, D; Sanders, A; Contreras, A; Moroni, P; Miller, R. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts Small Ruminant Research. 68: 114–125.

Paradis, M; Bouchard, E; Scholl, D; Miglior, F; Roy, J. 2010. Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. Journal of Dairy Science. 93: 2989-2997.

Park, J; Fox, L; Seo, K; McGuire, M.; Park, Y; Rarangirwa, F; Bohacch, G. 2011. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. Veterinary Microbiology. 147: 149-154.

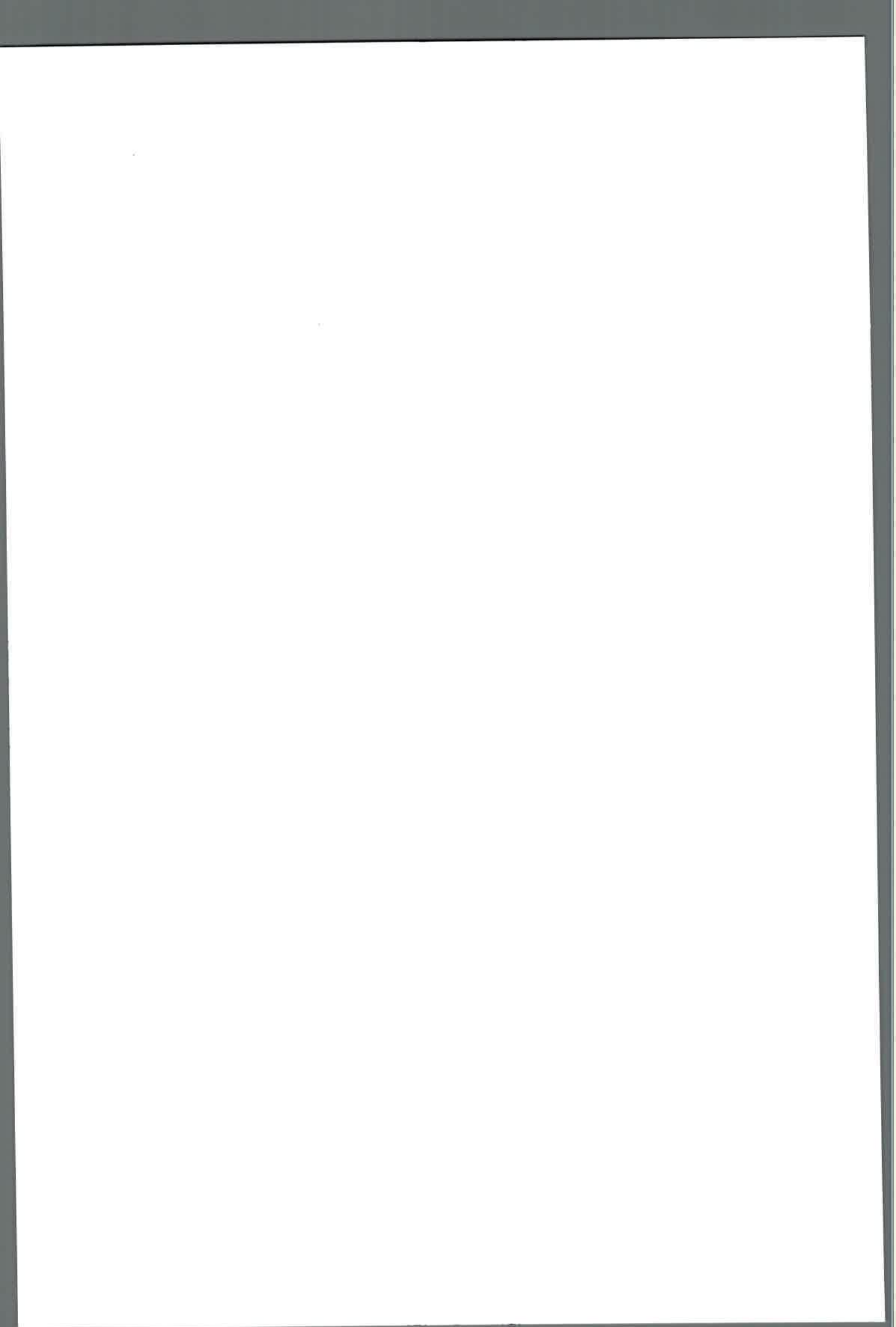
Park, Y; Fox, L; Hancock, D; McMahan, W; Park, Y. 2012. Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. Journal of Veterinary Science. 13:103–5.

Philpot, W. y Nickerson, S. 1992. Mastitis: El contraataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Estados Unidos: BabsonBros Co. pp. 147-234.

Piccart, K; Piepers, S; Verbeke, J; de Sousa, N; Beckers, J; De Vlieghe, S. 2015. Milk prolactin response and quarter milk yield after experimental infection with coagulase-negative staphylococci in dairy heifers. J Dairy Sci. 98 (7): 4593-600.

Piepers, S; Psomer, G; Barkema, H; de Kruif, A; De Vlieghe, S. 2010. Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than non-infected heifers. Journal of Dairy Science. 93: 2014-2024.

Piessens, V; Van Coillie, E; Verbist, B; Supré, K; Braem, G; Van Nuffel, A; De Vlieghe, S. 2011. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. J. Dairy Sci. 94: 2933-2944.



Pisoni, G; Moroni, P; Genini, S; Stella, A; Boettcher, P; Cremonesi, P; Scaccabarozzi, L; Giuffra, E; Castiglioni, B. 2010. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 135: 208-217.

Pyörälä, S. y Taponen, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. 134: 3-8.

Rabello, R; Souza, C; Duarte, R; Lopes, R; Teixeira, L; Castro, A. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science*. 88: 3211-3219.

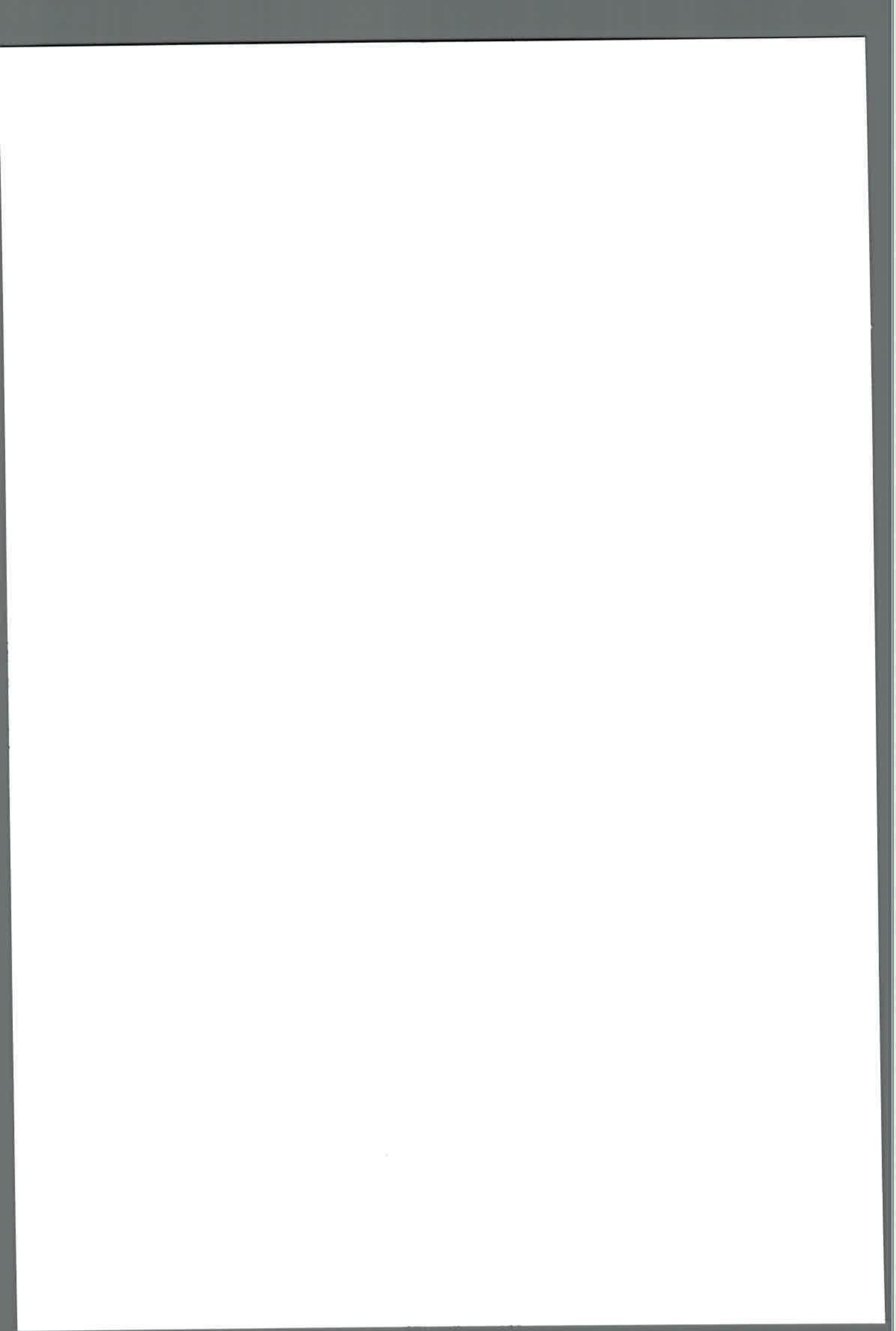
Rajala-Schultz, P; Smith, K; Hogan, J; Love, B. 2006. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary Microbiology*. 102: 33-42.

Rall, V; Sforcin, J; de Deus, M; de Sousa, D; Camargo, C; Godinho, N; Araújo, J. 2010. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese. *Foodborne Pathog Dis*. 7(9): 1121-1123.

Rampone, H; Bogni, C; Giraudo, J; Calzolari, A. 1993. Identification of staphylococci from bovine milk in Argentina. *Zbl. Bakt*. 279: 537-543.

Raspanti, C; Bonetto, C; Vissio, C; Pellegrino, M; Reinoso, E; Dieser, S; Bogni, C; Larriestra, A; Odierno, L. 2016. Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 48 (1): 50-6.

Rivero, V; Vena, M; Corbellini, C. 1984. Resultados bacteriológicos en casos de mastitis clínicas en rodeos lecheros de la cuenca de Abasto del Gran Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim*. 4: 211-223.



Roig Sagués, A. 2004. Riesgos y peligros en los productos lácteos. Recuperado en junio de 2015 en <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2004/08/11/13957.php>

Ruegg, P. 2009. The quest for the perfect test: phenotypic versus genotypic identification of coagulase-negative staphylococci associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 134: 15-19.

Ruegg, P; Oliveira, L; Jin, W; Okwumabua, O. 2015. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98: 1-14.

Sampimon, O; Zadoks, R; De Viegheer, S; Supre, K; Haesebrouck, F; Barkema, H; Lam, T. 2009. Performance of API Staph ID 32 and Staph-zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk sample. *Vet. Microbiol*. 136: 300-305.

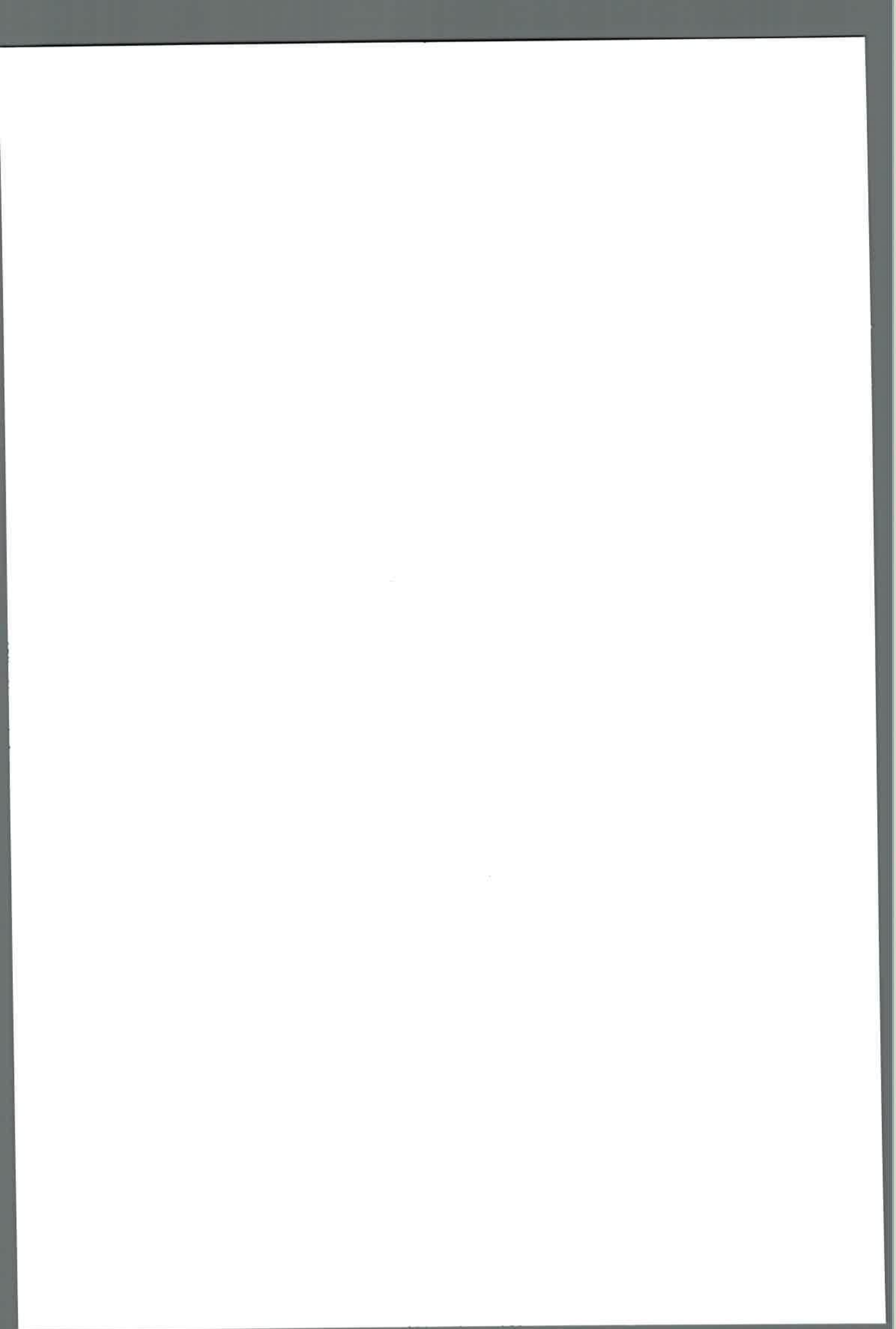
Sánchez, A; Contreras, A; Corrales, J. 1999. Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. *Small Ruminant Res*. 31: 197-201.

Sánchez Macías, D; Morales de la Nuez, A; Torres, A; Hernández Castellano, L; Jiménez Flores, R.; Castro, N; Argüello, A. 2013. Effects of addition of somatic cell to caprine milk on cheese quality. *International Dairy Journal*. 29:61-67.

Sansano, C. 2010. Mastitis bovina causada por ECN. Sitio Argentino de Producción Animal. Recuperado en agosto de 2015 en <http://www.produccion-animal.com.ar>.

Saran, A. y Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Ed. Inter-Médica SAICI. 1: 9-14, 49-62, 99-108, 125-132.

Scheifele, D; Bjornson, G; Dyer, R.; Dimmick, J. 1987. Delta-like toxin produced by coagulase-negative staphylococci is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*. 55: 2268-2273.



Schibler, L; Vaiman, D; Oustry, A; Guinec, N; Dangy-Caye, A; Billault, A; Crihiu, E. 1998. Construction and extensive characterization of a goat bacterial artificial chromosome library with threefold genome coverage. *Mamm Genome*. 9(2):119-24.

Schukken, Y; Gonzales, R; Tikofsky, L; Schulte, H; Santisteban, C; Welcome, F; Zadoks, R. 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? *Veterinary Microbiology*. 134: 9-14.

Silva, W; Silva, A; Macedo, M; Araújo, M; Mata, M; Gandra, E. 2003. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34: 125-127.

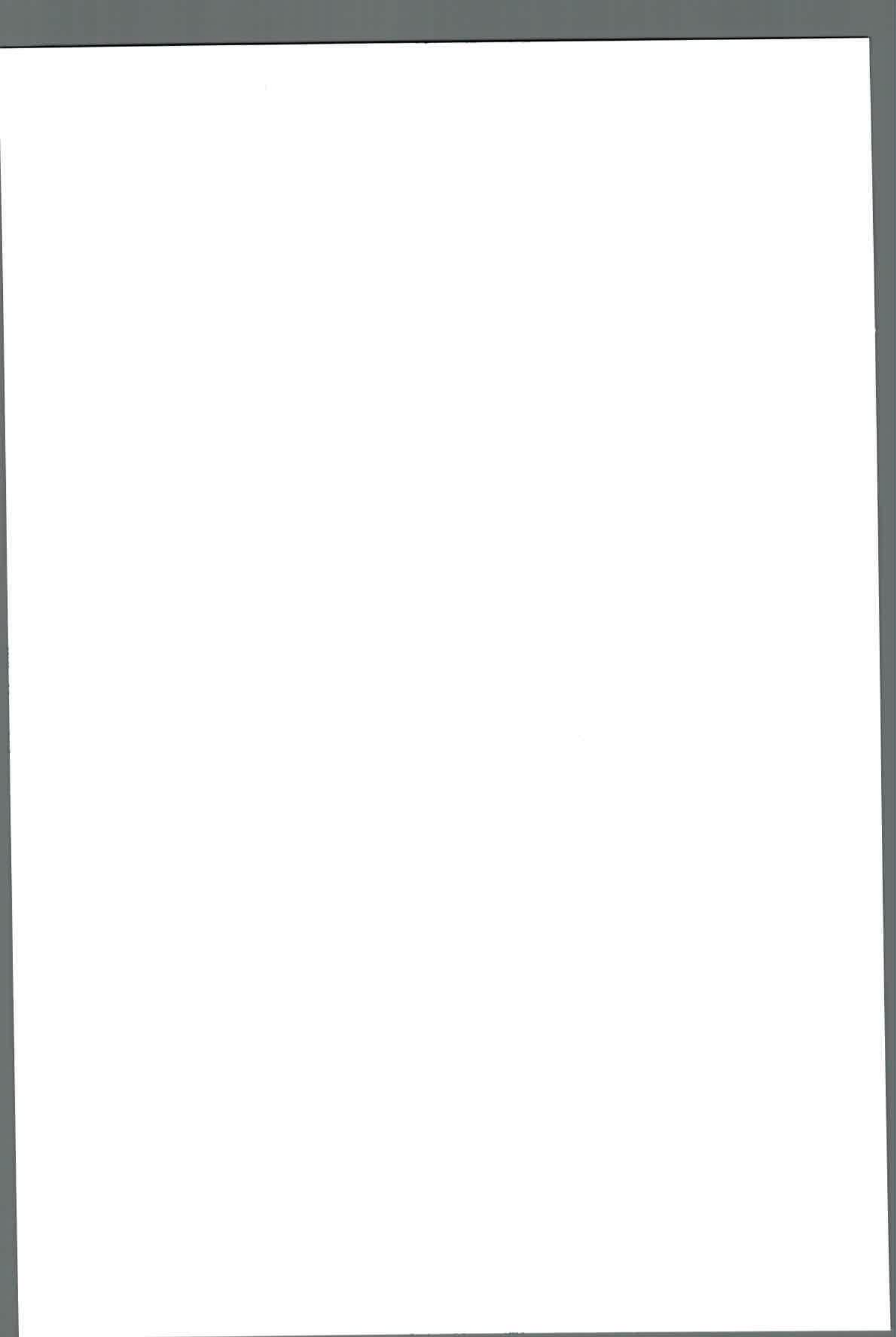
Simojoki, H; Orro, T; Taponen, S; Pyörälä, S. 2009. Host response in bovine mastitis experimentally induced with *Staphylococcus chromogenes*. *Veterinary Microbiology*. 134: 95-99.

Simojoki, H; Hyvönen, P; Orro, T; Pyörälä, S. 2010. High concentration of human lactoferrin in milk of rhLf-transgenic cows relieves signs of bovine experimental *Staphylococcus chromogenes* intramammary infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 136: 265-271.

Simojoki, H; Salomäki, T; Taponen, S; Iivanainen, A; Pyörälä, S. 2011. Innate immune response in experimentally induced bovine intramammary infection with *Staphylococcus simulans* and *S. epidermidis*. *Veterinary Research*. pp. 42-49.

Simojoki, H; Hyvönen, P; Plumed Ferrer, C; Taponen, S. 2012. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Veterinary Microbiology*. 158: 344-352.

Souza, F; Piepers, S; Della Libera, A; Heinemann, M; Cerqueira, M; De Vliegher, S. 2016. Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *J Dairy Sci*. 99 (4): 2867-74.



Supré, K; Haesebrouck, F; Zadoks, N; Vaneechoutte, M.; Piepers, S; De Vliegher, S. 2011. Some coagulase negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*. 94: 2329-2340.

Taponen, S; Simojoki, H; Haveri, M; Larsen, H; Pyörälä, S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology*. 115: 199–207.

Taponen, S; Koort, J; Bjorkroth, J; Saloniemi, H; Pyörälä, S. 2007. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *Journal of Dairy Science*. 90: 3301-3307.

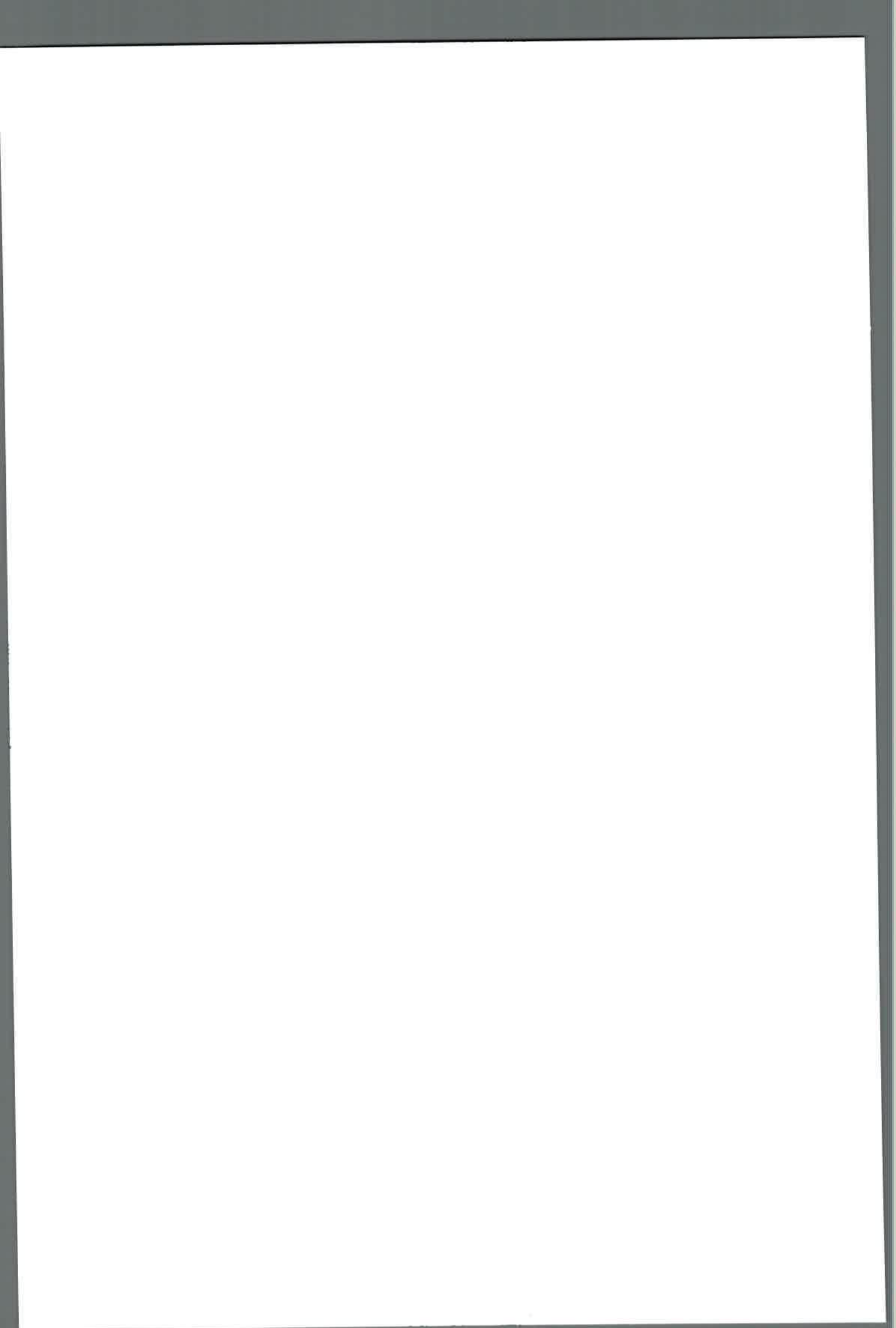
Taponen, S. 2008. Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. Tesis Doctoral. Department of Production Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki Finland.

Taponen, S. y Pyörälä, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*. 134: 29-36.

Tenhagen, B; Köster, G; Wallmann, J; Heuwieser, W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*. 89: 2542-2551.

Thorberg, B; Danielsson-Tham, M; Emanuelson, U; Persson Waller, K. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*. 92: 4962-4970.

Timms, L. y Schultz, L. 1987. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *Journal of Dairy Science*. 70: 2648-2657.



Todhunter, D; Cantwell, L; Smith, K; Hoblet, K; Hogan, J. 1993. Characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*. 34: 373-380.

Tomazi, T; Gonçalves, J; Barreiro, J; Arcari, M; Dos Santos, M. 2015. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *Journal of Dairy Science*. 98: 1-8.

Trinidad, P; Nickerson, S; Alley, T. 1990. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 73: 107-114.

Türkyılmaz, S. y Kaya, O. 2006. Determination of some Virulence Factors in *Staphylococcus* spp. Isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 30: 127-132.

Valle, J; Gomez, L; Piriz, S; Goyache, J; Orden, J; Vadillo, S. 1990. Enterotoxin Production by *Staphylococci* Isolated from Healthy Goats. *Applied and environmental microbiology*. 56: 1323-1326.

Vanderhaeghen, W; Piepers, S; Leroy, F; Van Coillie, E; Haesebrouck, S; de Vliegher, S. 2014. Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase- negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science*. 97: 5275-5293.

Vianna, P; Mazal, G; Santos, M; Bolini, H.; Gigante, M. 2008. Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. *J. Dairy Sci.* 91:1743-1750.

Waage, S; Mørk, T; Røros, A; Aasland, D; Hunshamar, A; Ødegaard, S. 1999. Bacteria Associated with Clinical Mastitis in Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science*. 82: 712-719.

Waller, K; Aspán, A; Nymana, A; Persson, Y; Grönlund Andersson, U. 2011. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*. 152: 112–116.

Watts, J. y Owens, W. 1987. Synergistic hemolysis associated with coagulase negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. *Journal of Clinical Microbiology*. 25:2037-2039.

Wedholm, A; Møller, H; Lindmark-Månsson, H; Rasmussen, M; Andrén, A; Larsen, L. 2008. Identification of peptides in milk as a result of proteolysis at different levels of somatic cells counts using LC MALDI MS/MS detection. *J Dairy Res*. 75 (1): 76-83.

Weiss, D. y J. Wardrop. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6° Ed. Editorial Wiley-Blackwell. 9(108): 836-842.

Welleberg, G; Van Der Poel, W; Van Oirschot, J. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*. 2361: 2-21

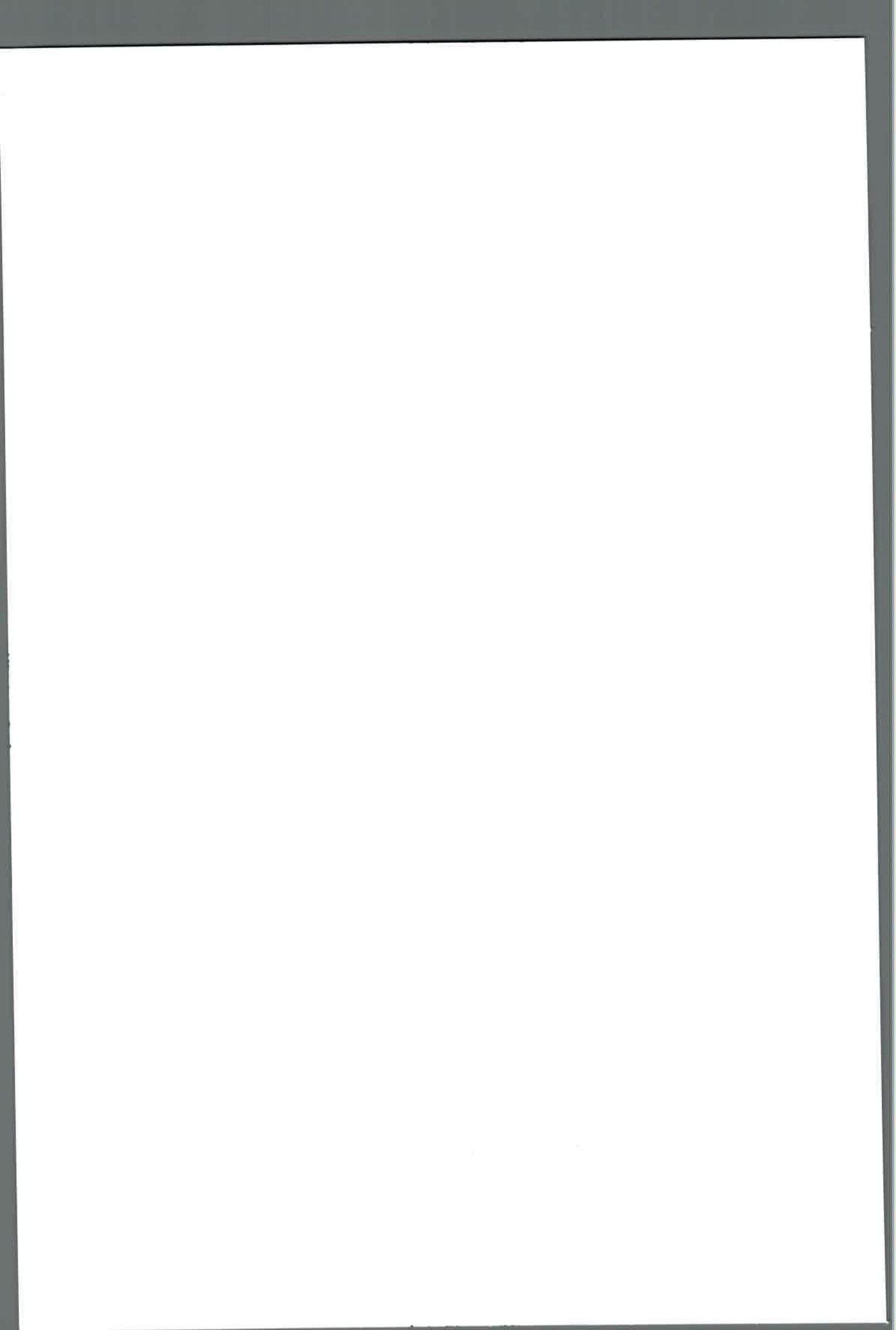
Winter, P; Schilcher, F; Fuchs, K; Colditz I. 2003. Dynamics of experimentally induced *Staphylococcus epidermidis* mastitis in East Friesian milk ewes, *J Dairy Re*. 70:157-164.

Xu, J; Tan, X; Zhang, X; Xia, X; Sun, H. 2015. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microb Pathog*. 88: 29-38.

Zhang, S. y Maddox, W. 2000. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infection and Immunity*. 68: 1102-1108.

Zuniga, E; Melville, P; Saidenberg, A; Laes, M; Gonsales, F; Salaberry, S; Gregor, F; Brandão, P; dos Santos, F; Lincopan, N; Benites, N. 2015. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microb Pathog*. 89: 1-6.





76696

76697

DONACION

Don: An. B.1.1.1

Autor: Magayo, Franco Maricel

Exp:

Inv N: 76697

