



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

TESIS DOCTORAL

**Exopolisacáridos y otros factores de virulencia en cepas de
Staphylococcus aisladas de leche ovina**

Que presenta para optar al grado de Doctor el Licenciado en Veterinaria

LUIS IGNACIO PÉREZ-ORDOYO GARCÍA

León, mayo de 2010.



universidad
de león

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

**INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Dres. D. ELÍAS-FERNANDO RODRÍGUEZ FERRI y D. CÉSAR-BERNARDO GUTIÉRREZ MARTÍN como Directores de la Tesis Doctoral titulada “EXOPOLISACÁRIDOS Y OTROS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Staphylococcus* AISLADAS DE LECHE OVINA” realizada por D. LUIS IGNACIO PÉREZ-ORDOYO GARCÍA en el Departamento de SANIDAD ANIMAL, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 20 de mayo de 2010.

Fdo.: Elías-F. Rodríguez Ferri

Fdo.: César-B. Gutiérrez Martín



universidad
de león

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO

**(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de SANIDAD ANIMAL en su reunión celebrada el día 27 de mayo de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “EXOPOLISACÁRIDOS Y OTROS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Staphylococcus* AISLADAS DE LECHE OVINA”, dirigida por el Dr. D. ELÍAS-FERNANDO RODRÍGUEZ FERRI y el Dr. D. CÉSAR-BERNARDO GUTIÉRREZ MARTÍN, elaborada por D. LUIS IGNACIO PÉREZ-ORDOYO GARCÍA y cuyo título en inglés es el siguiente “EXOPOLYSACCHARIDE AND OTHER VIRULENCE FACTORS OF *Staphylococcus* ISOLATED FROM SHEEP MILK”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 27 de mayo de 2010.

El Secretario,

Fdo.: Juan-Miguel Fregeneda Grandes

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo: Elías F. Rodríguez Ferri

**Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama.
ARISTÓTELES. *Etic.* L. IX, c. 8**

**La alegría que proviene del trabajo es grande, y grande es también la
que del ingenio procede; pero mayor es aún, sin comparación,
la que procede del trabajo del ingenio.
EDMONDO DE AMICIS**

**Y así tenga sabido que lo importante y raro no es entender de todo,
sino ser diestro en algo.
SAMANIEGO. *Fábulas morales.* El pato y la serpiente**

A mis hijos

A mis padres

Agradecimientos

Mi primer agradecimiento no puede por menos que estar destinado a mis directores de tesis, el Dr. Elias Fernando Rodriguez Ferri y el Dr. César Bernardo Gutiérrez Martín, por su apoyo incondicional y dirección dedicada, por su gran paciencia y comprensión a lo largo de estos (muchos) años, quienes acogieron a un veterinario de la industria en su intención de concluir los estudios de tercer ciclo. Espero haber sido merecedor de su esfuerzo, y les aseguro que su ejemplo como personas e investigadores ha hecho mella en mí.

Al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León, que me ha permitido utilizar sus instalaciones y equipos, imprescindibles para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del Área de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria, por permitirme utilizar su laboratorio, instrumental y material y orientarme para llevar a cabo las electroforesis de los sueros.

A las empresas Laboratorios Ovejero, S.A. y Laboratorios Syva, S.A., de León, por cederme las cepas de campo empleadas en este estudio.

A la Dra. Ana Vindel, del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, por haberme proporcionado las cepas de fagos de *Staphylococcus aureus*, así como los protocolos para su manejo.

A la Dra. Paniagua por sus enseñanzas, en especial las relativas a los fagos.

Al Dr. Jorge Riaño, por su ayuda con las técnicas de Biología Molecular y su genuina amistad.

A Ana Sutil, por su apoyo, cariño, aliento y comprensión constantes, que me facilitaron el encarar con decisión y denuedo la última fase de este estudio.

A los compañeros del Departamento de Sanidad Animal, Unidad de Microbiología e Inmunología, tanto presentes como a aquellos que ya marcharon, por su apoyo, crítica y ayuda, por facilitarme la posibilidad de hacer de este trabajo una experiencia más enriquecedora desde el punto académico y personal.

A Javier Peñalba, por su ayuda, dedicación y colaboración técnicas y su, espero, amistad perdurable.

A todos aquellos que con su acción o inacción me han impulsado a llegar hasta aquí, a finalizar esta tarea, con todo lo que representa para mi desarrollo como persona.

I.-Índice

I.- Índice.....	I
II.- Abreviaturas.....	VII
III.- Índice de tablas e ilustraciones.....	XI
IV.- Revisión bibliográfica	1
1.- Microorganismos frecuentes en la leche de ovejas clínicamente sanas.....	3
2.- Importancia de los estafilococos.	5
3.- Patologías debidas al género <i>Staphylococcus</i> en ovino, con especial referencia a la mastitis gangrenosa.....	7
4.- Características de los estafilococos	9
4.1.- Estructura celular.....	9
4.2.- Composición química de la envoltura celular	10
4.2.1.-Peptidoglicano	10
4.2.2.- Ácidos teicoicos de la pared.....	10
4.2.3.- Membrana citoplasmática.	10
4.3.- Actividad biológica de los polímeros de la envoltura celular.	11
4.3.1.- La pared celular como receptor de bacteriófagos.....	11
4.3.2.- Actividad biológica de los ácidos teicoicos	11
4.3.3.- Propiedades biológicas del peptidoglicano	11
a) Propiedades inmunológicas	11
b) Actividad endotóxica.....	12
c) Otras propiedades patogénicas o tóxicas.....	12
d) Propiedades no patogénicas	12
4.4.- Factores de adherencia: importancia taxonómica y relación con la virulencia.....	13
4.4.1.- Introducción a la adherencia	13
4.4.2.- Principales factores de adherencia	14
4.4.2.1.- Exopolisacáridos bacterianos	15
4.4.2.2.- Adhesinas de los estafilococos.....	28
4.4.2.3.- Hidrofobicidad	31
4.4.3.- Regulación de la adherencia y relación con la virulencia	33
4.5.- Poder patógeno.....	39
5.- Diagnóstico de la enfermedad	44
6.- Profilaxis y terapia de los procesos causados por estafilococos productores de exopolisacáridos	46
V.- Justificación y objetivos.....	49
VI.- Material y métodos.....	55

1.- Descripción de las cepas utilizadas en este estudio	57
1.1.- Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas aisladas	57
1.1.1.- Toma de muestras y aislamiento de las cepas.....	57
1.1.2.- Identificación	58
1.1.2.1.- Identificación a nivel de género.....	58
1.1.2.2.- Identificación a nivel de especie	60
1.1.3.- Fagotipado de las cepas de <i>S. aureus</i>	65
1.1.3.1.- Preparación de los fagos	66
1.1.3.2.- Aislamiento de fagos de origen ovino	67
1.1.3.3.- Fagotipado.....	68
1.2.- Otras cepas empleadas	68
2.- Estudio de factores de virulencia	69
2.1.- Factores de superficie	69
2.1.1.- Cápsula. Detección y serotipificación de cepas capsuladas.....	69
2.1.1.1.- Detección de la cápsula.....	70
2.1.1.2.- Serotipado capsular.....	71
2.1.2.- <i>Slime</i> . Detección de cepas productoras de <i>slime</i>	87
2.1.2.1.- Método de Christensen	87
2.1.2.2.- Agar Rojo Congo (ARC)	90
2.1.3.- Hidrofobicidad. Medida de la hidrofobicidad.....	93
2.1.3.1.- Cálculo de la hidrofobicidad mediante el uso de <i>p</i> -xileno.....	94
2.1.3.2.- Cálculo de la hidrofobicidad mediante el uso del hexadecano	95
2.1.4.- Determinación de la presencia de genes de factores de superficie	95
2.1.4.1.- Selección de cebadores y diseño de las PCR	96
2.2.- Estudio de otros factores de virulencia	101
2.2.1.- Pruebas de factores de virulencia de estafilococos (distintos de <i>S. aureus</i>).....	101
2.2.1.1.- Adherencia a superficies inertes	102
2.2.1.2.- <i>Slime</i>	102
2.2.1.3.- Hialuronidasa	102
2.2.1.4.- Fibrinolisisina (Estafiloquinasa).....	102
2.2.1.5.- Ureasa	102
2.2.1.6.- Gelatinasa.....	103
2.2.1.7.- Caseinasa.....	103
2.2.1.8.- Lecitinasa (<i>egg yolk factor</i>) y Lipasa.....	103
2.2.2.- Detección de bacteriocinas	103
VI.- Resultados	105
1.- Cepas aisladas en este estudio	107
1.1.- Identificación, distribución territorial y temporal de las cepas aisladas	107

1.2.- Fagotipado de las cepas de <i>S. aureus</i>	116
2.- Estudio de los factores de virulencia	126
2.1.- Factores de superficie.....	126
2.1.1.- Cápsula. Detección y serotipificación de cepas capsuladas.....	126
2.1.1.1.- Detección de la cápsula	126
2.1.1.2.- Serotipado capsular	136
2.1.2.- <i>Slime</i> . Detección de cepas productoras de <i>slime</i>	147
2.1.2.1.- Método de Christensen.....	147
2.1.2.2.- Agar Rojo Congo	161
2.1.3.- Hidrofobicidad. Medida de la hidrofobicidad	171
2.1.3.1.- Puesta a punto de la determinación de la hidrofobicidad mediante el uso de <i>p</i> - xileno y hexadecano	172
2.1.3.2.- Cálculo de la hidrofobicidad mediante el uso de <i>p</i> -xileno y hexadecano	175
2.1.4.- Determinación de la presencia de genes de factores de superficie.....	178
2.2.- Estudio de otros factores de virulencia	183
2.2.1.- Determinación de factores de virulencia en estafilococos (distintos de <i>S. aureus</i>)	183
2.2.2.- Detección de bacteriocinas.....	185
2.2.2.1.- Método de siembra de la cepa de <i>Cellulomonas fimi</i>	185
2.2.2.2.- Temperaturas de incubación.....	187
2.2.2.3.- Resultados de la detección de bacteriocinas	190
VIII.- Discusión	197
1.- Cepas aisladas en este estudio	199
1.1.- Identificación, distribución territorial y temporal de las cepas aisladas.....	199
1.2.- Fagotipado de las cepas de <i>S. aureus</i>	205
2.- Estudio de los factores de virulencia	208
2.1.- Factores de superficie.....	208
2.1.1.- Cápsula	209
2.1.1.1.- Presencia del <i>clumping factor</i>	210
2.1.1.2.- Crecimiento en agar blando suero (<i>Serum Soft Agar, SSA</i>)	211
2.1.1.3.- Tipado capsular	214
2.1.2.- <i>Slime</i>	223
2.1.2.1.- Método de Christensen.....	224
2.1.2.2.- Agar Rojo Congo	226
2.1.3.- Hidrofobicidad	229
2.1.3.1.- Puesta a punto de la determinación de la hidrofobicidad mediante el uso de <i>p</i> - xileno y hexadecano	230

2.1.3.2.- Resultados del cálculo de la hidrofobicidad	231
2.1.4.- Determinación de la presencia de genes de factores de adherencia.....	231
2.1.5.- Comparación de los resultados de la determinación de los factores de adherencia estudiados.....	235
2.2.- Estudio de otros factores de virulencia	248
2.2.1.- Otros factores de virulencia en estafilococos distintos de <i>S. aureus</i>	248
2.2.2.- Bacteriocinas.....	251
IX.- Conclusiones	253
X.- Apéndices.....	259
Apéndice M01: Cepas tipo utilizadas.....	261
Apéndice M02: Medios, soluciones y reactivos.....	265
Apéndice M03: Códigos de identificación.....	277
Apéndice M04: Secuencias utilizadas de las cepas tipo capsuladas.....	283
XI.- Resumen	289
XII.- Bibliografía	295

II.- Abreviaturas

- ABC:** Agar Base Columbia.
- AC:** Agar Columbia.
- ACF:** Adyuvante completo de Freund.
- ACS:** Agar Columbia Sangre.
- AIF:** Adyuvante incompleto de Freund.
- AMP:** *Neutrophil antimicrobial peptide* (péptido antimicrobiano de neutrófilo).
- ARC:** Agar Rojo Congo.
- A_{xyz}:** Absorbancia (densidad óptica) a una longitud de onda de *xyz* nanómetros.
- BHI:** Caldo infusión cerebro-corazón.
- BHIA:** Agar infusión cerebro-corazón.
- DO:** Densidad óptica.
- EPS:** Exopolisacárido
- HHW:** Medio sintético para la promoción de la formación de *slime* de Hussain, Hastings y White.
- HIC:** Cromatografía de interacción hidrofóbica.
- Hty:** Hidrofobicidad.
- MATS:** *Microbial Adhesion to solvent* (adhesión microbiana a solvente)
- MSCRAMM:** *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (componentes de la superficie celular que reconocen moléculas de la matriz adhesivas).
- PMN:** Leucocitos polimorfonucleares
- PFGE:** Electroforesis en campo pulsado.
- RTD:** *Routine test dilution* (dilución de prueba de rutina).
- SAT:** *Salt aggregation test* (prueba de agregación salina).
- SCN:** Estafilococo/s coagulasa negativo/s.
- SCNSN:** Estafilococo/s coagulasa negativo/s sensible/s a la novobiocina.
- SCNRN:** Estafilococo/s coagulasa negativo/s resistente/s a la novobiocina.
- SSA:** *Serum-Soft Agar* (Agar blando suero).
- SSF:** Solución salina fisiológica
- TSA:** Agar soja-tripticasa.
- TSB:** Caldo soja-tripticasa.
- UFC:** Unidades formadoras de colonia.

III.- Índice de tablas e ilustraciones

ÍNDICE DE TABLAS

Revisión

Tabla Rev01. Bacterias habituales en la leche de ovejas españolas clínicamente sanas	4
Tabla Rev02. Tipos de factores de adherencia.....	14
Tabla Rev03. Presencia de cepas de <i>S. aureus</i> capsuladas, datos de distintas procedencias.....	22
Tabla Rev04. Serotipos capsulares más frecuentes, datos de distintas procedencias.....	23
Tabla Rev05. Producción de <i>slime</i> en cepas de <i>Staphylococcus</i> de varios orígenes.Datos de varios autores.....	26
Tabla Rev06. Factores nutricionales y producción de <i>slime</i> . Datos de varios autores.....	28
Tabla Rev07. Adhesinas conocidas y proteínas (ligandos) que pueden unirse covalentemente a la superficie de <i>S. aureus</i> (modificado de Peacock <i>et al.</i> , 2002 y Clarke y Foster, 2006).....	30
Tabla Rev08. Otras proteínas relacionadas con la adherencia de <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> , datos de varios orígenes	31
Tabla Rev09. Factores de virulencia potenciales de <i>S. aureus</i>	40
Tabla Rev10. Determinantes de virulencia estudiados en poblaciones naturales de <i>S. aureus</i> (Peacock <i>et al.</i> , 2002).....	41

Material y Métodos

Tabla M01. Orden de codificación para la identificación	64
Tabla M02. <i>Set</i> básico de fagos y cepas propagadoras	65
Tabla M03. Cepas tipo de <i>S. aureus</i> utilizadas para la elaboración de los extractos capsulares	73
Tabla M04. Cronograma de la hiperinmunización de los conejos.....	76
Tabla M05. Cebadores de genes capsulares de <i>S. aureus</i> utilizados en este estudio.....	85
Tabla M06. Cebadores de genes de adhesinas utilizados en este estudio	97

Resultados

Tabla R01. Orden de las pruebas de identificación.....	107
Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio: referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen	107
Tabla R03. Resumen de las diferentes cepas de estafilococos estudiadas agrupadas por especie, en orden decreciente de frecuencia	113
Tabla R04. Resumen de las cepas de estafilococos estudiadas, agrupadas por año de aislamiento, indicando los casos estudiados por año y los aislados obtenidos por caso.....	114
Tabla R05. Resumen del origen de las cepas aisladas	115

Tabla R06. Resultado del fagotipado a 100 RTD con las cepas del set internacional... 116	116
Tabla R07. Resultado del fagotipado, a RTD, con el set Internacional de las cepas que fueron más sensibles con 100RTD	120
Tabla R08. Cepas con lisis completa con los fagos del Set Internacional	120
Tabla R09. Espectro lítico de los fagos aislados	121
Tabla R10. Resultado del fagotipado a RTD y 100 RTD de las cepas problema con los fagos aislados durante este estudio	122
Tabla R11. Resumen del resultado del fagotipado de las cepas problema con los fagos aislados.....	125
Tabla R12. Resumen de resultados de la prueba de <i>clumping factor</i> realizada a las cepas de <i>S. aureus</i> de este estudio	126
Tabla R13. Resumen de los resultados del <i>clumping factor</i> y del crecimiento en agar blando suero (<i>Serum Soft Agar, SSA</i>) de las cepas estudiadas	127
Tabla R14. Resultados generales del cultivo en agar blando suero (SSA).....	132
Tabla R15. Resultados del crecimiento en SSA desglosados según morfología colonial y especie bacteriana	133
Tabla R16. Comparación de los resultados del crecimiento en SSA y del <i>clumping factor</i> en las cepas de <i>S. aureus</i> de este estudio	134
Tabla R17. Porcentaje de γ -globulinas séricas de los sueros de los conejos en proceso de hiperinmunización, determinado mediante electroforesis	137
Tabla R18. Título medio de tres determinaciones de los sueros de los conejos en proceso de hiperinmunización obtenido mediante ELISA.....	141
Tabla R19. Resumen de los resultados del tratamiento con bacterias completas.....	143
Tabla R20. Secuencia y otros detalles de los cebadores probados frente a los serotipos capsulares 5 y 8 de <i>S. aureus</i>	145
Tabla R21. Cebadores y bandas esperadas en la PCR capsular múltiple.....	146
Tabla R22. Cepas positivas a la PCR capsular	147
Tabla R23. Absorbancia (DO) de las cepas de prueba sobre los tres caldos recomendados para efectuar la prueba de Christensen de detección de <i>slime</i>	149
Tabla R24. Resultados de la detección de la formación de <i>slime</i> con el método de Christensen (BHI, cristal violeta)	153
Tabla R25. Cepas con más de 5 puntos en el método de Christensen, agrupadas por especies	159
Tabla R26. Detalle de las puntuaciones de formación de <i>slime</i> de las especies más frecuentes	160
Tabla R27. Cepas de máxima puntuación en la prueba de Christensen	161
Tabla R28. Composición de los agares Rojo Congo	162
Tabla R29. Aspecto colonial sobre agar Rojo Congo de cepas de <i>Staphylococcus</i> según las materias primas utilizadas en la elaboración del medio	162
Tabla R30. Influencia del tiempo y temperatura de incubación en la apariencia colonial.....	164
Tabla R31. Influencia del modo de esterilización del colorante Rojo Congo en el aspecto de las colonias de algunas cepas de <i>Staphylococcus</i> sp	165
Tabla R32. Influencia de la adición de ClNa al medio agar Rojo Congo en el aspecto de las colonias de varias cepas.....	167

Tabla R33. Influencia de las condiciones de incubación y de la proporción de colorante en los resultados de la prueba del agar Rojo Congo	169
Tabla R34. Resumen de los resultados sobre agar Rojo Congo	170
Tabla R35. Distribución de la aparición de colonias de color diferente al rojo en agar Rojo Congo	171
Tabla R36. Comparativa entre las pruebas de <i>p</i> -xileno y hexadecano.....	173
Tabla R37. Prueba comparativa de la determinación de la hidrofobicidad mediante el uso de hexadecano o <i>p</i> -xileno en cepas sometidas a dos pases en agar Columbia sangre	174
Tabla R38. Comparación de la determinación de la hidrofobicidad usando <i>p</i> -xileno en cepas sometidas o no a dos pases en agar Columbia sangre.....	175
Tabla R39. Resultados por especie de la medida de la hidrofobicidad con <i>p</i> -xileno o hexadecano en la prueba comparada tras un doble pase en agar Columbia sangre	176
Tabla R40. Resultados de la detección de genes de factores de adherencia en las cepas aisladas.....	180
Tabla R41. Resultados de los factores de virulencia de tipo enzimático estudiados.....	183
Tabla R42. Comparación de los resultados de los SNA y <i>S. aureus</i> de los factores de virulencia de tipo enzimático estudiados.....	184
Tabla R43. Comparación de dos métodos de siembra	186
Tabla R44. Comparación de temperaturas de incubación	187
Tabla R45. Resultados de la prueba de detección de inhibición de <i>C. fimi</i>	190
Tabla R46. Resultados de la producción de bacteriocinas agrupados por especie.....	195

Discusión

Tabla D01. Resumen de las cepas de estafilococos estudiadas, agrupadas por año de aislamiento, indicando los casos estudiados por año y detallando los aislados obtenidos por caso	200
Tabla D02. Distribución de los aislados, por especie, en los años 1992 a 1994.	201
Tabla D03. Distribución en subgrupos de las cepas de <i>Staphylococcus</i> sp. aisladas en España de leche de ovejas sanas (datos de varios autores)	203
Tabla D04. Cepas identificadas en este estudio, reagrupando los SCN según su sensibilidad a la novobiocina.....	203
Tabla D05. Distribución de los aislados por especies en los años 1992 a 1994, reordenando las cepas de los SCN según su sensibilidad a la novobiocina.....	204
Tabla D06. Resultados del fagotipado a 100 RTD con el <i>set</i> internacional de las cepas del estudio	206
Tabla D07. Fagotipado de las dos cepas más sensibles al <i>Set</i> Internacional y de las cepas que no presentan morfología compacta en SSA y son sensibles a algún fago empleado en este estudio	207
Tabla D08. Resultados relativos a la detección capsular de <i>S. aureus</i> (PCR capsular, <i>clumping factor</i> y SSA)	218
Tabla D09. Resultados relativos a la detección capsular de <i>S. aureus</i> combinando los resultados posibles de los tres análisis practicados (PCR capsular, <i>clumping factor</i> y SSA)	220

Tabla D10. Distribución de las cepas productoras de <i>slime</i> de este estudio según el método del agar Rojo Congo.....	228
Tabla D11. Cepas estudiadas y resultados de las pruebas MATS, Christensen, Rojo Congo y PCR	236
Tabla D12. Resumen por especie de las cepas adherentes halladas en este estudio, según el método de Christensen.....	242
Tabla D13. Cepas productoras de <i>slime</i> en agar Rojo Congo y datos según el método de Christensen	243
Tabla D14. Cepas adherentes según Christensen, indicando el color de sus colonias en agar Rojo Congo	245
Tabla D15. Cepas adherentes según Christensen, productoras de <i>slime</i> en agar Rojo Congo y coincidencias entre ambos métodos	245
Tabla D16. Resumen de los resultados de hidrofobicidad mediante MATS	246
Tabla D17. Cepas positivas a genes <i>ica</i>	247

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Resultados

Gráfico R01. Resultados del <i>clumping factor</i> según la morfología en SSA.....	135
Gráfico R02. Porcentaje medio de γ -globulinas séricas	138
Gráfico R03. Titulaciones de sueros hiperinmunes, tratados o no, frente al polisacárido capsular del serotipo 1	142
Gráfico R04. Curvas de crecimiento de las ocho cepas de prueba.....	150
Gráfico R05. Porcentajes de cepas por especie respecto a la producción de <i>slime</i>	160
Gráfico R06. Respuesta de cada especie de <i>Staphylococcus</i> a la prueba de hidrofobicidad con <i>p</i> -xileno o con hexadecano	177

ÍNDICE DE FOTOS

Material y Métodos

Foto M01. SSA con colonias tipo difuso (izquierda) o compactas (derecha).....	71
Foto M02. Prueba de Christensen sobre varias cepas	87
Foto M03. Colonias negras de aspecto cristalino sobre agar Rojo Congo. Cepa 93/251.02, <i>S. aureus</i> , <i>slime</i> positiva	90
Foto M04. Colonias rojas en agar Rojo Congo. Cepa 92/66.01, <i>S. epidermidis</i> , <i>slime</i> negativa.....	91
Foto M05. Colonias con el centro negro, sobre agar Rojo Congo. Cepa 93/500, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>slime</i> intermedia	91
Foto M06. Colonias con apariencia diferente a las clásicas, sobre agar Rojo Congo	92

Resultados

Foto R01. Fagotipado a 100 RTD de la cepa S23	116
Foto R02. Prueba de SSA frente a la cepa tipo Mardi (serotipo 3) sin suero, con suero normal y con tres sueros de la misma sangría (10 ^a) mostrando crecimiento: difuso(control sin suero) , difuso (control suero normal), compacto (positivo), pseudodifuso (positivo débil) y difuso (resultado negativo).	139
Foto R03. Titulación mediante la prueba de SSA frente a la cepa tipo 7007 (serotipo 4). SN=suero normal, P= antisuero puro, 2-32 diluciones seriadas (inverso).....	139
Foto R04. ELISA indirecto para la titulación de anticuerpos anticapsulares (frente al serotipo 5). Sueros situados en columnas por triplicado. Diluciones en base 2.	140
Foto R05. Gel de agarosa al 1% en TBE 0,5x de la PCR frente al serotipo 1	144
Foto R06. Gel de agarosa de la PCR capsular múltiple.....	146
Foto R07. Detalle del <i>slime</i> producido por la cepa de <i>S. aureus</i> 4C en los medios HHW,TSB y BHI, incubación estática en tubo de cristal, 48h a 37°C y tinción por azul de toluidina.....	148
Foto R08. <i>Slime</i> producido por las 8 cepas seleccionadas de <i>Staphylococcus sp.</i> En los caldos HHW, TSB y BHI. Incubación estática en tubo de cristal, 48h a 37°C y tinción por azul de toluidina	149
Foto R09. <i>Slime</i> producido por dos de las cepas seleccionadas de <i>S. aureus</i> teñido con cristal violeta, safranina o tripán azul. Incubación estática, tubo plástico, 48h a 37°C	152
Foto R10. Aspecto a las 48 horas de incubación de la cepa de <i>S.aureus</i> 92/080.13 (2C) sembrada en agar Rojo Congo clásico (izquierda) o normal (derecha). En ambos casos con colorante al 0,08%	163
Foto R11. Precipitado en agar Rojo Congo.....	166
Foto R12. Aspecto a las 24 horas de incubación de la cepa de <i>S. aureus</i> 92/080.13 (2C) sembrada en agar Rojo Congo al 0,08% sin (izquierda) o con (derecha) la adición de un 3% de CINA	168
Foto R13. Aspecto a las 48 horas de incubación de la cepa Mardi de <i>S. aureus</i> sembrada en agar Rojo Congo con un 0,08% (izquierda) o un 0,12% (derecha) de colorante.....	169
Foto R14. Detección de los genes de <i>fbe</i> (495pb), <i>atlE</i> (682 pb) y <i>bap</i> (971) ciclo ADH03T	178
Foto R15. Detección de los genes de <i>fib</i> (404 pb) e <i>icaAB</i> (546 pb) ciclo ADH07T	178
Foto R16. Gel de la reacción de PCR para la detección de los genes de <i>cna</i> (524 pb) y <i>fnbB</i> (423 pb), ciclo ADH017T.....	179
Foto R17. Gel de la reacción de PCR para la detección de los genes de <i>fnbA</i> (127 pb), <i>bbp</i> (575 pb) e <i>icaA</i> (1315 pb), ciclo ADH018T	179
Foto R18. Resultado de la siembra de la cepa de <i>C. fimi</i> : por inundación (izquierda) o con hisopo (derecha)	185
Foto R19. Detección de bacteriocinas: combinaciones de temperaturas de incubación de tres cepas diferentes.....	189

IV.- Revisión bibliográfica

1.- Microorganismos frecuentes en la leche de ovejas clínicamente sanas

Las características nutritivas de la leche de los mamíferos hacen de ella un muy buen medio de mantenimiento y crecimiento de numerosos microorganismos bacterianos. Suelen ser éstos normalmente de origen ambiental, aunque alguno puede ser patógeno para la ubre, alterando los niveles productivos de los animales afectados, disminuyendo considerablemente la calidad de la leche y suponiendo, en algunos casos concretos, un riesgo cierto para la vida del animal afectado. El desarrollo de algunos agentes microbianos en la leche puede provocar, además, problemas sanitarios por la aparición, por ejemplo, de cepas del género *Staphylococcus* productoras de enterotoxinas (Valle *et al.* 1990; Salasia *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005). Algunos autores, sin embargo, rechazan el concepto de existencia de “microorganismos habituales” en la leche de animales sanos, considerando que este producto es, por definición, de naturaleza estéril (Marco *et al.*, 1992a).

Teniendo en cuenta que son los microorganismos potencialmente patógenos los que más atención han recibido por parte de los investigadores, son mucho más abundantes los estudios publicados sobre los mismos que los dedicados a otros agentes que se han venido considerando presentes de forma natural (o al menos no asociados necesariamente a procesos mastíticos) en la leche ovina (Mavrogianni *et al.*, 2007). Por otro lado, también hay que tener en cuenta que prácticas como la selección de los animales hacia mayores producciones (lo que puede disminuir la resistencia a infecciones), la separación del lactante (lo que ocasiona un vaciado de la ubre mucho menos frecuente, produciéndose retenciones), o los daños producidos por las propias máquinas ordeñadoras (Watson, 1981), representan factores favorecedores de la proliferación de estos agentes.

Entre los datos publicados sobre los microorganismos presentes en la leche de ovejas españolas, se puede citar a algunos autores que presentan resultados sobre un número amplio de muestras de leche tomadas al azar en ovejas clínicamente sanas (**Tabla Rev01**):

Tabla Rev01. Bacterias habituales en la leche de ovejas españolas clínicamente sanas.

	García (1990)	Marco et al. (1992a)	De la Cruz et al. (1993)
Número de muestras	Nd	260	547
Muestras positivas (%)	Nd	47 (18,08%)	137 (25,05%)
Microorganismos aislados:	Nº cepas (% sobre cepas aisladas)		
Género <i>Staphylococcus</i>	188 (87,85)	34 (72,34)	123 (89,78)
<i>S. arletae</i>	7 (3,27)	-	-
<i>S. aureus</i>	49 (22,89)	7 (14,9)	7 (5,1)
<i>S. epidermidis</i>	29 (13,55)	6 (12,8)	89 (59,1)
<i>S. caprae</i>	1 (0,46)	-	-
<i>S. caseolyticus</i>	3 (1,40)	-	-
<i>S. chromogenes</i>	-	4 (8,5)	3 (22)
<i>S. cohnii</i>	4 (1,86)	-	-
<i>S. equorum</i>	16 (7,47)	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	2 (0,93)	-	-
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	4 (1,86)	-	-
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>hyicus</i>	10 (4,67)	3	-
<i>S. haemolyticus</i>	2 (0,93)	-	-
<i>S. kloosii</i>	5 (2,33)	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	1 (0,46)	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	11 (5,14)	-	-
<i>S. sciuri</i>	2 (0,93)	-	-
<i>S. simulans</i>	2 (0,93)	7 (14,9)	9 (6,6)
<i>S. warneri</i>	2 (0,93)	3 (6,4)	-
<i>S. xylosus</i>	8 (3,73)	-	14 (10,1)
<i>S. gallinarum</i>	8 (3,73)	-	-
<i>S. lentus</i>	4 (1,86)	-	1 (0,7)
<i>Staphylococcus</i> spp.	20 (9,34)	7 (14,9)	-
<i>Micrococcus</i> spp.	20 (9,34)	4 (8,5)	14 (10,1)
<i>Stomatococcus mucilaginosus</i>	6 (2,80)	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	-	3 (6,4)	-
<i>Mannheimia haemolytica</i>	-	1 (2,1)	-
<i>Pasteurella multocida</i>	-	1 (2,1)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	3 (6,4)	-
<i>Corynebacterium bovis</i>	-	-	1 (0,7)
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	1 (0,7)
No identificadas	-	-	6 (4,4)

Leyenda: Nd: no determinado

Según se observa en estos datos, destaca la importancia del género *Staphylococcus* como integrante de los microorganismos obtenidos de la leche de ovejas españolas clínicamente sanas, llegando a representar en algún caso prácticamente el 90% de los aislados bacterianos. Dentro de los estafilococos, las especies coagulasa negativas (SCN) son las que se aíslan más frecuentemente, frente a patógenos clásicos como *S. aureus*. Estos datos coinciden con los datos obtenidos en ovejas de otros países, como lo indicado

por Jones quien, en 1991, presentó resultados de un estudio de 30.000 ovejas en Reino Unido en el que ya destacaba la importancia de los SCN entre los aislados de leche. En un estudio de Mavrogianni *et al.* en 2007, los autores observan que los estafilococos son las bacterias más frecuentemente aisladas de las mamas de ovejas y que, en algunos casos, además, se aísla de forma repetida la misma cepa de estafilococo de la misma oveja a lo largo de toda la lactación.

2.- Importancia de los estafilococos

Como hemos indicado, se puede afirmar que el género *Staphylococcus* es el aislado más frecuentemente a partir de leche de ovejas sanas, y también en el caso de mastitis ovinas (Rupp *et al.*, 2009). Dentro de él, los SCN son los más habituales, como indican varios autores (De la Cruz *et al.*, 1993; González, 1995). Este dato es importante, pues los SCN aparecen cada vez más a menudo como causa de mastitis subclínicas que amenazan la obtención de leche de la calidad requerida por las Directivas de la Comunidad Europea. Por todo ello puede considerarse que el interés e importancia de los SCN en leche de ovejas sanas o enfermas, resulta un aspecto de gran actualidad por su repercusión en la calidad de la leche (Pengov, 2001; Rupp *et al.*, 2009).

En el curso de los últimos años se ha venido estudiando ampliamente la epidemiología de las mastitis causadas por *S. aureus* utilizando métodos bacteriológicos convencionales (Clements *et al.*, 2003). Es sobradamente conocido que *S. aureus* es un patógeno contagioso y que las principales fuentes de la bacteria en rebaños infectados son los cuarterones mamarios, la piel de la ubre y los pezones (Anderson, 1983; Myllis *et al.*, 1997; Fragkou *et al.*, 2007; Mavrogianni *et al.*, 2007), aunque otras fuentes de infección también pueden contribuir a la difusión de la enfermedad. La transmisión de *S. aureus* tiene lugar normalmente durante el ordeño (Bergonnier *et al.*, 2003b), aunque en el ganado vacuno se ha demostrado que los insectos también los vehiculan de forma mecánica (Gillespie *et al.*, 1999). Los planes de control de la mastitis por *S. aureus* basados en estos hechos han reducido la incidencia de la enfermedad en algunos países, aunque en otros continúa representando una de las especies bacterianas más frecuentemente aisladas a partir de casos de mastitis clínicas no sólo en vacuno, sino también en ovejas (Bergonier *et al.*, 2003b; Vautor *et al.*, 2009b). Una indicación clara de la capacidad de *S. aureus* para adaptarse a las nuevas condiciones de producción animal es el incremento de la incidencia

de las mastitis causadas por este patógeno (Robertson y Williams, 1994), siendo el patógeno principal en un gran número de granjas, y ello pese a las mejoras de la sanidad introducidas en las explotaciones de leche.

Por otro lado, aunque menos invasivo que *S. aureus*, *S. epidermidis* es también capaz de producir mastitis en vacuno, de manera que en un estudio se ha llegado a aislar hasta en un 43,5% de los cuarterones de 27.526 vacas de leche (Anderson, 1983), aunque las mastitis que causa son habitualmente subclínicas o leves y con menos cambios histopatológicos que las producidas por el primero tanto en vacas (Anderson, 1983) como en ovejas (Winter y Colditz, 2002; Vautor *et al.*, 2009b). En el caso del ganado ovino, los SCN se señalan como la principal causa de las infecciones intramamarias subclínicas (Bergonier *et al.*, 2003; Fragkou *et al.*, 2007). Las consecuencias económicas de estas infecciones son importantes, ya que este tipo de procesos producen alteraciones en la ubre y en la calidad de leche, en particular en lo referente al contaje de células somáticas (Pengov, 2001; Bergonier *et al.*, 2003b; Clements *et al.*, 2003; Rupp *et al.*, 2009).

En conclusión, los miembros del género *Staphylococcus* son las bacterias más frecuentemente aisladas en leche de ovejas sanas o enfermas (Burriel, 1998; Lafi *et al.*, 1998; Pengov, 2001), siendo las mastitis más graves las causadas por *S. aureus*, aunque otros miembros del género, en especial *S. epidermidis*, también provocan alteraciones de la ubre de los ovinos, comúnmente de tipo subclínico (Lafi *et al.*, 1998; Winter y Colditz, 2002; Clements *et al.*, 2003; Fragkou *et al.*, 2007). Es destacable que son los SCN quienes aparecen como causa de la mayoría de estas mastitis subclínicas ovinas (Pengov, 2001), que amenazan la obtención de leche de la calidad requerida por las Directivas CE. Además, al contrario de lo que ocurre con *S. aureus*, en muchos casos (Burriel, 1997), los SCN persisten y se aíslan repetidamente de los mismos animales durante todo el periodo de lactación, manteniéndose en las ubres durante el secado y volviendo a proliferar y manifestarse en la siguiente lactación (Mavrogianni *et al.*, 2007).

3.- Patologías debidas al género *Staphylococcus* en ovino, con especial referencia a la mastitis gangrenosa

Las principales patologías causadas por los estafilococos en el ganado ovino incluyen las mastitis, la enfermedad de los abscesos y la piemia por garrapatas de los corderos (Anderson, 1983), siendo las primeras los procesos de mayor entidad y también de repercusión económica. La mastitis estafilocócica está causada normalmente por *S. aureus* y es la forma más común de mastitis bovina en todo el mundo (Quinn *et al.*, 2004). Resulta también muy frecuente en ganado ovino (Bergonier *et al.*, 2003b; Goñi *et al.*, 2004), pudiendo ser subclínica, clínica o crónica, asociándose las formas sobreaguda y gangrenosa a formas sistémicas graves que pueden llegar a ser mortales (Rupp *et al.*, 2009, Vautor *et al.*, 2009b).

La penetración de la bacteria en el canal de la mama se facilita por la existencia de lesiones traumáticas o infecciones intercurrentes, como sucede en el caso del ectima contagioso. Una vez en el interior de la mama, los estafilococos se difunden con rapidez por toda la glándula, produciéndose un aumento de temperatura y tamaño e induración del cuarterón afectado. Se desarrolla un edema en la pared abdominal anterior a la glándula afectada y luego, en la forma gangrenosa, la mama se vuelve fría y azul negruzca, desprendiéndose al final. Todo el proceso se desarrolla sólo en unos pocos días y, sin tratamiento, suele ser mortal o provocar la pérdida de la mama afectada. Si la infección comienza en una fase tardía de la lactación, puede provocar la formación de reacciones crónicas que mantienen estafilococos (Winter y Colditz, 2002), que permanecen latentes durante el secado y resurgen de forma aguda en la siguiente lactación (Mavrogianni *et al.*, 2007).

Alrededor de un 15% de los ovinos son portadores, en piel o en fosas nasales (Bergonier *et al.*, 2003), de estafilococos responsables de mastitis ovina, aunque esta proporción varía en función de la tasa existente en el rebaño, aumentando el porcentaje de portadores en paralelo a la tasa de mastitis (Anderson, 1983). En ovino se ha demostrado que la flora presente en el canal de la mama puede no sólo ser el origen de mastitis, sino que también puede proporcionar una cierta protección frente a cepas patógenas invasivas (Fragkou *et al.*, 2007).

Aunque clásicamente se ha considerado a *S. aureus* como único agente causal de la patología mamaria por estafilococos en ovino, la importancia de los SCN ha ido

aumentando a la par que las exigencias productivas y de control de la leche ovina (Bergonier *et al.*, 2003; Vautor *et al.*, 2009). En un estudio llevado a cabo en Reino Unido (Jones, 1991) sobre 30.000 ovejas entre 1985 y 1987, se observó que la incidencia anual de mastitis clínica oscilaba entre un 0 y un 24%, con una media del 5%. En cuanto a la etiología, *S. aureus* y *M. haemolytica* solos, juntos o asociados con otros microorganismos, fueron los agentes patógenos principales aislados de la leche de casi el 90% de las 730 ovejas afectadas clínicamente; en el caso de las mastitis subclínicas, alrededor del 50% de los casos eran causados por SCN. Resulta llamativo que estos hallazgos, en cuanto a las mastitis clínicas, coinciden con los hallados 60 años antes por Leyshon también en Reino Unido, lo que indica que, pese a las mejoras introducidas en el control, terapéutica y manejo de los rebaños lecheros, no se ha conseguido reducir ni variar la aparición de las mastitis agudas en el ganado ovino. De hecho, se sigue considerando en ovino a *S. aureus* al principal agente de mastitis clínica mientras que en mastitis subclínicas se aíslan más frecuentemente SCN (Lafi *et al.*, 1998; Bergonier *et al.*, 2003). Estos datos coinciden con los obtenidos en nuestro país por diferentes investigadores, destacándose la creciente importancia de las mastitis subclínicas causadas por SCN en los rebaños ovinos lecheros españoles (García, 1990; Marco *et al.*, 1992a; González, 1995).

Entre los aspectos que precisan más estudio en las mastitis está el de su epidemiología, cuya determinación conlleva el tipado de los aislados. Mientras que los métodos convencionales clásicos para el tipado de *S. aureus* (fagotipado, serotipado, biotipado, antibiogramas) generalmente son de poca utilidad en cepas de *S. aureus* de origen bovino (Matthews *et al.*, 1994a) aunque siguen siendo de utilidad para el diagnóstico de mastitis subclínicas ovinas (Burriel, 1998; Clements *et al.*, 2003), los métodos epidemiológicos basados en ADN han resultado prometedores para estudiar las rutas de transmisión de cepas virulentas (Maslow *et al.*, 1993; Vautor *et al.*, 2009).

Dada la relevancia de estos procesos patológicos y de su naturaleza multifactorial (Marco *et al.*, 1992a), para su control se precisa del empleo de diversas estrategias y metodologías combinadas. Una de ellas es el minimizar el contacto de las ubres con cepas de *S. aureus* virulentas capaces de provocar enfermedad crónica y subclínica (Burriel, 1998; Bergonier *et al.*, 2003), para lo que sería de mucha utilidad el disponer de más información sobre la epidemiología de *S. aureus* y los SCN en ovino (Marco *et al.*, 1992b).

Por otro lado, la terapéutica antimicrobiana es a menudo ineficaz en las mastitis causadas por *S. aureus* : en una investigación realizada en 1994 en Finlandia (Pyörälä y

Pyörälä, 1994), sólo el 28% de los cuarterones tratados resultaron estar curados microbiológicamente 3 semanas después de la terapia. Como resultado del estudio, se observó que las cepas de *S. aureus* aisladas en la fase aguda de la infección persistían en la ubre, siendo la reinfección por otras cepas de *S. aureus* rara, aislándose de manera repetida el mismo genotipo en 7 de 10 granjas. Pese a estos avances desde el punto de vista molecular, dichos estudios son costosos y precisan instrumentación específica, por lo que el uso de metodología clásica sería interesante y, en ciertos casos podría llegar a otorgar resultados muy aplicativos. Tal es la conclusión del estudio de Myllis *et al.* en 1997 que, efectuando el biotipado por el método de Devriese, obtuvieron resultados idénticos a los obtenidos por métodos epidemiológicos moleculares, lo que demuestra que algunas características de los estafilococos de interés epidemiológico pueden ser demostradas también fenotípicamente (Clements *et al.*, 2003; Vautor *et al.*, 2009).

Por tanto, tras las primitivas consideraciones en cuanto a la virulencia de los miembros del género *Staphylococcus*, reflejadas de alguna manera en la clasificación como estafilococos patógenos de sólo aquellos miembros del género integrantes de la especie *aureus* y que además producían coagulasa libre (Baird-Parker, 1974), los estafilococos coagulasa negativos (SCN) han ido ganando significación patológica. A partir de ello, numerosos investigadores han centrado sus esfuerzos en el estudio de este tipo de microorganismos (Fthenakis y Jones, 1990; Rupp *et al.*, 2009), especialmente desde que se han visto claramente asociados a procesos morbosos, inicialmente en la especie humana y posteriormente en los animales (Davies y Stone, 1987; Jarp, 1991; Pengov, 2001; Bergonier *et al.*, 2003).

4.- Características de los estafilococos

4.1.- Estructura celular

La estructura celular de los estafilococos es la típica de las bacterias Gram positivas. El citoplasma está rodeado por la membrana citoplasmática y la pared celular, esta última reconocible en el exterior como una capa gruesa, bastante homogénea y menos electrodensa que la membrana citoplasmática. Químicamente, las paredes de todos los estafilococos están formadas por peptidoglicano y ácido teicoico. La proporción de peptidoglicano llega a ser de hasta un 50 a 60% del peso seco de las preparaciones de pared; en algunos casos, se ha encontrado proteínas, siendo la mejor conocida la denominada proteína A, que es un componente característico.

4.2.- Composición química de la pared celular

4.2.1.- Peptidoglicano.

El peptidoglicano, también denominado mureína o mucopéptido, es la estructura de mayor importancia de la pared bacteriana, siendo el principal polímero responsable del mantenimiento de la forma de la bacteria (Schleifer, 1983). Esta enorme molécula rodea completamente la célula como si se tratara de una bolsa. Es un heteropolímero formado por cadenas de glicano que se encuentran entrelazados mediante péptidos cortos (Schleifer y Kandler, 1972); la estructura es relativamente uniforme y está formada por *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, alternados y unidos mediante enlaces β -1,4.

Pese a esta uniformidad genérica, se han utilizado con propósitos quimicotaxonómicos las diferencias cualitativas en la composición aminoacídica de preparaciones purificadas de pared. Sin embargo, la determinación cualitativa e incluso cuantitativa de dicha composición no es suficiente para caracterizar el tipo de peptidoglicano. Incluso si la composición en aminoácidos del peptidoglicano de dos cepas es cuantitativamente idéntica, la secuencia según la que se encuentran ordenados puede ser muy diferente (Schleifer y Kandler, 1972).

4.2.2.- Ácidos teicoicos de la pared

Los ácidos teicoicos de la pared celular son polímeros hidrosolubles formados por alditol (glicerol, ribitol), fosfato, un azúcar o un *N*-acetilamino azúcar y a veces D-alanina. Los radicales de glicerol y ribitol están unidos entre sí mediante puentes fosfodiéster.

La posible unión entre el ácido teicoico y el peptidoglicano consiste en un triglicerolfosfato, que está fijado con un enlace fosfodiéster a la posición 4 de la *N*-acetilglucosamina. Por su parte, la *N*-acetilglucosamina conecta el ácido teicoico al peptidoglicano mediante una unión fosfodiéster entre su posición 1 y probablemente la posición 6 del ácido *N*-acetilmurámico.

4.2.3.- Membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática de las bacterias supone una barrera selectiva que realiza funciones variadas, como el transporte electrónico ligado a la membrana, el transporte activo, la formación del *septum* y la segregación del ADN. Está compuesta básicamente por proteínas y fosfolípidos, siendo la de *S. aureus* la mejor estudiada, aunque incluso en esta especie se desconoce aún la estructura y función de muchas de las proteínas

de membrana. Entre las proteínas de función conocida se encuentran la adenosin trifosfatasa, poliprenolfosfoquinasa, y la L-lactato, D,L-glicerol-3-fosfato, NADH, L-malato y succinato oxidasas y deshidrogenasas.

4.3.- Actividad biológica de los polímeros de la envoltura celular

Los polímeros de la pared celular no sólo tienen importantes funciones estructurales sino que participan en distintas actividades biológicas.

4.3.1.- La pared celular como receptor de bacteriófagos

Se puede demostrar que diversos fagos de tipo de *S. aureus* se unen a paredes celulares aisladas de varias cepas de esta especie, aunque sólo algunas pueden ser lisadas por ellos, lo que indica que algunos componentes comunes de las paredes de los estafilococos funcionan como receptores de fagos.

4.3.2.- Actividad biológica de los ácidos teicoicos

Ya que los ácidos teicoicos están, al menos, parcialmente expuestos en la superficie celular, se forman anticuerpos específicos contra ellos si se inoculan células intactas, por ejemplo, a conejos. De hecho, se pueden detectar anticuerpos precipitantes frente al ácido teicoico en individuos que han sufrido una infección estafilocócica, método empleado, por ejemplo, para distinguir a pacientes con endocarditis estafilocócica de los de otros tipos de endocarditis.

Teniendo en cuenta esta propiedad, se han desarrollado métodos serológicos de diferenciación entre cepas.

4.3.3.- Propiedades biológicas del peptidoglicano

a) Propiedades inmunológicas

Parece que el peptidoglicano es un pobre inmunógeno, ya que la inmunización con preparaciones de peptidoglicano purificado sólo producen una respuesta débil en conejos. Sin embargo, se han descrito al menos tres determinantes antigénicos que generan anticuerpos específicos contra el glicano, la subunidad peptídica y el puente interpeptídico, habiéndose demostrado que tanto el grupo carboxilo terminal como el amino pueden funcionar como determinantes antigénicos. En concreto, se ha descubierto que la glicina-NH₂ terminal se encuentra en el peptidoglicano de todos los estafilococos descritos hasta el

momento, de forma que puede emplearse para la detección y diferenciación específica de los estafilococos.

b) Actividad endotóxica

El peptidoglicano estafilocócico solubilizado por ultrasonidos es pirogénico, con una cierta reacción cruzada con los peptidoglicanos procedentes de estreptococos, de manera que se puede observar una cierta tolerancia cruzada entre ellos pero no con la endotoxina de *Escherichia coli*. Esta capacidad pirogénica, detectable mediante la prueba del LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) es al menos 1000 veces menor que la del lipopolisacárido (LPS). Según los estudios de varios autores, esta propiedad se podría explicar en parte por la capacidad que tiene el peptidoglicano de activar el complemento, tanto por la vía clásica como por la vía alternativa.

Varios autores (Lee *et al.*, 1987b; Guidry *et al.*, 1991; Guidry *et al.*, 1994) han señalado que el peptidoglicano es el componente clave de la pared celular que interviene en la opsonización de los estafilococos; además, la reacción del hospedador frente a este componente de la pared, puede jugar un importante papel en el desarrollo de la “inmunidad natural” a las bacterias Gram positivas.

c) Otras propiedades patogénicas o tóxicas

Existe una serie de propiedades diversas atribuibles al peptidoglicano, que incluyen, entre otras:

- producción de inflamación por inoculación intradérmica.
- activación de dosis subletales de estafilococos viables con producción de lesiones purulentas.
- inhibición de la migración de células peritoneales no sensibilizadas.

d) Propiedades no patógenicas

Se incluyen también, entre otras:

- capacidad como adyuvante debida al peptidoglicano (salvo *S. epidermidis*)
- actividad inmunosupresora, dependiendo del momento de administración del antígeno, que parece deberse a una actividad inductora directa sobre células inmunosupresoras.

4.4.- Factores de adherencia, su importancia taxonómica y relación con la virulencia

4.4.1.- Introducción a la adherencia

La mayoría de los microorganismos prefieren un modo de vida en el que la población se encuentre fijada sobre un soporte (estado sésil o bentónico), más que un modo de vida libre y aislado en el medio ambiente (estado planctónico). Mientras que los individuos en estado planctónico son importantes para la proliferación y difusión de su comunidad bacteriana, la población sésil es la que favorece la persistencia microbiana en un determinado ambiente (Clutterbuck *et al.*, 2007).

La adherencia a las superficies es una estrategia de supervivencia que permite a las bacterias instalarse y colonizar un ambiente particular, de modo que el estado planctónico podría reducirse al paso de una superficie a otra, esto es, a la difusión, dentro de un ambiente particular, vivo o inerte. Tras fijarse a un soporte, las bacterias generan una comunidad organizada, a la que William Costerton en 1999 denominó *biofilm* y que se define como “una población bacteriana adherida a una superficie e inmersa en una matriz de exopolisacárido”. Inicialmente, dichos biofilmes y la actividad bacteriana resultante se conocían únicamente por su capacidad de colonizar y corroer canalizaciones y los cascos de los buques, por ejemplo. Posteriormente se descubrió, sin embargo, que la importancia médico-sanitaria de formaciones similares es una cuestión capital en la patogenia de muchas enfermedades infecciosas, ya que el 65% de las infecciones bacterianas en el hombre implican la formación de biofilmes, pudiéndose formar en catéteres o implantes, o bien atacar órgano o tejidos como dientes, ojos, pulmones o el tracto urogenital, entre otros. La eliminación de un biofilm es difícil desde el punto de vista médico: por ejemplo, los tratamientos antibióticos que pueden ser eficaces para las bacterias planctónicas, son menos eficaces con las del biofilm (Filloux y Vallet, 2003).

En relación con ello, un factor importante de la interacción entre *S. aureus*, *S. epidermidis* y otros estafilococos y sus hospedadores respectivos está representado por la capacidad de las bacterias para adherirse a componentes de la matriz extracelular y a proteínas séricas. Para colonizar y diseminarse utilizan un amplio abanico de estrategias cuya base molecular y genética es multifactorial, con un solapamiento amplio entre la actuación de unas sustancias y otras, como sucede en el caso de las adhesinas y otros factores de adherencia.

Los factores de adherencia pueden ser proteínas (adhesinas), como las fimbrias y las adhesinas no fimbriales, y estructuras no proteicas, polisacáridos (**Tabla Rev02**):

Tabla Rev02. Tipos de factores de adherencia.

Naturaleza	Tipo	Ejemplos
Proteínas (adhesinas)	Fimbrias (pili)	Adhesinas filamentosas de <i>E. coli</i> (P,S, tipo 1, K-88, K-99, CFA-1) , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (tipo 4), <i>Salmonella sp.</i> (tipo 1) y <i>Vibrio cholerae</i> (Tep)
	Adhesinas no fimbriales	<i>Yersinia sp.</i> (proteínas Inv y Ail), <i>Bordetella pertussis</i> (pertactina), <i>Streptococcus pyogenes</i> (proteína fijadora a fibronectina), adhesinas de <i>Staphylococcus sp.</i>
Polisacáridos	Glicocálix	<i>Streptococcus mutans</i> (glucanos y fructanos), <i>S. epidermidis</i> (formación de biofilmes, <i>slime</i>)

4.4.2.- Principales factores de adherencia

La capacidad de adherencia de una cepa bacteriana depende de las características de la superficie de la misma, por lo que diversos factores, tales como la hidrofobicidad celular, o estructuras superficiales como adhesinas o polisacáridos de cubierta (cápsulas o *slime*) condicionan la mayor o menor adhesividad de un determinado aislado.

Es importante recordar, sin embargo, que factores externos a la bacteria influyen considerablemente en sus características de superficie, de manera que se ha observado que el cambio de condiciones de cultivo ocasiona la aparición de variantes coloniales con caracteres superficiales diferentes, no sólo en *S. aureus*, sino en otras especies de estafilococos. Por ejemplo, el subcultivo repetido a 42°C de *S. hyicus*, cepa ST67P, proporcionó a Yoshida *et al.* en 1991 diversos tipos coloniales con características superficiales diferentes de las poseídas por la cepa original. Aunque el perfil bioquímico era idéntico, otros resultados no fueron concordantes con los obtenidos en la cepa parental, que mostraba una gran cápsula observable por microscopía electrónica, lo que indicó claramente que las condiciones de cultivo influían en las propiedades de superficie de los estafilococos. También la composición del medio de cultivo influye: el uso de suero de leche bovina se ha aconsejado como promotor del restablecimiento de las características superficiales (Mamo *et al.*, 1991b). Otros factores, tales como los periodos de conservación

de las cepas en medios comunes, podrían afectar a la formación de *slime*, aunque Matthews *et al.*, también en 1991, trabajando con cepas de origen bovino de SCN, observaron que la conservación de las mismas a 4°C no afectaba a la capacidad de formación de *slime* ni de cápsula.

4.4.2.1.- Exopolisacáridos bacterianos

Los polisacáridos bacterianos extracelulares se presentan como dos formas básicas. Como cápsula (polisacárido capsular, CPS, antígeno K), el polisacárido está íntimamente asociado con la superficie celular y puede estar ligado de forma covalente a la pared bacteriana. En contraste, los polisacáridos del *slime* (mucus) sólo están asociados de forma débil (desprendible) a la superficie celular. La distinción entre el CPS y *slime* se determina frecuentemente según el grado de asociación a las células tras centrifugación. La diferenciación entre las dos formas puede ser difícil, ya que células productoras de gran cantidad de CPS pueden liberar algo de material periférico, aparentando una producción de *slime* (Whitfield, 1988).

Desde un punto de vista funcional, los exopolisacáridos bacterianos no son únicamente uno de los principales factores relacionados con las propiedades de adherencia, sino que tienen importantes propiedades antigénicas, taxonómicas y de virulencia.

a).- Historia

Algunos estudios científicos, ya a principios del siglo XX, informaban sobre la existencia de ciertas cepas de *Staphylococcus* con propiedades de virulencia, antigénicas e incluso coloniales, que las diferenciaban de las cepas comunes. El conocimiento de la importancia de las estructuras superficiales en relación con las características antigénicas o de virulencia se ha ido desarrollando a la par que la observación de dichas características diferenciales.

En 1931, Gilbert propuso que la formación de cápsula podía ser un determinante de virulencia en el caso de los estafilococos; posteriormente, Julianelle y Weighard, en 1934, dividieron los estafilococos en cepas patógenas (de tipo A), y saprofitas (de tipo B). La clasificación de una cepa en uno de los dos grupos se realizaba empleando una reacción de precipitación y, lo que resulta más relevante, consideraron que la virulencia o no de un aislado se debía a la presencia de un polisacárido específico, que podría tratarse de un polisacárido capsular.

Más adelante, en la discusión de su completo trabajo de 1952 sobre la clasificación antigénica de estafilocos humanos, Oeding postuló la existencia de cápsulas entre las cepas con las que trabajó. Posteriormente, en 1958, Hunt y Moses observaron que la cepa Smith de *S. aureus* presentaba dos variantes coloniales en el agar blando suero SSA (*Serum Soft Agar*), que diferían considerablemente en su virulencia para ratón. Comprobaron que la inyección intraperitoneal de 5×10^8 o más UFC de la cepa Smith “difusa” producía de forma casi segura la muerte de los animales entre 5 a 12 horas después, mientras que no ocurría lo mismo con la variante “compacta”. La mayoría de las propiedades bioquímicas de ambas variantes era casi idéntica, no siendo tampoco tipables por el *set* normal de fagos ni a la RTD (dilución rutinaria de prueba) ni a 1000 x RTD. Las diferencias entre ambas variantes eran que la difusa no producía coagulasa ligada (*clumping factor*), mostraba en pruebas de difusión en agar un antígeno no común a la compacta y poseía (observada por microscopía electrónica) una cápsula de la que carecía la variante compacta. En el estudio de las fases de fagocitosis intraperitoneal de esta variante difusa, se observó que la fagocitosis de la misma se producía de forma diferida con respecto a la variante compacta, en un momento en el que ya existían demasiados estafilococos como para que los polimorfonucleares neutrófilos fueran capaces de eliminarlos por completo. Por tanto, la resistencia relativa de la variante difusa a la fagocitosis en el peritoneo, durante la fase temprana de la infección, parecía ser determinante de su virulencia para los ratones.

A partir de 1961, se fue confirmando que la virulencia de algunas cepas de *Staphylococcus* era debida a la presencia de una cápsula que retrasaba o impedía la fagocitosis (Wiley, 1961). En 1963, Ekstedt describió la existencia, en la variante difusa de la cepa Smith, de dos antígenos, uno proteico y otro polisacárido, con potencial inmunógeno. Mientras que el antígeno polisacárido protege únicamente cuando la cepa de desafío se mezcla con mucina, el proteico lo hace tanto cuando se mezcla con mucina como cuando se administra sin mucina. A partir de estos resultados, el autor postula que los antígenos retardadores de la fagocitosis cubren a los responsables de la activación de la fijación del complemento o del crecimiento compacto en SSA. También coincide con otros autores en el hecho de que la mayoría de las cepas de desarrollo difuso no eran fagotipables.

Sin embargo, puesto que muchas de las cepas aisladas como difusas proceden de casos asintomáticos más que de casos clínicos de enfermedad declarada, daba la sensación de que estas cepas tenían poco que ver con las grandes problemáticas de las estafilococias.

En este momento también, comienza a surgir la hipótesis de que estas cepas aisladas en laboratorio muestran nuevas características cuando crecen *in vivo*, es decir, que posiblemente las propiedades de los estafilococos *in vivo* difieran de las que consiguen tras el crecimiento en laboratorio. Esta hipótesis se verificaría con observaciones a partir de animales infectados; los estafilococos *in vivo* poseen una tasa respiratoria aeróbica mucho mayor y la inmunización con cepas de este tipo promueve la fagocitosis peritoneal (Koenig y Melly, 1965), lo que indicaría de nuevo que el subcultivo en laboratorio supone la pérdida de ciertas propiedades de virulencia que se recuperan *in vivo*, observación que ya en 1894 hizo Van de Velde al comprobar que los estafilococos podían hacerse más virulentos por pases en tejidos animales.

b).- Importancia taxonómica de los exopolisacáridos

La estructura antigénica de los estafilococos es compleja y se han aplicado varios métodos para llevar a cabo su clasificación, desde este punto de vista. En lo referente a polisacáridos superficiales, los estudios taxonómicos se han centrado en la cápsula.

En 1952, Oeding se encontraba con ciertas dificultades en el serotipado de estafilococos mediante aglutinación debido a la compleja estructura antigénica de estas bacterias, presentándose considerables reacciones cruzadas. Aún así reconoce este investigador la valía del sistema frente al fagotipado, ya que numerosas cepas aparecían como no tipables por aquel sistema. El autor consiguió describir diversos tipos serológicos, indicando la existencia de antígenos muy frecuentes, otros más escasos y que algunos eran aparentemente específicos. Por otro lado, señaló el hecho de que las cepas podían presentar cierta variabilidad a lo largo del estudio, probablemente debida al subcultivo, aunque él la atribuía a fenómenos de mutación.

Más tarde, en un interesante estudio publicado en 1963, Oeding y Haukenes, describieron una serie de antígenos superficiales de *S. aureus*, incluyendo algunos carbohidratos diferentes del ácido teicoico, que presentan reactividad frente a sueros normales humanos y de conejo. Sin embargo, Barber y Taga, en 1965, reconocieron la dificultad del análisis de dichos antígenos, debido a la variabilidad entre cepas, las respuestas individuales de los animales de laboratorio y la aparente alteración por pases en animales o *in vitro* de las preparaciones obtenidas. En esta época, algunos autores eran capaces de localizar “material capsular” incluso intracelularmente.

Finalmente, tras estos estudios a partir de cepas humanas, Yoshida *et al.* determinaron la existencia de cápsulas bien definidas en 1970, aunque inicialmente se supuso que todas eran similares a la de la cepa tipo Smith. Poco después en ese mismo año, Yoshida describió la existencia de 3 serotipos capsulares denominados A (cepa Smith), B y C, mediante pruebas sobre SSA con sueros homólogos y heterólogos. Más adelante, en 1974, Wiley y Maverakis describieron en sus trabajos con cepas humanas la existencia de, al menos, 4 serotipos capsulares en *S. aureus*. Posteriormente, en 1977, Yokomizo *et al.* estudiaron cepas capsuladas de 5 serotipos en casos de mastitis bovina. Dado el creciente interés en la relación de la cápsula y la virulencia, se siguieron efectuando avances en cuanto a serogrupos capsulares y en 1982, Karakawa y Vann ya describían la existencia de 8 tipos capsulares diferenciables (del 1 al 8) en *S. aureus*, desarrollando en 1985 métodos rápidos para realizar el serotipado (Karakawa *et al.*, 1985), de manera que en ese mismo año se describieron 11 serotipos (Sompolinsky *et al.*, 1985). En los últimos años se ha descrito el serotipo 336, cuya importancia parece ser creciente (Guidri *et al.*, 1998), aunque se postula que no se trataría de un serotipo capsular sino de la existencia un polímero superficial que también se encuentra en cepas capsuladas pertenecientes a los serotipos 5 y 8 (Ma *et al.*, 2004).

En cuanto a los SCN, también se ha descrito en ellos la existencia de cápsulas (Matthews *et al.*, 1991a), lo que podría permitir la diferenciación de serogrupos capsulares.

c).-Virulencia e inmunidad

La mayoría de las investigaciones que comenzaron a publicarse a finales de las décadas de los 50 y 60 sobre el fenómeno de la encapsulación de los estafilococos partían del estudio de la cepa Smith de origen humano, planteando las opciones de inmunización existentes, incluyendo un debate entre la teoría humoral y celular de la inmunidad en el caso concreto de las estafilococias (Ekstedt, 1963a y b).

Fisher, en 1960, consiguió una preparación inmunógena a partir de una cepa propia, designada como 90B, débilmente hemolítica, coagulasa positiva, *clumping* negativa y no fagotipable, características éstas muy comunes entre este tipo de cepas. A partir de la misma desarrolló una serie de estudios de la influencia de la atmósfera de cultivo (normal, con un 20% de CO₂) hasta conseguir un antígeno termoestable y no dializable, que en concentraciones menores de 1 µg /ratón resultaba protector frente a 100 DL₅₀ de la cepa homóloga.

En el trabajo llevado a cabo por Fisher *et al.*, en 1963, con una cepa del tipo Smith, los autores llegaron a proponer que se trataba de una cepa única desde el punto de vista inmunológico, debido a sus características especiales. Posteriormente, observaron que otras cepas presentaban también, por ejemplo, una alta resistencia a la fagocitosis, aunque según los autores este fenómeno sólo se daba en cepas poco frecuentes. En estos primeros estudios se descubrió que mediante un adecuado tratamiento de los cultivos de este tipo de cepas se conseguía un polisacárido muy inmunógeno designado SPA (*Staphylococcal Polysaccharide Antigen*), cuyo principal constituyente era el ácido 2-amino-2-deoxi-D-glucurónico. Sus estudios de protección-desafío en ratones demostraron que la dosis protectora 50 (DP₅₀) se situaba entorno a 0,004 µg/ratón y se conseguía en un 50% de los animales la parálisis inmune con 30 veces esta cantidad, es decir 0,12 µg/ratón. Por otro lado, la susceptibilidad de los ratones inmunizados con SPA a otros agentes bacterianos, algunos de los cuales presentan polisacáridos de cubierta, como *Diplococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa* no se veía alterada, indicando la especificidad del preparado.

Pese a estos estudios sobre la importancia de las estructuras extracelulares de los estafilococos en relación con su poder patógeno, Anderson, en 1976, en una amplia revisión relativa a los mecanismos de virulencia de estas bacterias en las mastitis bovinas, señaló que la existencia de cepas “realmente” capsuladas según la definición clásica de Mudd era esporádica y que, según su experiencia, no existía hasta aquella fecha un solo caso de mastitis bovina registrado que estuviera causado por este tipo de cepas.

Sin embargo, Lee *et al.* en 1993 indicaron que los polisacáridos capsulares son producidos por aproximadamente el 90% de los aislamientos de *S. aureus*. Los mismos autores señalaron también que, aunque se habían descrito 11 serotipos capsulares, la mayoría de los aislamientos de *S. aureus* pertenecen a los serotipos 5 u 8. Las cepas de estos serotipos más prevalentes son microencapsuladas, porque sus cápsulas son menores que las producidas por los serotipos 1 ó 2; dichas microcápsulas son polisacáridos extracelulares que contienen ácido urónico, que no se observan en las tinciones negativas como las de tinta china, por lo que no cumplirían la definición clásica. Los aislados de los serotipos 1 y 2 son muy capsulados y virulentos en los modelos animales, mientras que existe cierta controversia en cuanto a que las cepas de los serotipos 5 u 8 sean realmente más virulentas que los mutantes no capsulados (Albus *et al.*, 1991).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar qué tipo de factores defensivos celulares o solubles se encuentran relacionados con la inmunidad frente a las infecciones por estafilococos. Para ello se han desarrollado y empleado diversos modelos animales o *in vitro* para intentar reflejar condiciones concretas o bien procesos determinados, aunque a veces dichos modelos pueden sesgar la interpretación de la importancia de un determinado factor de virulencia (Perdreau-Remington, 1998).

En cuanto a los SCN existe una considerable controversia en lo que respecta a su virulencia en casos de mastitis en rumiantes. En su tesis doctoral, Jarp realiza una serie de comparaciones entre cepas de SCN en función de las lesiones que aparecen en las mamas bovinas y caprinas, y concluye que dichas cepas no presentan excesiva capacidad patogénica (Jarp, 1990), mientras que Bergonier *et al.*, en 2003, los relacionan directamente con las mastitis subclínicas. En ovino, en algunos casos se ha postulado que estos microorganismos podrían proteger a la mama frente al establecimiento de cepas más virulentas aunque en condiciones de bajada de defensas, pueden ser origen de mastitis (Fragkou *et al.*, 2007).

En investigaciones desarrolladas en los últimos años se está demostrando que la encapsulación de los estafilococos coagulasa negativos es un fenómeno relativamente frecuente y que no está relacionada con la producción de *slime* de los mismos. Las cápsulas ofrecerían las mismas ventajas a los SCN que en el caso de especies coagulasa positivas, confiriendo mayor resistencia a la fagocitosis y representando por ello importantes factores de virulencia (Hancock, 1989). Sin embargo, es importante reseñar que aún falta mucha información sobre la estructura y composición concreta de la cápsula de los SCN, así como del estudio de los efectos de dichas sustancias sobre el hombre y los animales; esta estructura puede suponer, por otra parte, una nueva herramienta útil en el biotipado y en los estudios epidemiológicos.

d).- Cápsula

Mudd, en su enunciado clásico de 1965, define la cápsula como “una estructura recubridora por el exterior de la pared bacteriana, que aparece de forma habitual bajo condiciones de cultivo normales y que se puede demostrar por tinción negativa”. La cápsula de los estafilococos es una capa de polisacáridos fijada firmemente a la superficie bacteriana y que debe ser visible por microscopía óptica, por lo que su grosor debería ser mayor de 200 nm, aunque las capas subvisibles externas a la pared celular e

inmunoquímicamente diferentes de la misma se deberían considerar como microcápsulas (Wilkinson, 1983).

La producción de cápsula por *S. aureus* fue descrita por primera vez en 1931 por Gilbert, pero debido a que las técnicas empleadas para su detección eran poco sensibles (tinción negativa, morfología colonial), se detectaban pocas cepas con esta estructura (O’Riordan y Lee, 2004). Entre las cepas capsuladas identificadas inicialmente, actualmente consideradas como “altamente encapsuladas”, destacan las cepas M y Smith difusa, que producen colonias mucoides, resisten la fagocitosis y son virulentas para el ratón (Koenig *et al.*, 1962; Lee *et al.*, 1987a). Posteriormente, los estudios con sueros normales e inmunes frente a *S. aureus* capsulados y no capsulados indicaron que las opsoninas presentes en los sueros normales estaban dirigidas contra los mucopéptidos expuestos de las cepas no capsuladas y que los sueros procedentes de animales inmunizados con microorganismos heterólogos, tales como *E. coli* o *Streptococcus* grupo A, eran eficaces en la opsonización de cepas acapsuladas, mientras que las cepas capsuladas precisaban sueros homólogos para ser opsonizadas (Karakawa y Young, 1979).

Teniendo en cuenta estos hechos, parece claro que uno de los factores de virulencia de *S. aureus* es la formación de cápsula (Nilsson *et al.*, 1997). En la especie humana se ha afirmado que hasta el 67% de los hemocultivos positivos a estafilococos corresponden a los serotipos capsulares 5 u 8 (Arbeit *et al.*, 1984). En un modelo de artritis séptica en ratones, empleando cepas mutantes formadoras o no de cápsula del serotipo 5, se demuestra que la mortalidad es mayor en caso de que la cepa sea productora de cápsula, ya que estas cepas son difícilmente fagocitadas por los macrófagos y, en el caso de que lo sean, sobreviven mejor.

En Medicina Veterinaria, el interés en la capsulación de los estafilococos surge a propósito de la presencia o no de cepas capsuladas entre las bacterias causantes de mastitis en el ganado bovino. En 1983, Norcross y Opdebeeck indicaron que en aislados procedentes mastitis estafilocócicas puras por *S. aureus* del ganado bovino, hasta un 94% de los aislados estudiados por el método del *Serum Soft Agar* aparecían con morfología difusa, es decir, que eran capsulados, siempre que se tratase de cepas no subcultivadas o con pocos pases, lo que se contradecía con la conclusión de otros autores (Yokomizo *et al.*, 1977), que señalaban un porcentaje muy inferior de cepas capsuladas entre aislados de orígenes similares. Estudios posteriores han confirmado la importancia de evitar los subcultivos para mantener las propiedades de capsulación de las cepas (Odierno *et al.*,

1992). En la **Tabla Rev03** figuran detallados algunos de los resultados obtenidos por diversos autores y grupos de investigación.

Tabla Rev03. Presencia de cepas de *S. aureus* capsuladas, datos de distintas procedencias.

Presencia de cápsula				
Cepas estudiadas	Origen	Cepas positivas (%) (método)	Observaciones	Referencia
875 <i>S. aureus</i> Frescas	Infecciones humanas	37/875 (4,2%) (SSA)	-	Yoshida et al., 1970
<i>S. aureus</i> 1519 colección 79 frescas	Mastitis bovina	14/1519 (0,92%) 5/79 (6,32%) (SSA)	Tipos Yoshida	Yokomizo et al., 1977
<i>S. aureus</i> Frescas	Mastitis bovina	94% (SSA)	Pierden cápsula por subcultivo	Norcross y Opdebeeck, 1983
104 <i>S. aureus</i> Colección	Mastitis bovina	0% (tinc.neg) 30/104 (28,84%) (SSA)	Pese a SSA, al ser tinción negativas, las considera no capsuladas.	Anderson, 1984
477 <i>S. aureus</i> Colección	Infecciones humanas, bovino(17), alimentos (21) y manipuladores (23)	93,29% (inmunodifusión)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NC: 8,4% (32/477) ▪ 5: 15,5% (59/477) ▪ 7: 2,3% (9/477) ▪ 8: 62,9% (239/477) ▪ 10: 1,6% (6/477) ▪ NE: 8,9% (34/477) 	Sompolinsky et al., 1985
200 <i>S. aureus</i> Colección	Mastitis bovina	4% / 75% (SSA)	4% tras estar en lab 75% tras pase en medios adecuados	Opdebeeck et al., 1987

Legenda: NC; no capsuladas // NE; no estudiadas// frescas; sin pases en laboratorio.

Aunque desde 1937 existen referencias de la cápsula de *S. aureus* (Lyons, citado por Wiley en 1961), no fue hasta los primeros estudios sobre encapsulación de *S. aureus* realizados por Yoshida y Ektedt en 1968 cuando se han ido describiendo una cantidad creciente de serotipos capsulares en esta especie bacteriana. En la serotipificación se comenzó utilizando anticuerpos policlonales (Yoshida, 1971; Karakawa y Vann, 1982), siendo reemplazados en los últimos años por anticuerpos monoclonales (Nelles *et al.*, en 1985). El trabajo de estos autores permitió conocer que los anticuerpos monoclonales frente a los serotipos 5 y 8, aparentemente los más frecuentes entre los aislamientos clínicos humanos (Arbeit *et al.*, 1984, **Tabla Rev04**), no presentaban reacciones cruzadas entre sí, resultando ser una herramienta sumamente útil en la clasificación de los aislados de origen clínico.

Tabla Rev04. Serotipos capsulares más frecuentes, datos de distintas procedencias.

Serotipos capsulares más frecuentes				
Especie	Esp. Origen (n)	Método	Tipos	Referencia
<i>S. aureus</i>	Humano	Inmunoelectroforesis o inmunodifusión (8 tipos)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1: 0,39% (1/256) ▪ 3: 0,39% (1/256) ▪ 4: 5,85% (15/256) ▪ 5: 25,39% (65/256) ▪ 6: 0,39% (1/256) ▪ 7: 1,56% (4/256) ▪ 8: 39,06% (100/256) ▪ NT: 23,04% (59/256) 	Arbeit <i>et al.</i> , 1984
<i>S. aureus</i>	Humano	monoclonales	5, 8	Nelles <i>et al.</i> , 1985
<i>S. aureus</i>	Humano	inmunodifusión	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NC: 8,4% (32/477) ▪ 5: 15,5% (59/477) ▪ 7: 2,3% (9/477) ▪ 8: 62,9% (239/477) ▪ 10: 1,6% (6/477) ▪ NT: 8,9% (34/477) 	Sompolinsky <i>et al.</i> , 1985
<i>S. aureus</i>	Bovino, Ovino, Caprino	Monoclonales	+ 5 en vacas +8 en ovejas/cabras	Poutrel <i>et al.</i> , 1988
<i>S. aureus</i>	Bovino, Ovino	ELISA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5: 26,6% (25/94) ▪ 5: 7,5% (4/52) 	Baselga <i>et al.</i> , 1991
<i>S. aureus</i> (103 cepas)	Conejos (37)	ELISA de competición con anticuerpos policlonales	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5: 29,7 % ▪ 8: 59,5 % ▪ 5+8: 5,4% ▪ NT: 5,4% 	Poutrel <i>et al.</i> , 1993
	Aves (33)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5: 75,8 % ▪ 8: 15,1 % ▪ 5+8: 9,1% 	
	Porcino (27)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5: 66,7 % ▪ 8: 29,6 % ▪ 5+8: 1,0% 	
	Equino (6)		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5: 16,1 % ▪ 8: 83,3 % 	
<i>coagulasa positivos</i>	Pollos	ac policlona	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5: 91% (51/56) ▪ 8: 9% (5/56) 	Daum <i>et al.</i> , 1994
	Pavos	ac policlona	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5: 33% (13/40) ▪ 8: 38% (15/40) ▪ NT: 29% (12/40) 	

Leyenda: NC: no capsuladas ; NT: no tipables; ac: anticuerpo

Estudios posteriores de serotipado con anticuerpos monoclonales fueron realizados por Hochkeppel *et al.* en 1987 y especialmente los de Poutrel *et al.* en 1988, poniendo de manifiesto que dichos serotipos (5 y 8) son prevalentes también entre los aislados de leche de cabra, vaca y oveja.

Aunque inicialmente se investigó la presencia de cápsula únicamente en *S. aureus*, numerosos autores se han planteado la presencia de cepas capsuladas en otras especies del

género. Debido fundamentalmente a su implicación en procesos de tipo séptico, *S. epidermidis* ha sido una de las primeras especies de SCN a las que se les ha atribuido la existencia de dicha estructura. Teniendo en cuenta que la mayoría de los métodos no ópticos ni moleculares de detección de la cápsula en *S. aureus* se han basado en la reactividad de la proteína A de la pared con diversos tipos de anticuerpos, como es el caso de la prueba de crecimiento difuso en *Serum Soft Agar* (Forsum *et al.*, 1972), y que dicho componente de la pared no suele estar presente más que en dicha especie (Forsgren *et al.*, 1983), en los SCN se debería utilizar otra aproximación diferente, como el método de Ichiman (1984), por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos fluorescentes.

La aplicación de la metodología de anticuerpos fluorescentes ha supuesto la descripción de diversos tipos capsulares en *S. epidermidis*, igual que antes había sucedido con *S. aureus* (Hancock, 1989). El estudio seriado de cepas capsuladas de *S. epidermidis* ha permitido confirmar que en esta especie, la asociación de virulencia y presencia de cápsula es directa (Yamada *et al.*, 1988), lo mismo que ocurre en *S. aureus* (Dall *et al.*, 1994). Las cepas que presentan cápsula, así como mayor volumen celular asociado, son significativamente más virulentas para ratones y son capaces de adsorber mayor cantidad de antisuero específico, en comparación con las cepas avirulentas; por otro lado, al microscopio electrónico las cepas virulentas presentan una cápsula bien definida rodeando la célula, lo que no ocurría con las cepas avirulentas (Yamada *et al.*, 1988; Makizumi, 1993).

Además de ello, teniendo en cuenta las reacciones superficiales frente a antisueros específicos, Yoshida *et al.*, en 1990, observaron protección cruzada entre cepas de *S. hyicus* y *S. epidermidis* mediante pruebas de protección en ratones, lo que podría suponer en el caso de estas dos especies que una adecuada producción de anticuerpos anticapsulares frente a una de las especies pueda llegar a proteger frente a la infección por cepas capsuladas de ambas especies.

Finalmente, diversas investigaciones han demostrado que la encapsulación de los SCN es un fenómeno relativamente frecuente y que no se relaciona con la producción de *slime* de los mismos (Fattom *et al.*, 1992).

e).- *Slime*

Se denomina *slime* a una capa de exopolisacáridos que se sitúa alrededor de la célula bacteriana y que no se encuentra fijada firmemente a la pared del estafilococo, por lo

que puede desprenderse del cuerpo bacteriano (Wilkinson, 1983). Además, esta capa carece de estructura regular y puede no rodear completamente a la bacteria.

Podría esperarse que una capa de las características descritas alterara las propiedades superficiales de las bacterias productoras. Se explicaría así las variaciones de carga eléctrica superficial de las cepas de estafilococos, en función de la presencia o no de tal estructura (Beck *et al.*, 1988a,b). Igual sucedería con otras características, como la exposición o no de ciertos receptores (Whitfield, 1988), lo que justificaría el hecho aparentemente demostrado de que las cepas que presentan tales estructuras no son fagotipables o lo son con grandes dificultades (Koenig y Melly, 1965; Ohshima *et al.*, 1988). Otros autores han propuesto que la ocultación de ciertos receptores de superficie podría hacer que las cepas productoras de *slime* fueran menos adherentes a sustratos inanimados que las que no lo producen. En este sentido, Baldassarri *et al.* (1997), en un estudio llevado a cabo sobre 53 aislados de origen clínico, que las cepas de *S. epidermidis* no productoras de *slime* se adherían significativamente mejor a fibronectina o fibrinógeno que las cepas productoras y poseyeron consistentemente mayor hidrofobicidad superficial; por otro lado, los mutantes no productores también mostraron dichas cualidades comparados con las respectivas cepas parentales.

Entre otras propiedades atribuidas al *slime* producido por ciertas especies de *Staphylococcus*, aparte de las relativas a la adherencia y virulencia, en especial a lo referido a *S. epidermidis*, cabe citar la indicada por Bykowska *et al.* en 1985, como capacidad anticoagulante. El efecto anticoagulante no era sensible al calentamiento (a 100°C, durante 30 minutos), siendo posiblemente debido a componentes del *slime* similares a otros glucosaminoglicanos.

Se han utilizado muchos métodos para la detección de la producción de *slime* por cepas de SCN. Entre los más frecuentemente empleados se encuentran los de Christensen y el del agar Rojo Congo (Hébert *et al.*, 1988; Woznicova *et al.*, 1993; Arciola *et al.*, 2001); ambos poseen la ventaja de sencillez de realización, aunque la interpretación sea subjetiva. Numerosos estudios han comparado ambos métodos siendo, al menos con cepas de origen humano, aparentemente repetitivos. En el trabajo desarrollado por Woznicova *et al.* en 1993 sobre 212 SCN aislados de hemocultivos humanos, se detectó la formación de *slime* en 28 cepas (13%) pertenecientes a cuatro especies, siendo más frecuente en *S. epidermidis* (17%). Comparando el método del agar Rojo Congo con el método de Christensen, la sensibilidad y especificidad del primero fueron del 85% y 99%,

respectivamente, pareciendo que dicho método es un herramienta adecuada para la detección de *slime* en estafilococos.

El porcentaje de cepas capaces de producir *slime* es variable según los autores consultados, las especies de estafilococos implicadas y el proceso clínico y especie. En la **Tabla Rev05** se detallan algunos resultados reseñados en la bibliografía:

Tabla Rev05. Producción de *slime* en cepas de *Staphylococcus* de varios orígenes. Datos de varios autores.

Producción de <i>slime</i>				
Cepas estudiadas	Origen	Cepas positivas (%)	Observaciones	Referencia
84	Bovino	100% (SSA)	De 23 <i>S. aureus</i>	Rather et al., 1986
144	Bovino y ovino	21	<i>S. aureus</i>	Baselga et al., 1991
206	Bovino	52 (25,24%)	Más abundante en <i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. chromogenes</i> y <i>S. warneri</i> que en otros SCN	Matthews et al., 1991b
212	Humano	28 (13)	Más frecuente en <i>S. epidermidis</i> (17%) SCN	Woznicova et al., 1993
393	Humano (203) y bovino (190)	Humanas (0,9%) Bovinas (10,5%)	SCN	Saa y Kruze, 1995

El interés de los investigadores sobre los estafilococos productores de *slime* se debe a la indudable asociación de su presencia con problemas como la contaminación y persistencia de SCN sobre dispositivos ortopédicos (prótesis, etc), así como a diversas infecciones de carácter nosocomial (Christensen *et al.*, 1983); sin embargo, el problema de distinción entre aislados de importancia clínica y los que representan microorganismos saprofitos, ha impulsado el desarrollo de diversos estudios en los que se intentaba descubrir la asociación entre factores como la especie de estafilococo, su hidrofobicidad y la producción de *slime*, con la importancia de las cepas aisladas desde el punto de vista clínico (Martin *et al.*, 1989).

Los primeros estudios sobre el papel del *slime* como factor de virulencia (Bayston y Penny, 1972; Younger *et al.*, 1987) le otorgaban gran interés al favorecer, entre otros aspectos, la adherencia. Ello proporcionaría ventajas a las cepas con capacidad de formar

frente a aquéllas que no la poseían, aunque parece ser según los estudios realizados por Perdreau-Remington *et al.* en 1998, que en ciertos modelos experimentales dicha ventaja no se observa. Sin embargo, los mismos autores reconocen que quizás el modelo elegido influya en los resultados y en las conclusiones que puedan derivarse de ellos.

Pese a la controversia existente (Shiro *et al.*, 1994), algunos autores plantean directamente la asociación entre la formación de *slime* y la patogenicidad de aislados clínicos de SCN. En el estudio efectuado por Ishak *et al.*, en 1985, resulta llamativo que, utilizando 27 SCN aislados de hemocultivos humanos sucesivos, inicialmente parece que las cepas *slime* positivas eran más patógenas al ser más abundantes entre las cepas sépticas (siendo *S. epidermidis* el más frecuente y clínicamente significativo entre los *slime* positivos). Sin embargo, en cuanto a la fagocitosis, no se encontraban diferencias entre los aislados *slime* positivos y los negativos, por lo que el argumento de la alta frecuencia de aislados *slime* positivos entre cepas sépticas en apoyo de la asociación *slime* y patogenicidad quizá no sea tan sólido como se pensaba. Los autores explican esta contradicción basándose en la posibilidad de que el *slime* hubiera sido eliminado durante el pretratamiento.

Otros autores han realizado pruebas de virulencia y adherencia de cepas de SCN capsulados, productores de *slime* y negativos a dichas estructuras, habiéndose observado que pese a que las cepas *slime* positivas eran las más adherentes a superficies plásticas, las capsuladas lo eran más que las anteriores a células vesicales aunque sobre otros sustratos dicha diferencia no se producía. Por otro lado, algunas cepas *slime* positivas resultaban avirulentas para el ratón (Makizumi , 1993).

Muchos han sido los factores implicados o relacionados en la producción de *slime* por parte de los estafilococos, aunque en general los más estudiados han sido aquellos de carácter nutricional, entre los que destacan (**Tabla Rev06**):

Tabla Rev06. Factores nutricionales y producción de *slime*. Datos de varios autores.

Influencias nutricionales en la formación de <i>slime</i>		
Factor	Efecto	Referencia
Fosfato	Ninguno	Fox <i>et al.</i> , 1998
NaCl	Inductor	Baselga <i>et al.</i> , 1992; Sompolinsky <i>et al.</i> , 1985
Medio 110	Inductor	Baselga <i>et al.</i> , 1992
Suero de leche	Inductor	Watson, 1988; Baselga <i>et al.</i> , 1992
Agar nutritivo, 3% casaminoácidos + 1% dextrosa	Inductor	Johnson <i>et al.</i> , 1986
Glucosa	Inductor	Christensen <i>et al.</i> , 1982 ; Baselga <i>et al.</i> , 1991 ; Mack <i>et al.</i> , 1992
Suero de leche	Inductor	Mattila-Sandholm <i>et al.</i> , 1990; Mamo <i>et al.</i> , 1991a
Sacarosa al 3,6%	Inductor	Ziebuhr <i>et al.</i> , 1997
Fructosa, lactosa, maltosa, sacarosa, manosa, ribosa, celobiosa, xilosa , galactosa, ramnosa	Inductores débiles	Christensen <i>et al.</i> , 1982
Arabinosa, manitol, dextrano, α -metil manósido	Ninguno	Christensen <i>et al.</i> , 1982
Urea	Esencial	En <i>S. saprophyticus</i> , Hjelm <i>et al.</i> , 1991.
Carencia de oxígeno	Inhibidor	Barker <i>et al.</i> , 1990

En cuanto a la influencia de la atmósfera sobre la producción de *slime*, parece que se inhibe la formación de dichos exopolisacáridos en condiciones de anaerobiosis o microaerofilia, al menos parcialmente, pese a obtenerse a veces mejores crecimientos (Pérez Giraldo *et al.*, 1995) que en aerobiosis.

4.4.2.2.- Adhesinas de los estafilococos

La adherencia bacteriana es un paso inicial en la colonización y está mediada, en parte, por estructuras y moléculas de la superficie bacteriana denominadas adhesinas, conocidas globalmente como *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* o MSCRAMMs (Hartford *et al.*, 1999; Cucarella *et al.*, 2002). Algunas de estas

moléculas no sólo facilitan la adherencia sino que interfieren en la respuesta inmune del hospedador o son esenciales en el proceso que provoca la internalización de la bacteria; de hecho, recientemente se ha descubierto que la capacidad de sobrevivir intracelularmente puede ser importante en la patogénesis de *S. aureus* y que la supresión por mutagénesis dirigida de la expresión de alguna adhesina puede influir en el curso de la infección retrasándola, aunque en muchos casos no la evite (Brouillette *et al.*, 2003).

Existen multitud de sustratos y los consiguientes receptores para las adhesinas de *S. aureus* y algunas de éstas utilizan varios. Por otra parte, se ha descrito un cierto solapamiento funcional entre las adhesinas, de manera que varias MSCRAMMs se pueden fijar al mismo sustrato, por lo que la adherencia se puede deber a la acción individual o combinada de varias adhesinas, dificultando su estudio independiente (Harraghy *et al.*, 2003). Esta flexibilidad y plasticidad en la respuesta parece que facilita la interacción de la bacteria con el hospedador, más adaptable al nicho de que se trate, de manera que el microorganismo pueda modificar su respuesta según las circunstancias, lo que explicaría la capacidad de *S. aureus* para infectar tejidos muy variados, dando lugar a patologías diversas (Clarke y Foster, 2006).

La mayoría de las MSCRAMMs están ligadas covalentemente al peptidoglicano de la superficie bacteriana (**Tabla Rev07**), aunque no es el caso de todas. También existen algunas proteínas fijadoras de ligandos que se secretan al medio extracelular y que pueden afectar a la adherencia de la bacteria; en este sentido, la proteína asociada al biofilm *bap* puede enmascarar las adhesinas y alterar así el proceso de adhesión (Cucarella *et al.*, 2002).

Tabla Rev07. Adhesinas conocidas y proteínas (ligandos) que pueden unirse covalentemente a la superficie de *S. aureus* (modificado de Peacock *et al.*, 2002 y Clarke y Foster, 2006).

Adhesina	Modo de unión al peptidoglicano	Ligando de la matriz extracelular
Spa (Proteína A)	Covalente	IgG, IgM, factor de Von Willebrand, TNFR1
FnBPA	Covalente	Fibronectina, Fibrinógeno, Elastina, interviene en la internalización y en la agregación plaquetaria
FnBPB	Covalente	Fibronectina, Elastina e interviene en la internalización
CifA	Covalente	Fibrinógeno
CifB	Covalente	Fibrinógeno, Citoqueratina 10
SdrC	Covalente	Desconocido
SdrD	Covalente	Desconocido
SdrE	Covalente	Desconocido
Pls	Covalente	Lípidos celulares, incluyendo el gangliósido M3. Promueve la adherencia acélulas epiteliales nasales
Cna	Covalente	Colágeno
IsdA	Covalente	Fibrinógeno, Fibronectina, Fetuina, Hemoglobina, Transferrina y hemina.
IsdB	Covalente	Hemoglobina y hemina
IsdC	Covalente	Hemina
IsdH	Covalente	Haptoglobina, complejo haptoglobina-hemoglobina
SraP	Covalente	Desconocido, se fija a las plaquetas.
SasG	Covalente	Desconocido, se liga a las células epiteliales nasales.
SasB, SasD, SasF, SasF, SasK y SasH	Covalente	Desconocido
Ebh	Iónica	Fibronectina
Emp	Iónica	Fibrinógeno, Fibronectina, Vitronectina
EbpS	-	Elastina
Bbp	-	Sialoproteína ósea
Efb	-	Fibrinógeno
Atl (amidasa)	Iónica	Desconocido
Atl (glucosaminidasa)	Iónica	Fibronectina
Aaa	Iónica	Fibrinógeno, Fibronectina, Vitronectina
Enolasa	Iónica	Laminina
EbpS	Transmembrana	Elastina
Ácido teicoico de la pared	Covalente (al peptidoglicano)	Desconocido, se une a células epiteliales y endoteliales.

Como se ha indicado antes, también existe otro tipo de proteínas, que aunque no se ligan de forma covalente a la pared bacteriana (**Tabla Rev08**) que intervienen de forma muy importante en la adherencia de *S. aureus*.

Tabla Rev08. Otras proteínas relacionadas con la adherencia de *S. aureus* y *S. epidermidis*, datos de varios orígenes.

Especie	Proteína	Situación	Actividad	Referencia
A	<i>eap (map)</i>	S, P	Adherencia a fibronectina y fibrinógeno, sialoproteína ósea y vitronectina; facilita internalización; adherencia a varias células eucariotas; apoptosis de células T; adherencia interbacteriana; estimula síntesis de IL-4, inmunomodulación. Análogo del MHC clase II	Peacock <i>et al.</i> , 2002 Harraghy <i>et al.</i> , 2003
A	<i>bap</i>	M	Adhesión inicial, adherencia intercelular, enmascaramiento de adhesinas.	Cucarella <i>et al.</i> , 2002
E	<i>atlE?</i>	¿?	Unión a la vitronectina	Barbier <i>et al.</i> , 2000 Klug <i>et al.</i> , 2003
E	<i>fbe</i>	¿?	Unión al fibrinógeno	Klug <i>et al.</i> , 2003

Legenda: Especie: A: *S. aureus*, E: *S. epidermidis*; Situación: en el Medio, fijada a Pared, Superficial

Entre ellas cabe destacar la proteína denominada *eap* (o *map*), proteína que se detecta mayoritariamente en el medio de cultivo aunque es capaz de fijarse a la superficie de los estafilococos, favoreciendo su agregación, incluso “preparando” la superficie de las células eucarióticas o superficies inertes para la adherencia bacteriana. Se ha descrito que esta proteína favorece la adherencia con hasta a siete tipos diferentes de proteínas séricas o de la matriz intercelular, facilita la internalización de *S. aureus* en fagocitos y además posee actividad inmunomoduladora (Harraghy *et al.*, 2003), de manera que favorece la producción de IL-4 y altera la respuesta inmune desviándola desde una respuesta Th1 (celular) hacia otra Th2 (humoral).

4.4.2.3.- Hidrofobicidad

La adherencia de los microorganismos patógenos a las células hospedadoras se consigue tanto por mecanismos específicos como inespecíficos. Los primeros atañen a las adhesinas o a los exopolisacáridos bacterianos junto con los correspondientes receptores celulares, mientras que los segundos incluyen cargas eléctricas e hidrofobicidad de las paredes bacterianas (Beck *et al.*, 1988b). Las estructuras bacterianas de superficie, tales como cápsulas, *slime*, fimbrias o *pili* y las propiedades de superficie como carga eléctrica e hidrofobicidad se relacionan entre sí y están implicadas en la adhesión bacteriana a tejidos

y superficies sólidas. Sin embargo, no está totalmente establecida la relación entre carga superficial, hidrofobicidad y adhesión, teniendo en cuenta también que las propiedades de superficie varían según la composición del medio de cultivo y la edad del cultivo (Beck *et al.*, 1988a).

Se ha propuesto la baja hidrofobicidad superficial (*Hty*) como uno de los factores de virulencia de los estafilococos, asociada obviamente a la estructura externa de la bacteria (Jonsson y Wadström, 1984) y en especial a la formación o no de *slime*. En la mastitis bovina, las bacterias aptas deben ser capaces de sobrevivir a las fuerzas de arrastre del ordeño o amamantamiento, por lo que la adherencia bacteriana a las superficies epiteliales y probablemente la baja hidrofobicidad (como se ha propuesto en infecciones humanas) pueden jugar un papel importante en la capacidad invasiva de una determinada cepa (Baselga *et al.* 1992).

Se ha medido la *Hty* con métodos como el SAT (*Salt Aggregation Test*) y cromatografía de interacción hidrofóbica, mostrando ambos una buena correlación. Beck *et al.*, en 1988(a), observaron que la *Hty* aumentaba durante el crecimiento e incluso podía cambiar si el medio era líquido o sólido. Emplearon 125 cepas de *S. aureus* (72 bovinas y 53 ovinas) consideradas "viejas" al haber sido conservadas a -20°C y descongeladas hasta 6 veces. Por otra parte, mantenían 58 cepas "frescas", no subcultivadas más de dos veces en agar sangre antes de ser congeladas. Emplearon la cepa capsulada Yoshida A de *S. aureus* como control y varios medios de cultivo diferentes. A partir de sus estudios observaron que la *Hty* aumentaba en la fase de crecimiento logarítmico y se estabilizaba en la estacionaria. Diversos autores han descrito que la mayoría de las cepas de origen bovino de *S. aureus* son muy *Ho* (autoagregantes, hidrofóbicas), después del crecimiento durante 18 h en agar sangre a 37°C.

Baselga *et al.*, en 1992, estudiaron 72 cepas de origen bovino y 53 ovinas (todas procedentes de casos de mastitis) y observaron que la hidrofobicidad aumentaba durante la fase logarítmica del crecimiento, hecho éste ya detectado en otras bacterias como *M. haemolytica* (Corstvet *et al.*, 1982). Además, coincidían en que los aislados "frescos", no sembrados en laboratorio, eran más hidrofóbicos y que las cepas "refrescadas" por pase en mama de ratón recuperaban sus propiedades hidrofóbicas, mientras que por el contrario se volvían más hidrofílicas tras cultivarse en medios inductores de la producción de exopolisacáridos, posiblemente debido al carácter hidrofílico de los polisacáridos. Estos resultados pueden indicar, hasta cierto punto, que debería existir un equilibrio entre la

capacidad formadora de *slime* (aumento de hidrofilia) y la hidrofobicidad (aumento de la virulencia) para considerar la virulencia de un aislado. Sin embargo, tal como se ha enunciado *ad supra*, parece que la hidrofobicidad y la producción de *slime* están contrapuestos, por lo que ambos factores, en caso de que alguno de ellos suponga una mayor virulencia de un aislado en particular, o no aparecen simultáneamente o bien actúan de modo diferente.

En un estudio dirigido a la detección e interrelación de factores de virulencia, tales como la hidrofobicidad de la superficie celular, formación de cápsula y de *slime* realizado sobre 393 cepas de SCN, tanto de origen humano como bovino (Saa y Kruze, 1995), se observó que la mayoría de las cepas humanas (95%) y bovinas (82,6%) mostraban propiedades hidrofóbicas, aunque únicamente el 11,3% y el 7,9% de dichas cepas, respectivamente, eran capsuladas. Esto puede explicarse, sin embargo, porque se sabe que las cepas de *S. aureus* capsuladas son más hidrofílicas que las no capsuladas, como ha sido comprobado por Jonsson y Wadström, en 1984, con la cepa Smith difusa (capsulada) y Smith compacta (no capsulada), utilizando el SAT y la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

En los estudios sobre septicemias *sensu stricto* causadas por *S. epidermidis* en la especie humana (Dall *et al.*, 1994) se profundiza considerablemente en la asociación de diversos factores de las cepas aisladas y su relativa relevancia para determinar la virulencia de los mismos en comparación con aislados considerados saprofitos. Estos autores, que estudian factores como la cuantificación de la producción de *slime*, hidrofobicidad, hexosas superficiales, presencia de cápsula y fagocitosis por el bazo murino, observan que existe una correlación positiva entre las hexosas presentes superficialmente y la virulencia para el hospedador.

4.4.3.- Regulación de la adherencia y relación con la virulencia

Los genes de virulencia de *S. aureus* están modulados por al menos dos reguladores globales: *agr* y *sarA*. El locus *agr* es un sistema multigénico complejo que regula los factores de virulencia, detectando la densidad celular; cuando ésta es alta se activa *agr*, de manera que induce la producción de proteínas extracelulares como las exotoxinas y, simultáneamente, reprime la expresión de antígenos de superficie como la proteína A y otras adhesinas. Por otro lado, el locus *sar*, con su gen *sarA*, puede activar promotores de *agr*, aunque también puede activar ciertos genes de virulencia independientemente de *agr*;

en concreto, en la fases iniciales de la infección, cuando la densidad celular es baja, se activa la producción de proteínas de la superficie celular, como las adhesinas, lo que permite la fijación inicial o la colonización de los tejidos del hospedador en el lugar de la infección. Posteriormente, cuando la concentración celular es alta, se promueve la producción de proteínas, como las exotoxinas, que dañan las células, degradando los tejidos circundantes y permiten la difusión de las bacterias a otros lugares alejados del punto de entrada.

También relacionados con la adherencia bacteriana se encuentran los polisacáridos superficiales que forman las cápsulas y el *slime*, capaces de interferir en la respuesta inmune del hospedador y favorecer la persistencia de las bacterias al formarse las comunidades bacterianas llamadas biofilmes. En cuanto a los polisacáridos capsulares, se ha demostrado que el polisacárido capsular del serotipo 8 de *S. aureus* raramente se sintetiza antes de que se alcance la fase estacionaria, pareciendo que es más importante en la fase de diseminación que en la colonización inicial. Además, se ha relacionado a los polisacáridos capsulares de *S. aureus* de los serotipos 1 y 2 con el enmascaramiento de adhesinas de la superficie celular (Smelzer y Gillaspy, 2000), por lo que los polisacáridos capsulares 5 y 8 pueden jugar también un papel durante la diseminación, desde el foco inicial de infección a lugares secundarios. Sin embargo, las bacterias que partan del foco primario vuelven a encontrar bajas densidades celulares, de modo que el sistema *agr* es inactivado pero, aún así, la síntesis del polisacárido capsular continúa un cierto periodo de tiempo, lo suficiente para permitir a las bacterias cubiertas por la cápsula evitar la fagocitosis y el alcanzar nuevos lugares para asentarse (Luong *et al.*, 2002a). Este mecanismo probablemente es común al resto de polisacáridos capsulares.

Por otro lado, cada vez se está reconociendo más que la capacidad de formación de los complejos bacterianos multicelulares muy organizados conocidos como biofilmes (Vancraeynest *et al.*, 2004) representa un importante factor de virulencia en estafilococos (Arciola *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2005), lo que puede haber influenciado el progresivo reconocimiento de *S. epidermidis* como patógeno en estos procesos. Por lo tanto, la detección de la capacidad de formar biofilmes es importante para la evaluación de la virulencia de aislados de esta especie bacteriana en mastitis. Esta forma de crecimiento bacteriano se caracteriza por la presencia de colonias adherentes, rodeadas por una gran matriz de exopolisacáridos que protege a las bacterias de los antimicrobianos, de los anticuerpos circulantes o de mucosas, y de la fagocitosis (O’Gara y Humphreys, 2001;

Cucarella *et al.*, 2002), ayudando a la supervivencia bacteriana en entornos hostiles del hospedador. De hecho, se ha demostrado que aunque los macrófagos son capaces de penetrar en el biofilm, son incapaces de fagocitar bacterias en su interior (Clutterbuck *et al.*, 2007). En un estudio recientemente realizado por Begun *et al.*, en 2007, se ha demostrado que el exopolisacárido del biofilm protege a *S. epidermidis* de las defensas en el modelo nematodo *Caenorhabditis elegans* y que la presencia de un *locus icaADBC* intacto (responsable de la formación de *slime*) era condición imprescindible para que las infecciones fueran letales. Se sabe que este operón *ica* es reprimido por *IcaR* y también por *TcaR*, un regulador del *locus* asociado a la teicoplanina. Otros reguladores globales influyen también, como el *sarA* (el regulador accesorio de estafilococo) y quizás el factor alternativo de estrés sigma (σ^B), que es importante para la regulación del biofilm en *S. epidermidis* aunque menos en *S. aureus*. De hecho, se ha demostrado que la producción de biofilm en *S. aureus* se ve más afectada por las mutaciones en el gen *sar* que en el *locus ica* (Beenken *et al.*, 2004).

La formación de un biofilm supone una secuencia coordinada de sucesos que incluye una fijación inicial a la superficie primaria, la formación de microcolonias, su expansión y la diseminación de la bacteria (Tu Quoc *et al.*, 2007). Aunque aún se comprende poco la regulación de la formación del biofilm, se supone compleja y multifactorial (Clarke y Foster, 2006). En la fase de proliferación se ocasiona una acumulación de células en multicapa rodeadas de una matriz polimérica de polisacárido (O’Gara y Humphreys, 2001), que contiene también proteínas de superficie responsables de la fijación de las bacterias a los distintos sustratos (Oliveira *et al.*, 2006).

En el caso de *S. epidermidis* (O’Gara y Humphreys, 2001) se ha propuesto un modelo de adherencia y formación de biofilm. En la primera fase, la adherencia está mediada por la adhesina capsular polisacárida (PSA) y una o varias proteínas, incluida la autolisina y, posteriormente, se produce la acumulación de bacterias debida al PIA (antígeno polisacárido de adhesión intercelular). La fijación inicial de los estafilococos a superficies inertes se cree que se debe a muchos factores: por ejemplo, la alteración de la carga negativa del ácido teicoico reduciendo la esterificación D-alanil afecta a la adherencia a poliestireno (Gross *et al.*, 2001). También modulan la fijación a superficies inertes factores proteicos como la autolisina *atlE*, la proteína asociada a la agregación y la proteína asociada a biofilm. Se ha observado que las proteínas de superficie de *S. aureus* se producen pronto durante el curso de la infección, cuando las prioridades de la bacteria

serían evitar las defensas del hospedador y la colonización de tejidos apropiados (Smelzer y Gillaspy, 2000).

Posteriormente, ya en la fase postfijación de los estafilococos, es el glicocalix el que juega un papel crucial. El denominado antígeno polisacárido de adhesión intercelular (PIA) es un polímero de *N*-acetilglucosamina, y su biosíntesis está regulada por el operón *icaADBC* (Barbier *et al.*, 2000; O’Gara y Humphreys, 2001; Martín López *et al.*, 2002; Cucarella *et al.*, 2004; Vancraeynest *et al.*, 2004). La presencia del PIA es importante para la virulencia, tanto en modelos de infecciones sistémicas como en las de implantes. Resulta funcional en la adhesión célula a célula y es esencial para la acumulación de biofilm en la mayoría de las cepas clínicas de *S. epidermidis*, así como imprescindible para su capacidad de hemaglutinación (Mack *et al.*, 2000); en esta especie la expresión del *locus icaADBC* y la síntesis de PIA están íntimamente relacionadas y reguladas. Además, últimamente se ha demostrado que también codifica la PSA (adhesina capsular polisacárida de *S. epidermidis*), cuya importancia como factor de virulencia se ha demostrado en dos modelos animales.

En *S. aureus* se ha demostrado que los anticuerpos frente a PIA son protectores en ratón (Fluckiger *et al.*, 2005) pero la expresión de PIA en *S. aureus* y en *S. epidermidis* es diferente y, pese a que es producido y expresado *in vivo* sin dificultad en ambas especies, su síntesis en *S. aureus* está muy influenciada por los factores ambientales, no siendo siempre producido *in vitro* (Vasudevan *et al.*, 2003; Yazdani *et al.*, 2006). En *S. aureus* existen también considerables diferencias entre cepas en cuanto a su producción, mientras que en *S. epidermidis* su expresión suele ser elevada y menos influenciada por las condiciones del medio (O’Gara y Humphreys, 2001; Fluckiger *et al.*, 2005).

Aunque la producción de PIA es prevalente en muchas cepas de laboratorio o clínicas, no siempre está correlacionada con la formación de biofilm, no sólo por la influencia en *S. aureus* de los factores ambientales en su producción, sino también porque en algunos modelos animales en los que se ha llegado a deleccionar el *locus ica* no se ha visto excesivamente influida la formación de biofilm *in vitro* ni *in vivo*. Por ello, puesto que en ausencia del *locus ica* se ha observado la formación de biofilm, se ha sugerido la existencia de rutas metabólicas dependientes e independientes del mismo.

Pese a que la importancia de la presencia de este *locus* parece que no sea tanta en relación a la virulencia, sí se ha observado que en *S. epidermidis* la presencia *ica* está

prácticamente limitada a cepas relacionadas con sepsis (Barbier *et al.*, 2000), de manera que las cepas invasivas son más *ica* positivas que las saprofitas (Fluckiger *et al.*, 2005). De hecho, en los estudios de Ziebuhr *et al.* (1997) se determinó que el 85% de los *S. epidermidis* de hemocultivos contenían los genes *ica*, mientras esto mismo sólo ocurría en el 6% de las cepas saprofitas. En el caso de *S. aureus*, también se ha observado que la presencia del locus *ica* es significativamente más común entre aislados invasivos que en los obtenidos de portadores (Peacock *et al.*, 2002).

Posteriormente, se ha descrito la existencia de un gen denominado *bap* (*biofilm associated protein*) que codifica una proteína grande, de 2.276 aminoácidos, que promueve tanto la fijación inicial como la adhesión interbacteriana, mientras que el PIA/PNAG interviene únicamente en adhesión interbacteriana (Cucarella *et al.*, 2004). Las cepas de *S. aureus* portadoras del gen *bap* se considera que son grandes formadoras de biofilm (Vancraeynest *et al.*, 2004), aunque en *S. aureus* de origen cunícola parece que este gen no está relacionado con la formación de *slime*. La proteína *bap* está relacionada estructuralmente con la proteína α C de los estreptococos del grupo B y tiene una región central (*core*, aminoácidos 948 a 2.139) formado por 13 unidades repetidas dispuestas en tándem de 258 nucleótidos, que codifican repeticiones de una secuencia de 86 aminoácidos (repeticiones C). Esta región C representa el 52% de la proteína *bap*. El gen *bap* se encuentra localizado en una isla de patogenicidad y hasta el momento sólo se ha descrito en aislados de mastitis bovina.

Sobre la regulación de la formación de biofilm, últimamente se ha informado de la existencia de reguladores globales, incluyendo sensores bicomponente, que regulan su formación en los estafilococos. Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, el locus regulador génico accesorio (*agr*), controla la producción de muchos factores de virulencia en respuesta a señales-quórum (*quorum sensing*) capturadas por el sistema sensor bicomponente *agrAC*, un sistema muy extendido en tipos bacterianos muy variados (Clutterbuck *et al.*, 2007). La molécula efectora del locus *agr* es un ARN regulador denominado RNAIII; además de sus efectos en la expresión de genes de factores de virulencia, el transcrito primario de RNAIII también codifica la hemolisina δ , cuyas propiedades como surfactante se piensa que modulan la formación del biofilm. Un estudio reciente con *S. aureus* reveló que la disrupción de sistema señal bicomponente *arILS* promovió intensamente la formación de biofilm, aumentando la fijación a superficies y la producción de PIA. De forma similar, la inactivación de un sistema *sensor-quorum*

mediado por *LuxS* mostró un aumento de la formación de biofilm *in vitro* y provocó una mayor virulencia *in vivo* en ratas con infección mediada por biofilmes (Tu Quoc *et al.*, 2007). Concretamente, en el caso de las cepas de mastitis bovina, se ha informado de que la regulación de la formación de biofilm se consigue por la actividad combinada de los *loci ica* (*intercelular adhesion*), *bap* (*biofilm-associated protein*), *agr* (*accessory gene regulator*) y *sar* (*staphylococcal accessory regulator*) (Oliveira *et al.*, 2006).

En los últimos tiempos, la comparación del metabolismo de bacterias planctónicas o en comunidades en biofilmes mediante perfiles de transcripción (*transcriptional profiling*) ha revelado alteraciones significativas en la expresión génica que sugieren que se producen cambios metabólicos significativos entre ambas situaciones. De hecho, parece que en los biofilmes se produce una adaptación selectiva en respuesta al crecimiento anaeróbico y al pH reducido. Un estudio proteómico reciente que compara la expresión de proteínas en ambas situaciones mostró la existencia de grandes diferencias en el perfil proteico, incluyendo un claro aumento en los biofilmes de proteínas asociadas con la fijación celular, síntesis del peptidoglicano y el metabolismo del formiato y piruvato.

Los biofilmes protegen a las bacterias de los mecanismos de defensa del hospedador, de la actividad antimicrobiana y de las condiciones adversas, como ya hemos señalado. La resistencia frente a los antimicrobianos está relacionada con la dificultad del antibiótico para difundir a través del biofilm, con la baja actividad metabólica de las bacterias en las capas inferiores y con los cambios fisiológicos en el modo de crecimiento, incluyendo la presencia de células "persistentes" en las que la muerte celular programada está inactiva (Oliveira *et al.*, 2006).

Sin embargo, hay también muchos factores ambientales que influyen en la formación de biofilmes, siendo desencadenantes exógenos conocidos la salinidad, la glucosa, la limitación de oxígeno, la depleción de hierro, los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} , el EDTA, el pH interno, las concentraciones de CO_2 , la osmolaridad, la heparina y varios tipos de estrés, como el calor y el etanol (Oliveira *et al.*, 2006; Tu Quoc *et al.*, 2007). Incluso se ha demostrado recientemente que el estrés del ciclo del ácido tricarbóxico induce la formación de PIA y promueve la formación de biofilm, lo que sugiere que pueden detectarse determinadas señales metabólicas endógenas y regular la formación de biofilmes. Quedan aún por ser investigados los sistemas sensoriales que responden a señales que afectan a la formación y desarrollo de los biofilmes.

4.5 - Poder patógeno

S. aureus es un patógeno con un amplio rango de hospedadores susceptibles y es una de las principales causas de infección en la especie humana y en animales en todo el mundo. Por otra parte, junto con otros miembros del género, también es un integrante habitual de la microbiota de mamíferos y coloniza de forma asintomática las mucosas nasal, intestinal y vaginal. Sin embargo, si las barreras mucosas se rompen o las defensas en mucosas del hospedador disminuyen, puede ser causar de morbilidad y mortalidad importantes en humanos y animales (Lee, 1996).

S. aureus puede provocar un variado espectro de enfermedades, desde infecciones cutáneas de escasa importancia hasta enfermedades que amenazan la vida del individuo infectado. Por otro lado, debido al aumento de las resistencias antibióticas entre los miembros de esta especie y a la amplia variedad de factores de virulencia de que dispone, la importancia del desarrollo de inmunógenos eficaces es cada vez mayor. En la especie humana, el rápido incremento de las cepas meticilín-resistentes y la amenaza de aparición de resistencias a la vancomicina están causando considerable alarma entre la comunidad médica. Las infecciones en las que se encuentra implicado este microorganismo son extremadamente frecuentes y a menudo ponen en peligro la vida del hospedador.

La inmunidad frente a las infecciones por *S. aureus* y otros estafilococos sigue conociéndose mal. Aunque parece que existe poca resistencia a la colonización de las mucosas por *S. aureus*, los animales sanos poseen una resistencia innata elevada a las infecciones invasivas, lo que hace que sea difícil conseguir infecciones estafilocócicas experimentales, requiriéndose inóculos grandes y, a veces, la introducción simultánea de cuerpos extraños (Lee, 1996). Esta inmunidad natural se atribuye a las barreras mucosas y epidérmicas, así como a las defensas humoral y celular. La respuesta fagocítica de los polimorfonucleares neutrófilos como primera línea de defensa orgánica contra la invasión de *S. aureus* es un determinante crítico en el resultado final de las infecciones estafilocócicas. Para que esta respuesta sea eficaz es imprescindible que el proceso de opsonización se efectúe correctamente, por lo que factores como el tipo de cepa de estafilococos y la presencia de opsoninas y complemento influyen de manera decisiva en el curso de la infección, ya que una vez fagocitados, la mayoría de las cepas de estafilococos son destruidas con facilidad.

Sin embargo, se considera que el poder patógeno de una determinada cepa de *S. aureus* se debe a una combinación de los factores extracelulares propiamente dichos como las exotoxinas, junto con otras propiedades más ligadas a las características celulares de superficie, como son la adherencia y la formación de biofilm (Vancraeynest *et al.*, 2004). Por tanto, los componentes bacterianos y productos secretados que afectan la patogénesis de *S. aureus* son numerosos (**Tabla Rev09**) e incluyen adhesinas asociadas a la superficie, polisacáridos capsulares, exoenzimas y exotoxinas.

Tabla Rev09. Factores de virulencia potenciales de *S. aureus*

<p>Componentes asociados a la bacteria</p> <ul style="list-style-type: none">• Proteína A• Polisacáridos capsulares• Peptidoglicano• Adhesinas: Proteínas fijadoras a fibronectina A y B, fibrinógeno, colágeno, etc. <p>Exoenzimas</p> <ul style="list-style-type: none">• Coagulasa, lipasa, hialuronidato liasa, nucleasa, estafiloquinasa, proteasas <p>Exotoxinas</p> <ul style="list-style-type: none">• Enterotoxinas (A-E), leucocidina, toxina 1 del síndrome de shock tóxico, α toxina, β toxina, γ toxina, δ toxina

Esta constelación de productos y estructuras permite a los estafilococos adherirse a las membranas eucarióticas, resistir a la opsonofagocitosis, lisar las células de los mamíferos y disparar la producción de una cascada de moléculas inmunomoduladoras del hospedador. Pese a la abundancia de estudios desarrollados desde hace muchos años, se conoce relativamente poco de los papeles individuales de cada factor de virulencia en la inducción de inmunidad protectora contra la infección estafilocócica.

En un interesante estudio de la presentación y combinaciones de los genes de las adhesinas y toxinas en poblaciones naturales de *S. aureus* en el ser humano, Peacock *et al.*, en 2002, analizan la presencia de 33 posibles determinantes de virulencia (**Tabla Rev10**), en cepas aisladas en portadores humanos sanos o en enfermos que presentaban procesos invasivos, tanto adquiridos intrahospitalariamente como no.

Tabla Rev10. Determinantes de virulencia en poblaciones naturales de *S. aureus*
(Peacock *et al.*, 2002).

Determinante	Posible función
Adhesinas	
fnBPA	Adhesina para fibronectina
clfA y clfB	Adhesinas para fibrinógeno
cna	Adhesina para colágeno
sdrC, sdrD y sdrE	Posibles adhesinas
bbp	Adhesina para la sialoproteína ósea
ebpS	Adhesina para la elastina
Map/eap	Proteína análoga del complejo principal de histocompatibilidad de clase II
Toxinas	
TSST-1	Toxina 1 del shock tóxico. Exotoxina con actividad de superantígeno.
Enterotoxinas A, B, C, D, E, G, H, I y J	Exotoxinas con actividad de superantígeno.
Exfoliatinas A y B	Exotoxinas con actividad de superantígeno.
Toxina α	Toxina citolítica formadora de poros.
Toxina β	Esfingomielinasa
Toxina δ	Toxina citolítica
Leucocidina de Pantón-Valentine	Leucocidina bicomponente
Toxina γ	Leucocidina bicomponente
Otros	
<i>locus ica</i>	Adhesina intercelular de polisacárido
Coagulasa	Se une a la protrombina, activando la conversión de fibrinógeno a fibrina.
<i>efb</i>	Se une al fibrinógeno
Proteasa V8	Serin proteasa
Subgrupo <i>agr</i>	Regulador global

Una vez determinada la presencia o ausencia de los mismos entre su colección de cepas de campo, observaron que ocho de ellos son más frecuentes en los aislados invasivos que en los de portadores, lo que les ayudó a concluir que lo más probable era que las infecciones graves por *S. aureus* en humanos no se deban a la acción de un único factor de virulencia, sino a la acción combinada de varios de ellos a lo largo del desarrollo del proceso morboso.

S. aureus es, por otra parte, la principal causa de las infecciones intramamarias en rumiantes (Marco *et al.*, 1992a; Goñi *et al.*, 2004; Vautor *et al.*, 2009a), que son las infecciones de mayor repercusión económica en la industria lechera en los Estados Unidos y en todo el mundo, con aproximadamente la mitad de las vacas afectadas por algún tipo de mastitis. Esta enfermedad supone alrededor del 70% de las pérdidas de los ganaderos de

leche (Bayles *et al.*, 1998), por lo que el esclarecimiento de su patogénesis sería de gran importancia para paliar pérdidas económicas tan graves.

El mecanismo de la persistencia de los estafilococos en su hospedador, pese a la inducción de aparentemente suficientes niveles de anticuerpos humorales y de mucosas, permanece en gran medida inexplicado. Este tema resulta de gran importancia tanto para animales como humanos, ya que pueden sufrir infecciones estafilocócicas repetidas e incluso enfermedades toxigénicas como el síndrome del shock tóxico. Pese a que existen evidencias de que la inmunosupresión inducida por superantígenos (Bayles *et al.*, 1998) es parcialmente responsable tanto de la persistencia de la infección como de la baja respuesta de anticuerpos frente a algunos productos estafilocócicos, no todos los procesos son atribuidos a cepas productoras de superantígenos; por ejemplo, menos de la mitad de los aislados estafilocócicos procedentes de mastitis bovinas son productores de conocidas exotoxinas superantigénicas (Kenny *et al.*, 1993).

Tras las primeras consideraciones en cuanto a la virulencia de los miembros del género *Staphylococcus* reflejadas, en cierta forma, por la clasificación como estafilococos patógenos de sólo aquellos miembros del género integrantes de la especie *aureus* y que además producían coagulasa libre (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8ª ed.), los estafilococos coagulasa negativos han ido progresivamente ganando significación patológica. El interés de los investigadores sobre los SCN ha surgido debido a su indudable asociación a problemas médicos, como la contaminación y persistencia sobre dispositivos ortopédicos (prótesis, etc), así como en diversas infecciones de carácter nosocomial. En el campo veterinario, el interés de los SCN se refleja también en su asociación con mastitis subclínicas y otros procesos (Bergonier *et al.*, 2003; Quinn *et al.*, 2004; Fragkou *et al.*, 2007).

Sin embargo, las pruebas sobre la virulencia de cepas de SCN capsuladas, productoras de *slime* y negativas a dichas estructuras, realizadas por algunos autores, tampoco han resultado muy clarificadoras en cuanto a la importancia de dichos factores en la virulencia, habiéndose observado, por ejemplo, que pese a que las cepas *slime* positivas eran las más adherentes a superficies plásticas, las capsuladas lo eran más que las anteriores a células vesicales, aunque sobre células de origen renal dicha diferencia no se producía. Por otro lado, algunas cepas *slime* positivas no resultaban virulentas para el ratón (Makizumi 1993), por lo que parece que estos factores considerados individualmente no son definitivos en cuanto a determinar la virulencia de una cepa concreta de estafilococo.

Teniendo en cuenta dichas dudas en cuanto a su virulencia, en los aislados de estas especies surgió un problema añadido sobre la distinción entre los de importancia clínica y los que representan microorganismos saprofitos, lo que ha impulsado el desarrollo de diversos estudios en los que se intentaba asociar factores como la identificación de especie, la hidrofobicidad y la producción de *slime* con la importancia de las cepas aisladas desde el punto de vista clínico (Martin *et al.*, 1989). Por ejemplo, en un estudio encaminado a la detección de factores de virulencia como la hidrofobicidad de la superficie celular y la formación de cápsula y de *slime*, realizado sobre 393 cepas de SCN tanto de origen humano como bovino, se observó que la mayoría de las cepas humanas (95%) y bovinas (82,6%) mostraron propiedades hidrofóbicas, mientras que únicamente el 11,3% y el 7,9% de las cepas, respectivamente, eran capsuladas, lo que indicaba la importancia relativa de la cápsula a la hora de proporcionar características de hidrofobicidad. La formación de *slime* se detectó en un 10,5% de las cepas bovinas y sólo en un 0,9% de las cepas humanas. Para determinar la virulencia de las cepas se empleó el método de las conejas lactantes, a partir del cual se demostró que, de las especies empleadas en el estudio, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. haemolyticus* eran las más patógenas (Saa y Kruze, 1995).

Los estudios sobre septicemias *sensu stricto* causadas por *S. epidermidis* en la especie humana efectuados por Dall *et al.* (1994), profundizan considerablemente en la asociación de diversos factores de las cepas aisladas y su relativa relevancia para determinar la virulencia de los mismos en comparación con aislados considerados saprofitos. Según los autores, que estudian factores como cuantificación de la producción de *slime*, la hidrofobicidad, las hexosas superficiales, la presencia de cápsula y fagocitosis por el bazo murino, se produce una correlación positiva entre las hexosas presentes superficialmente y la virulencia para el hospedador, es decir, que factores presentes en la superficie celular pueden considerarse factores de virulencia en este tipo de aislados.

Pese a los primeros estudios sobre la importancia del *slime* como factor de virulencia al favorecer, entre otros, la adherencia de las cepas con la capacidad de formarlos frente a aquéllas que no la poseían (Wiley y Maverakis, 1974; Ishak *et al.*, 1985), parece que en ciertos modelos experimentales dicha ventaja no es apreciable (Perdreau-Remington *et al.*, 1998), aunque los mismos autores reconocen que quizás el modelo elegido influya en los resultados obtenidos.

Se han observado diferencias entre cepas de *S. epidermidis* en cuanto a su capacidad de adherencia a componentes de matrices orgánicas extracelulares como el fibrinógeno. En cepas muy adherentes se ha detectado una proteína que favorece dicha característica y que es similar a la encontrada en *S. aureus*, responsable de la reacción del *clumping factor* (*clfA*). Este dato supone un nuevo avance en la comprensión del mecanismo de adherencia y colonización de *S. epidermidis*, favoreciendo la hipótesis de la ventaja adaptativa de ciertas cepas adherentes frente a aquellas que no lo son (Nilsson *et al.*, 1998).

En conclusión, se observa un continuado interés en el estudio de la etiopatogenia de las infecciones causadas por estafilococos, de manera que se conoce que dicho género bacteriano posee numerosos factores de virulencia, tanto relacionados con sus características superficiales como con productos excretados; puesto que estos factores pueden actuar de manera combinada o individualmente sigue investigándose su importancia.

Los datos sobre inmunización pasiva o activa en la que se logran títulos anticapsulares adecuados indican que se consigue una inmunización eficaz frente a las infecciones de cepas homólogas capsuladas (Fattom *et al.*, 1996).

5.- Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de las estafilococias se basó inicialmente en el aislamiento e identificación de las bacterias causales de los procesos en estudio, particularmente en el caso de infecciones superficiales, aunque incluso en ciertos casos de septicemias se llegaron a conseguir buenos resultados. Sin embargo, a veces era difícil interpretar la importancia del cultivo positivo, conseguido de fuentes en las que podía existir un alto grado de contaminación (Wheat *et al.*, 1983).

En el caso de que no se consiguieran cultivos positivos por tratarse de lesiones profundas, por antibioterapia previa o por otras causas, en Medicina Humana se recurrió a técnicas serológicas para el diagnóstico de las estafilococias, incluyendo las que detectaban anticuerpos frente a la hemolisina α y, especialmente, frente a los ácidos teicoicos de la pared celular. Para dicha detección utilizaban técnicas como la doble difusión en placas de Ouchterlony, la contrainmunoforesis (CIE), el ELISA y el RIA. La ventaja de estos métodos frente al cultivo era su rapidez y que permitían el diagnóstico etiológico de las

estafilococias antes de que los resultados del cultivo estuvieran disponibles, aunque la inexistencia de antígenos estándar pudiera representar una desventaja. La CIE resultó la más sensible y con menos falsos positivos en el caso de pacientes con hemocultivos positivos a *S. aureus* (West *et al.*, 1983). Otros investigadores emplearon en el diagnóstico de las bacteriemias por *S. aureus* (Ochoa, 1988) en la especie humana técnicas serológicas también basadas en la detección de anticuerpos frente al ácido teicoico, como la precipitación doble del ácido teicoico, la CIE, la inmunodifusión pasiva, el RIA, y kits comerciales como el ENDO-STAPH. Con estas técnicas intentaban detectar especialmente aquellos casos en los que la bacteriemia cursaba junto con endocarditis, con aceptables resultados en el caso de la CIE, que demostró ser un método más sensible y con menos falsos positivos que la inmunodifusión pasiva. Por otro lado, el RIA es más sensible pero más costoso y complicado. En cuanto a los métodos serológicos de detección y cuantificación de anticuerpos frente a los polisacáridos capsulares, diversos métodos, como la CIE y la electroforesis en cohete empleados para otros agentes capsulados como los neumococos (Kenny y Foy, 1975), se podrían emplear en el caso de los estafilococos. Finalmente, se impusieron técnicas serológicas como el ELISA para la detección de anticuerpos frente a los serotipos capsulares 5 y 8 de *S. aureus* en el diagnóstico serológico de las endocarditis humanas (Christensson *et al.*, 1991), con buenos resultados, permitiendo una muy buena discriminación frente a otros tipos de agentes causantes de septicemia así como la confirmación del contacto en casos de hemocultivos negativos.

En Medicina Veterinaria, el proceso de mayor importancia causado por estafilococos es la mastitis de los rumiantes, que normalmente se diagnostica clínicamente y mediante análisis bacteriológico. En el caso del diagnóstico de las mastitis ovinas (González, 1995) y de otros rumiantes, se complementa el análisis bacteriológico con técnicas como el *California Mastitis Test* o el recuento de células somáticas. Normalmente no se efectúan pruebas serológicas frente a los antígenos capsulares, aunque se conoce que la prevalencia de unos u otros serotipos es diferente, según la especie animal de que se trate (Sompolinsky *et al.*, 1985; Poutrel *et al.*, 1988).

Finalmente, tanto en Medicina Veterinaria como Humana, un aspecto muy importante a considerar en cuanto a los procesos causados por estafilococos es la identificación, caracterización y distinción de las cepas procedentes de brotes o aislados ambientales, como pasos principales para determinar la fuente del brote y para diseñar y poner en práctica las medidas de prevención y control necesarias (Shimizu *et al.*, 1997). Hasta hace relativamente poco tiempo, se han empleado numerosas técnicas fenotípicas

con esta intención, como el biotipado o el fagotipado. El biotipado de *S. aureus* puede hacerse según el origen y la conexión epidemiológica, en ecovariedades específicas de hospedador (humana, aviar, bovina u ovina) o bien en biotipos no específicos. Por otro lado, el fagotipado es una técnica ya establecida para estudiar la ecología de *S. aureus* y la epidemiología de infecciones por dicha bacteria, aunque se podría ver interferida por la existencia de cepas capsuladas (Ohsima *et al.*, 1988). Posteriormente, se han ido desarrollando otras técnicas basadas en la caracterización genómica; en particular, la electroforesis en campo pulsante (PFGE) que se utiliza con frecuencia para distinguir cepas diferentes de *S. aureus*. La clasificación, siguiendo los patrones electroforéticos de campo pulsante, resulta útil para investigar la fuente, transmisión y difusión de infecciones nosocomiales y, especialmente, para el tipaje epidemiológico y la determinación del parentesco genético de cepas de *S. aureus* meticilín-resistentes. Según un estudio, se confirmó que el biotipado por el método de Devriese (1984) permitió la confirmación del origen de las cepas aisladas mientras que la PFGE resultó de gran ayuda para subdividir variedades dentro de un mismo fagotipo, pareciendo un método con un buen poder de resolución y reproducibilidad, de gran utilidad en estudios epidemiológicos y ecológicos, junto con los métodos fenotípicos clásicos (Shimizu *et al.*, 1997).

6.- Profilaxis y terapia de los procesos causados por estafilococos productores de exopolisacáridos

El control de las mastitis causadas por *S. aureus* supone el empleo de diversas estrategias y metodologías combinadas. Una de ellas es minimizar el contacto de las ubres con cepas de *S. aureus* virulentas capaces de provocar enfermedad crónica, para lo que sería de mucha utilidad disponer de más información sobre la epidemiología de *S. aureus*. Los métodos clásicos convencionales para el tipado de *S. aureus* (fagotipado, serotipado, biotipado, antibiogramas) generalmente resultan de poca utilidad en cepas de *S. aureus* de origen bovino (Matthews *et al.*, 1994a), mientras que los métodos epidemiológicos basados en DNA han proporcionado resultados prometedores al estudiarse las rutas de transmisión de cepas bacterianas virulentas (Maslow *et al.*, 1993).

Por otro lado, la terapéutica antimicrobiana es a menudo ineficaz en las mastitis causadas por *S. aureus*. En un trabajo realizado en 1994 en Finlandia (Pyörälä y Pyörälä, 1994), sólo el 28% de los cuarterones tratados se resolvieron bacteriológicamente tres semanas tras la terapia. Como resultado del estudio, se observó que las cepas de *S. aureus*

aisladas en la fase aguda de la infección persistían en la ubre, siendo rara la reinfección por otras cepas de *S. aureus*, aislándose el mismo genotipo en 7 de 10 granjas. En estudios realizados sobre cepas de origen animal, se ha observado que las cepas de SCN presentaban resistencia antibiótica natural a moléculas empleadas de forma habitual en el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* (Guérin-Faubleé y Brun, 1999). Teniendo en cuenta la baja eficacia de la terapia antimicrobiana en el tratamiento de las estafilococias de importancia veterinaria, la prevención se convierte en una de las mejores armas en la lucha frente a dichos procesos. Los polisacáridos capsulares de *S. aureus* pueden ser importantes en la inmunidad de las infecciones estafilocócicas debido a que están asociados a la superficie, presentan especificidad antigénica limitada y muy conservada entre aislados clínicos. En un modelo de endocarditis (Lee *et al.*, 1997) planteado para comprobar si era posible proteger pasivamente mediante el uso de anticuerpos (IgG) purificados procedentes de conejos inmunizados con una vacuna compuesta por polisacáridos capsulares (tipo 5 y 8) unidos covalentemente al exotoxide A de *P. aeruginosa*, se demostró que los animales inmunizados pasivamente con anticuerpos anticapsulares quedaban protegidos frente a un desafío homólogo.

Sin embargo, hay que considerar que la propia naturaleza de los exopolisacáridos los convierte en pobres inmunógenos. Las pruebas efectuadas sobre ratones y humanos vacunados con vacunas conjugadas de los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8 de *S. aureus*, unidos a la exoproteína A recombinante de *P. aeruginosa* indican que los polisacáridos capsulares tipo 8 de bajo peso molecular no eran inmunogénicos en ratones y los de alto peso molecular generaban niveles bajos de anticuerpos sin efecto potenciador. Tras la primera inoculación, los conjugados generaron respuestas tipo IgM e IgG, siendo fundamentalmente del tipo IgG1 e IgG2, con actividad opsonofagocítica (Fattom *et al.*, 1993). Pese a la dificultad de conseguir niveles altos de anticuerpos, los datos sobre inmunización pasiva o activa en los que se logran títulos adecuados anticapsulares indican que se consigue una inmunización eficaz frente a las infecciones de cepas homólogas capsuladas (Fattom *et al.*, 1996).

Los procesos artríticos han supuesto un punto de atención de los investigadores para determinar qué factores influyen en el establecimiento, desarrollo y resolución de dicha patología estafilocócica. En el curso de las investigaciones que sobre este extremo efectuaron Verdrengh y Tarkowski, en 1998, se evaluó la importancia de los granulocitos y de una citoquina, el factor estimulante del crecimiento de granulocitos-macrófagos (GM-

CSF), en las artritis experimentales. El GM-CSF no sólo incrementaba la producción de células fagocíticas, sino también su eficacia bactericida. Los resultados demostraron que los granulocitos son las principales células defensivas durante la infección por *S. aureus*, pero que su sobreestimulación no supone una mejoría en el curso de la infección, debido en parte a los efectos dañinos de ciertas sustancias segregadas por dichas células. Teniendo en cuenta estos datos, se han llevado a cabo numerosas investigaciones para estudiar las defensas mamarias (Craven y Williams, 1985), con el objeto de su fortalecimiento para una mejor lucha frente a las mastitis. Desde mediados del siglo XX (Cameron, 1966), se inició el estudio la capacidad antigénica de ciertas cepas de estafilococos o sus fracciones (Stamp y Edwards, 1964) que pudieran llegar a formar parte de una vacuna antiestafilocócica. En este aspecto, se ha seguido investigando en paralelo a lo realizado en Medicina Humana, de manera que se avanza con el fin de lograr en un futuro cercano una vacuna contra las mastitis estafilocócicas más eficaz que las que se encuentran actualmente en uso.

V.- Justificación y Objetivos

Los microorganismos habituales existentes en la leche de origen ovino son muy diversos, pudiendo dar lugar parte de ellos al desarrollo de diversas patologías con consecuencias de tipo sanitario y, especialmente, con repercusiones económicas de importancia. Las bacterias que se encuentran en la leche de los pequeños rumiantes proceden fundamentalmente del ambiente que rodea al animal y también de la piel del mismo (Myllis *et al.*, 1997; Burriel, 1998; Bergonier *et al.*, 2003), siendo el género bacteriano más frecuentemente aislado el género *Staphylococcus* (Marco *et al.*, 1992a; Corrales *et al.*, 1999). Por otro lado, estos microorganismos se transmiten fácilmente de forma mecánica entre animales, siendo incluso vehiculados por insectos entre animales, como se ha demostrado en ganado vacuno (Gillespie *et al.*, 1999).

El género *Staphylococcus* se caracteriza por una gran versatilidad metabólica, lo que permite su buena supervivencia en diversas condiciones ambientales y también, en ciertas ocasiones, hace posible que pueda ubicarse en la mama y llegar a provocar procesos patológicos en la ubre, que incluso pueden llegar a causar la muerte del animal afectado. Esta característica facilita también su gran adaptabilidad al entorno (Clarke y Foster, 2006), lo que explicaría su capacidad para infectar tejidos diversos y dar lugar a patologías variadas, especialmente mastitis.

Sobre los agentes causales de las mastitis estafilocócicas, especialmente las mastitis clínicas y en particular las ocasionadas por *S. aureus*, se han llevado a cabo numerosos estudios; sin embargo, con la mejora de los programas sanitarios y la mayor exigencia en la calidad de la producción láctea, han ido ganando importancia e interés los aspectos relativos al conocimiento de las mastitis subclínicas causadas por estafilococos coagulasa negativos (SCN) con el propósito de su prevención (Burriel y Scott, 1998). Todo ello ha producido un considerable estímulo a los estudios de otros miembros del género como causales de procesos morbosos menos evidentes.

A partir de dichas investigaciones, se ha demostrado la implicación en ciertos tipos de mastitis de diversas especies de SCN (Pengov, 2001; Bergonier *et al.*, 2003) que, aunque en general no provocan cuadros clínicos agudos, sí ocasionan procesos de tipo crónico y subclínico que causan importantes pérdidas económicas (Fthenakis y Jones, 1990; Watkins *et al.*, 1991; González, 1995; Lafi *et al.*, 1998). Fruto de alguno de dichos estudios ha sido el descubrimiento de que la capacidad de permanencia de estos microorganismos en la ubre ovina puede relacionarse con la presencia, rodeando a las bacterias implicadas, de ciertos polisacáridos (cápsula, *slime*), que podrían representar

factores de virulencia asociados a la resistencia a la opsonización (Karakawa y Vann, 1982; Vancraeynest *et al.*, 2004), a la fagocitosis (O’Gara y Humphreys, 2001; Cucarella *et al.*, 2002; Luong *et al.*, 2002a) y al aumento de la capacidad de adherencia de los estafilococos a diversas estructuras del hospedador (Sompolinsky *et al.*, 1985). Estas estructuras han sido asociadas incluso a una mayor resistencia a los tratamientos antibióticos (Baselga *et al.*, 1991; O’Gara y Humphreys, 2001; Cucarella *et al.*, 2002; Goñi *et al.*, 2004).

La descripción de tales estructuras, junto con la existencia de otros factores de virulencia en cepas de especies no consideradas patógenas *per se*, ha facilitado un gran interés por el estudio de los mecanismos básicos de patogenicidad y de los factores de virulencia de los estafilococos en ovino (Mavrogianni *et al.*, 2007). En Medicina Humana, los datos que se han ido obteniendo en relación con las infecciones nosocomiales (Ishak *et al.*, 1985) están impulsando el estudio en profundidad de tales especies y sus factores de virulencia asociados. Debido a la aparición de resistencias bacterianas, posiblemente conectadas a la presencia de estructuras superficiales como el mucus o *slime* (Baselga *et al.*, 1991; O’Gara y Humphreys, 2001; Cucarella *et al.*, 2002), está aumentando de forma paralela el volumen de investigación relacionada con la necesidad urgente de disponer de un control inmunológico eficaz de dichas enfermedades (Ekstedt, 1963a; Arbeit *et al.*, 1984; Ma *et al.*, 2004; Fragkou *et al.*, 2007), o mediante la selección de estirpes ovinas con una alta resistencia a la enfermedad (Rupp *et al.*, 2009).

Existe una gran cantidad de estudios en Medicina Humana sobre la existencia de cepas de *S. aureus* capsuladas, el predominio de ciertos serotipos (Arbeit *et al.*, 1984) y la capacidad de otras especies de estafilococos, en especial *S. epidermidis*, de adherirse de forma tenaz a soportes inertes (Ishak *et al.*, 1985), siendo por el contrario escasos los estudios llevados a cabo en Medicina Veterinaria, en particular sobre cepas aisladas de la especie ovina.

Parece evidente que el estudio de dichas estructuras y de otros posibles factores de virulencia en aislados de leche ovina facilitará un mayor conocimiento sobre los posibles agentes patógenos causantes de mastitis ovinas, por lo que el propósito de este estudio se centra en:

- La caracterización de las cepas de *Staphylococcus sp.* aisladas de muestras de leche ovina procedentes de explotaciones de aptitud láctea.

- La detección de factores de virulencia de superficie en dichas cepas, tanto polisacáridos (cápsula, producción de *slime*) como de otra naturaleza (adhesinas).
- La determinación de factores de virulencia enzimáticos y producción de bacteriocinas.
- La observación de la posible influencia de los factores nutricionales sobre el desarrollo, detección y permanencia de dichas estructuras en los aislados en estudio.

VI.- Material y Métodos

1.- Descripción de las cepas utilizadas en el estudio

1.1.- Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas aisladas

Las 286 cepas utilizadas en el presente trabajo pueden agruparse en 2 secciones: 246 cepas aisladas de muestras de leche ovina (cepas problema), cuyo origen se describe a continuación y 40 cepas tipo, que se describen en el apartado 1.2.

Las 246 cepas problema fueron aisladas, en distintas etapas, de muestras de leche ovina remitidas a los servicios de diagnóstico y atención al cliente de Laboratorios Ovejero, S.A. (224 cepas) y Laboratorios Syva, S.A. (22 cepas), ambos de León, entre 1989 y 2005.

1.1.1.- Toma de muestras y aislamiento de cepas

Las cepas problema se aislaron a partir de muestras de leche ovina, incluyéndose muestras individuales y muestras de tanque de recogida en la explotación.

El aislamiento se llevó a cabo mediante siembra por agotamiento sobre placas de agar triptosa, adicionadas con un 10% de sangre desfibrinada de cordero, o bien agar Columbia sangre, en ambos casos incubados durante 48 horas en aerobiosis a 37°C. En los casos procedentes de enfermedad clínica (mastitis, habitualmente) en los que se disponía de diversas muestras de un mismo rebaño, se procedió a la siembra de cada una por separado.

Tras la incubación de cada muestra, se aislaron las colonias con morfología típica del género *Staphylococcus*, que se resembraron por duplicado en tubos de agar BHI inclinado para volver a incubarlas nuevamente durante 24 horas, en aerobiosis. Uno de los tubos, una vez que fueron visibles las colonias, se almacenó a 4°C para ser utilizado como cultivo de partida durante la identificación de la cepa y el crecimiento del otro se recogió en medio de conservación de cepas (**Apéndice M02**), se alicuotó, congeló y conservó a -80°C.

1.1.2.- Identificación

Debido al elevado número de cepas a procesar, se procedió a seleccionar una serie de pruebas de forma que fueran lo suficientemente concluyentes para permitir llegar a la identificación a nivel de especie, partiendo de pruebas bioquímicas clásicas aunque algunas veces utilizándolas miniaturizadas para ganar en operatividad.

Se tomó como punto de referencia en la identificación la pauta recogida en el “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Schleifer, 1986), completada en casos concretos con modificaciones o aportaciones que en cada caso se citan convenientemente.

La identificación se desarrolló en dos fases:

1.1.2.1.- Identificación a nivel de género

A partir del crecimiento de 24 horas obtenido de la resiembra de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Staphylococcus*, se procedía a comprobar la pureza y al estudio de la morfología microscópica y colonial.

Adicionalmente, se llevaron a cabo determinaciones en relación con la producción de catalasa, prueba de sensibilidad a la lisostafina, crecimiento en agar en presencia de furazolidona y producción de ácido del glicerol en aerobiosis, en presencia de eritromicina.

1.1.2.1.1.- Estudio de la morfología microscópica

Para el estudio de la morfología microscópica se utilizó la tinción de Gram, que se llevó a cabo mediante el método clásico, basado en la modificación de Hucker descrita por Lányi (1987), según se detalla en el **Apéndice M02**.

1.1.2.1.2.- Detección de la actividad catalasa

Para la detección de actividad catalasa se tomaba un asa del crecimiento y se suspendía en una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un portaobjetos; la aparición de burbujas se consideró como un resultado positivo.

1.1.2.1.3.- Prueba de sensibilidad a la lisostafina

Siembra e incubación: con un hisopo se sembraron las cepas en estudio sobre placas de agar triptosa, a razón de 4 cepas por placa. Sobre cada uno de los inóculos de depositaron 20 µl de una solución de lisostafina a 54 U/ml, equivalente a 200

µg/ml (**Apéndice M02**). Se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas. Cada cepa se probó dos veces.

Lectura e interpretación: se interpretó la inhibición del crecimiento bacteriano en el punto de depósito de la solución de lisostafina a 200 µg/ml (Oeding, 1983) como indicador de la sensibilidad de la cepa en estudio.

1.1.2.1.4.- Crecimiento en agar en presencia de furazolidona

En este medio se valora la capacidad de los micrococcos de crecer en presencia de furazolidona al 0,0025%, mientras que la mayoría de las cepas de estafilococos son inhibidas (Von Rheinhaben y Hadlok, 1981).

Siembra e incubación: con un hisopo a partir del crecimiento en caldo BHI se sembraron las cepas en estudio sobre placas de agar TSA, a las que se había añadido furazolidona (**Apéndice M02**), a razón de 4 cepas por placa. Se incubaron las placas a 37°C durante 48 horas. Cada cepa se probó dos veces.

Lectura e interpretación: se valoró el crecimiento como indicador de la sensibilidad de la cepa en estudio.

1.1.2.1.5.- Producción de ácido del glicerol en aerobiosis, en presencia de eritromicina

La prueba se basa en la capacidad de los estafilococos, pero no de los micrococcos, de producir ácido a partir del glicerol en presencia de 0,4 µg/ml de eritromicina.

Para llevar la prueba a cabo se siguieron las recomendaciones de Schleifer y Kloos (1975), empleando como medio basal el agar base, con púrpura, de Difco (**Apéndice M02**), al que se añadió un 1% v/v de glicerol antes de esterilizarse en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Una vez estéril, el medio se atemperó a 50°C en un baño maría antes de añadir la eritromicina. La eritromicina se añadió en solución, partiendo de la disolución de 40 mg de eritromicina en 5 ml de etanol de 95° y aforando con agua de calidad milliQ hasta 100 ml. La solución así preparada se esterilizó por filtración a través de filtros de 0,22 µm. El medio completo se elaboró añadiendo 1 ml de la solución de eritromicina por litro de medio atemperado. Tras homogeneizar bien, el medio se distribuyó en placas de Petri.

Siembra e incubación: en cada placa se sembraban 6 cepas en estrías radiales, partiendo de un cultivo líquido o de una suspensión en PBS estéril, para evitar el

arrastre de nutrientes desde un medio sólido que pudiera provocar la aparición de falsos positivos. Las placas se incubaban hasta 72 horas a 37°C, en aerobiosis.

Lectura e interpretación: las placas sembradas se observaron a las 24, 48 y 72 horas de incubación, considerando como resultado positivo el crecimiento de la cepa problema, así como la aparición de un cambio de color del medio, de púrpura a amarillo, debido a la acidificación del mismo. Cada cepa fue probada dos veces.

1.1.2.2.- Identificación a nivel de especie

Para agilizar el proceso identificativo, se llevó a cabo para cada especie una selección de pruebas contrastadas por su valor en la discriminación a nivel de especie, a la vez que se puso en práctica un sistema de codificación con el propósito de constituir una base de datos útil en la identificación.

1.1.2.2.1.- Selección de las pruebas bioquímicas

A partir de los datos taxonómicos disponibles, fundamentalmente procedentes del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Schleifer, 1986) se procedió a seleccionar las pruebas existentes de más sencilla realización y discriminatorias, que nos permitieran llegar de forma rápida y eficaz a la identificación del nivel de especie de las cepas de *Staphylococcus* aisladas. Las pruebas seleccionadas fueron:

1.1.2.2.1.1.- Crecimiento en medio semisólido de tioglicolato (Oeding, 1983)

Mediante esta prueba se estudiaba la capacidad de la cepa de prueba para crecer anaeróbicamente. Para ello utilizamos un medio fluído con tioglicolato de Difco (**Apéndice M02**), que se preparaba siguiendo las instrucciones del fabricante.

El medio se distribuía en tubos de vidrio a razón de 20 ml por tubo. Para eliminar el oxígeno disuelto, los tubos se sometían a ebullición durante 10 minutos, y se colocaban antes de la siembra en un baño regulado a 45°C.

Siembra e incubación: los tubos así dispuestos se sembraban mediante pipeta Pasteur a lo largo del centro del tubo con 0,1-0,2 ml de una suspensión en PBS de la cepa en estudio, a una concentración aproximada de 10⁶-10⁷ UFC/ml. Los tubos se dejaron durante al menos una hora a temperatura ambiente para facilitar la gelificación del medio semisólido, antes de incubarse a 37°C durante 7 días.

Lectura e interpretación: diariamente se examinaban los tubos a contraluz para detectar la presencia de crecimiento en la zona anaeróbica. Un tipo de crecimiento denso y uniforme se consideró indicador de que la cepa era capaz de crecer en anaerobiosis.

1.1.2.2.1.2.- Producción de acetoína a partir de la glucosa (Prueba de Voges-Proskauer)

La detección de la producción de acetilmetilcarbinol (acetoína) se llevó a cabo utilizando el medio de cultivo MR-VP (Difco), preparado según las instrucciones del fabricante (**Apéndice M02**).

Siembra e incubación: los tubos se inocularon a partir de cultivos en medio sólido y se incubaron durante 4 días a 37°C, ya que incubaciones más prolongadas podían ocasionar la aparición de falsos negativos por degradación de la acetoína (Lanyi, 1987).

Lectura e interpretación: tras la adición y homogeneización de 0,6 ml del reactivo A y 0,2 ml del reactivo B (**Apéndice M02**) por tubo, se inclinaban los tubos para aumentar la aireación y se leía el desarrollo de color a los 15 y 60 minutos. La aparición de un color rojo intenso se interpretó como un resultado positivo.

1.1.2.2.1.3.- Producción de ácido en aerobiosis a partir de carbohidratos

Para la detección de la producción de ácido a partir de azúcares, se utilizó como medio basal el caldo base con púrpura de bromocresol, de Difco (**Apéndice M02**). Una vez elaborado el medio, se añadían los distintos sustratos (esterilizados previamente por filtración) hasta alcanzar una concentración final del 1%. Los azúcares empleados fueron xilosa, sacarosa, maltosa, manitol, manosa, trehalosa y lactosa.

El medio completo se distribuyó en tubos de hemólisis a razón de 3 ml/tubo.

Siembra e incubación: los tubos se inocularon con 50 µl de una suspensión de la cepa en estudio a una concentración aproximada de 10^6 - 10^7 UFC/ml, a partir de un cultivo en medio sólido, y se incubaron durante 3 días a 37°C en aerobiosis.

Lectura e interpretación: se consideró como resultado positivo la aparición de un cambio de color del medio, de púrpura a amarillo, debido a la acidificación del mismo. Cada cepa fue probada dos veces.

1.1.2.2.1.4.- Prueba de reducción de los nitratos

Como medio se utilizó el caldo con nitrato, de Difco (**Apéndice M02**), que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se repartió en tubos, a razón de 5 ml, y se esterilizó en autoclave.

Siembra e incubación: los tubos se sembraron a partir de un cultivo en agar inclinado y se incubaron a 37°C durante 7 días, junto a un tubo sin inocular, que sirvió de control negativo.

Lectura e interpretación: transcurrido el periodo de incubación, se añadió a cada tubo 1 ml de cada uno de los dos reactivos de Griess-Ilosvay (Harrigan y McCance, 1966). Una vez añadidos, la presencia de nitritos se manifestó por la aparición de un color rojo, manteniéndose sin cambio el tubo testigo. Puesto que los nitratos podían haber sido reducidos más allá de los nitritos, sobre los tubos que no habían desarrollado color rojo se añadía polvo de zinc, de manera que si existían nitratos sin reducir se desarrollaba en este caso la coloración roja, indicando la prueba como negativa. Si no se desarrollaba color, significaba que la reducción había sido completa, más allá de nitritos y se consideraba la reacción como positiva.

1.1.2.2.1.5.- Producción de fosfatasa alcalina (Lanyi, 1987)

Esta prueba de detección de la producción de fosfatasa alcalina se basa en la liberación de fenolftaleína a partir del difosfato de fenolftaleína, cuando está presente el enzima. Mientras que el difosfato es incoloro, la fenolftaleína es un indicador ácido-base, de color rojo a pH alcalino, de manera que si se expone el crecimiento bacteriano sobre este medio de una cepa que posee el enzima a los vapores de amoníaco, se produce un viraje de color.

El medio empleado consiste en agar nutritivo al que se le añadía un 1% de una solución acuosa de difosfato de fenolftaleína esterilizada por filtración.

Siembra e incubación: en cada placa se sembraron por estría un máximo de 4 cepas, incubándolas durante 48 horas a 37°C.

Lectura e interpretación: tras la incubación, se colocaba una porción de papel de filtro en las tapas de las placas de Petri, vertiendo en las mismas unas gotas de amoníaco. A continuación, se cerraban las placas y se colocaban invertidas, de manera que las colonias quedaran expuestas a los vapores de amoníaco durante unos 30 segundos. Las colonias de las cepas positivas se tornaban de color rosa, mientras que las negativas permanecían con su color original.

1.1.2.2.1.6.- Producción de coagulasa

Para la detección de actividad coagulasa se empleó plasma de conejos clínicamente sanos. Una vez obtenido el plasma, se repartía en tubos de hemólisis, a razón de 0,5 ml por tubo.

Siembra e incubación: los tubos así preparados se sembraban con 50 µl de un cultivo de 18 horas sobre BHI de cada una de las cepas en estudio. Como control negativo se empleaba un tubo de plasma al que se añadía 50 µl de caldo BHI sin inocular. Los tubos se agitaban suavemente y se incubaban a 37°C durante 24 horas.

Lectura e interpretación: los tubos se observaron tras 1, 2, 3, 4 y 24 horas de incubación. La formación de un coágulo se interpretó como prueba positiva.

1.1.2.2.1.7.- Producción de desoxirribonucleasa (DNAsa)

Se estudió utilizando el agar para la prueba de DNAsa de Difco, que se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (**Apéndice M02**).

Siembra e incubación: las cepas se sembraron en estrías radiales a razón de 6 por placa, incubándose durante 24 horas a 37°C.

Lectura e interpretación: para realizar la lectura, se inundaban las placas con CIH 1 N, dejándolo actuar durante 5 minutos. La aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento se consideró reacción positiva (Lanyi, 1987).

1.1.2.2.1.8.- Resistencia / sensibilidad a la novobiocina

Esta prueba se realizó mediante el método en medio sólido, empleando para ello placas de agar de Mueller-Hinton y discos de novobiocina (Difco), con una carga de 30 µg de novobiocina por disco.

Siembra e incubación: las cepas se sembraron en cuadrantes mediante hisopo, a razón de 4 cepas por placa. Sobre cada una de las superficies sembradas se colocó un disco de novobiocina mediante pinzas estériles y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Lectura e interpretación: tras la incubación se procedió a la observación y medición de los halos de inhibición. Se consideraron cepas sensibles las que producían un halo de inhibición de diámetro superior a 25 mm.

1.1.2.2.2.- Codificación de las pruebas y creación de una base de datos

Partiendo de la propuesta de Schleifer (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1986) y las posibilidades de identificación y discriminación a partir de las pruebas anteriores, considerando la prueba positiva como 1, como 0 la negativa y en el caso de las tardías, débiles o no discriminatorias, ambos (tanto 0 como 1), se elaboró una base de datos (Microsoft Access 2.0) relacionando cada especie con sus posibles códigos de identificación (**Apéndice M03**).

De esta manera, obtenido el código de catorce dígitos (**Tabla M01**) de un aislado a partir de los resultados de las pruebas de identificación, se procedía a una consulta informática de los 246 códigos presentes en la base de datos, permitiéndose adjudicar la especie con rapidez y eficacia.

Tioglicolato	Voges-Proskauer	Xilosa	Sacarosa	Maltosa	Manitol	Manosa	Trehalosa	Lactosa	Nitratos	Fosfatasa	Coagulasa	DNAsa	Novobiocina

Tabla M01. Orden de codificación para la identificación

En un número reducido de casos en los que un mismo código podía corresponder a dos o más especies, se establecieron una serie de pruebas accesorias para permitir la discriminación entre ellas.

1.1.3.- Fagotipado de las cepas de *S. aureus*

Las 98 cepas de *S. aureus* estudiadas fueron sometidas a fagotipado utilizando un juego de 19 bacteriófagos (**Tabla M02**), proporcionados amablemente por la Dra. Ana Vindel, del Instituto de Salud Carlos III, así como 3 fagos adicionales aislados por nosotros de cepas ovinas de *S. aureus*.

Este juego básico se corresponde con el suministrado por el “Laboratorio Internacional de Referencia de Fagotipia”, de Colindale (R.U.), y consta de 23 fagos.

Tabla M02. Set básico de fagos y cepas propagadoras

Bacteriófago	Cepa propagadora	Grupo fágico
3 A	3 A	II
3C	3C	II
6	6	III
29	29	I
42E	42E	III
47	47	III
52	52	I
52 A	52 A	I
53	53	III
54	54	III
55	55	II
71	71	II
75	75	III
77	77	III
79	52 A	I
80	80	I
81	81	Sin agrupar
83 A	83 A	III
84	84	III
85	85	III
94	94	IV
95	95	Sin agrupar
96	96	IV
-	1030	-
-	W57	-
-	18042	-
-	2009	-

Además de los fagos, se trabajó con las cepas propagadoras de los mismos (**Apéndice M01**), designadas con el mismo número que los fagos salvo la cepa 52A/79, que se emplea para la propagación tanto del fago 52A como del 79.

Se emplearon como cepas control cuatro cepas de estafilococos cuyos fagotipos son conocidos: las cepas W57, 1030, 2009 y 18042.

1.1.3.1.- Preparación de los fagos

1.1.3.1.1.- Determinación de la RTD (dilución de rutina, *Routine Test Dilution*)

Una vez recibidos los fagos y sus cepas propagadoras, se procedió a recomprobar la RTD, titulándolos sobre su cepa propagadora. Para ello, se preparaba un cultivo joven de la cepa propagadora sobre caldo nutritivo incubado a 37°C, en agitación durante 4 horas. Transcurrido ese periodo, se inundaba una placa de agar nutritivo con iones (**Apéndice M02**) con 3 ml de dicho cultivo, retirándose el exceso de líquido mediante una pipeta Pasteur estéril.

Una vez que la placa inoculada estaba seca, se depositaban sobre ella gotas de 15 µl correspondientes a diluciones crecientes del fago a titular, desde 10⁻¹ a 10⁻⁷.

Después de incubar 18 horas a 30°C, se procedía a la observación de la aparición de placas de lisis en los puntos de depósito de las gotas, considerándose como RTD la máxima dilución en la que apareciera lisis confluyente.

1.1.3.1.2.- Propagación de los fagos en medio sólido

En función de la RTD y de las cepas a fagotipar, teniendo en cuenta que se debe iniciar el fagotipado empleando 100 RTDs por fago, fue preciso proceder a la multiplicación de alguno de los recibidos.

Se utilizó el método del agar semisólido descrito por Swastrom y Adams en 1951 (Dra. Vindel, comunicación personal), mezclando en tubos atemperados a 45°C las siguientes cantidades y productos:

- 3 ml de agar semisólido (**Apéndice M02**)
- 0,3 ml de un cultivo de 4 horas de la cepa propagadora en caldo nutritivo
- 0,3 ml del fago diluido en caldo nutritivo a su RTD
- 0,25 ml de Cl₂Ca al 1%

La mezcla resultante se depositaba sobre placas de agar nutritivo de 9 cm de diámetro y se incubaba a 30°C durante 18 horas. Después de la incubación, se arrastraba la

capa de agar semisólido con 3 ml de caldo nutritivo, igualmente ayudándonos de un hisopo estéril y aspirando con una pipeta estéril.

Esta suspensión se centrifugó a 5.000 rpm a 4°C en una centrífuga “Hettich Universal 30 RF”, se decantó y se filtró a través de filtros de 0,22 µm de diámetro, titulándose de nuevo sobre su cepa propagadora y desechando aquéllas de título bajo, conservando sólo las suspensiones restantes a 4°C, hasta su uso.

1.1.3.2.- Aislamiento de fagos de origen ovino

Puesto que ciertas cepas de *S. aureus* de origen ovino mostraron placas de lisis de forma espontánea tras sembrarse sobre agar nutritivo con iones, se procedió a intentar el aislamiento de dichos fagos, su multiplicación, titulación y determinación del espectro lítico.

La metodología comprendió:

1.1.3.2.1.- Aislamiento del fago a partir de una única calva.

Se se llevó a cabo con una pipeta Pasteur a modo de troquel, extrayendo la calva seleccionada con el fragmento de agar correspondiente.

1.1.3.2.2.- Multiplicación inicial

Este fragmento se utilizó como inóculo de un tubo de caldo BHI (Pronadisa) de la cepa lisógena de 4 horas de incubación. Este cultivo se dejaba incubando toda la noche a 30°C y al día siguiente se procedía a centrifugar el cultivo y filtrarlo por 0,22 µm.

1.1.3.2.3.- Estandarización de la suspensión de fago

Una vez obtenida esta suspensión inicial, se continuaba con la multiplicación y titulación habituales, como se indica en los puntos 1 y 2, hasta obtener suspensiones de título suficiente (RTD \geq 4).

1.1.3.2.4.- Determinación del espectro lítico

Conseguidas las suspensiones, se procedió a la determinación del espectro lítico de los fagos ovinos obtenidos, comprobando a RTD y 100 RTD el efecto que causaban sobre las cepas propagadoras y de control del juego de fagos, comparado simultáneamente con el que causaban sobre las cepas propagadoras propias. Este estudio se realizó en dos fases, utilizando las cepas propagadoras disponibles así como las propias, en conjunto, un total de

30 cepas. En una primera fase, se comprobó a 100 RTD y RTD cada uno de los fagos hallados sobre las cepas antedichas. En la segunda fase se seleccionaron aquellas cepas sobre las que los fagos ovinos mostraron algún tipo de actividad y se llevó a cabo una titulación (10^0 a 10^{-7}) sobre ellas, a la vez que se retitulaban en las cepas propagadoras iniciales de los fagos.

1.1.3.3.- Fagotipado

Cada cepa de prueba se inoculó en un tubo conteniendo 3 ml de caldo nutritivo que se incubó a 37°C en agitación durante 4 horas.

Posteriormente, se sembraron con el cultivo dos placas de agar nutritivo con iones (secadas previamente bajo flujo laminar) por inundación y se retiró el exceso de líquido mediante pipeta estéril. Una vez secas las placas, se colocaban sobre ellas, a intervalos regulares, gotas de 15 µl conteniendo 100 RTD de cada uno de los fagos utilizados. Las placas se dejaban secar hasta la desaparición de las gotas depositadas para ser incubadas después durante 18 horas a 30°C.

Tras la incubación, se observaban las placas inoculadas en busca de placas de lisis, anotando los resultados obtenidos de cada cepa de prueba frente a los fagos empleados.

En aquellas cepas en las que alguno de los fagos utilizados a 100 RTD presentó lisis, se procedió a comprobar el efecto de una RTD.

1.2.- Otras cepas empleadas

Aparte de las cepas aisladas e identificadas para este estudio, ha sido preciso utilizar 40 cepas tipo o de referencia, procedentes de diversos orígenes (Apéndice M01).

En este apartado se incluyen:

- 7 cepas tipo de *S. aureus* capsuladas,
- 27 cepas propagadoras y control de los fagos de *S. aureus*,
- 1 cepa de *Cellulomonas fimi*, cepa indicadora para las pruebas de producción de bacteriocinas,
- 3 cepas de *S. aureus* positivas a factores de adherencia utilizadas como control en las PCR y
- 2 cepas tipo, controles positivo y negativo de *S. epidermidis*, para las pruebas de *slime*.

2.- Estudio de factores de virulencia

Una vez caracterizadas las cepas objeto de esta Tesis Doctoral, se procedió a llevar a cabo el estudio de una serie de factores de virulencia, tanto de expresados a nivel de superficie como de otro tipo.

2.1.- Factores de superficie

La superficie bacteriana es el primer nivel estructural de la bacteria en interactuar con el medio ambiente y, en su caso, con el hospedador y su sistema defensivo, por lo que de sus características puede depender la capacidad de supervivencia del microorganismo un medio en particular.

En este capítulo se describen una serie de pruebas que se llevaron a cabo con el fin de detectar y cuantificar (caso de que fuera posible), estructuras de superficie como las integradas mayoritariamente por polisacáridos (*slime*, cápsula) y también aquellas otras que fueron llevadas a cabo para cuantificar la hidrofobicidad bacteriana. La suma de las determinaciones anteriores fue integrada en la denominación genérica de “factores de superficie”.

Además, se llevaron a cabo comparaciones entre varios sistemas de ejecución de las técnicas y también entre distintos métodos para comprobar la utilidad de cada uno de ellos.

2.1.1.- Cápsula. Detección y serotipificación de cepas capsuladas

La presencia de cápsula, entendida como una capa de polisacáridos bien organizada, fijada a la pared celular que rodea completamente a la bacteria, es una estructura que confiere resistencia a la fagocitosis y, por tanto, un factor de virulencia.

En este estudio se ha determinado la presencia de cápsula en cepas de *S. aureus* mediante dos técnicas clásicas; por un lado, la detección de la presencia de *clumping factor* y la aparición de crecimiento difuso en agar *blando* suero (*Serum Soft Agar*, SSA), por otro.

Para el tipado capsular de las cepas de *S. aureus* se emplearon también dos aproximaciones diferentes; una mediante la utilización de sueros hiperinmunes (serotipado) y otra, utilizando técnicas de biología molecular (detección y tipado):

- Previa obtención de sueros policlonales hiperinmunes en conejos frente a los polisacáridos capsulares de las cepas tipo, se utilizó la técnica del agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) según el método descrito en 1971 por Yoshida.
- Se adaptó para este propósito (detección y tipado capsular) y se puso a punto una reacción de PCR múltiple para los serotipos capsulares, cuyos genes correspondientes habían sido secuenciados en el momento de efectuar este estudio (Sau *et al.*, 1997; Luong *et al.*, 2002b; Salasia *et al.*, 2004).

2.1.1.1- Detección de la cápsula

2.1.1.1.1.- Presencia del *clumping factor*

La prueba de la presencia de *clumping factor* solamente se aplicó sobre las cepas aisladas pertenecientes a la especie *S. aureus*.

Para llevar a cabo la prueba, se preparaba una suspensión en SSF de la cepa cultivada toda la noche sobre agar base Columbia. Una gota de dicha suspensión se mezclaba con otra de plasma de conejo (bioMérieux) y se homogeneizaban mediante un asa de plástico sobre un portaobjetos. La formación de flóculos se consideró como prueba positiva.

2.1.1.1.2.- Crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*)

La prueba del agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Finkelstein y Sulkin (1958). Esta prueba fue empleada en un principio por sus autores para detectar estafilococos coagulasa positivos, aunque posteriormente se utilizó también para comprobar la presencia de cápsula en *S. aureus*. En este estudio se empleó sobre todas las cepas problema y, en el caso de las cepas de *S. aureus*, también para el serotipado capsular.

2.1.1.1.2.1.- Preparación de la prueba

Después de esterilizar el medio de cultivo (**Apéndice M02**) durante 20 minutos a 121°C, se distribuía en dos series de tubos, a razón de 10 ml de medio por tubo. A cada tubo de una de las series se le añadía un 1% de suero normal de conejo, dejando la otra serie sin suero. Ambas series se dejaban en un baño mantenido a 50°C para favorecer las mezclas posteriores.

2.1.1.1.2.2.- Siembra e incubación

El día anterior a la prueba, se sembraba un tubo de caldo BHI con cada cepa en estudio y se incubaba a 37°C durante 18 a 24 horas. El día de la prueba se sembraban 50 µl de una dilución 10⁻⁶ del caldo BHI cultivado, tanto en un tubo con suero como en otro sin suero de conejo. Los tubos se homogeneizaban a fondo y se mantenían una hora a temperatura ambiente antes de ser incubados 18 h a 37°C.

2.1.1.1.2.3.- Lectura e interpretación

Para que la prueba pueda ser interpretada fácilmente debe conseguirse una observación clara de colonias aisladas, de modo que si el crecimiento era muy denso debía repetirse la prueba. En el caso de que la cepa en estudio fuera capsulada, las colonias aparecían alargadas, con un aspecto de llama, o difuso, mientras que si no lo eran, el aspecto colonial era el denominado compacto, ya que las colonias aparecían esféricas (**Foto M01**) y claramente delimitadas. En algunos casos se podían describir aspectos pseudodifusos, en algunos casos.

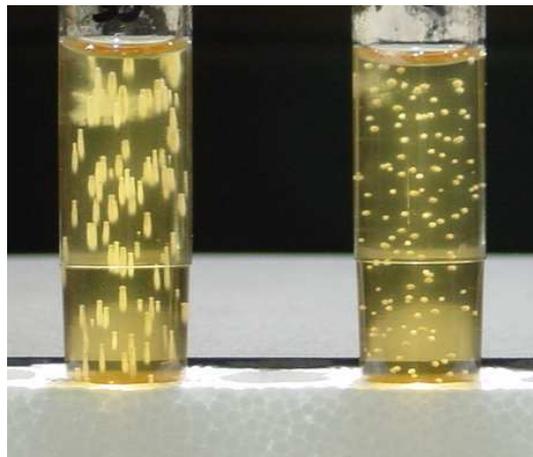


Foto M01. SSA con colonias tipo difuso (izquierda) o compactas (derecha).

2.1.1.2.- Serotipado capsular

2.1.1.2.1.- Sueros hiperinmunes

En el curso de este trabajo fue preciso la utilización de sueros hiperinmunes, que fueron producidos por nosotros en conejo frente a los polisacáridos capsulares de las cepas tipo de *S. aureus*.

La preparación de los sueros hiperinmunes se llevó a cabo utilizando como inmunógenos polisacáridos purificados de los seis serotipos capsulares de *S. aureus* más frecuentemente descritos en la bibliografía. El proceso de hiperinmunización fue seguido de la electroforesis de sueros, que se llevó a cabo a lo largo del proceso de seguimiento de la hiperinmunización de cada uno de los conejos utilizados. Finalmente, se llevó a cabo la titulación mediante la técnica del agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) y un método ELISA. Esta última determinación fue especialmente adaptada para este propósito.

2.1.1.2.1.1.- Animales de experimentación

Para la obtención de sueros hiperinmunes frente a los polisacáridos capsulares de las cepas tipo de *S. aureus* se emplearon 18 conejos albinos de cruce industrial Neozelandés-California, de 8 semanas de edad y unos 2 kg de peso al comienzo de la hiperinmunización, machos y hembras indistintamente.

Los animales se mantuvieron con pienso industrial para conejo y agua *ad libitum* en jaulas individuales y a una temperatura de entre 14 y 18°C. Los conejos, su alojamiento y manutención fueron proporcionados por la granja “La Reguera”, en Villabalter (León), por cortesía de sus propietarios. Durante todo el proceso de hiperinmunización se tuvo en cuenta la normativa vigente en cuanto a Bienestar Animal.

2.1.1.2.1.2.- Preparación de inmunógenos

2.1.1.2.1.2.1.- Método empleado para la purificación de las cápsulas de las cepas tipo

Para la producción y purificación de las cápsulas de las cepas tipo se siguió básicamente, con pequeñas variaciones, el método de Fournier *et al.* (1987).

2.1.1.2.1.2.2.- Cepas empleadas

Las cepas tipo de *S. aureus* utilizadas para la purificación parcial del polisacárido capsular fueron las siguientes (**Tabla M03**).

Tabla M03. Cepas tipo de *S. aureus* utilizadas para la elaboración de los extractos capsulares.

Cepa de referencia de <i>S. aureus</i>	Serotipo capsular
<i>M</i>	1
<i>Smith (difuso)</i>	2
<i>Mardi</i>	3
<i>7007</i>	4
<i>Reynolds</i>	5
<i>Becker</i>	8

El origen de dichas cepas aparece indicado en el **Apéndice M01**.

2.1.1.2.1.2.3.- Mantenimiento de las cepas tipo (cepas de referencia)

A continuación de su recepción, las cepas se subcultivaron una sola vez por duplicado sobre agar Columbia sangre (ACS); de este modo se prevenía la pérdida de factores de superficie por el subcultivo repetido. Tras 18-24 horas de incubación a 37°C, una de las placas se utilizó para recomprobar pureza y perfil bioquímico así como para sembrar la cepa sobre los siguientes medios:

- Agar Rojo Congo (ARC), para determinar si las cepas eran formadoras o no de *slime* (Freeman *et al.*, 1989) ,
- Agar blando suero (*Serum Soft Agar*, SSA), para recomprobar su capsulación (Finkelstein y Sulkin, 1958) y
- Caldo BHI, para comprobar si eran formadoras o no de *slime* según el método de Christensen (Christensen *et al.*, 1982).

El crecimiento obtenido en la otra placa de ACS se resuspendió sobre medio de conservación (**Apéndice M02**), se homogeneizó a fondo y se prepararon alícuotas en tubos eppendorf a razón de 500 µl /tubo, que posteriormente se mantuvieron en congelación a – 80°C.

2.1.1.2.1.2.4.- Medios y condiciones de cultivo

Para el cultivo de las cepas de referencia a fin de obtener el extracto capsular correspondiente, se utilizó agar base Columbia (ABC) (Fournier *et al.*, 1987), con un 3% de NaCl, para favorecer la formación de exopolisacáridos (Yoshida y Ekstedt, 1968). El medio se distribuyó en tres frascos de Roux por cepa.

Las cepas se sembraron directamente a partir de las alícuotas diluidas al 50% con PBS estéril de pH 7,2, a razón de 3 ml por frasco de Roux, y se incubaron a $37\pm 0,2$ °C durante 48 horas.

2.1.1.2.1.2.5.- Recogida de las cepas

Las cepas cultivadas en los frascos de Roux, tras comprobar su pureza por microscopía, se recogieron por arrastre con asa estéril sobre PBS estéril, de pH 7,2.

2.1.1.2.1.2.6.- Purificación de la cápsula

La extracción y purificación de la cápsula se llevó a cabo según el esquema propuesto por Fournier *et al.* (1987), siguiendo los siguientes pasos:

1. Extracción del polisacárido capsular por calor mediante autoclavado a 121°C durante 60 minutos,
2. Separación de las células por centrifugación a 12.000 xg (en centrífuga Kubota KR-20.000T) durante 30 minutos,
3. Reextracción por calor del sedimento celular (ver 1 y 2) seguida de
4. Diálisis de los sobrenadantes frente a agua milliQ durante 48 h a 4°C.
5. Liofilización para obtener el extracto capsular crudo (en un liofilizador Virtis modelo Génesis 12LE),
6. Rehidratación del liófilo del extracto crudo en PBS a 10 mg/ml,
7. Tratamiento con proteasa (Sigma P-5147, 1 mg/ml) toda la noche a 37°C,
8. Segunda diálisis frente a agua milliQ durante 48 h a 4°C,
9. Segunda liofilización y, finalmente,
10. Rehidratación en PBS a 10 mg/ml, alicuotado y conservación a -80°C.

2.1.1.2.1.3.- Hiperinmunización

2.1.1.2.1.3.1- Inóculo

El protocolo de inoculación se elaboró y planificó siguiendo las recomendaciones de Johnston et al. (1991) para la elaboración de antisueros en conejos.

Como inóculo se empleó una emulsión conteniendo al 50% adyuvante de Freund (completo o incompleto, ver el esquema de la hiperinmunización), de Sigma, y una suspensión en PBS de pH 7,2 de una determinada cantidad de cada uno de los seis polisacáridos semipurificados. La emulsión se preparó con los ingredientes atemperados a 37°C y con la ayuda de dos jeringas de tamaño adecuado para conseguir una emulsión homogénea.

Los inóculos se prepararon de manera que en la 1ª inoculación se administraron a cada conejo 500 µg de polisacárido en adyuvante completo de Freund (ACF), mientras que para las inoculaciones 2ª y 3ª se emplearon 250 µg de polisacárido y adyuvante incompleto (AIF), finalizando con la inoculación de 1000 µg por vía endovenosa, sin adyuvante, en las inoculaciones 4ª, 5ª y 6ª. En la inoculación de cada tipo de polisacárido se utilizaron tres conejos.

2.1.1.2.1.3.2- Cronograma de las inoculaciones y sangrías

El ritmo de inoculaciones y sangrías empleado figura en la **Tabla M04**.

2.1.1.2.1.3.3- Procedimiento de inoculación

Las inoculaciones se efectuaron como sigue:

- en la primera inoculación se realizaron 6 administraciones de 0,25 ml por individuo: cuatro por vía subcutánea en la región dorso-lumbar y 2 más vía intramuscular en la zona caudal de cada uno de los muslos (músculo semitendinoso). Las inoculaciones se efectuaron con jeringas desechables de insulina de 1 ml y previo atemperamiento de las emulsiones (para favorecer su inyectabilidad y disminuir las molestias para el animal).
- en la segunda y tercera inoculaciones se administró 1 ml por conejo, distribuido en cuatro dosis subcutáneas en el dorso y
- en las inoculaciones cuarta, quinta y sexta se inyectó 0,1 ml de la suspensión del extracto en PBS vía intravenosa, administrado en la vena marginal de la oreja.

Tabla M04. Cronograma de la hiperinmunización de los conejos.

Vía	Inoculación	Volumen total	Distribución	Sangría	Observaciones
0	1 ^a	500 µg en 1,5 ml	4 x 0,25 en dorso sc 2 x 0,25 semitendinoso im	1 ^a	ACF
14	-	-	No	2 ^a	
21	2 ^a	250 µg en 1,0 ml	4 x 0,25 en dorso sc	-	AIF
28	-	-	-	3 ^a	
35	-	-	-	4 ^a	
41	3 ^a	250 µg en 1,0 ml	4 x 0,25 en dorso sc	4 ^a bis	AIF
50	-	-	-	5 ^a	
69	-	-	-	6 ^a	
76	4 ^a	1 mg en 0,1 ml iv	1 mg en 0,1 ml iv	-	en PBS
91	-	-	-	7 ^a	
97	5 ^a	1 mg en 0,1 ml iv	1 mg en 0,1 ml iv		en PBS
104	-	-	-	8 ^a	
111	6 ^a	1 mg en 0,1 ml iv	1 mg en 0,1 ml iv	9 ^a	en PBS
120	-	-	-	10 ^a	
133	-	-	-	11 ^a	
146	-	-	-	12 ^a	
160	-	-	-	13 ^a	
161	-	-	-	14 ^a	Sangría final

Leyenda: im=intramuscular, sc=subcutánea, iv=intravenosa, ACF= adyuvante completo de Freund, AIF= adyuvante incompleto de Freund.

Tras las inoculaciones subcutáneas o intramusculares, las zonas intervenidas se masajearon suavemente para favorecer la distribución del inóculo y evitar depósitos localizados que favorecieran su encapsulación.

2.1.1.2.1.3.4- Ejecución de las sangrías

Se utilizó una caja de contención especial para conejos, de manera que se sometiera a los animales al menor estrés posible y se evitaran lesiones. Las sangrías se efectuaron en la vena marginal de la oreja, empleando para ello jeringas de un solo uso de 2 ml de capacidad.

La muestras de sangre se depositaron en tubos estériles tipo “venoject”, de 5 ml de capacidad, y se trasladaron a temperatura ambiente hasta el laboratorio, tiempo suficiente para permitir la coagulación.

Una vez llegados al laboratorio, se colocaron a 4°C para favorecer la retracción del coágulo. Finalmente se centrifugaron y el suero obtenido se alicuotó y congeló por debajo de -20°C.

2.1.1.2.1.4.- Serología

El estudio de los sueros de los conejos se llevó a cabo en dos momentos: durante el proceso de hiperinmunización mediante electroforesis, y una vez finalizado, por medio del estudio de la actividad anticapsular mediante la técnica del agar blando suero (SSA) y mediante un método ELISA anticapsular. Ambas técnicas serán descritas más adelante, en las secciones correspondientes.

2.1.1.2.1.4.1.-Seguimiento del proceso de hiperinmunización mediante electroforesis

Se siguió el desarrollo del proceso de hiperinmunización mediante electroforesis de los sueros obtenidos de cada una de las sangrías. Para la electroforesis se emplearon tiras de acetato de celulosa CELLOGEL[®] y una serie de soluciones y reactivos que figuran detallados en el **Apéndice M02**.

Las muestras séricas se procesaron según el siguiente método:

Preparación y carga de la muestra

- las tiras de electroforesis se mantenían conservadas en metanol puro, por lo que antes de su utilización se lavaban en solución tampón nº1 (Biosystems) durante 10 minutos
- una vez lavadas se secaban entre papel de filtro y se colocaban en el marco de electroforesis que se colocaba seguidamente en la cubeta cargada con tampón.
- se colocaba la muestra sobre la tira, empleando el aplicador semimicro que permitía la carga de 10 µl de suero por tira de acetato de celulosa.

Electroforesis

- una vez preparada la muestra se conectaba la fuente (Electrónica Argemi, modelo EF 657 N), a 200 V durante 32 minutos.

Tinción y procesado de las tiras de electroforesis

Una vez finalizada la carrera de la muestra, se sometía a los siguientes pasos:

- tinción con colorante negro amido (Biosystems) durante 5 minutos, en agitación suave
- decoloración: 4 baños en agitación suave
- deshidratación durante un minuto, en agitación

- transparentado al calor durante 5 a 10 minutos.

Lectura de las tiras de electroforesis

La lectura de las tiras se realizó mediante el fotodensitómetro BT-506 de la firma Biotecnica (Roma) y se calcularon los porcentajes de las fracciones séricas mediante una hoja de cálculo Excel.

2.1.1.2.1.4.2.- Control de la actividad anticapsular de los sueros mediante la técnica del agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*)

Para evaluar la actividad anticapsular de los sueros hiperinmunes obtenidos se empleó la técnica de Yoshida, en 1971, basada a su vez en la prueba del agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*), método descrito por Finkelstein y Sulkin (1958). La técnica básica del SSA se encuentra descrita en la sección 2.1.1.1.2.

La determinación de la actividad de los antisueros se realizó llevando a cabo diluciones en base 2 de los sueros hiperinmunes finales hasta 1: 32. Se mezclaron 0,1 ml de cada dilución, 0,1 ml de suero normal de conejo y una dilución 10^{-6} de la cepa homóloga, origen del polisacárido empleado en la hiperinmunización, cultivada toda la noche a 37°C con 10 ml de BHI-agar blando (agar al 0,15%). La mezcla se incubó 24 h a 37°C, observándose en que dilución del suero aún se continuaba observando la morfología colonial compacta. Como control negativo se empleó un tubo de BHI-agar blando conteniendo suero normal de conejo en lugar del suero hiperinmune.

La dilución máxima de antisuero que producía tipo colonial compacto se consideró una unidad, utilizándose 2 unidades en 0,1 ml en el tipado posterior de las cepas en estudio.

2.1.1.2.1.4.3.- Seguimiento del proceso de hiperinmunización mediante un método ELISA de titulación de sueros anticapsulares

Se diseñó un método ELISA para la titulación de los sueros hiperinmunes empleados. Se partió inicialmente de lo indicado por Lee *et al.* (1985), habiéndose realizado una serie de ajustes para poner a punto la técnica.

a) Tapizado de placas

Para el tapizado de las placas de ELISA se siguió el siguiente procedimiento:

- se diluyeron los polisacáridos purificados en PBS 0,05 M, de pH 7, a razón de 20 $\mu\text{g/ml}$.
- los polisacáridos se distribuyeron a razón de 200 $\mu\text{l/pocillo}$ en placas de poliestireno de 96 pocillos POLISORB, de NUNC, y se incubaron toda la noche a 4°C.
- posteriormente, se eliminaron los polisacáridos no adsorbidos mediante vertido enérgico.
- se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS-Tween 0,05%, de pH 7,2.
- las placas se bloquearon con gelatina al 0,5% en PBS, a razón de 250 $\mu\text{l/pocillo}$.
- se incubaron 2 horas a 37°C y
- finalmente se eliminó la solución de bloqueo, se sellaron las placas y se guardaron congeladas a -80°C hasta su uso.

b).- ELISA de titulación

Para la titulación de los sueros hiperinmunes se llevó a cabo una prueba de ELISA en cuya ejecución se siguieron las etapas que se señalan a continuación:

- descongelación de las placas a temperatura ambiente,
- 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS-Tween 0,05%, de pH 7,2 ,
- dilución de los sueros con PBS normal en diluciones dobles seriadas,
- distribución de los sueros a razón de 200 $\mu\text{l/pocillo}$, incluyendo el negativo (suero negativo) y el blanco (PBS de dilución),
- incubación de las placas durante 45 minutos a 37°C,
- decantación y lavado (x3) durante 3 minutos, con PBS-Tween 0,05%, de pH 7,2
- adición del conjugado (Ig de cabra anti Ig de conejo, Sigma, diluido 1:50.000),
- incubación de las placas durante 45 minutos a 37°C,
- lavado (x3) durante 3 minutos con PBS-Tween 0,05% de pH 7,2,
- adición del sustrato a razón de 100 $\mu\text{l/pocillo}$ (*O*-fenilendiamina, 0,4 mg/ml en tampón citrato de pH 5,2 con un 0,03% de peróxido de hidrógeno).

- incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos,
- frenado de la reacción con HCl 3 N a razón de 50 µl/pocillo y
- lectura en un lector de ELISA (MRX de Dynex Technologies) a 490 nm.

Interpretación: se consideraba como positiva cualquier densidad óptica (DO) mayor o igual a la media de los sueros negativos más dos veces su desviación estándar.

2.1.1.2.2.- Serotipado capsular de *S. aureus* mediante la técnica del agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*).

El método de Yoshida (1971) se basa en que el uso de un suero anticapsular provoca que las cepas capsuladas homólogas aparezcan con morfología compacta en el SSA, permaneciendo difusas con el suero normal de conejo.

Esta prueba sólo se efectuó con las cepas de *S. aureus* que presentaban un crecimiento difuso (es decir, que estaban capsuladas) en la técnica normal del SSA.

2.1.1.2.1.1.- Preparación de la prueba

Los antisueros producidos mediante el proceso de hiperinmunización se titularon previamente frente a su cepa homóloga. Para la titulación se siguió el método descrito por Yoshida (1971): se practicaron diluciones en base 2 de los sueros hasta 1:32. Se mezcló 0,1 ml de cada dilución, suero normal de conejo y una dilución 10^{-6} de la cepa capsulada tipo, homóloga, cultivada toda la noche a 37°C, con 10 ml de BHI-agar blando. La mezcla se incubó 24 horas a 37°C. La dilución mínima de antisuero que producía tipo colonial compacto se consideró una unidad, utilizándose 2 unidades en 0,1 ml, en el tipado.

2.1.1.2.1.2.- Siembra e incubación

Se mezclaron 2 unidades en 0,1 ml de antisuero, 0,1 ml de suero normal de conejo y de una dilución 10^{-6} de la cepa cultivada 18 h a 37°C con 10 ml de BHI-agar blando (agar al 0.15%) para cada uno de los serotipos capsulares en estudio (1, 2, 3, 4, 5 y 8). Se utilizó suero normal de conejo como control. Las mezclas se incubaron 24 horas a 37°C.

2.1.1.2.1.3.- Lectura e interpretación

Las cepas que pasan de difusas a compactas se consideran del mismo serotipo que el antisuero empleado.

2.1.1.2.3.- Serotipado capsular de *S. aureus* mediante ELISA

Se intentó llevar a cabo el serotipado capsular de las cepas de *S. aureus* mediante la técnica ELISA de doble placa empleada por Poutrel *et al.* en 1988, tanto directamente con los sueros hiperinmunes como tratándolos según el método de Mittal *et al.* (1982) para eliminar inespecificidades.

2.1.1.2.3.1.- Tratamiento de los sueros hiperinmunes para el ELISA de doble placa

2.1.1.2.3.1.1.- Preparación de las cepas

- Cultivar las cepas en agar Columbia a 37°C durante 18 horas.
- Recoger el crecimiento arrastrado con 3 ml de PBS por placa.
- Añadir 3 gotas de formol al 40%.
- Centrifugar a 3000 rpm 10 minutos a 4°C.
- Eliminar sobrenadante.

2.1.1.2.3.1.2.- Tratamiento de los sueros

- Se elaboraron con los precipitados las siguientes mezclas para añadir a los sueros hiperinmunes:

Mezcla n°	Serotipos bacterianos presentes	Mezclar con antisuero
1	2+3+4+5+8	1
2	1+3+4+5+8	2
3	1+2+4+5+8	3
4	1+2+3+5+8	4
5	1+2+3+4+8	5
8	1+2+3+4+5	8

- Los sueros se diluyeron a 1: 50 en PBS pH 7,2 y se les añadió al 1:10 la mezcla bacteriana correspondiente.
- Se homogeneizó y se incubó a 37°C durante 2 horas
- Se centrifugaron las mezclas a 13.000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, que es el suero tratado diluído 1:10.

2.1.1.2.3.2.- ELISA de serotipado de doble placa

2.1.1.2.3.2.1- Preparación de las placas

Placas I

- se diluyeron los polisacáridos purificados en PBS 0,05 M, de pH 7, a razón de 5 µg/ml.
- los 6 tipos de polisacáridos se distribuyeron a razón de 100 µl/pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos POLISORB, de NUNC, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se preparan dos placas I, una para los polisacáridos 1, 2 y 3 y otra para los polisacáridos 4, 5 y 8. El reparto por placa era:
 - en las filas A a F los extractos de las tres cepas tipo, a la concentración indicada (en columnas impares).
 - fila G: se dispensa PBS únicamente
 - fila H: reservada para los sueros negativos de cada uno de los animales cuyos antisueros se empleen. Se tapizan 4 pocillos por polisacárido, igual a las filas A, C y E respectivamente.
- se incubaron las placas a 37°C durante una hora
- posteriormente, se eliminaron los polisacáridos no adsorbidos mediante vertido enérgico.
- se realizó 1 lavado de 30 minutos con PBS-Tween+gelatina al 0,5% de pH 7,2.
- se efectúan 3 lavados con PBS-Tween de pH 7,2, se sellan las placas y se guardaron congeladas a -80°C hasta su uso.

Placas II

- se bloquearon placas de poliestireno de 96 pocillos POLISORB, de NUNC, con gelatina al 0,5% en PBS, a razón de 250 µl/pocillo.
- se incubaron 2 horas a 37°C y
- finalmente se eliminó la solución de bloqueo por vertido enérgico
- se efectuaron 3 lavados con PBS-Tween de pH 7,2, se sellaron las placas y se guardaron congeladas a -80°C hasta su uso.

2.1.1.2.3.2.2.- ELISA de serotipado

- descongelación de las placas II a temperatura ambiente,
- 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS-Tween al 0,05%, de pH 7,2 ,
- Los pocillos de las placas II bloqueadas con gelatina recibieron 100 µl de las muestras (sobrenadantes de las bacterias autoclavadas) y 100 µl de los sueros hiperinmunes, a una concentración correspondiente a una densidad óptica (DO) a 492 nm entre 0,2-0,5 y determinada por titulación previa. Cada muestra se enfrentó a cada uno de los antisueros y se distribuyó por columnas, de manera que cada pareja de placas servía para 12 muestras.
- se incubaron a 37°C 1 hora y luego durante toda la noche, a 4°C
- se transfirieron 100 µl de las mezclas de las placas II a las filas impares de las placas I y se incubaron durante 1 hora a 37°C
- en las filas pares se colocaron los sueros anti 1, 2 y 3 (en una placa I) y 4, 5 y 8 (en la otra placa I), respectivamente, en diluciones 1:100 a 1:3200 para comprobar la titulación. En la fila H se distribuyeron los sueros negativos correspondientes a la dilución 1:100, a razón de 4 pocillos por serotipo.
- Se decantaron y lavaron (3 veces) durante 3 minutos, con PBS-Tween al 0,05%, de pH 7,2
- Se adicionó el conjugado (Ig de cabra anti Ig de conejo, Sigma, diluido 1:50.000),
- Se incubaron las placas durante 45 minutos a 37°C,
- lavado (3 veces) durante 3 minutos con PBS-Tween 0,05% de pH 7,2,
- se adicionó el sustrato a razón de 100 µl/pocillo (*O*-fenilendiamina, 0,4 mg/ml en tampón citrato de pH 5,2, con un 0,03% de peróxido de hidrógeno).
- Se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos,
- frenado de la reacción con HCl 3 N a razón de 50 µl/pocillo y
- se realizó la lectura en un lector de ELISA (MRX de Dynex Technologies) a 490 nm.

Interpretación: Se consideró un resultado positivo cualquier DO correspondiendo a un 50% de inhibición o más.

2.1.1.2.4.- Tipado mediante técnicas de PCR

2.1.1.2.4.1.- Extracción del ADN de las cepas

Para la realización de las pruebas moleculares se procedió en primer lugar a la extracción del ADN de las cepas de prueba. Para ello se utilizó el método descrito por Vancraeynest *et al.*, en 2004. Brevemente consiste en:

- sembrar las cepas por estría sobre agar base Columbia e incubar a 37°C toda la noche (18 h),
- resuspender una colonia de la cepa en 20 µl de tampón de lisis (SDS al 0,25% en NaOH 0,05N),
- calentar a 95°C durante 5 minutos,
- enfriar sobre hielo y diluir con 180 µl de agua destilada,
- centrifugar 10 minutos a 16.000 xg y finalmente,
- recoger el sobrenadante y congelar a -20°C hasta su uso.

2.1.1.2.4.2.- Determinación de los serotipos capsulares 1, 5 y 8

Estas pruebas se llevaron a cabo exclusivamente sobre las cepas previamente identificadas como *S. aureus*.

a) Selección y diseño de los cebadores (*primers*) para las PCR

Para la determinación molecular de los serotipos capsulares 1, 5 y 8 se estudió la presencia de los genes capsulares específicos *cap1H*, *cap5H* y *cap8H* en las cepas aisladas y previamente identificadas como *S. aureus*.

Inicialmente, se probaron los cebadores descritos por Salasia *et al.*, en 2004. Se llevó a cabo el diseño de nuevos *primers* sobre la base, además, de los trabajos de Luong *et al.*, (2002b -serotipo 1-), y de Sau *et al.*, (1996, 1997 -serotipos 5 y 8-), definiendo una pareja de cebadores para el serotipo capsular 1, un cebador común de extremo 5' para los serotipos 5 y 8 y ocho cebadores más para los extremos 3' de dichos serotipos, basándonos en las secuencias de las cepas de referencia publicadas (**Apéndice M04**) y empleando el programa informático *on line Primer3* para el diseño.

Los cebadores utilizados fueron los que figuran en la **Tabla M05**.

b) Selección de los cebadores (primers) óptimos

Para la selección de los cebadores más adecuados, se procedió a comprobar su capacidad de hibridación empleando la correspondiente cepa homóloga como ADN molde. La PCR empleada era:

<u>Mezcla de reacción (Salasia <i>et al.</i>, 2004):</u>	(μ l)
Volumen total:	30,0
Primer 1 (10 pmoles)	1,0
Primer 2 (10 pmoles)	1,0
dNTPs (10 mM de cada)	0,6
Tampón termofílico 10x	3,0
MgCl ₂ (50 mM)	1,8
Taq (Biotools 5 U/ μ l)	0,1
Agua MQ	20,0
ADN muestra	2,5

Tabla M05. Cebadores de genes capsulares de *S. aureus* utilizados en este estudio

Ex	nombre	Secuencia	Referencia
Serotipo 1			
5'	cap1-5	AAGGGGCGAATTAGATGATG	Este estudio
3'	cap1-3	TGAATGAACCTACCGACATAAA	
Serotipo 5			
5'	cap5-5	ATGACGATGAGGATAGCG	Salasia <i>et al.</i>
3'	cap5-3	CTCGGATAACACCTGTTGC	
5'	cap58G	TTTGAAGTTCCTGGTGTCC	Este estudio, extremo 5' común a los serotipos 5 y 8
3'	cap5H	TGTTGTACGGCTTGGTTGG	Este estudio
3'	cap5H1	TTGTTGTACGGCTTGGTTGG	
3'	cap5H2	ATTGTTGTACGGCTTGGTTGG	
3'	cap5H3	GTTGTACGGCTTGGTTGG	

2.1.2.- *Slime*. Detección de cepas productoras de *slime*

El mucus o *slime* es una matriz de polisacáridos que se forma en el exterior de las células de algunas cepas bacterianas, entre las que se encuentran cepas de estafilococos. Esta matriz se produce bajo ciertas condiciones de cultivo y favorece la adherencia de las bacterias a las superficies.

En este trabajo se ha procedido a estudiar varios métodos de detección de *slime*, empleando dos técnicas de cultivo: el método de Christensen y el agar Rojo Congo.

2.1.2.1.- Método de Christensen

En este método se detecta la adherencia de la cepa en estudio mediante la observación, tras la tinción, de los depósitos bacterianos originados en tubos de un medio líquido incubados durante 48 horas en estático. Tras la incubación se procedía a teñir los cúmulos bacterianos que se habían producido en las paredes de los tubos de ensayo, de manera que se asociaba una mayor intensidad o extensión del cúmulo (**Foto M02**) con una mayor capacidad de adherencia de la cepa a superficies inertes.

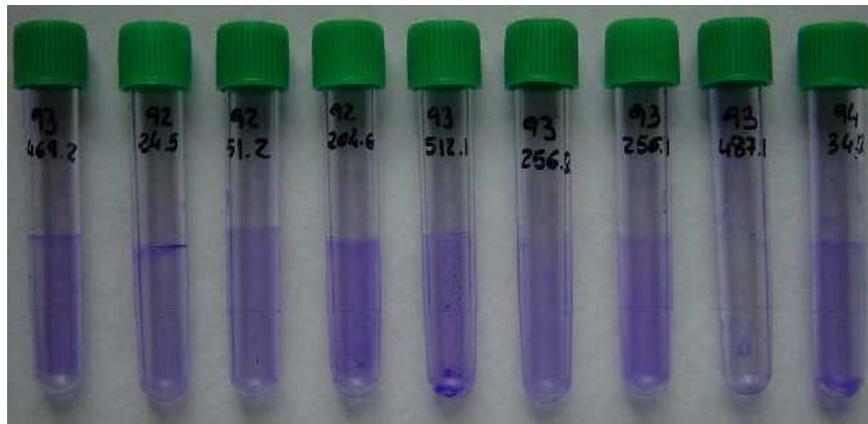


Foto M02. Prueba de Christensen sobre varias cepas.

A partir del método descrito originalmente por Christensen *et al.* (1982) han surgido una serie de variaciones en cuanto al medio de cultivo y el colorante a emplear. Por tanto, antes de proceder a utilizar el método en todas las cepas del estudio, llevamos a cabo una puesta a punto, comparando algunas de las variantes que aparecían en la bibliografía.

Para ello, seleccionamos 8 cepas de prueba que representaban las tres especies más frecuentemente aisladas en nuestro estudio (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. xylosus*) y que

eran o no productoras de *slime* o capsuladas (*S. aureus*), según los resultados de las pruebas preliminares realizadas (**Apéndice M01**).

2.1.2.1.1.- Puesta a punto del método

Se comparó la influencia en los resultados y la facilidad de lectura de la prueba del medio de cultivo utilizado, o bien del tipo de colorante utilizado, para teñir el crecimiento bacteriano adherido a las paredes del tubo.

2.1.2.1.1.1.- Medio de cultivo

Para la realización de la prueba se emplearon tubos de ensayo con 10 ml de los siguientes caldos: TSB, BHI o bien (**Apéndice M02**) el medio sintético HHW (Hussain *et al.*, 1991), desarrollado por sus autores para inducir la producción de *slime*, que se incubaron 48 horas, en estático, a 37°C.

2.1.2.1.1.2.- Comparación del *slime* presente

Se sembró cada una de las cepas seleccionadas para las pruebas iniciales de factores de superficie en tubos de vidrio conteniendo 10 ml de cada uno de los tres caldos. Una vez sembradas y homogeneizadas, se incubaron durante 48 horas, en estático, a 37°C. Transcurrida la incubación, el caldo se eliminó por decantación y se tiñó el interior de los tubos con tripán azul al 0,4%, rotándolos manualmente durante 1 minuto para permitir la tinción de todo el material presente, adherido a las paredes o al fondo. El exceso de colorante se eliminó por decantación y los tubos se secaron abiertos e invertidos en estufa de 37°C, toda la noche. Se evaluó visualmente el *slime* teñido.

2.1.2.1.1.3.- Estudio del crecimiento de las cepas tipo en cada uno de los caldos de prueba.

Para evitar que las posibles diferencias observadas entre los medios líquidos, en cuanto a la cantidad de *slime* formado, se debieran a diferencias en el crecimiento obtenido en cada uno de los caldos, se estudió éste en estático, a 37°C, de cada una de las cepas de prueba, sobre los tres medios de cultivo.

Método:

- se cultivaba cada una de las cepas durante 18 horas en estático, en un tubo de BHI.

- se homogeneizaba a fondo el tubo y se sembraban tres tubos, conteniendo 10 ml de cada uno de los caldos de prueba, con 0,2 ml del crecimiento obtenido (inóculo del 2%).
- se efectuaba una lectura, por espectrofotometría, de la DO de partida de cada tubo, a 450 nm (hora 0).
- se llevaban a cabo lecturas de las DO a las 22 y 46-47 horas de cultivo, en estático, a 37°C.

2.1.2.1.1.4.- Colorante utilizado

Puesto que varios autores han aconsejado emplear varias soluciones colorantes para la tinción del *slime* formado en las paredes de los tubos, procedimos a comprobar su uso comparando la facilidad de lectura visual de las cepas seleccionadas.

Para ello, se sembraron tres tubos de BHI por cepa y, tras homogeneizarlos, se incubaron en estático, durante 48 h a 37°C. Transcurrida la incubación, se eliminaron los caldos con crecimiento visible, se lavaron con PBS y se tiñó un tubo de cada cepa durante 15 minutos con cada uno de los siguientes colorantes: safranina al 5%, tripán azul al 0,4% ó cristal violeta al 2% (**Apéndice M02**). Posteriormente, se lavaron los tubos con agua destilada y se secaron en estufa.

Una vez secos, se realizó una lectura visual de los resultados obtenidos.

2.1.2.1.1.5.- Método final empleado

Siembra e incubación: Las cepas se cultivaron sobre caldo BHI en estático, durante 48 horas a 37° C.

Lectura e interpretación: Transcurrida la incubación, se eliminaba el cultivo por decantación, se lavaba con PBS pH 7,2 y posteriormente se añadía 1 ml de solución de cristal violeta al 2%, a la vez que se rotaba el tubo para cubrir con el colorante toda la pared. Los tubos se dejaban en reposo durante 15 minutos, se lavaban con agua destilada y se colocaban invertidos sobre un material absorbente, dejándose secar 8 horas a 37°C.

En la lectura visual del depósito existente se valoró su abundancia entre un valor de 0 a 3 y a tres alturas del tubo: superficie, pared y fondo. Se consideró una cepa como productora de *slime* si su puntuación total era igual o superior a 6.

2.1.2.2.- Agar Rojo Congo (ARC)

El medio agar rojo congo utilizado está basado en el desarrollado por Freeman *et al.* en 1989. Los autores emplearon este medio únicamente con cepas de estafilococos coagulasa negativos (SCN) de origen humano, para intentar detectar la formación de *slime* y distinguir cepas productoras de no productoras. En nuestro caso, el ARC se probó con todas las cepas estudiadas, con el propósito de observar su aplicabilidad a otras especies de estafilococos.

Por otro lado, debido a los resultados iniciales que se obtuvieron con las pruebas iniciales, en las que se compararon los resultados obtenidos con este medio con los conseguidos con el método clásico de detección de la formación de *slime*, el de Christensen, se decidió llevar a cabo una serie de pruebas para determinar la composición y condiciones de incubación óptimas del ARC. El método original de utilización de ARC fue:

Siembra e incubación: Sobre placas de ARC (**Apéndice M02**) se realizaba una siembra de la cepa en estudio por agotamiento, incubándose 24 h, a 37°C. Posteriormente, se volvía a incubar durante un nuevo periodo de 24 h a temperatura ambiente.

Lectura e interpretación: Los autores consideraban únicamente como positivas (es decir, productoras de *slime*) las cepas cuyas colonias eran negras y de aspecto cristalino (**Foto M03**), mientras que consideraban:



Foto M03. Colonias negras de aspecto cristalino sobre agar Rojo Congo. Cepa 93/251.02, *S. aureus*, *slime* positiva.

negativas las que presentaban colonias rojas (**Foto M04**),

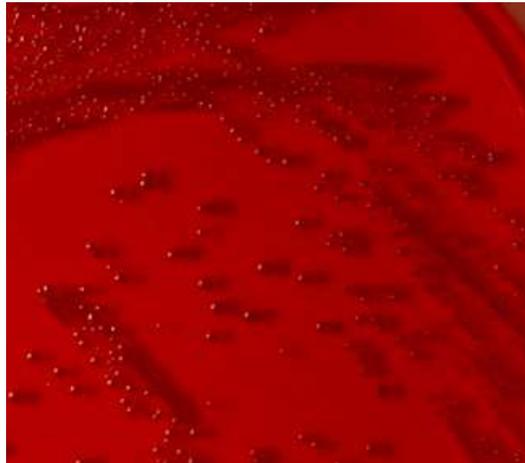


Foto M04. Colonias rojas en agar Rojo Congo. Cepa 92/047.11, *S. epidermidis* slime negativa.

e intermedias las que daban lugar a colonias de centro negro (**Foto M05**).

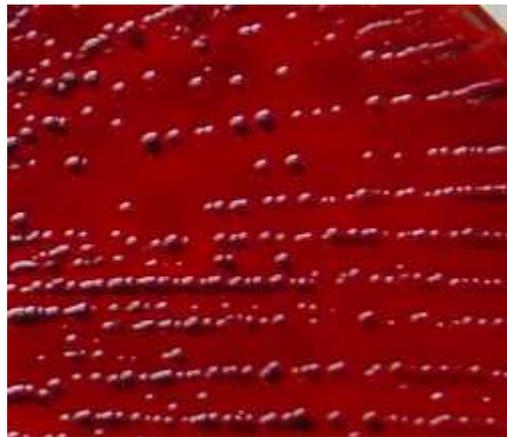


Foto M05. Colonias con el centro negro, sobre agar Rojo Congo. Cepa 92/204.6, *S. aureus*, slime intermedia.

Teniendo en cuenta que al emplear el medio con otras especies de estafilococos, los resultados que se iban obteniendo con las cepas de este estudio mostraban otros tipos de colonia (**Foto M06**), consideramos los siguientes aspectos fenotípicos:

- Color: negro, rojo, gris o marrón;
- Brillo de la superficie: brillante o mate;
- Superficie : lisa o rugosa;
- Consistencia: blanda o seca (cristalina);
- Precipitado: presencia o ausencia.

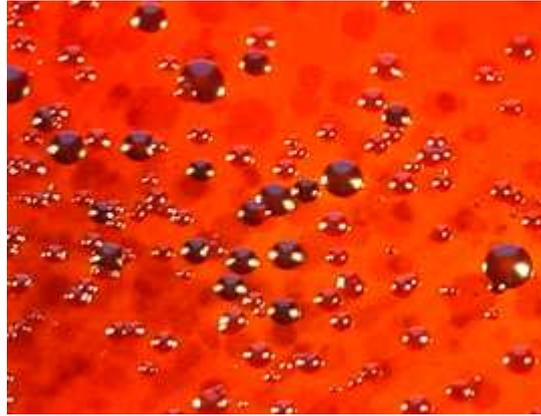


Foto M06. Colonias con apariencia diferente a las clásicas, sobre agar Rojo Congo.

Dado que los resultados obtenidos en las pruebas preliminares fueron diferentes en algunos casos, y más variados que los descritos originalmente por los autores en otros (**Foto M06**), procedimos a comprobar la influencia de distintos factores sobre el aspecto:

2.1.2.2.1.- Influencia del método de esterilización del medio y el colorante

Para comprobar la posible influencia del método de esterilización del colorante en los resultados obtenidos con este medio, se realizaron las siguientes pruebas en las que se comparó:

2.1.2.2.1.1.- Medio y colorante esterilizados simultáneamente en autoclave

2.1.2.2.1.2.- Medio y colorante esterilizados en autoclave por separado, y mezclados asépticamente

2.1.2.2.1.3.- Medio esterilizado en autoclave, y colorante esterilizado por filtración

2.1.2.2.2.- Influencia de la composición del medio base (Apéndice M02)

2.1.2.2.2.1.- Procedencia de las materias primas:

Puesto que existen bastantes referencias de la influencia de diversos factores del medio de cultivo, que condicionan considerablemente la aparición o no de *slime*, se probó a modificar dos componentes del medio, para observar si había diferencia en el aspecto de las colonias, considerando:

2.1.2.2.2.1.1.- Medio con la composición clásica.

2.1.2.2.2.1.2.- Medio con la composición modificada.

En este último medio se había modificado el agar y la base del caldo o infusión utilizados, manteniéndose las proporciones del artículo original.

Para el desarrollo de esta prueba se prepararon y esterilizaron simultáneamente ambos medios con el colorante incluido. Tras la esterilización en autoclave, se prepararon placas de ambos medios, en las que se sembraron 8 cepas de estafilococos seleccionadas por sus características, que fueron incubadas a 37°C, anotando el aspecto de las colonias obtenido a las 24 y 48 horas.

2.1.2.2.2.2.- Proporción de colorante Rojo Congo.

Puesto que en el mercado se comercializa el colorante con una riqueza del 50% y del 75% pero en el artículo original no se especificaba la riqueza del colorante utilizado, se investigaron ambos supuestos a partir del medio clásico considerando que la proporción normal correspondiera a una riqueza del 50% y otro medio con un 25% más de colorante para alcanzar una riqueza teórica del 75% [medio al 0,08% (original) y medio al 0,12%].

2.1.2.2.3.- Duración y temperatura de incubación

Se valoró también la influencia del tiempo y temperatura de incubación, comparando el aspecto de las colonias (sobre el mismo medio de cultivo) de cepas seleccionadas. Las lecturas se efectuaron a las 24 h de incubación a 37°C (Freeman *et al.*, 1989) y en una segunda lectura, después de 24 h a temperatura ambiente (48 h totales) (Arciola *et al.*, 2001).

2.1.3.- Hidrofobicidad. Medida de la hidrofobicidad

La capacidad de adherencia de un microorganismo es la primera fase imprescindible de la infección. La adherencia de los microorganismos patógenos a las células del hospedador implica la existencia de adhesinas y receptores específicos completándose la unión por la intervención de mecanismos inespecíficos de tipo físico-químico, que en último extremo determinan una unión de carácter irreversible. En este sentido, las cargas eléctricas y la hidrofobicidad de las paredes bacterianas, desempeñan un papel relevante (Beck *et al.*, 1988a,b).

Para la determinación de la hidrofobicidad bacteriana se han empleado diversas metodologías, entre las que se incluyen la medida de la misma mediante el empleo de compuestos orgánicos o de soluciones de sales.

2.1.3.1.- Cálculo de la hidrofobicidad mediante el uso de *p*-xileno

Siguiendo el método de Hogt *et al.* (1983), se utilizó la aparente propiedad de las cepas productoras de exopolisacáridos de ser más hidrofóbicas que las cepas no recubiertas y de tener, por tanto, más afinidad por los compuestos orgánicos como el *p*-xileno, lo que permite calcular su índice de hidrofobicidad.

El método empleado es como sigue:

2.1.3.1.1.- Preparación de las cepas

Con el fin de conocer la posible influencia de la fase de crecimiento o el subcultivo en los resultados de la hidrofobicidad (Ljungh *et al.*, 1985; Rozgonyi *et al.*, 1985; Beck *et al.*, 1988a), se llevaron a cabo una serie de determinaciones preliminares para fijar las mejores condiciones de cultivo en el estudio de la hidrofobicidad.

Se aplicaron tres modalidades de cultivo:

- a) en BHI (Oxoid), durante 24 horas,
- b) en BHI (Oxoid), durante 48 horas, o
- c) mediante el subcultivo repetido (2 veces) en agar Columbia con sangre de cordero.

A partir de este punto, se resuspendió el crecimiento en PBS desde medio sólido y luego se recogió por centrifugación (Hoght *et al.*, 1983, modificado por Baselga *et al.*, 1992). Los sedimentos obtenidos se lavaron en PBS 0,02M, pH 7,2, y se resuspendieron en el mismo tampón a la concentración inicial, comprobada por espectrofotometría.

2.1.3.1.2.- Desarrollo de la prueba

En primer lugar se midió la DO a 540 nm (A_{540}) de las suspensiones bacterianas obtenidas a partir de la resuspensión del crecimiento tras el lavado.

Posteriormente se mezcló 1 ml ó 1,5 ml de las soluciones bacterianas con 0,25 ó 1 ml de *p*-xileno (Aldrich), se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar durante 10 más para permitir la separación de fases, y finalmente se midió la A_{540} de la fase acuosa.

2.1.3.1.3.- Lectura y resultados

Se calculó la hidrofobicidad (Hty) según la fórmula:

$$Hty = \left[1 - \frac{A_{540}(\text{tras el xileno})}{A_{540}(\text{antes del xileno})} \times 100 \right]$$

Las cepas se clasificaron como : 1) hidrofóbicas, si la hidrofobicidad era superior al 70%; 2) intermedias, si se encontraba entre el 40% y el 70% ó 3) hidrofílicas, si la hidrofobicidad era inferior al 40%.

2.1.3.2.- Cálculo de la hidrofobicidad mediante el uso del hexadecano

También se utilizó hexadecano para medir el grado de hidrofobicidad. Con este propósito, se siguió básicamente el método descrito por Baleona *et al.*, (2001), estudiando, como en el caso anterior, la influencia del precultivo sobre los resultados obtenidos.

Brevemente, las bacterias cultivadas en BHI o procedentes de dos países en agar Columbia con sangre de cordero se centrifugaron, a 1.000 x g durante 10 minutos, se lavaron y se resuspendieron en PBS 0,02M, de pH 7,2, hasta una densidad óptica de 0,9-1,1 a 400 nm. Dos mililitros de la suspensión se pasaron a tubos de fondo en U y se mezclaron con 0,3 ml de *n*-hexadecano (Sigma). La mezcla se homogeneizó durante 2 minutos, se dejó que la fase orgánica se separara y se determinó la DO de la fase acuosa. El porcentaje de adhesión a hidrocarburos se calculó como sigue:

$$\% = \frac{DO_{400}(\text{suspensión inicial}) - DO_{400}(\text{fase acuosa})}{DO_{400}(\text{suspensión inicial})} \times 100$$

Las cepas se clasificaron como de 1) hidrofobicidad fuerte, si el resultado obtenido era superior al 50%; 2) moderada, si se encontraba entre el 20 y el 50%; o 3) negativa, si resultaba por debajo del 20%.

2.1.4.- Determinación de la presencia de genes de factores de adherencia

La capacidad de adherencia a superficies inertes no se basa sólo en la formación de *slime* ni en la hidrofobicidad celular, sino que existen una serie amplia de factores de adherencia diversos, de manera que procedimos a llevar a cabo la detección de la presencia

en las cepas de estudio de los genes que codifican para dichos factores (los más importantes descritos hasta la fecha). Dicha detección se llevaría a cabo por técnicas de PCR.

2.1.4.1.- Selección de cebadores y diseño de las PCR

Entre los abundantes factores de adherencia de las especies *S. aureus* y *S. epidermidis* descritos en la bibliografía consultada, se seleccionaron aquéllos que podrían considerarse de mayor interés, que son, por orden alfabético del gen diana, los siguientes:

2.1.4.1.1.- Para *S. aureus* :

- gen *bap* (proteína asociada al biofilm), que codifica una proteína de 2276 aminoácidos que promueve tanto la fijación inicial como la adhesión intercelular, de interés en mastitis de varias especies, en especial en bovino (Cucarella *et al.*, 2004) que, aunque es poco frecuente, está presente en cepas muy productoras de *slime* (Cucarella *et al.*, 2001).
- gen *bbp* (proteína de unión a la sialoproteína del hueso), que se ha descrito en cepas adherentes aisladas en septicemias en la especie humana (Tristan *et al.*, 2003).
- gen *cna* (proteína de unión al colágeno), descrito en osteomielitis humanas (Hartford *et al.*, 1999).
- gen *fib* (proteína de unión al fibrinógeno), descrito en cepas de diversos procesos humanos (Tristan *et al.*, 2003).
- genes *fnbA* y *fnbB* (proteínas de unión a la fibronectina), descritos en cepas invasivas humanas (Peacock *et al.*, 2002).
- gen *icaA* (adhesina intercelular), relacionado con la presencia del operón *icaABCD* en cepas procedentes de orígenes muy variados, como por ejemplo en mastitis bovina (Vasudevan *et al.*, 2003), conejos (Vancraeynest *et al.*, 2004) y en canales de cerdo (Nitzsche *et al.*, 2007).

2.1.4.1.2.- Para *S. epidermidis*:

- gen *icaAB* o *ica ADB* (adhesina intercelular), descrito en cepas hospitalarias humanas (Barbier *et al.*, 2000; Klug *et al.*, 2003).

- gen *atlE* (unión a la vitronectina), descrito igualmente en cepas nosocomiales humanas (Barbier *et al.*, 2000; Klug *et al.*, 2003).
- gen *fbe* (unión al fibrinógeno), descrito asimismo en cepas de infecciones humanas (Klug *et al.*, 2003).

Una vez elegidos los genes de interés, para seleccionar los cebadores más apropiados se partió de los descritos para las especies *S. aureus* y *S. epidermidis*. Se efectuó un cotejado y comprobación de alineación de sus secuencias con el programa *online Blastn 2. 2. 17* (*Basic Local Alignment Search Tool* , [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov / blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) para comprobar que fueran específicas de la detección de los genes indicados en los artículos consultados.

Los cebadores que se eligieron finalmente fueron los reflejados en la tabla siguiente (**Tabla M06**) :

Tabla M06. Cebadores de genes de adhesinas utilizados en este estudio.

Gen diana	Primer	Secuencia (5'-3')	Producto (pb)	Referencia
Descritos en <i>S. aureus</i>				
<i>bap</i>	<i>bap-6m</i>	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC	971	Cucarella <i>et al.</i> Vancrayenest <i>et al.</i> Nitzsche <i>et al.</i>
	<i>bap-7c</i>	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC		
<i>bbp</i>	<i>bbp-5'</i>	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG	575	Tristan <i>et al.</i> Vancrayenest <i>et al.</i>
	<i>bbp-3'</i>	ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT		
<i>can</i>	<i>cna-5'</i>	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423	Tristan <i>et al.</i> Vancrayenest <i>et al.</i>
	<i>cna-3'</i>	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG		
<i>fib</i>	<i>FIB-1</i>	CTACAACACTACAATTGCCGTC AACAG	404	Tristan <i>et al.</i> Vancrayenest <i>et al.</i>
	<i>FIB-2</i>	GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC		
<i>fnbA</i>	<i>fnbA-5'</i>	CATAAATTGGGAGCAGCATCA	127	Vancrayenest <i>et al.</i>
	<i>fnbA-3'</i>	ATCAGCAGCTGAATTCCCATT		
<i>fnbB</i>	<i>FNBB-1</i>	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	524	Tristan <i>et al.</i> Vancrayenest <i>et al.</i>
	<i>FNBB-2</i>	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		
<i>icaA</i>	<i>icaA-5'</i>	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315	Vasudevan <i>et al.</i> Vancrayenest <i>et al.</i> Nitzsche <i>et al.</i>
	<i>icaA-3'</i>	AAGATATAGCGATAAGTGC		
Descritos en <i>S. epidermidis</i>				
<i>icaAB (ADB)</i>	<i>icaAB-F</i>	TTATCAATGCCG CAGTTGTC	546	Barbier <i>et al.</i> , Klug <i>et al.</i>
	<i>icaAB-R</i>	GTTTAACGCGAGTGCCTAT		
<i>atlE</i>	<i>atl-F</i>	CAACTGCTCAACCGAGAACA	682	Barbier <i>et al.</i> , Klug <i>et al.</i>
	<i>atl-R</i>	TTTGTAGATGTTGTGCCCA		
<i>fbe</i>	<i>fbe-F</i>	TAAACACCGACGATAATAACCAA	495	Klug <i>et al.</i>
	<i>fbe-R</i>	GGTCTAGCCTTATTTTCATATTCA		

Comprobada dicha especificidad, se procedió a realizar pruebas para poder agruparlos, en lo posible, en mezclas de PCR múltiples (*multiplex-PCR*), basándonos inicialmente en el trabajo de Barbier *et al.* (2000) y modificando las proporciones según las asociaciones de que se tratara. Para establecer estas asociaciones, se tuvo en cuenta el tamaño de los productos de PCR esperables, así como la compatibilidad de las temperaturas de anillamiento a emplear, lo que se determinó partiendo de los datos teóricos y realizando las correspondientes pruebas, incluyendo gradientes de temperatura.

Una vez agrupados los pares de *primers* en mezclas de reacción *multiplex*, y comprobando que se obtuvieran las bandas esperables, se procedió a llevar a cabo la optimización de dichas reacciones siguiendo lo recomendado sobre la aplicación del método Taguchi a las PCR por Cobb y Clarkson en 1994.

Para la realización de las PCR se utilizó un termociclador “Eppendorf”, modelo “Mastercycler gradient”.

Como programa básico partimos del publicado por Tristan *et al.* en 2003, que fuimos modificando hasta llegar a la definición del ciclo adecuado.

2.1.4.1.3.- Combinaciones y mezclas finales empleadas

2.1.4.1.3.1.- Factores *fbe*, *atlE* y *bap* (con bandas esperables de 495, 682 y 971 pb, respectivamente)

<u>Mezcla de reacción</u>	<u>(μl)</u>
Volumen total:	30,00
<i>fbe-F</i> (5 pmoles)	0,05
<i>fbe-R</i> (5 pmoles)	0,05
<i>atl-F</i> (5 pmoles)	0,05
<i>atl-R</i> (5 pmoles)	0,05
<i>bap-6m</i> (5 pmoles)	0,05
<i>bap-7c</i> (5 pmoles)	0,05
dNTPs (10 mM de cada)	0,60
Tampón termofílico 10x	3,00
MgCl ₂ (50 mM)	1,80
Taq (Biotools 5 U/ μ l, 1,25U)	0,25
Agua MQ	23,55
ADN muestra	0,50

Programa del termociclador (ciclo ADH03T)

1.- Desnaturalización inicial a 94°C	1 minuto
2.- 31 ciclos de amplificación:	
Desnaturalización inicial a 94°C	1 minuto
Anillamiento a 56°C	1 minuto
Extensión a 72°C	1 minuto
3.- Extensión final a 72°C	5 minutos

2.1.4.1.3.2.- Factores *fib* e *icaAB* (con bandas esperables de 404 y 546 pb, respectivamente)

<u>Mezcla de reacción:</u>	<u>(μl)</u>
Volumen total:	30,00
<i>FIB-1</i> (5 pmoles)	0,05
<i>FIB-2</i> (5 pmoles)	0,05
<i>icaAB-F</i> (5 pmoles)	0,05
<i>icaAB-R</i> (5 pmoles)	0,05
dNTPs (10 mM de cada)	0,60
Tampón termofílico 10x	3,00
MgCl ₂ (50 mM)	1,80
Taq (Biotools 5 U/ μ l, 1,25U)	0,25
Agua MQ	23,15
ADN muestra	1,00

Programa del termociclador (ciclo ADH07T):

1.- Desnaturalización inicial a 94°C	2 minutos
2.- 30 ciclos de amplificación:	
Desnaturalización inicial a 94°C	1 minuto
Anillamiento a 56°C	1 minuto
Extensión a 72°C	1 minuto
3.- Extensión final a 72°C	5 minutos

2.1.4.1.3.3.- Factores *cna* y *fnbB* (con bandas esperables de 473 y 524 pb respectivamente)

<u>Mezcla de reacción</u>	<u>(μl)</u>
Volumen total:	30,00
<i>cna</i> -5' (5 pmoles)	0,05
<i>cna</i> -3' (5 pmoles)	0,05
<i>FNBB-1</i> (15 pmoles)	0,15
<i>FNBB-2</i> (15 pmoles)	0,15
dNTPs (10 mM de cada)	1,20
Tampón termofílico 10x	3,00
MgCl ₂ (50 mM)	1,80
Taq (Biotools 5 U/ μ l, 1,25U)	0,25
Agua MQ	22,35
ADN muestra	1,00

Programa del termociclador (ciclo ADH17T):

1.- Desnaturalización inicial a 94°C	2 minutos
2.- 30 ciclos de amplificación:	
Desnaturalización inicial a 94°C	1 minuto
Anillamiento a 52°C	1 minuto
Extensión a 72°C	1 minuto
3.- Extensión final a 72°C	5 minutos

2.1.4.1.3.4.- Factores *fnbA*, *bbp* y *icaA* (con bandas esperables de 127, 575 y 1315 pb, respectivamente)

<u>Mezcla de reacción</u>	<u>(μl)</u>
Volumen total:	30,00
<i>fnbA</i> -5' (5 pmoles)	0,05
<i>fnbA</i> -3' (5 pmoles)	0,05
<i>bbp</i> -5' (5 pmoles)	0,05
<i>bbp</i> -3' (5 pmoles)	0,05
<i>icaA</i> -5' (5 pmoles)	0,05

<i>icaA</i> -3' (5 pmoles)	0,05
dNTPs (10 mM de cada)	0,60
Tampón termofílico 10x	3,00
MgCl ₂ (50 mM)	1,80
Taq (Biotools 5 U/μl, 1,25U)	0,25
Agua MQ	23,05
ADN muestra	1,00

Programa del termociclador (ciclo ADH18T):

1.- Desnaturalización inicial a 94°C	2 minutos
2.- 30 ciclos de amplificación:	
Desnaturalización inicial a 94°C	1 minuto
Anillamiento a 58°C	1 minuto
Extensión a 72°C	1 minuto 30 segundos
3.- Extensión final a 72°C	5 minutos

2.2.- Estudio de otros factores de virulencia

Aparte de los factores de virulencia ligados a la superficie bacteriana y a la adherencia, también se procedió al estudio de otros factores de virulencia, en particular aquellos específicos de los estafilococos diferentes de *S. aureus* así como a la producción de bacteriocinas.

2.2.1.- Pruebas de factores de virulencia de estafilococos (distintos de *S. aureus*)

Teniendo en cuenta la importancia que han adquirido últimamente los estafilococos coagulasa negativos, se procedió a estudiar en todas las cepas la presencia de una serie de factores que se han considerado factores de virulencia de los SCN (Gemmell, 1983; Ducha y Latre, 1992). Se incluyeron los siguientes:

- adherencia sobre superficies inertes (descrito previamente, sección 2.1.2.1),
- presencia de *slime* (descrito previamente, sección 2.1.2.2),
- producción de enzimas:
 - hialuronidasa
 - fibrinolisina

- DNAsa (estudiada en la fase identificación, sección 1.3)
- Fosfatasa (estudiada en la fase identificación, sección 1.3)
- Ureasa
- Gelatinasa
- Caseinasa
- Lecitinasa (*egg yolk factor*) y
- Lipasa

En dicho estudio se emplearon los siguientes métodos:

2.2.1.1- Adherencia a superficies inertes

Se realizó según el método de Christensen (sección 2.1.2.1).

2.2.1.2.- Slime

Mediante la siembra en agar Rojo Congo (sección 2.1.2.2).

2.2.1.3.- Hialuronidasa

Sobre una siembra previa de *Pasteurella multocida* tipo A capsulada (NCTC 10322) sobre agar Columbia sangre, se sembraron después las cepas problema, como puntos, y tras incubar 10 horas a 35-37°C, se observó al trasluz la formación de un halo colonial característico alrededor de las cepas de estafilococos productoras (Murray y Pearce, 1949).

2.2.1.4.- Fibrinolisina (Estafiloquinasa)

Se estudió según el método de Christie y Wilson (1941), sobre placas de agar nutritivo (Difco), adicionadas con un 12% de plasma de conejo, previamente calentado al baño maría a 56°C durante 15 minutos. Las cepas se sembraban en estrías y se incubaban a 30°C durante 48 horas.

2.2.1.5.- Ureasa

Para estudiar la producción de ureasa empleamos el método rápido en caldo (Lanyi, 1987). El medio líquido se preparó como se describe en el **Apéndice M02**.

Siembra e incubación: el medio se repartió en tubos estériles, a razón de 0,5 ml por tubo, y se sembró con un asa a partir de un cultivo líquido de 24 horas de la cepa en estudio en BHI (Pronadisa), incubándose toda la noche a 37°C.

Lectura e interpretación: la hidrólisis de la urea provocaba una modificación del pH del medio por liberación de amoníaco, lo que originaba un cambio de color del caldo, que se tornaba de un tono púrpura. Los tubos de las cepas negativas permanecían del color anaranjado inicial del medio.

2.2.1.6.- Gelatinasa (Lanyi, 1987)

Siembra e incubación: se sembraron por picadura tubos conteniendo un agar para la prueba de la gelatinasa (**Apéndice M02**) con las cepas de prueba y se incubaron durante una semana a 35-37°C.

Lectura e identificación: transcurrida la incubación, se refrigeraron los tubos de prueba junto con un tubo no inoculado, hasta que se produjo la gelificación. En ese momento, se consideró como productora de gelatinasa aquella cepa cuyo tubo permanecía líquido.

2.2.1.7.- Caseínasa

Siembra e incubación: sobre placas de agar conteniendo leche descremada se sembraron las cepas en estrías, incubando durante tres días a 35-37°C.

Lectura e interpretación: se consideraron como productoras de caseínasa aquellas cepas que presentaron un halo alrededor del crecimiento.

2.2.1.8.- Lecitinasas (*egg yolk factor*) y Lipasa (Lanyi, 1987)

Los complejos fosfolipídicos son agentes emulsionantes que aparecen en numerosos tejidos, en el suero y en la yema de huevo, siendo la lecitovitelina el ejemplo mejor conocido. Bajo la acción de la fosfolipasa bacteriana, la emulsión traslúcida de esta sustancia se torna opalescente, debido a la liberación de grasas.

Para la prueba se utilizó un agar nutritivo como medio basal al que se añadió, estando atemperado a 50°C, un 10% (v/v) de una suspensión estéril de yema de huevo (Fluka, **Apéndice M02**). Se mezcló cuidadosamente y se distribuyó en placas.

Siembra e incubación: las cepas se sembraron como estrías, a razón de un máximo de 6 por placa, y se incubaron a 37°C durante 3 días.

Lectura e interpretación:

- **Lecitinasas:** las cepas positivas aparecían rodeadas por un halo turbio.
- **Lipasa:** observadas con luz oblicua, el crecimiento de las cepas positivas aparecía con una superficie de apariencia oleosa o perlada.

2.2.2.- Detección de bacteriocinas

Siguiendo las indicaciones de De Oliveira *et al.* (1998) sobre la detección de actividad de bacteriocinas en cepas de estafilococos, procedimos a evaluar la misma en nuestros aislados, utilizando como cepa indicadora la de *Cellulomonas fimi* CECT 4283.

Brevemente, el método consiste en sembrar las cepas problema, como puntos, en placas en las que se ha sembrado previamente la cepa indicadora de *C. fimi*. Estas placas se incuban durante 48 horas a 30°C o 37°C y se procede a observar si se inhibe el crecimiento de *C. fimi* alrededor del crecimiento de las cepas problema (aparición de halo de inhibición).

Para la realización de la prueba en sí, se comparó la influencia de varios factores:

- a) Método de siembra de *C. fimi* por inundación (según lo recomendado por De Oliveira *et al.*) o en estrías densas con hisopo
- b) Temperaturas de incubación de las placas sembradas: 37-37°C, 30-30°C, 37-30°C y 30-37°C.

Una vez escogido el método que permitía la visualización óptima de los halos de inhibición, se procedió a utilizarlo con todas las cepas incluidas en el estudio.

VI.- Resultados

1.- Cepas aisladas en este estudio

1.1.- Identificación, distribución territorial y temporal de las cepas aisladas

La Tabla R01 muestra el orden de las pruebas que conforman el código de identificación utilizado para la adscripción de especie a las cepas aisladas en este estudio.

Tabla R01. Orden de las pruebas de identificación.

Tioglicolato	Voges-Proskauer	Xilosa	Sacarosa	Maltosa	Manitol	Manosa	Trehalosa	Lactosa	Nitratos	Fosfatasa	Coagulasa	DNAsa	Novobiocina
--------------	-----------------	--------	----------	---------	---------	--------	-----------	---------	----------	-----------	-----------	-------	-------------

En la Tabla R02 se encuentran las cepas aisladas con su código de identificación correspondiente.

Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio; referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen.

Referencia	Identificación	Código	Provincia
89/304.00	<i>S. aureus</i>	1101111111110	León
92/002.03	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Toledo
92/002.05	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Toledo
92/002.06	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Toledo
92/002.07	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Toledo
92/003.04	<i>S. xylosus</i>	1011111110001	Palencia
92/003.05	<i>S. xylosus</i>	1011111110001	Palencia
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Madrid
92/021.04	<i>S. aureus</i>	1101111111110	León
92/022.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011111111010	Zamora
92/024.01	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Zamora
92/024.03	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Zamora
92/024.04	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Zamora
92/024.05	<i>S. aureus</i>	1101111111110	Zamora
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	11010110011010	León
92/032.01	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	León
92/032B	<i>S. haemolyticus</i>	10011001000000	León
92/039.01	<i>S. aureus</i>	11011110111110	Zamora
92/039.02	<i>S. aureus</i>	11011110111110	Zamora
92/039.03	<i>S. aureus</i>	11011110111110	Zamora

Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio; referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen (continuación).

Referencia	Identificación	Código	Provincia
92/039.05	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/040.03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
92/040.05	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
92/040.07	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	León
92/042.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Valladolid
92/046.03	<i>S. xylosus</i>	00111111111001	Zamora
92/047.01	<i>S. xylosus</i>	00110111111001	Zamora
92/047.02	<i>S. xylosus</i>	00111111111001	Zamora
92/047.03	<i>S. xylosus</i>	00110111111001	Zamora
92/047.04	<i>S. xylosus</i>	00110111111001	Zamora
92/047.08	<i>S. epidermidis</i>	11010110011010	Zamora
92/047.11	<i>S. epidermidis</i>	11011010111001	Zamora
92/047.14	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Zamora
92/051.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/051.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/051.03	<i>S. xylosus</i>	11111111111001	Zamora
92/052.01	<i>S. aureus</i>	11010110111110	Zamora
92/052.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/052.04	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/052.05	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/052.06	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/052.08	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/062.03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
92/063.01	<i>S. epidermidis</i>	11011110111000	Zamora
92/063.04	<i>S. epidermidis</i>	11011000111000	Zamora
92/063.06	<i>S. epidermidis</i>	11011000111000	Zamora
92/063.08	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/063.10	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/063.11	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/063.12	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/063.13	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/063.14	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/063.15	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/063.16	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/063.17	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/063.19	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/063.23	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/063.30	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/063.31	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/066.02	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/066.03	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/066.04	<i>S. epidermidis</i>	10011010111010	Zamora

Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio; referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen (continuación).

Referencia	Identificación	Código	Provincia
92/066.05	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011111111010	Zamora
92/066.07	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/066.08	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/066.12	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/066.13	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/066.14	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/066.15	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/066.16	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/080.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/080.02	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/080.03	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011011111010	Zamora
92/080.05	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/080.06	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/080.07	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/080.08	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
92/080.09	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/080.10	<i>S. epidermidis</i>	11011010101000	Zamora
92/080.11	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/080.13	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/080.14	<i>S. epidermidis</i>	11011011111000	Zamora
92/094.05	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
92/094.06	<i>S. xylosus</i>	00111111111001	León
92/101.05	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
92/101.08	<i>S. simulans</i>	10010111111010	León
92/140.02	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/140.09	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/140.12	<i>S. gallinarum</i>	10111111111011	Zamora
92/140.15	<i>S. hominis</i>	00011001110010	Zamora
92/172.05	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/172.06	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/172.10	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/201.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/201.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
92/201.05	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Zamora
92/201.06	<i>S. xylosus</i>	00110111110001	Zamora
92/201.07	<i>S. xylosus</i>	10111111110001	Zamora
92/201.08	<i>S. epidermidis</i>	11011010111100	Zamora
92/201.09	<i>S. xylosus</i>	10111111110001	Zamora
92/204.06	<i>S. aureus</i>	11011110111110	Burgos
92/213.02	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/213.06	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/213.07	<i>S. epidermidis</i>	11011000111000	Zamora
92/216.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Sevilla

Resultados

Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio; referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen (continuación).

Referencia	Identificación	Código	Provincia
92/218.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Valladolid
92/225.03	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/225.06	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/225.11	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
92/225.15	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
93/096.01	<i>S. aureus</i>	11011111111010	Zamora
93/098.03	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
93/120.02	<i>S. xylosus</i>	01111011110001	León
93/129.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/160.05	<i>S. xylosus</i>	11111111111011	Zamora
93/172	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Segovia
93/215.06	<i>S. simulans</i>	10011111110000	Madrid
93/220.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Palencia
93/230.02	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Palencia
93/231.c1	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Zamora
93/231.c2	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Zamora
93/231.c3	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
93/234.01	<i>S. xylosus</i>	10111111010001	León
93/234.02	<i>S. aureus</i>	10011111110001	León
93/234.03	<i>S. xylosus</i>	10111111010001	León
93/234.04	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/234.05	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/234.08	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/234.09	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/234.11	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/234.14	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/240.01	<i>S. simulans</i>	10010101110000	Zamora
93/240.02	<i>S. epidermidis</i>	10011010111000	Zamora
93/240.03	<i>S. epidermidis</i>	10011010111000	Zamora
93/240.04	<i>S. epidermidis</i>	10011010111010	Zamora
93/240.05	<i>S. epidermidis</i>	10011010111000	Zamora
93/240.06	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011011111010	Zamora
93/240.07	<i>S. epidermidis</i>	10011010111000	Zamora
93/241.01	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
93/251.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cuenca
93/251.03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cuenca
93/251.06	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cuenca
93/256.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/256.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/256.03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/257.02	<i>S. gallinarum</i>	10111111111011	Zamora
93/257.05	<i>S. gallinarum</i>	10111111111011	Zamora
93/273.03	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Zamora

Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio; referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen (continuación).

Referencia	Identificación	Código	Provincia
93/273.04	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
93/273.05	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Zamora
93/273.06	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Zamora
93/281.00	<i>S. xylosus</i>	10111111110001	León
93/281.01	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/281.02	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/281.03	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/281.04	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	León
93/281.12	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	León
93/281.13	<i>S. simulans</i>	100101011100d0	León
93/281.18	<i>S. hyicus subesp.chromogenes</i>	10011111111010	León
93/281.19	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/281.20	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/281.21	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/283.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Palencia
93/283.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Palencia
93/285.02	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/285.05	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	León
93/285.06	<i>S. gallinarum</i>	10111111111011	León
93/285bis	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Valladolid
93/291.05	<i>S. xylosus</i>	10111111100001	Palencia
93/303.03	<i>S. xylosus</i>	10111111100001	Zamora
93/323.01	<i>S. xylosus</i>	10111111100001	Palencia
93/323.04	<i>S. xylosus</i>	10110111100001	Palencia
93/328.11	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Valladolid
93/328.13	<i>S. haemolyticus</i>	11011001110000	Valladolid
93/328.14	<i>S. epidermidis</i>	11011010111000	Valladolid
93/354.03	<i>S. epidermidis</i>	11011000111000	Burgos
93/354.06	<i>S. haemolyticus</i>	01011101110010	Burgos
93/389.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Navarra
93/406.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
93/406.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
93/406.03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
93/469.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Palencia
93/487.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
93/494.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
93/494.03	<i>S. xylosus</i>	10111111100001	Zamora
93/500.00	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
93/501.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
93/504.03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
93/506.04	<i>S. epidermidis</i>	11011010111110	Zamora
93/508.00	<i>S. xylosus</i>	01111011110001	Zamora
93/510.03	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Zamora

Resultados

Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio; referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen (continuación).

Referencia	Identificación	Código	Provincia
93/510.04	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Zamora
93/512.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
93/520.01	<i>S. xylosus</i>	00111111010001	Zamora
94/023.02	<i>S. epidermidis</i>	11011010111001	Palencia
94/023.03	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Palencia
94/024.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
94/024.04	<i>S. xylosus</i>	00111111011001	León
94/025.01	<i>S. xylosus</i>	00111111110001	Palencia
94/025.02	<i>S. xylosus</i>	10111111111001	Palencia
94/025.04	<i>S. epidermidis</i>	11011010111010	Palencia
94/032.00	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
94/034.02	<i>S. aureus</i>	11001010011110	Valladolid
94/034.05	<i>S. aureus</i>	11001010011110	Valladolid
94/092.04	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
94/092.05	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
94/093.01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
94/093.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
94/108.06	<i>S. xylosus</i>	10111111110001	Palencia
94/114.01	<i>S. gallinarum</i>	10111111111011	Zamora
94/114.02	<i>S. gallinarum</i>	00111111111011	Zamora
94/114.04	<i>S. gallinarum</i>	10111111111011	Zamora
94/143.00	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
94/165.01	<i>S. xylosus</i>	00111111011001	Palencia
94/165.02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Palencia
94/166.02	<i>S. hominis</i>	00011000110000	Zamora
94/174.01	<i>S. gallinarum</i>	10111111111001	Zamora
94/174.02	<i>S. gallinarum</i>	10111111111001	Zamora
94/175.00	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
94/177.00	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Salamanca
94/205.01	<i>S. aureus</i>	11011110111110	Burgos
94/205.02	<i>S. aureus</i>	11011110111110	Burgos
94/205.03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
S01	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cuenca
S02	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
S03	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Teruel
S04	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cuenca
S06	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cuenca
S07	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
S08	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
S09	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cáceres
S10	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Valladolid
S12	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Sevilla
S13	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora

Tabla R02. Cepas identificadas en el estudio; referencia, identificación, código de identificación y provincia de origen (continuación).

Referencia	Identificación	Código	Provincia
S14	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
S15	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
S16	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
S18	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Burgos
S19	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
S20	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León
S21	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Ávila
S22	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Cáceres
S23	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
S24	<i>S. aureus</i>	11011111111110	Zamora
S25	<i>S. aureus</i>	11011111111110	León

En el listado de las 246 cepas de estafilococos se encuentran 8 especies distintas como se resume en la **Tabla R03**, que incluye el número de cada una y su porcentaje relativo sobre el total:

Tabla R03. Resumen de las diferentes cepas de estafilococos estudiadas agrupadas por especie en orden decreciente de frecuencia.

Identificación	Nº de aislados	% sobre el total de aislados
<i>S. aureus</i>	109	44,31
<i>S. epidermidis</i>	73	29,67
<i>S. xylosus</i>	41	16,67
<i>S. gallinarum</i>	9	3,66
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	5	2,03
<i>S. simulans</i>	4	1,63
<i>S. haemolyticus</i>	3	1,22
<i>S. hominis</i>	2	0,81
Total:	246	100,00

Como puede observarse, existe un predominio de *S. aureus* sobre el resto de las especies, aunque también es importante la representación de *S. epidermidis* y *S. xylosus*, que entre ambas representan un 46,34% del total de cepas objeto del estudio.

Esta abundancia relativa de estas dos especies de SCN, se debió en parte al tipo de muestras de origen. Hay que considerar que en la época en la que se obtuvo el mayor número de muestras (1992-1994) se mantenía una relación cercana con una serie de veterinarios consultores y de ADS que manifestaban un gran interés por lograr una mejora importante en la calidad de leche, lo que les llevaba no sólo a la búsqueda de soluciones

Resultados

frente a las mastitis clínicas (básicamente debidas a *S. aureus*) sino también a las mastitis de tipo subclínico. Son precisamente este tipo de procesos los protagonizados mayoritariamente por las especies de SCN, en ocasiones aisladas también como acompañantes en otros procesos de mayor entidad clínica en los que la especie dominante es *S. aureus*; por otro lado, este mismo interés hizo que en muchos casos se analizaran muestras de más de un individuo por rebaño, lo que ocasionó el aislamiento de cepas de la misma especie en individuos diferentes pudiendo tratarse de la misma cepa.

Las cepas estudiadas corresponden a aislados llevados a cabo en 9 años no correlativos, con la siguiente distribución de número de cepas y casos por año (**Tabla R04**):

Tabla R04. Resumen de las cepas de estafilococos estudiadas, agrupadas por año de aislamiento, indicando los casos estudiados por año y los aislados obtenidos por caso.

Año	Nº casos	Nº cepas	Nº máximo de aislados por caso
1989	1	1	1
1992	29	110	16
1993	38	84	11
1994	16	29	3
2001	3	3	1
2002	2	2	1
2003	1	1	1
2004	10	10	1
2005	6	6	1

En cuanto a la distribución de cepas por año, el mayor número se concentra, en el periodo que va desde 1992 a 1994, ambos inclusive (223 cepas, el 90,6 % del total), época de una intensa colaboración con veterinarios de explotación y campo, hecho que también repercute claramente en el número de muestras y cepas aisladas por caso. Las cepas procedentes de los años 1989 y de 2001 en adelante, son aislados de *S. aureus* procedentes de casos de mamitis gangrenosa, seleccionadas especialmente para determinar su grado de capsulación, formación de *slime* y fagotipo.

Tabla R05. Resumen del origen de las cepas aisladas.

Provincia	Número de cepas	Porcentaje
Ávila	1	0,41
Burgos	15	6,10
Cáceres	2	0,81
Cuenca	6	2,44
León	51	20,73
Madrid	2	0,81
Navarra	1	0,41
Palencia	18	7,32
Salamanca	1	0,41
Segovia	1	0,41
Sevilla	2	0,81
Teruel	1	0,41
Toledo	4	1,63
Valladolid	9	3,66
Zamora	132	53,66
TOTAL	246	100,00

En lo que se refiere al origen de los aislados (**Tabla R05**), éste incluye 15 provincias, con un claro predominio de cepas procedentes de Zamora (53,66%) y León (20,73%).

La distribución de las cepas aisladas por provincias está condicionada por una serie de factores como:

- la importancia comercial de una determinada zona para el laboratorio,
- la relevancia del ovino de leche en la provincia de que se trate y
- la proximidad geográfica relativa de las explotaciones al laboratorio de análisis.

1.2.- Fagotipado de las cepas de *S. aureus*

Las cepas de *S. aureus* fueron fagotipadas con 19 fagos del set internacional y las tres cepas fágicas aisladas de las cepas propias (**Foto R01**).



Foto R01. Fagotipado a 100 RTD de la cepa S23

En la **Tabla R06** que sigue, se presentan los resultados obtenidos después de fagotipar a 100 RTD las cepas de *S. aureus*.

Tabla R06. Resultado del fagotipado a 100 RTD con las cepas del Set Internacional

Fago Cepa	3A	3C	6	29	42E	52A	53	54	55	71	75	77	79	80	81	83A	84	95	96
89/304				+		++		+	+										d
92/002.03																			
92/002.5																			
92/002.6																			
92/002.7				LC															
92/021.4																			
92/024.1				d		d					d			d	d			d	
92/024.3																			
92/024.4																			
92/024.5																			
92/039.1	d	d	LC	++	+	LC	+	+		d	++		++	+	+	d		+	d
92/039.2	d	d	++	++	d	LC	d	+			+	d	++	++	+	+		+	d

Tabla R06. Resultado del fagotipado a 100 RTD con las cepas del Set Internacional (continuación)

Fago Cepa	3A	3C	6	29	42E	52 A	53	54	55	71	75	77	79	80	81	83 A	84	95	96
92/039.3																			
92/040.3																			
92/040.5																			
92/042.1		d	++	LC	d	+	d	d		d		d	LC	++	d	+		+	+
92/051.1						+							d			d			d
92/051.2	d	d	d	+		+							+			D			
92/052.1	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC			LC	++	++	LC	LC	LC	LC	LC	LC
92/052.2																			
92/052.4																			
92/052.5						d							d						
92/052.6																			
92/052.8																			
92/062.3																			
92/063.30																			
92/063.31																			
92/066.15																			
92/080.1																			
92/080.9																			
92/080.11			+	++															
92/080.13																			
92/094.5				+															
92/172.05																			
92/172.6																			
92/172.10																			
92/201.1																			
92/201.2																			
92/204.6																			
92/216.02																			
92/218.1				d															
93/096.01																			
93/129.2																			
93/172																			
93/220.1				d		d													
93/231C.3																			
93/234.02																			
93/234.8				d		d							d						d

Tabla R06. Resultado del fagotipado a 100 RTD con las cepas del Set Internacional (continuación)

Cepa \ Fago	Fago																			
	3A	3C	6	29	42E	52 A	53	54	55	71	75	77	79	80	81	83 A	84	95	96	
S01																				
S02																				
S03																				
S04																				
S06																				
S07																				
S08																				
S09																				
S10																				
S12																				
S13																				
S14																				
S15				LCt										d					d	
S16																				
S18																				
S19																				
S20																				
S21																				
S22																				
S23	LC	LC		LCt	d									LCt	LC					LC
S24																				
S25																				

Leyenda: LC: lisis confluyente (+t=turbia), ++: 50 o más placas de lisis, +: 20-50 placas de lisis, d: menos de 20 placas, **sombreado:** sin lisis.

Una vez realizado el fagotipado a 100 RTD, se procedió a realizar el fagotipado a RTD de aquellas cepas que presentaron lisis completa al menos con uno de los fagos del *Set Internacional*.

Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente **Tabla R07**.

Resultados

Tabla R07. Resultado del fagotipado, a RTD, con el *Set Internacional* de las cepas que fueron más sensibles con 100RTD.

Fago \ Ceba	3 A	3C	6	29	42E	52 A	53	54	55	71	75	77	79	80	81	83 A	84	95	96
92/2.7																			
92/39.1																			
92/39.2																			
92/42.1																			
92/52.1	+	d	d	LCt						d				+	LCt		d		
94/24.1																			
S15																			
S23	LC	LC		LC										LC	LC				

Leyenda: LC: lisis confluyente (+t=turbia), +: 20-50 placas de lisis, d: menos de 20 placas, **sombreado:** sin lisis

Los resultados obtenidos indican que:

1.- las cepas de *S. aureus* ovinas fueron relativamente poco susceptibles a los fagos del *Set* internacional utilizados, de manera que sólo 23 mostraron algún tipo de calva a 100 RTD (**Tabla R06**), presentando sólo 9 la sensibilidad suficiente para ser comprobadas a RTD (**Tabla R07**).

Como puede observarse, de todas estas cepas, sólo dos de ellas presentaron lisis completa a RTD con fagos del *set* internacional, cepas y fagos relacionados en la **Tabla R08**.

Tabla R08. Cepas con lisis completa con los fagos del *set* internacional

<u>Ceba</u>	Susceptible a RTD a fago (fagogrupo)
92/052.1	29 (I) y 81 (sin agrupar)
S23	3 A (II), 3C (II), 29 (I), 80 (I) y 81 (sin agrupar)

2.- En el curso del estudio se detectaron cuatro cepas de *S. aureus* lisógenas que permitieron el aislamiento de tres fagos. El espectro lítico de los fagos aislados se estudió frente a las cepas lisógenas de origen, así como frente a las 27 cepas propagadoras y de prueba disponibles (**Tabla R09**).

Tabla R09. Espectro lítico de los fagos aislados.

Fago aislado	Cepas propagadoras									
	3 A	3C	6	29	42E	47	52	52 A	53	54
281		P(++)	Pt		1 2(++)					
304	Pt	Pt	Pt		P					Pt
21.4										

Fago aislado	Cepas propagadoras									
	55	71	75	77	80	81	83 A	84	85	94
281										
304							Pt		Pt	
21.4										

Fago aislado	Cepas propagadoras									
	95	96	W57	1030	2009	18042	89/304	92/21.4	93/281.21	92/39.3
281				1 2(+)			3	1 2(++)	3 4(++)	3
304			Pt	1			4 5(++)	4	3	4 5(++)
21.4							3 4(++)	3 4(++)	1	3 4(++)

Nota: en cada celda se indica el logaritmo de la dilución en la que se observa lisis total (fago sin diluir se indica con "P"). Se incluye la siguiente dilución si en ella se observan placas.

Leyenda: t=turbia (se nota la gota y diferencia con el resto del cultivo), ++: 50 o más placas de lisis, +: 20-50 placas de lisis, d: menos de 20, **sombreado:** sin lisis.

Los resultados obtenidos muestran que estos fagos presentaban poca o nula actividad sobre las cepas propagadoras de fagos de *S. aureus* de origen humano, mientras que sí actuaban sobre las cepas lisógenas de origen ovino, aunque no se tratara de la cepa de origen del fago aislado.

3.- Los tres fagos aislados se probaron a 100 RTD y a RTD sobre las cepas ovinas de *S. aureus* aisladas. Los resultados, mostrados en la **Tabla R10**, indican que los fagos ovinos fueron activos, en mayor o menor medida, sobre 68 de las 109 cepas de *S. aureus* probadas (62,38%), mientras que 31 cepas (28,44%) no resultaron susceptibles a ninguno de los tres fagos.

Tabla R10. Resultado del fagotipado a RTD y 100 RTD de las cepas problema con los fagos aislados durante este estudio.

Fago Cepa	21.4 100x	21.4 RTD	281 100x	281 RTD	304 100x	304 RTD
89/304	LC	LC	LC	LC	LC	LC
92/002.03						
92/2.5	LC	LC				
92/2.6	LC	LC	LC		LC	
92/2.7	LC	+			d	
92/21.4	LC		D		+	
92/24.1	LC	LC			LC	++
92/24.3	LC	LC			LC	
92/24.4	LC	LC			LC	
92/24.5	LC	LC			LC	
92/39.1	LC	LC	LC	++	LC	LC
92/39.2	LC	LC	LC	++	LC	LC
92/39.3	LC	LC				
92/40.3	LCt					
92/40.5	LCt					
92/42.1	LC	LC	LC	LC	LC	LC
92/51.1	LC	LC	LC	+	LC	+
92/51.2	LC	LC	LC	+	LC	+
92/52.1	LC	LC	LC	++	LC	LC
92/52.2	LC	LC			LC	++
92/52.4						
92/52.5	LC	LC	LC	++	LC	++
92/52.6	LC	LC			LC	
92/52.8	LC	LC			LC	
92/62.3	LC	LC	LC		LC	
92/63.30	LC	LC			LCt	
92/63.31	LC	LC				
92/66.15	LC	LC	++		++	
92/80.01	LC	LC	LC	LC	LC	LC
92/80.09	LC					
92/80.11	LC	LC	++	d	LC	+
92/80.13	LC	+	d		+	d
92/94.05	LC	d			+	d
92/172.05						
92/172.06	LC	LC	LC	++	LC	
92/172.10	LCt					
92/201.01	LC	LC	++	+	LC	++
92/201.02	LC	LC	LC	LC	LC	LC

Tabla R10. Resultado del fagotipado a RTD y 100 RTD de las cepas problema con los fagos aislados durante este estudio (continuación).

Fago Cepa	21.4 100x	21.4 RTD	281 100x	281 RTD	304 100x	304 RTD
92/204.6	LC	LC	LC	LC	LC	LC
92/216.02						
92/218.1	LC	LC	LC	++	LC	LC
93/096.01						
93/129.2	LC	LC	LC	LC	LC	LC
93/172	LC	LC	LC	++	LC	+
93/220.01	LC	LC	LC	++	LC	
93/231C.3	LC	LC				
92/234.02						
93/234.08	LC	LC	LC	LC	LC	LC
93/234.09						
93/234.11	LC	LC	LC			
93/251.02	LC	LC			LC	+
93/251.03	++					
93/251.06	LC				d	
93/256.01						
93/256.02	LC	LC	LC	d	LC	D
93/256.03	LC	LC	LC	LC	LC	LC
93/281.02	LC	LC	LC	+	LC	
93/281.21						
93/283.01						
93/283.02						
93/285bis						
93/389.02	LC	LC			LC	++
93/406.01	LC	LC	++	d	LC	+
93/406.2	LC	LC	++	d	LC	+
93/406.03	LC	LC	++	d	LC	+
93/469.02						
93/487.01						
93/494.01						
93/500	LC				LC	++
93/501.02	LC	LC	LC		LC	
93/504.03	LC	LC	LC		LC	
93/512.01	LC				LC	+
94/24.01	LC	LC	LC	+	LC	++
94/32	LC					
94/34.02	LC	LC	LC	LC	LC	LC

Tabla R10. Resultado del fagotipado a RTD y 100 RTD de las cepas problema con los fagos aislados durante este estudio (continuación).

Cepa \ Fago	21.4 100x	21.4 RTD	281 100x	281 RTD	304 100x	304 RTD
94/34.05	LC	LC	LC	LC	LC	LCt
94/92.04	LC	++			LC	++
94/92.05	LC	++			LC	++
94/93.01	d				LC	++
94/93.02	+				LC	++
94/143	LCt				++	D
94/165.02	LC	LC	LC	++	LC	LC
94/175	LC	LC	LC	++	LC	LC
94/177	LC	LC	LC	LC	LC	LC
94/205.01						
94/205.02	LC	LC	LC	LC	LC	LC
94/205.03	LC	LC	LC	LC	LC	LC
S01						
S02	LC	LC			LC	
S03						
S04						
S06						
S07	LC	+				
S08	LC	LC			LC	++
S09					LC	+
S10						
S12						
S13						
S14						
S15						
S16	LC	LC			LC	++
S18						
S19	LC	LC	LC	LC	LC	LC
S20	LC	LC	+	+	LC	++
S21						
S22						
S23						
S24						
S25						

Legenda: LC: lisis confluyente (+t=turbia), ++: 50 o más placas de lisis, +: 20-50 placas de lisis, d: menos de 20 placas, **sombreado:** sin lisis

Finalmente, en la **Tabla R11** se resume fago a fago la susceptibilidad de las cepas de prueba a los fagos aislados, tanto a 100 RTD como a RTD.

El 57,80 % de las cepas resultaron sensibles al fago 21.4, el 43,12 % al 304 y el 32,11 % al 21.4.

Tabla R11. Resumen del resultado del fagotipado de las cepas problema con los fagos aislados durante este estudio.

Fago Efecto		Cepas con efecto (% sobre el total de <i>S.aureus</i>)					
		21.4 100x	21.4 RTD	281 100x	281 RTD	304 100x	304 RTD
LC		69 (63,30)	57 (52,29)	34 (31,19)	14 (12,84)	57 (52,29)	19 (17,43)
++		1 (0,92)	2 (1,83)	6 (5,50)	10 (9,17)	2 (1,83)	14 (12,84)
+		1 (0,92)	3 (2,75)	1 (0,92)	6 (5,50)	3 (2,75)	10 (9,17)
d		1 (0,92)	1 (0,92)	2 (1,83)	5 (4,59)	2 (1,83)	4 (3,67)
Total		72 (66,06)	63 (57,80)	43 (39,45)	35 (32,11)	64 (58,72)	47 (43,12)

Leyenda: LC: lisis confluyente, ++: 50 o más placas de lisis, +: 20-50 placas de lisis, d: menos de 20 placas

2.- Estudio de los factores de virulencia

2.1.- Factores de superficie

2.1.1.- Cápsula. Detección y serotipificación de cepas capsuladas.

2.1.1.1.- Detección de la cápsula

Entre las pruebas clásicas que se han venido empleando de forma más frecuente para la detección de la capsulación de *S. aureus*, aparte de la tinción negativa, se encuentran las de detección del *clumping factor* y la prueba de crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*).

2.1.1.1.1.- Presencia del *clumping factor*

La prueba se llevó a cabo únicamente sobre las 109 cepas de *S. aureus*. Los resultados individuales se recogen en la **Tabla R13** y, de forma resumida, en la **Tabla R12**:

Tabla R12. Resumen de resultados de la prueba de *clumping factor* realizada a las cepas de *S. aureus* de este estudio.

<i>clumping factor</i>	Nº cepas	Proporción sobre el total de <i>S. aureus</i>
Positivo	75	68,80 %
Negativo	29	26,60 %
Débil	5	4,58 %

Cabe destacar que, según la bibliografía consultada (Koenig, 1962; Wilkinson, 1983), las cepas de *S. aureus* en las que no se detecta el *clumping factor* también pueden estar capsuladas. En nuestro caso, puede considerarse que hasta un 26,6% de las cepas podrían estar capsuladas (un 31,18% si interpretamos la reactividad parcial como presencia de microcápsula), aunque la confirmación de este carácter precisa conocer otros aspectos.

Los resultados de dichas pruebas aplicadas a las 246 cepas de nuestro estudio fueron los siguientes (**Tabla R13**):

Tabla R13. Resumen de los resultados del *clumping factor* y del crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) de las cepas de estudiadas.

Referencia	Identificación	Clumping Factor	SSA
89/304.00	<i>S. aureus</i>	+	C
92/002.03	<i>S. aureus</i>	+	M
92/002.05	<i>S. aureus</i>	+	C
92/002.06	<i>S. aureus</i>	+	C
92/002.07	<i>S. aureus</i>	+	D
92/003.04	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/003.05	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/021.04	<i>S. aureus</i>	-	D
92/022.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	NR	D
92/024.01	<i>S. aureus</i>	+	C
92/024.03	<i>S. aureus</i>	+	C
92/024.04	<i>S. aureus</i>	+	C
92/024.05	<i>S. aureus</i>	+	C
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/032.01	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/032B	<i>S. haemolyticus</i>	NR	D
92/039.01	<i>S. aureus</i>	+	C
92/039.02	<i>S. aureus</i>	d	C
92/039.03	<i>S. aureus</i>	d	C
92/039.05	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/040.03	<i>S. aureus</i>	+	D
92/040.05	<i>S. aureus</i>	+	D
92/040.07	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/042.01	<i>S. aureus</i>	+	C
92/046.03	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/047.01	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/047.02	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/047.03	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/047.04	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/047.08	<i>S. epidermidis</i>	NR	M
92/047.11	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/047.14	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/051.01	<i>S. aureus</i>	+	C
92/051.02	<i>S. aureus</i>	-	C
92/051.03	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/052.01	<i>S. aureus</i>	-	C
92/052.02	<i>S. aureus</i>	+	C
92/052.04	<i>S. aureus</i>	-	D
92/052.05	<i>S. aureus</i>	+	C
92/052.06	<i>S. aureus</i>	+	C
92/052.08	<i>S. aureus</i>	+	C
92/062.03	<i>S. aureus</i>	-	M

Resultados

Tabla R13. Resumen de los resultados del *clumping factor* y del crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) de las cepas de estudiadas (continuación).

Referencia	Identificación	Clumping Factor	SSA
92/063.01	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.06	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.08	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.10	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.11	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.12	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.13	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.14	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.15	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.16	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.17	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.19	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.23	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/063.30	<i>S. aureus</i>	-	D
92/063.31	<i>S. aureus</i>	-	M
92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.05	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	NR	PD
92/066.07	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.08	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.12	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.13	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.14	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/066.15	<i>S. aureus</i>	+	C
92/066.16	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/080.01	<i>S. aureus</i>	+	C
92/080.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/080.03	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	NR	D
92/080.05	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/080.06	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/080.07	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/080.08	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/080.09	<i>S. aureus</i>	-	D
92/080.10	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/080.11	<i>S. aureus</i>	-	D
92/080.13	<i>S. aureus</i>	-	D
92/080.14	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/094.05	<i>S. aureus</i>	+	P
92/094.06	<i>S. xylosus</i>	NR	C
92/101.05	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/101.08	<i>S. simulans</i>	NR	D
92/140.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/140.09	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/140.12	<i>S. gallinarum</i>	NR	D

Tabla R13. Resumen de los resultados del *clumping factor* y del crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) de las cepas de estudiadas (continuación).

Referencia	Identificación	Clumping Factor	SSA
92/140.15	<i>S. hominis</i>	NR	D
92/172.05	<i>S. aureus</i>	-	D
92/172.06	<i>S. aureus</i>	+	C
92/172.10	<i>S. aureus</i>	+	D
92/201.01	<i>S. aureus</i>	+	D
92/201.02	<i>S. aureus</i>	+	C
92/201.05	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/201.06	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/201.07	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/201.08	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/201.09	<i>S. xylosus</i>	NR	D
92/204.06	<i>S. aureus</i>	+	C
92/213.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	PD
92/213.06	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/213.07	<i>S. epidermidis</i>	NR	PD
92/216.02	<i>S. aureus</i>	+	C
92/218.01	<i>S. aureus</i>	+	C
92/225.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/225.06	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/225.11	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
92/225.15	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/096.01	<i>S. aureus</i>	d	PD
93/098.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/120.02	<i>S. xylosus</i>	NR	D
93/129.02	<i>S. aureus</i>	+	C
93/160.05	<i>S. xylosus</i>	NR	M
93/172	<i>S. aureus</i>	+	C
93/215.06	<i>S. simulans</i>	NR	D
93/220.01	<i>S. aureus</i>	+	C
93/230.02	<i>S. xylosus</i>	NR	C
93/231.c1	<i>S. xylosus</i>	NR	C
93/231.c2	<i>S. xylosus</i>	NR	C
93/231.c3	<i>S. aureus</i>	+	C
93/234.01	<i>S. xylosus</i>	NR	C
93/234.02	<i>S. aureus</i>	-	D
93/234.03	<i>S. xylosus</i>	NR	D
93/234.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/234.05	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/234.08	<i>S. aureus</i>	+	C
93/234.09	<i>S. aureus</i>	-	C
93/234.11	<i>S. aureus</i>	+	M
93/234.14	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/240.01	<i>S. simulans</i>	NR	D
93/240.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/240.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/240.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	D

Resultados

Tabla R13. Resumen de los resultados del *clumping factor* y del crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) de las cepas de estudiadas (continuación).

Referencia	Identificación	Clumping Factor	SSA
93/240.05	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/240.06	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	NR	D
93/240.07	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/241.01	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/251.02	<i>S. aureus</i>	-	C
93/251.03	<i>S. aureus</i>	+	C
93/251.06	<i>S. aureus</i>	+	C
93/256.01	<i>S. aureus</i>	+	C
93/256.02	<i>S. aureus</i>	+	C
93/256.03	<i>S. aureus</i>	+	C
93/257.02	<i>S. gallinarum</i>	NR	D
93/257.05	<i>S. gallinarum</i>	NR	D
93/273.03	<i>S. xylosum</i>	NR	D
93/273.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/273.05	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/273.06	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/281.00	<i>S. xylosum</i>	NR	D
93/281.01	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/281.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/281.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	C
93/281.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/281.12	<i>S. xylosum</i>	NR	C
93/281.13	<i>S. simulans</i>	NR	D
93/281.18	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	NR	D
93/281.19	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/281.20	<i>S. aureus</i>	+	C
93/281.21	<i>S. aureus</i>	+	C
93/283.01	<i>S. aureus</i>	+	C
93/283.02	<i>S. aureus</i>	+	C
93/285.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/285.05	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/285.06	<i>S. gallinarum</i>	NR	D
93/285bis	<i>S. aureus</i>	d	M
93/291.05	<i>S. xylosum</i>	NR	D
93/303.03	<i>S. xylosum</i>	NR	D
93/323.01	<i>S. xylosum</i>	NR	D
93/323.04	<i>S. xylosum</i>	NR	D
93/328.11	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/328.13	<i>S. haemolyticus</i>	NR	D
93/328.14	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/354.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
93/354.06	<i>S. haemolyticus</i>	NR	D
93/389.02	<i>S. aureus</i>	-	D
93/406.01	<i>S. aureus</i>	-	D
93/406.02	<i>S. aureus</i>	-	D
93/406.03	<i>S. aureus</i>	-	D

Tabla R13. Resumen de los resultados del *clumping factor* y del crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) de las cepas de estudiadas (continuación).

Referencia	Identificación	Clumping Factor	SSA
93/469.02	<i>S. aureus</i>	+	C
93/487.01	<i>S. aureus</i>	+	C
93/494.01	<i>S. aureus</i>	+	D
93/494.03	<i>S. xylosus</i>	NR	D
93/500.00	<i>S. aureus</i>	+	C
93/501.02	<i>S. aureus</i>	-	C
93/504.03	<i>S. aureus</i>	d	C
93/506.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	M
93/508.00	<i>S. xylosus</i>	NR	D
93/510.03	<i>S. xylosus</i>	NR	D
93/510.04	<i>S. xylosus</i>	NR	D
93/512.01	<i>S. aureus</i>	+	C
93/520.01	<i>S. xylosus</i>	NR	D
94/023.02	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
94/023.03	<i>S. xylosus</i>	NR	C
94/024.01	<i>S. aureus</i>	+	M
94/024.04	<i>S. xylosus</i>	NR	D
94/025.01	<i>S. xylosus</i>	NR	PD
94/025.02	<i>S. xylosus</i>	NR	D
94/025.04	<i>S. epidermidis</i>	NR	D
94/032.00	<i>S. aureus</i>	+	D
94/034.02	<i>S. aureus</i>	+	C
94/034.05	<i>S. aureus</i>	+	C
94/092.04	<i>S. aureus</i>	-	D
94/092.05	<i>S. aureus</i>	-	D
94/093.01	<i>S. aureus</i>	-	D
94/093.02	<i>S. aureus</i>	-	D
94/108.06	<i>S. xylosus</i>	NR	D
94/114.01	<i>S. gallinarum</i>	NR	D
94/114.02	<i>S. gallinarum</i>	NR	PD
94/114.04	<i>S. gallinarum</i>	NR	D
94/143.00	<i>S. aureus</i>	+	C
94/165.01	<i>S. xylosus</i>	NR	D
94/165.02	<i>S. aureus</i>	+	PD
94/166.02	<i>S. hominis</i>	NR	C
94/174.01	<i>S. gallinarum</i>	NR	D
94/174.02	<i>S. gallinarum</i>	NR	D
94/175.00	<i>S. aureus</i>	-	PD
94/177.00	<i>S. aureus</i>	-	PD
94/205.01	<i>S. aureus</i>	-	PD
94/205.02	<i>S. aureus</i>	-	PD
94/205.03	<i>S. aureus</i>	-	PD
S01	<i>S. aureus</i>	+	D
S02	<i>S. aureus</i>	+	PD
S03	<i>S. aureus</i>	+	C
S04	<i>S. aureus</i>	+	D

Tabla R13. Resumen de los resultados del *clumping factor* y del crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*) de las cepas de estudiadas (continuación).

Referencia	Identificación	Clumping Factor	SSA
S06	<i>S. aureus</i>	+	D
S07	<i>S. aureus</i>	+	D
S08	<i>S. aureus</i>	+	C
S09	<i>S. aureus</i>	+	C
S10	<i>S. aureus</i>	+	C
S12	<i>S. aureus</i>	+	PD
S13	<i>S. aureus</i>	+	C
S14	<i>S. aureus</i>	+	C
S15	<i>S. aureus</i>	+	C
S16	<i>S. aureus</i>	+	C
S18	<i>S. aureus</i>	+	C
S19	<i>S. aureus</i>	+	C
S20	<i>S. aureus</i>	+	D
S21	<i>S. aureus</i>	+	C
S22	<i>S. aureus</i>	-	C
S23	<i>S. aureus</i>	+	C
S24	<i>S. aureus</i>	+	C
S25	<i>S. aureus</i>	+	D

Leyenda: C=compacta, D=difusa, PD=pseudodifusa, d= débil, NR=no realizado (cepas de especies distintas de *S. aureus*).

2.1.1.1.2.- Crecimiento en agar blando suero (*Serum Soft Agar, SSA*)

La prueba, que inicialmente se supuso de aplicación específica en el caso de *S. aureus*, se incluyó como prueba de rutina, independientemente de la adscripción de especie, ya que se han descrito algunas cepas de otras especies que también pueden mostrar una morfología colonial compacta (Ohtomo *et al.*, 1982).

La **Tabla R14** recoge y resume los resultados obtenidos con la técnica del SSA en las 246 cepas estudiadas.

Tabla R14. Resultados generales del cultivo en agar blando suero (SSA).

Morfología colonial	Nº cepas	Porcentaje
Compacta	73	29,67
Difusa	149	60,57
Mixta	9	3,66
Pseudodifusa	15	6,10

En la **Tabla R15** se resumen los resultados obtenidos según la especie bacteriana de procedencia y la morfología colonial en SSA:

Tabla R15. Resultados del crecimiento en SSA desglosados según morfología colonial y especie bacteriana.

Morfología colonial	Nº cepas ¹	% el total ²	Especie	Cepas ³	% de la especie sobre el tipo de morfología
Compacta (C)	73	29,67	<i>S. aureus</i>	64	87,67
			<i>S. xylosum</i>	7	9,59
			<i>S. epidermidis</i>	1	1,37
			<i>S. hominis</i>	1	1,37
Difusa (D)	149	60,57	<i>S. epidermidis</i>	68	45,64
			<i>S. xylosum</i>	32	21,48
			<i>S. aureus</i>	29	19,46
			<i>S. gallinarum</i>	8	5,37
			<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	4	2,68
			<i>S. simulans</i>	4	2,68
			<i>S. haemolyticus</i>	3	2,01
Pseudodifusa (PD)	15	6,10	<i>S. aureus</i>	10	66,67
			<i>S. epidermidis</i>	2	13,33
			<i>S. gallinarum</i>	1	6,67
			<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	1	6,67
			<i>S. xylosum</i>	1	6,67
Mixta (M)	9	3,66	<i>S. aureus</i>	6	66,67
			<i>S. epidermidis</i>	2	22,22
			<i>S. xylosum</i>	1	11,11
Total	246	100		246	

Notas: (¹) cepas que presentan esa morfología; (²) sobre el total de cepas del estudio; (³) de cada especie con esa morfología.

Según puede verse, la mayoría de las cepas que presentan morfología compacta corresponden a *S. aureus* (87,67%), aunque algunas cepas de otras tres especies muestran también esta morfología en el SSA (*S. xylosum*, *S. epidermidis* y *S. hominis*). Otras morfologías en las que se observa una reactividad parcial al SSA (pseudodifusa y mixta) son también mayoritariamente debidas a cepas de *S. aureus*, en la práctica dos terceras partes en cada caso (66,67%).

En cuanto a la morfología difusa, se presenta en todas las especies de SCN estudiados, siendo más frecuente en la especie más abundante, *S. epidermidis* (45,64%). Hay que considerar que en *S. aureus* se identifica como indicadora de capsulación, debido a que las estructuras superficiales responsables de la aparición de la morfología compacta en SSA estarían ocultas bajo la cápsula de polisacárido. Según ello, 29 cepas de *S. aureus*

Resultados

serían capsuladas, representando el 26,60% de las cepas de dicha especie y el 11,79% sobre el total de cepas aisladas.

Comparando este indicador de capsulación en *S. aureus* con los resultados del *clumping factor*, resulta llamativo que el número de cepas que presentan morfología difusa en SSA y que son *clumping factor* negativas sea el mismo: 29. Sin embargo, analizando cada tipo con respecto a la detección o no de *clumping factor*, aparece la siguiente distribución (**Tabla R16**):

Tabla R16. Comparación de los resultados del crecimiento en SSA y del *clumping factor* en las cepas de *S. aureus* de este estudio.

Morfología en SSA	N° de cepas (% sobre total)	Resultado del <i>clumping factor</i> (% sobre tipo SSA)		
		Positivo	Negativo	Débil
Compacta	64 (58,71)	55 (85,93)	6 (9,37)	3 (4,68)
Difusa	29 (26,60)	13 (44,82)	16 (55,17)	0 (0,00)
Pseudodifusa	10 (9,17)	4 (40,00)	5 (50,00)	1 (10,00)
Mixta	6 (5,50)	3 (50,00)	2 (33,33)	1 (16,66)
TOTAL	109 (100)	75 (68,80)	29 (26,60)	5 (4,58)

La representación de estos datos en un gráfico de porcentajes acumulados (**Gráfico R01**), permite observar que, aunque sí parece haber alguna relación entre la morfología difusa en el agar blando suero (*Serum Soft Agar*, SSA) y la no detección de *clumping factor*, no existe una correspondencia directa: de las 29 cepas que presentan morfología difusa, únicamente 16 (55,17%) reaccionan negativamente en el *clumping factor*. Por otro lado, también resulta llamativo comprobar que la coincidencia es mayor entre las cepas que presentan morfología compacta (64) y la detección de *clumping factor* entre ellas : 55 , un 85,93%.

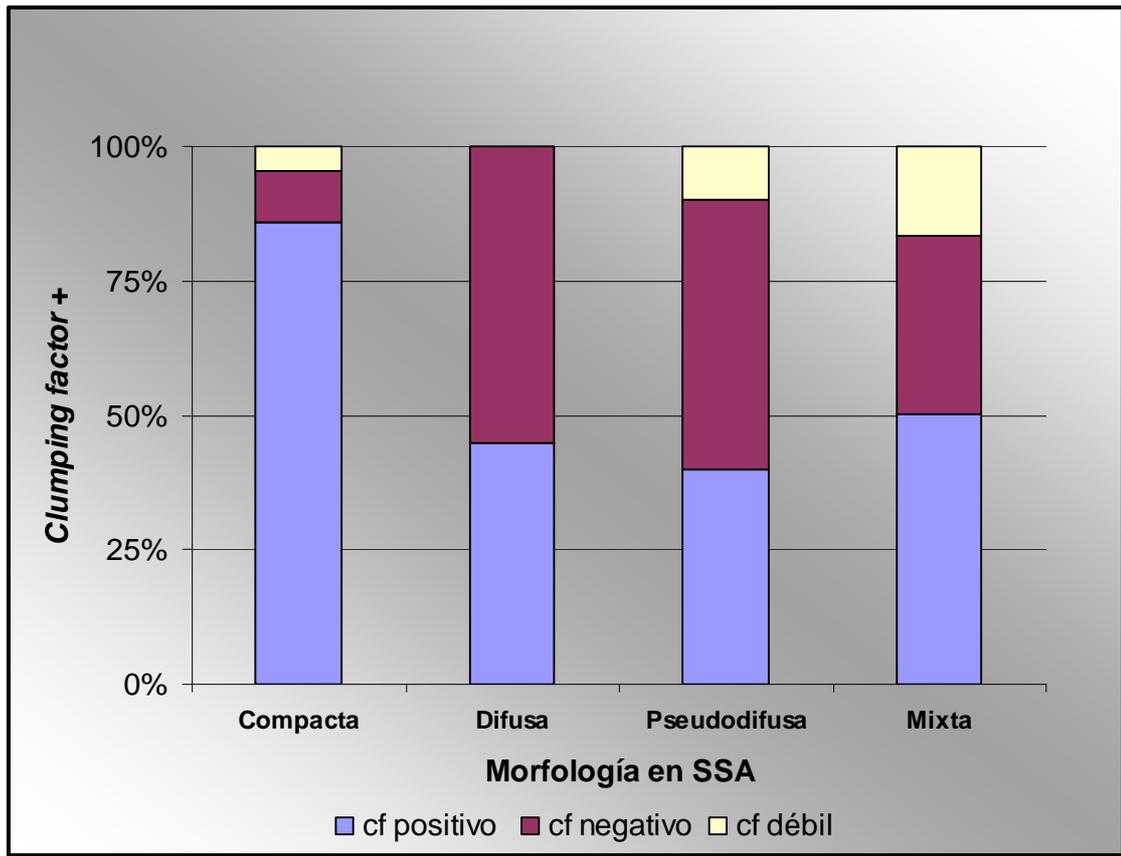


Gráfico R01. Resultados del *clumping factor* según la morfología en SSA

A la vista de los resultados obtenidos se decidió el uso del método del SSA para detectar cepas de *S. aureus* capsuladas. El uso exclusivo del *clumping factor* con este fin podría llevar a descartar como no capsuladas cepas que fueran positivas al *clumping factor* pero difusas en SSA. Además, la prueba del crecimiento en SSA permite distinguir colonias aisladas, lo que sirve para detectar cepas que presenten variantes difusas y compactas (en nuestro estudio cepas que presentan morfología mixta) y, en su caso, poder llevar a cabo el aislamiento de la variante colonial que interese.

2.1.1.2.- Serotipado capsular

2.1.1.2.1.- Sueros hiperinmunes

Uno de los objetivos de este trabajo fue detectar la presencia de cepas capsuladas de *S. aureus* y determinar su serotipo. Con este propósito se dispuso de cepas tipo, de referencia, de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 8, que se utilizaron como fuente de los polisacáridos capsulares, empleados para hiperinmunizar conejos, al objeto de producir una batería de sueros policlonales anticapsulares específicos que pudieran ser utilizados en fases posteriores para el serotipado capsular.

El seguimiento del proceso de hiperinmunización se llevó a cabo mediante distintos procedimientos, cuya selección estuvo dirigida por su sensibilidad para detectar una respuesta de anticuerpos por lo general escasa, debido a la baja inmunogenicidad del antígeno utilizado (polisacárido capsular potenciado con adyuvante de Freund). Se utilizaron sucesivamente la inmunodifusión doble, la inmunodifusión radial, la precipitación y la aglutinación, todas ellas con resultados negativos, por lo que se realizó un seguimiento mediante electroforesis de los sueros. Finalmente, la puesta a punto de un método ELISA supuso la posibilidad de titular con fiabilidad los sueros obtenidos en cada una de las fases del proceso de hiperinmunización. A continuación, se recogen los resultados obtenidos mediante electroforesis y ELISA.

2.1.1.2.1.1.- Seguimiento del proceso de hiperinmunización mediante electroforesis

En la **Tabla R17** se muestra el resumen de los resultados obtenidos mediante la electroforesis sérica de los sueros de los conejos hiperinmunizados.

Tabla R17. Porcentaje de γ -globulinas séricas de los sueros de los conejos en proceso de hiperinmunización, determinado mediante electroforesis.

Días postinoculación		0	14	28	35	50	69	91	104	111	120	133
Serotipo (cepa)	Nº conejo	Número de sangría seguida por electroforesis										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 (M)	1	10,4	12,6	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	9,5	11,6	14,9	NR	11,4	NR	28,0	30,0	21,2	NR	31,9
	3	9,1	10,5	15,0	14,3	NR	16,0	16,4	31,7	16,2	8,2	21,1
	Media	9,7	11,5	14,1	14,3	11,4	16,0	22,2	30,8	18,7	8,2	26,5
2 (Smith)	4	9,8	9,2	12,8	NR	9,6	11,2	13,0	26,1	17,8	6,4	25,7
	5	4,4	6,4	10,2	NR	9,9	NR	17,9	29,1	15,2	25,0	26,5
	6	7,7	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Media	7,3	9,9	11,5	NP	9,8	11,2	15,5	27,6	16,5	15,7	26,1
3 (Mardi)	7	NR	14,2	20,4	NR	17,7	20,5	16,8	22,1	23,6	31,2	31,6
	8	NR	14,2	12,3	12,2	NR	17,7	28,7	25,1	35,1	17,6	30,8
	9	NR	9,4	10,5	NR	NR	15,4	13,2	12,4	11,2	21,3	8,1
	Media	NP	12,6	14,4	12,2	17,7	17,9	19,6	19,8	23,3	23,4	23,5
4 (7007)	10	6,0	10,6	13,7	NR	18,3	18,3	13,6	26,1	17,8	NR	NR
	11	NR	8,5	13,8	11,7	NR	16,5	8,6	22,5	NR	14,8	15,5
	12	NR	9,4	15,7	-	-	-	-	-	-	-	-
	Media	6,0	9,5	14,4	11,7	18,3	17,4	11,1	24,3	17,8	14,8	15,5
5 (Reynolds)	13	9,9	9,6	6,1	NR	NR	20,3	12,4	23,3	20,0	NR	14,3%
	14	7,2	11,7	10,0	NR	NR	NR	18,3	12,9	-	-	-
	15	5,3	6,9	11,1	NR	14,9	12,0	NR	NR	NR	NR	NR
	Media	7,5	9,4	9,1	14,7	14,9	16,2	15,4	18,1	20,0	NP	14,3
8 (Becker)	16	NR	13,0	17,0	NR	22,7	23,1	-	-	-	-	-
	17	11,4	10,0	15,2	16,3	17,9	21,3	16,0	21,3	21,3	18,3	27,4
	18	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Media	8,6	11,5	16,1	16,3	20,3	22,2	16,0	21,3	21,3	18,3	27,4
Media global		7,8	10,7	13,3	13,8	15,4	16,8	16,6	23,7	19,6	16,1	22,2
Días postinoculación		0	14	28	35	50	69	91	104	111	120	133

Leyenda: NR= sangría no realizada, NP= no procede, - = conejo muerto

Como se observa en la tabla, existe una serie de oscilaciones en el porcentaje medio de γ -globulinas séricas que podría deberse, entre otras causas, a la técnica de cuantificación utilizada. Por otra parte, se observan diferencias marcadas entre conejos del mismo grupo, posiblemente debido a cuestiones de tipo individual. En el **Gráfico R02** se puede ver con más claridad dicha circunstancia.

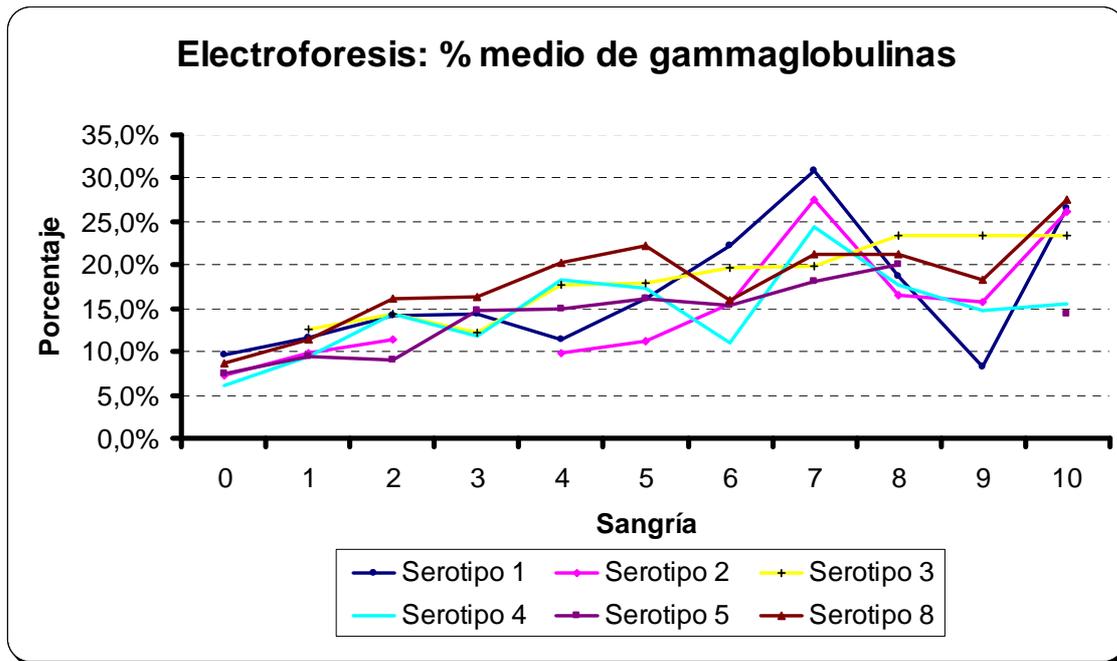


Gráfico R02. Porcentaje medio de γ -globulinas séricas.

Como se ha señalado, la escasa sensibilidad de la técnica obligó a su sustitución por un ELISA indirecto que, a partir de la sangría n° 10, fue la única técnica utilizada en el seguimiento de la inmunización de los animales.

2.1.1.2.1.2.- Control de la actividad anticapsular de los sueros mediante la técnica del agar blando suero (*Serum Soft Agar*, SSA)

La técnica del agar blando suero (*Serum Soft Agar*, SSA) ha sido empleada por varios autores, en especial por Yoshida (1971), para comprobar la potencia de antisueros capsulares frente a *S. aureus*. El método se basa en la capacidad de los sueros anticapsulares para cambiar la morfología colonial de difusa a compacta de las cepas capsuladas cultivadas en el medio SSA desarrollado por Finkelstein y Sulkin (1958).

En nuestro caso, fue empleada para evaluar, en algunos momentos de la hiperinmunización, la respuesta que se conseguía con algunos de los sueros que se iban obteniendo. El propósito final era seleccionar sueros adecuados para llevar a cabo el serotipado capsular de los aislados de *S. aureus* que presentasen morfología difusa en SSA con suero normal de conejo.

En general, los sueros estudiados mostraron poca potencia y además se observaba una gran variabilidad individual entre conejos, aún comparando el mismo punto del proceso de hiperinmunización (**Foto R02**).

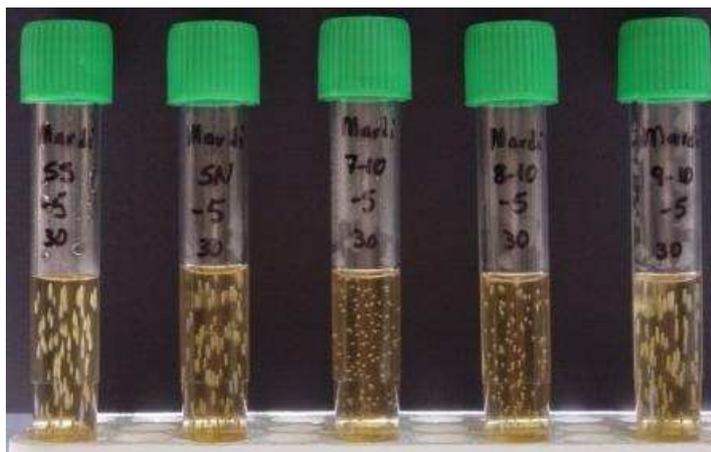


Foto R02. Prueba de SSA frente a la cepa tipo Mardi (serotipo 3) sin suero, con suero normal y con tres sueros de la misma sangría (10^9) mostrando crecimiento: difuso (control sin suero), difuso (control suero normal), compacto (positivo), pseudodifuso (positivo débil) y difuso (resultado negativo).

Una vez probado un amplio número de sueros de los seis serotipos, ninguno superó las 16 U (dilución 1:16, **Foto R03**).

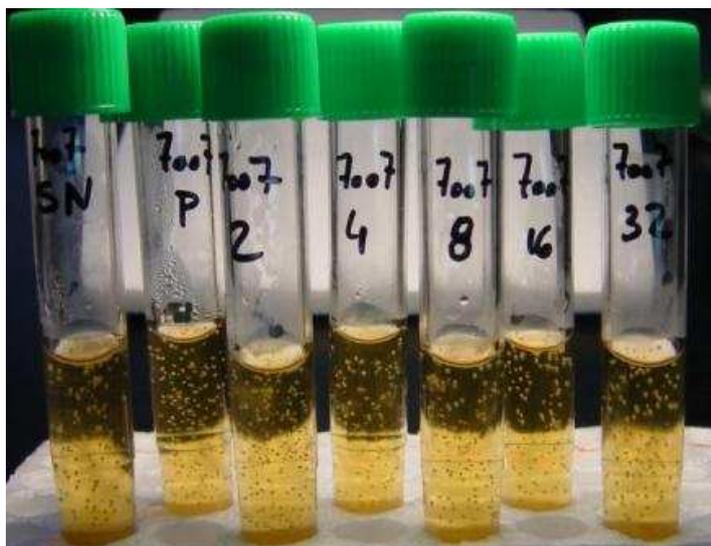


Foto R03. Titulación mediante la prueba de SSA frente a la cepa tipo 7007 (serotipo 4). SN=suero normal, P= antisuero puro, 2-32 diluciones seriadas (inverso).

Los resultados obtenidos, unido a la difícil estandarización del método, aconsejó reservarlo para su uso en casos concretos, procediendo a la búsqueda de otro sistema alternativo de tipado, bien mediante ELISA de inhibición, citado antes, o mediante técnicas de PCR (ver más adelante en el apartado 2.1.1.2.3).

2.1.1.2.1.3.- Seguimiento del proceso de hiperinmunización mediante un ELISA de titulación de sueros anticapsulares

Aplicando la metodología descrita en el apartado Material y Métodos, se puso a punto un ELISA indirecto para detectar los anticuerpos anticapsulares. Este método era homólogo, de manera que cada suero se tituló en placas con el polisacárido homólogo fijado a los pocillos. En la siguiente **Foto R04** se muestra una placa de titulación con la distribución de los reactivos correspondientes:



Foto R04. ELISA indirecto para la titulación de anticuerpos anticapsulares (frente al serotipo 5). Sueros situados en columnas por triplicado. Diluciones en base 2.

Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla R18**.

Tabla R18. Título medio de tres determinaciones de los sueros de los conejos en proceso de hiperinmunización obtenido mediante ELISA.

Suero	Sangría número															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Serotipo 1	1	0	100	400												
	2	0	100	400	-	-	-	1600	1600	6400	-	6400	6400	6400	12800	6400
	3	0	50	50	50	-	50	800	800	6400	1600	12800	1600	1600	6400	3200
	Media	0	83,3	283,3	50	-	50	1200	1200	6400	1600	9600	4000	4000	9600	4800
Serotipo 2	4	0	100	50	-	50	200	6400	6400	6400	6400	-	3200	3200	6400	3200
	5	0	50	50	-	-	1600	3200	3200	6400	6400	-	800	800	-	800
	6	0	50													
	Media	0	66,7	50	-	50	900	4800	4800	6400	6400	-	2000	2000	6400	2000
Serotipo 3	7	0	0	800	-	400	800	1600	400	800	400	1600	400	1600	12800	6400
	8	0	0	200	200	-	400	400	800	800	800	800	800	1600	1600	1600
	9	0	0	100	-	-	400	800	800	800	800	-				
	Media	0	0	366,7	200	400	533,3	933,3	666,7	800	666,7	1200	600	1600	7200	4000
Serotipo 4	10	0	400	800	-	800	1600	6400								
	11	0	50	800	400	-	3200	6400	6400	-	1600	1600	400	800	800	400
	12	0	0	1600												
	Media	0	150	1066,7	400	800	2400	6400	6400	-	1600	1600	400	800	800	400
Serotipo 5	13	0	50	3200	1600	-	6400	6400	6400	12800	12800	6400	3200	6400	12800	12800
	14	0	100	400	-	-	-	3200	800							
	15	0	50	100	-	200	200									
	Media	0	66,67	1233,3	1600	200	3300	4800	3600	12800	12800	6400	3200	6400	12800	12800
Serotipo 8	16	0	100	200	-	100	100									
	17	0	50	100	50	-	200	12800	12800	6400	3200	3200	1600	1600	800	800
	18	0														
	Media	0	75	150	50	100	150	12800	12800	6400	3200	3200	1600	1600	800	800
Media general	0	73,6	480,6	460	310	1222,2	5155,6	4911,1	6560	4377,8	4400	1966,7	2733,3	4960	4133,3	

Concluida la titulación de los sueros de la última sangría, se llevó a cabo su utilización para el serotipado capsular para lo cual se puso a punto un ELISA de inhibición en dos fases, siguiendo el método de Poutrel *et al.*, de 1988, pero sustituyendo el uso de anticuerpos monoclonales por los sueros policlonales, al no disponerse de anticuerpos monoclonales frente a los 6 serotipos capsulares en estudio.

2.1.1.2.2.- Serotipado capsular de *S. aureus* mediante ELISA

Hasta este momento, los sueros hiperinmunes habían sido titulados frente a los polisacáridos homólogos empleando el ELISA de titulación que nos permitió seguir la evolución de la hiperinmunización de los conejos.

En pruebas previas se había detectado la existencia de reacciones cruzadas entre los sueros hiperinmunes y los serotipos capsulares heterólogos. Puesto que esta circunstancia

imposibilitaba la utilización de dichos sueros para el serotipado capsular, tratamos los sueros para eliminar las inespecificidades existentes.

El tratamiento empleado para los sueros fue el detallado en Material y Métodos (sección 2.1.1.2.3.1.2.), siguiendo el método de Mittal *et al.* (1982); básicamente, los antisueros se trataron con una suspensión concentrada, compuesta por bacterias completas inactivadas de los serotipos heterólogos.

Los sueros hiperinmunes que se eligieron para la prueba fueron los sueros 2-11 (anti 1), 4-11 (anti 2), 7-11 (anti 3), 11-11 (anti 4), 13-11 (anti 5) y 17-11 (anti 8).

Una vez tratados los sueros, se titularon frente a todos los serotipos, homólogo y heterólogos, con el fin de determinar la eficacia del tratamiento en la eliminación de las reacciones inespecíficas.

En general, el tratamiento de los sueros produjo un descenso muy marcado de su título que, a modo de ejemplo, se ilustra en el caso del serotipo 1 en el **Gráfico R03**.

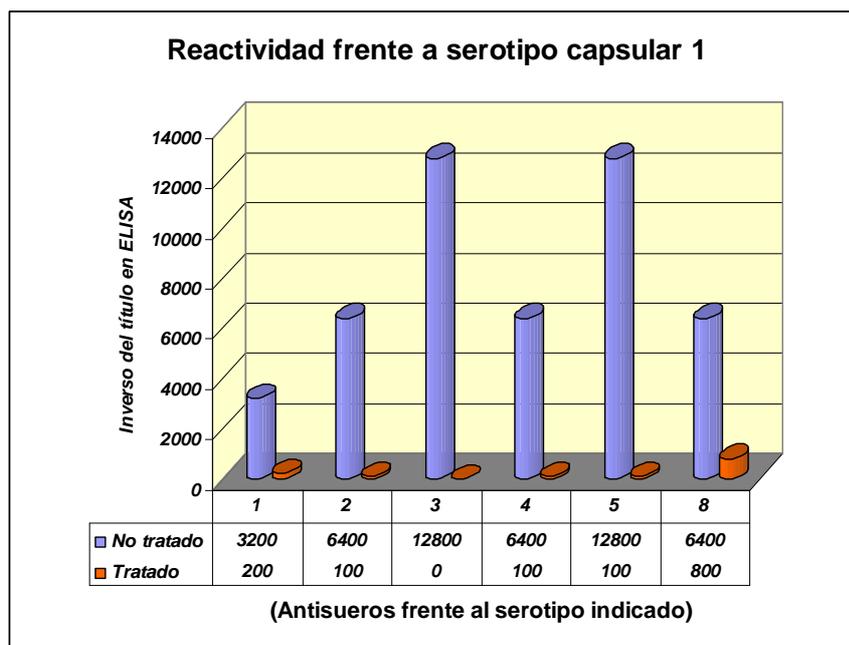


Gráfico R03. Titulaciones de sueros hiperinmunes, tratados o no, frente al polisacárido capsular del serotipo 1

En la **Tabla R19** se resumen los datos obtenidos con los sueros que se trataron por este método.

Tabla R19. Resumen de los resultados del tratamiento con bacterias completas

Suero	Serotipo	Serotipo en la placa					
		1	2	3	4	5	8
2-11	1	200 3.200	800 6.400	12.800 25.600	800 6.400	400 6.400	<100 6.400
4-11	2	100 6.400	800 12.800	<100 6.400	<100 1.600	200 12.800	<100 6.400
7-11	3	<100 12.800	100 1.600	<100 3.200	<100 800	<100 6.400	<100 3.200
11-11	4	100 6.400	<100 400	<100 800	100 400	200 800	100 6.400
13-11	5	100 12.800	12.800 51.200	25.600 -51.200 204.800	3.200 25.600	200 51.200	<100 12.800
17-11	8	800 6.400	3.200 6.400	200 6.400	<100 1.600	400 6.400	800 6.400

Nota: en negrita el título sin tratar frente al mismo serotipo. Homólogos recuadrados.

El tratamiento realizado no llegaba a permitir que se eliminaran todas las reacciones cruzadas entre serotipos, de forma que los sueros hiperinmunes obtenidos no resultaban utilizables para llevar a cabo el serotipado capsular mediante ELISA.

Se llevaron a cabo otras pruebas de tratamiento de los sueros, incluyendo la adsorción con los polisacáridos, el uso de caolín, agar y otros tratamientos, aunque sin resolver el problema, por lo que al final se desechó esta técnica de serotipado capsular.

2.1.1.2.3- Detección de los genes capsulares utilizando técnicas de PCR

Una vez que fue extraído el ADN de todas las cepas objeto del estudio, se alicuotó y se conservó a -20°C hasta su uso.

2.1.1.2.3.1.- Diseño y puesta a punto de la PCR múltiple

2.1.1.2.3.1.1.- Cebadores (*primers*)

2.1.1.2.3.1.1.1.- Serotipo 1

Se tomó como referencia el trabajo de Luong *et al.*, de 2002, en el que se indicaba que los genes del operón *cap1* son específicos, y las secuencias depositadas en *GeneBank* (U10927 REGION: 18496..18951). Se diseñaron los siguientes cebadores mediante el programa *on line Primer3*:

Nombre	Secuencia	Tamaño de producto esperado
<i>cap1-5'</i>	AAGGGGCGAATTAGATGATG	456 pb
<i>cap1-3'</i>	GAATGAACCTACCGACATAAA	

Para llevar a cabo la PCR, inicialmente se empleó la mezcla de reacción descrita por Salasia *et al.*(2004) con ADN extraído de la cepa homóloga, en este caso, la cepa M de *S. aureus*. En esta primera prueba se llevó a cabo un gradiente de temperaturas y se utilizó el ADN tal como se extrajo y con una dilución 1:10, para evitar posibles inhibiciones de la reacción. El gel resultante se muestra en la **Foto R05**.

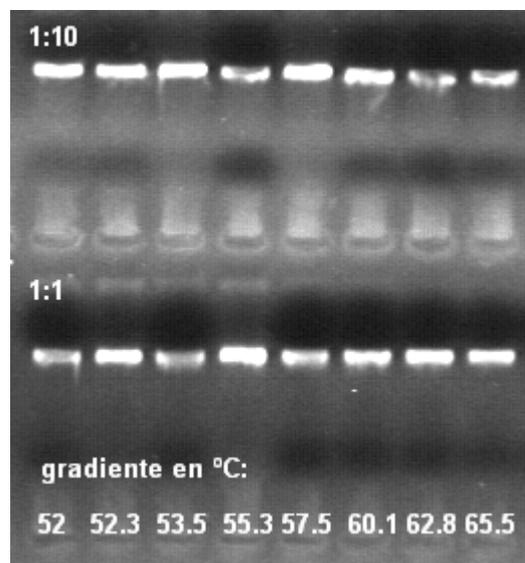


Foto R05. Gel de agarosa al 1% en TBE 0,5x de la PCR frente al serotipo 1.

Como puede observarse, se obtiene una buena respuesta de la cepa M (serotipo 1) a los cebadores diseñados, con formación de bandas en todas las temperaturas empleadas, tanto con el ADN diluido como sin diluir, no habiendo inhibición de la reacción. Seguidamente, se comprobó la especificidad de la reacción empleando el ADN extraído de las 6 cepas tipo capsuladas disponibles y se comprobó la ausencia de reacciones cruzadas, por lo que se procedió a buscar cebadores adecuados frente a los serotipos 5 y 8 a fin de poder desarrollar la PCR múltiple.

2.1.1.2.3.1.1.2.- Serotipos 5 y 8

En este caso partimos de los cebadores descritos por Salasia *et al.*, en 2004, aunque las pruebas con los mismos no dieron los resultados esperados. Posteriormente, teniendo en

cuenta los estudios de Sau *et al.*, (1996, 1997) (*GeneBank* números de acceso U73374 y U81973), en el que se hacía constar la homología entre los operones *cap5* y *cap8*, de manera que el gen G resultaba común a ambos serotipos mientras que el gen H era específico de serotipo, diseñamos un único *primer* 5' común a los serotipos 5 y 8 (denominado *cap58G*) y varios *primers* 3' que figuran detallados a continuación en la **Tabla R20**.

Tabla R20. Secuencia y otros detalles de los cebadores probados frente a los serotipo capsular 5 y 8 de *S. aureus*.

ex	Nombre	Secuencia	Referencia	Banda esperada
Serotipo 5				
5'	<i>cap5-5</i>	ATGACGATGAGGATAGCG	Salasia <i>et al.</i> , 2004	880 pb
3'	<i>cap5-3</i>	CTCGGATAACACCTGTTGC		
5'	<i>cap58G</i>	TTTGAAGTTCCTGGTGTCC	Este estudio, extremo 5' común a los serotipos 5 y 8	
3'	<i>cap5H</i>	TGTTGTACGGCTTGGTTGG	Este estudio, para el serotipo 5, junto con el <i>cap58G</i>	616 pb
3'	<i>cap5H1</i>	TTGTTGTACGGCTTGGTTGG		617 pb
3'	<i>cap5H2</i>	ATTGTTGTACGGCTTGGTTGG		618 pb
3'	<i>cap5H3</i>	GTTGTACGGCTTGGTTGG		615 pb
Serotipo 8				
5'	<i>cap8-5</i>	ATGACGATGAGGATAGCG	Salasia <i>et al.</i> , 2004	1147 pb
3'	<i>cap8-3</i>	CACCTAACATAAGGCAAG		
3'	<i>cap8H</i>	ATCAAACCCACCAGAAAACG	Este estudio, para el serotipo 8, junto con el <i>cap58G</i>	983 pb
3'	<i>cap8H1</i>	TTGAATCATTTGCCAGTTCC		886 pb
3'	<i>cap8H2</i>	TGGAACCTTGAATCATTTGC		893 pb
3'	<i>cap8H3</i>	TCAAACCCACCAGAAAACG		983 pb

Se comprobó el funcionamiento y rendimiento de todos los cebadores y finalmente se puso a punto una PCR múltiple en la que los tamaños finales de banda y los cebadores empleados fueron los que figuran en la **Tabla R21**.

Tabla R21. Cebadores y bandas esperadas en la PCR capsular múltiple.

Gen	Extremo 5'	Extremo 3'	Banda
<i>cap 1</i>	<i>cap1-5'</i>	<i>cap1-3'</i>	456 pb
<i>cap 5</i>	<i>cap58G</i>	<i>cap5H2</i>	618 pb
<i>cap 8</i>		<i>cap8H1</i>	886 pb

La PCR que se diseñó para determinar si las cepas de *S. aureus* capsuladas pertenecían a los serotipos 1, 5 u 8 permitía en una sólo reacción la discriminación de los tres serotipos. Además, resultaba específica de dichos serotipos sin presentar reacciones cruzadas entre ellos, siendo negativas las cepas tipo de los serotipos 2 (cepa Smith), 3 (cepa Mardi) y 4 (cepa 7007). Como controles positivos se utilizó el ADN extraído de las cepas tipo capsuladas de *S. aureus* M (serotipo 1), Reynolds (serotipo 5) y Becker (serotipo 8). Tanto la mezcla de reacción como el programa de termociclador empleados figuran detallados en el capítulo de “Material y Métodos”. La **Foto R06** muestra, a modo de ejemplo, un gel de agarosa correspondiente a los amplicones de esta PCR.

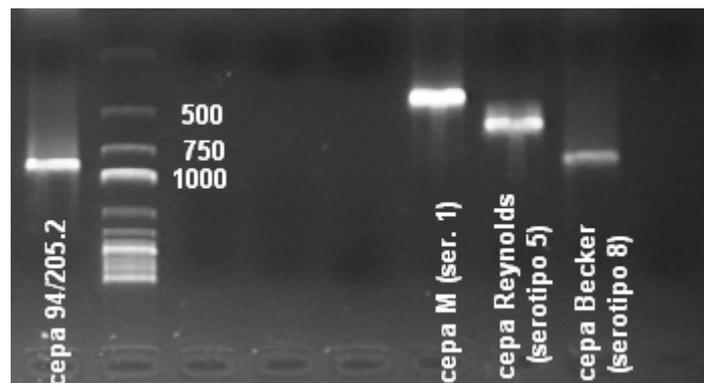


Foto R06. Gel de agarosa de la PCR capsular múltiple.

2.1.1.2.3.1.2.-Resultados de la PCR capsular múltiple

Se extrajo el ADN y se realizó la PCR de todas las cepas de *S. aureus*, independientemente de la morfología que presentasen en agar blando suero (SSA), puesto que es un hecho conocido que el mantenimiento *in vitro* de cepas de *Staphylococcus* spp. puede ocasionar la pérdida de la cápsula, lo que provocaría que cepas que *in vivo* fueran capsuladas aparecieran negativas en la prueba en agar blando suero. Por otro lado, la presencia de cepas con expresión capsular mínima (microcápsuladas) puede dar lugar a cepas con aspecto compacto en SSA e incluso positivas a *clumping factor*.

Cada cepa fue objeto de análisis mediante PCR en dos ocasiones y días diferentes. En la **Tabla R22** siguiente se presentan las cepas de *S. aureus* que resultaron positivas en la PCR capsular frente a los serotipos 1, 5 y 8.

Tabla R22. Cepas positivas a la PCR capsular.

Cepa	Identificación	PCR CAPSULAR (Serotipos 1, 5 y 8)
92/002.07	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
92/039.02	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
92/040.03	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
92/040.05	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
92/052.08	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
92/080.11	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
92/216.02	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
93/234.02	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
93/389.02	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
93/406.02	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
94/032.00	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
94/092.05	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
94/177.00	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
94/205.02	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8
S20	<i>S. aureus</i>	Serotipo 8

Como se aprecia en la tabla, 15 de las 109 cepas de *S. aureus* fueron positivas a la PCR de determinación capsular, lo que supone un 13,76% de las cepas, siendo destacable que todas pertenecieron al serotipo 8.

2.1.2.- *Slime*. Detección de cepas productoras de *slime*

2.1.2.1.- Método de Christensen

El método de Christensen consiste en la detección de la formación de *slime* mediante la tinción de las poblaciones bacterianas adheridas a superficies inertes. En el ajuste y puesta a punto del método, se utilizó un número reducido de cepas seleccionadas.

2.1.2.1.1.- Ajuste y puesta a punto del método

Se comparó la influencia en los resultados de la prueba de varios medios de cultivo y colorantes.

2.1.2.1.1.1.- Influencia del tipo de medio de cultivo empleado.

Puesto que algunos autores (Hussain *et al.*,1991) aconsejan el uso del medio HHW químicamente definido como caldo de elección para la detección de *slime* según el método de Christensen, llevamos a cabo su comparación frente al uso de TSB o BHI. El estudio comparativo se realizó con las 8 cepas de prueba seleccionadas a que se hizo referencia con anterioridad y que aparecen recogidas en el **Apéndice M01**.

2.1.2.1.1.1.1.- Comparación del *slime* presente.

Los resultados de las pruebas realizadas con las 8 cepas simultáneamente en los tres caldos, mostraron inequívocamente que la formación de *slime* en tubo en el medio HHW, en caso de aparecer, era considerablemente más pobre que empleando cualquiera

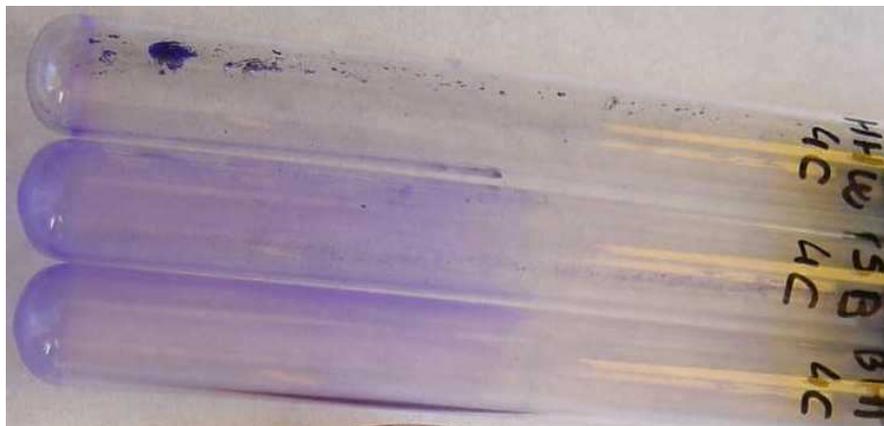


Foto R07. Detalle del *slime* producido por la cepa de *S. aureus* 4C en los medios HHW, TSB y BHI, , incubación estática en tubo de cristal, 48h a 37°C y tinción por Azul de Toluidina.

de los otros dos caldos (**Fotos R07 y R08**). En ellos los resultados eran similares entre sí, como ya ha sido referido por Freeman *et al.* en 1989.

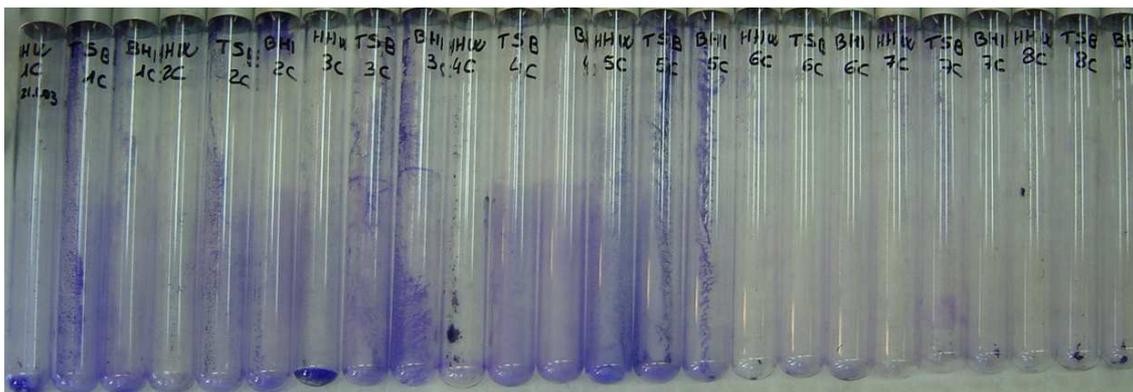


Foto R08. Slime producido por las 8 cepas seleccionadas de *Staphylococcus* sp. En los caldos HHW, TSB y BHI. Incubación estática en tubo de cristal, 48h a 37°C y tinción por azul de toluidina.

2.1.2.1.1.2.- Crecimiento de las cepas tipo en cada uno de los caldos de prueba.

Para resolver posibles dudas en relación con la influencia de la capacidad de crecimiento en el medio de cultivo, se llevó a cabo un estudio comparativo del crecimiento obtenido en cada uno de los caldos mediante la medida de la densidad óptica (DO) a las 22 y 46 horas de cultivo en condiciones óptimas (**Tabla R23**):

Tabla R23. Absorbancia (DO) de las cepas de prueba sobre los tres caldos recomendados para efectuar la prueba de Christensen de detección de *slime*.

ref	Identificación	caldo	Horas de cultivo			ref	Identificación	caldo	Horas de cultivo		
			0	22	46				0	22	46
1C	93/406.01 <i>S. aureus</i>	BHI	0,059	1,355	1,350	5C	93/241.01 <i>S. epidermidis</i>	BHI	0,023	1,466	1,330
		TSB	0,125	1,233	1,215			TSB	0,059	1,202	1,201
		HHW	0,114	1,571	1,711			HHW	0,053	1,449	1,547
2C	92/080.13 <i>S. aureus</i>	BHI	0,067	1,287	1,368	6C	92/066.01 <i>S. epidermidis</i>	BHI	0,095	1,222	1,012
		TSB	0,144	0,776	0,879			TSB	0,067	0,846	0,920
		HHW	0,134	1,166	1,348			HHW	0,048	0,872	1,262
3C	93/234.08 <i>S. aureus</i>	BHI	0,055	1,414	1,455	7C	93/520.01 <i>S. xylosus</i>	BHI	0,066	0,731	1,124
		TSB	0,116	1,290	1,316			TSB	0,099	0,598	0,806
		HHW	0,108	1,621	1,748			HHW	0,106	0,470	0,843
4C	93/500 <i>S. aureus</i>	BHI	0,058	1,346	1,373	8C	94/165.01 <i>S. xylosus</i>	BHI	0,070	0,654	0,913
		TSB	0,111	0,974	1,025			TSB	0,105	0,498	0,685
		HHW	0,118	1,562	1,657			HHW	0,112	0,434	0,667

En la página siguiente representamos en el **Gráfico R04** los resultados de crecimiento de las 8 cepas en los 3 caldos.

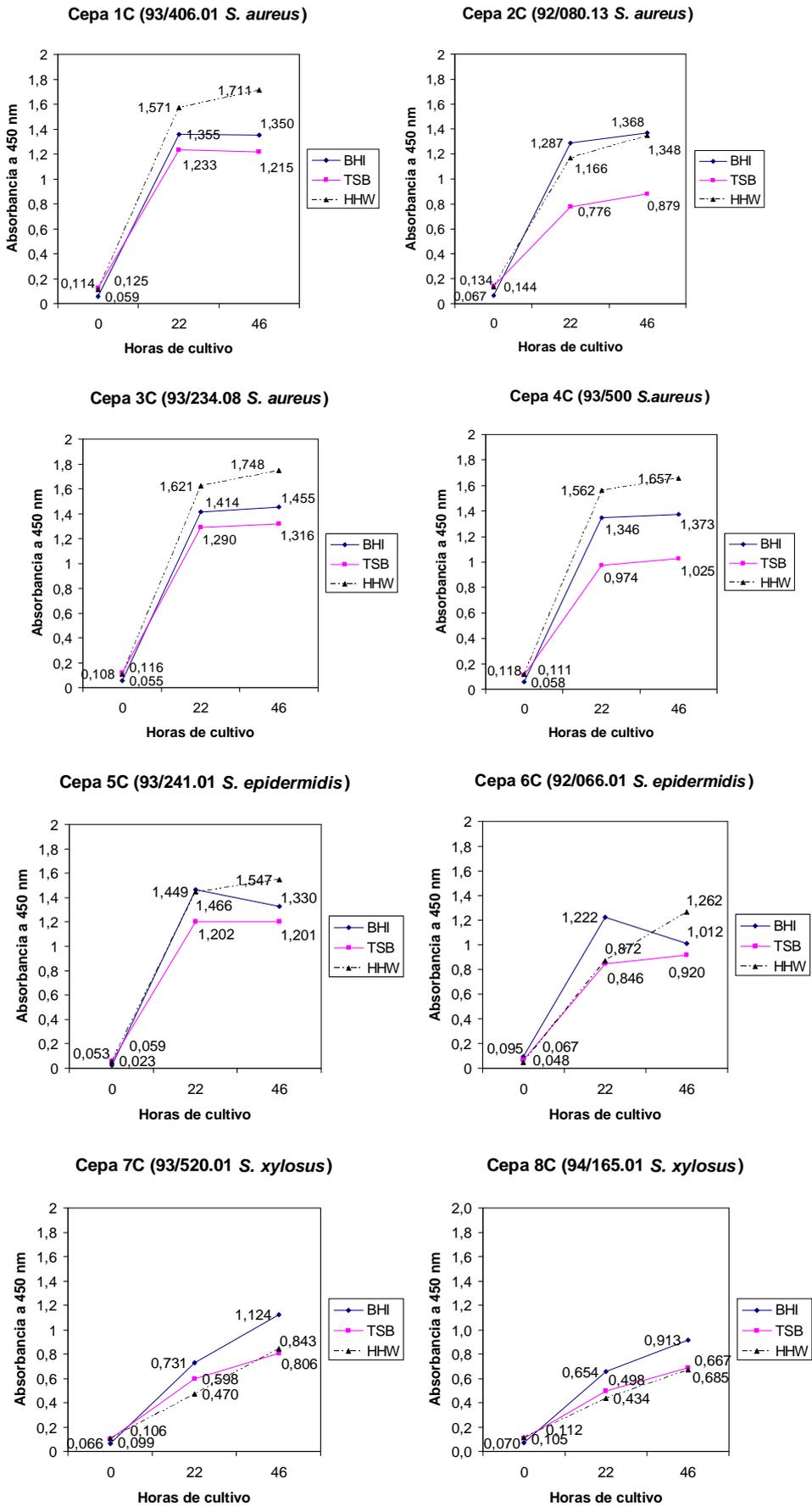


Gráfico R04. Curvas de crecimiento de las 8 cepas de prueba.

Por lo que se refiere a las 4 cepas de *S. aureus*, si se promedian las DO de partida (0,059; 0,124 y 0,118 respectivamente en BHI, TSB y HHW) con las obtenidas a las 46 h de incubación (1,386; 1,108 y 1,616 respectivamente), resulta que la mayor diferencia se obtiene en el caso del caldo HHW (1,498) seguido del BHI (1,327) y en último lugar el TSB (0,984).

En el caso de las dos cepas de *S. epidermidis*, los valores medios de partida fueron respectivamente 0,059; 0,063 y 0,050 y los obtenidos a las 46 horas 1,171; 1,010 y 1,409 de lo que resulta que la mayor diferencia en crecimiento se obtuvo en el caso de HHW (1,359) seguido del BHI (1,112) y TSB (0,947).

Finalmente, en las dos cepas de *S. xyloso*, los valores medios de partida fueron de 0,068; 0,102 y 0,104, siendo las obtenidas a las 46 horas de 1,068; 0,745 y 0,755 de lo que resulta que la mayor diferencia se obtuvo en el caso del BHI (1,000) seguido del HHW (0,651) y del TSB (0,643). De todo ello se deduce que con carácter general el medio HHW es el que permite mayores crecimientos y el TSB los peores, con el matiz de que en el caso de *S. xyloso*, el BHI supera ampliamente a los demás.

Una vez estudiados los crecimientos en los tres caldos probados, se comprobó que la menor formación de *slime* sobre el medio HHW no se debía a un menor crecimiento en este medio comparándolo con los otros dos, sino que incluso, al menos con cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, en este medio se conseguían mayores DO que en los otros dos caldos empleados. En el caso de *S. xyloso*, el peor crecimiento se obtuvo precisamente en HHW. Consecuencia de todo ello fue la elección del caldo BHI para el estudio de la formación de *slime* por el método de Christensen.

2.1.2.1.1.1.3.- Colorante utilizado

Puesto que varios autores han aconsejado emplear diferentes soluciones colorantes [(Christensen *et al.*(1982): tripán azul; Freeman *et al.*(1989): tripán azul; Hogt *et al.*(1983): azul alcian; Souto *et al.*(1989): azul alcian o safranina; Hèbert (1988): safranina; Chilek y Simurda(2003): cristal violeta ; Fox *et al.*(2005): cristal violeta], para la tinción del *slime* formado en las paredes de los tubos, procedimos a comprobar el uso de los más frecuentes comparando la facilidad de lectura visual del *slime* formado por las cepas seleccionadas. Esta prueba sólo tenía por objeto elegir el colorante más adecuado para hacer más patente el crecimiento adherido a los tubos de ensayo y facilitar así su lectura.

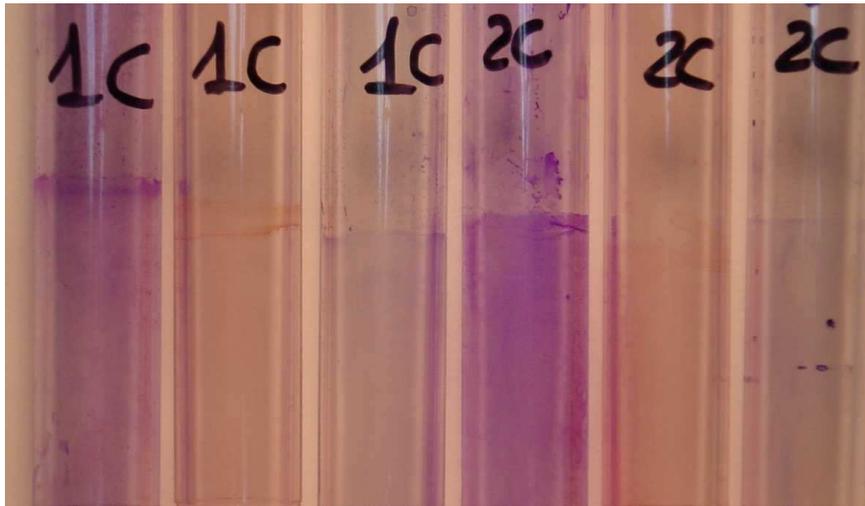


Foto R09. *Slime* producido por 2 de las cepas seleccionadas de *S. aureus* teñido con cristal violeta, safranina o tripán azul. Incubación estática, tubo plástico, 48h a 37°C .

Los resultados obtenidos se presentan en la **Foto R09**, en la que se comparan una cepa de *S. aureus* poco productora (1C) con una más productora de *slime* (2C). Según se observa, se consigue mayor diferenciación entre ambas cepas mediante el uso de cristal violeta que empleando cualquiera de los otros dos colorantes, siendo elegido por ello en este procedimiento. A partir de este momento, todas las valoraciones del *slime* en tubo se realizaron empleando cristal violeta como colorante.

2.1.2.1.1.4.- Resultados de la formación de *slime* mediante el método de Christensen

Como se ha señalado, se utilizó caldo BHI y cristal violeta como colorante. Puesto que el crecimiento se llevó a cabo en un sistema en estático, la valoración de la presencia de *slime* se realizó en la superficie, pared y fondo del tubo de ensayo. En la **Tabla R24** se presentan los resultados globales obtenidos. El valor adjudicado utilizó una escala (0-3) en función de la intensidad observada (ver Material y Métodos).

Tabla R24. Resultados de la detección de la formación de *slime* con el método de Christensen (BHI, cristal violeta).

REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN	Puntuación en Christensen			
		superficie	pared	fondo	Total
89/304.00	<i>S. aureus</i>	1	2	1	4
92/002.03	<i>S. aureus</i>	3	2	1	6
92/002.05	<i>S. aureus</i>	3	2	1	6
92/002.06	<i>S. aureus</i>	3	2	1	6
92/002.07	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
92/003.04	<i>S. xylosus</i>	1	0	0	1
92/003.05	<i>S. xylosus</i>	1	1	3	5
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	1	2	3	6
92/021.04	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
92/022.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	1	2	1	4
92/024.01	<i>S. aureus</i>	1	2	2	5
92/024.03	<i>S. aureus</i>	1	2	1	4
92/024.04	<i>S. aureus</i>	1	2	1	4
92/024.05	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	2	0	2	4
92/032.01	<i>S. xylosus</i>	2	0	1	3
92/032B	<i>S. haemolyticus</i>	0	0	1	1
92/039.01	<i>S. aureus</i>	0	1	1	2
92/039.02	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
92/039.03	<i>S. aureus</i>	0	1	1	2
92/039.05	<i>S. epidermidis</i>	1	0	2	3
92/040.03	<i>S. aureus</i>	0	0	1	1
92/040.05	<i>S. aureus</i>	0	0	1	1
92/040.07	<i>S. xylosus</i>	2	1	3	6
92/042.01	<i>S. aureus</i>	0	0	2	2
92/046.03	<i>S. xylosus</i>	0	0	1	1
92/047.01	<i>S. xylosus</i>	0	1	2	3
92/047.02	<i>S. xylosus</i>	0	1	2	3
92/047.03	<i>S. xylosus</i>	0	0	2	2
92/047.04	<i>S. xylosus</i>	0	1	2	3
92/047.08	<i>S. epidermidis</i>	3	2	2	7
92/047.11	<i>S. epidermidis</i>	0	0	2	2
92/047.14	<i>S. xylosus</i>	2	2	2	6
92/051.01	<i>S. aureus</i>	0	2	2	4
92/051.02	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
92/051.03	<i>S. xylosus</i>	3	1	1	5
92/052.01	<i>S. aureus</i>	3	2	2	7
92/052.02	<i>S. aureus</i>	0	2	2	4
92/052.04	<i>S. aureus</i>	1	2	3	6
92/052.05	<i>S. aureus</i>	3	0	0	3
92/052.06	<i>S. aureus</i>	3	1	2	6
92/052.08	<i>S. aureus</i>	3	2	2	7
92/062.03	<i>S. aureus</i>	1	3	2	6
92/063.01	<i>S. epidermidis</i>	1	3	2	6

Tabla R24. Resultados de la detección de la formación de *slime* con el método de Christensen (BHI, cristal violeta) (continuación).

REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN	Puntuación en Christensen			
		superficie	pared	fondo	Total
92/063.04	<i>S. epidermidis</i>	1	3	2	6
92/063.06	<i>S. epidermidis</i>	1	3	3	7
92/063.08	<i>S. epidermidis</i>	1	3	3	7
92/063.10	<i>S. epidermidis</i>	2	0	2	4
92/063.11	<i>S. epidermidis</i>	1	1	3	5
92/063.12	<i>S. epidermidis</i>	3	1	1	5
92/063.13	<i>S. epidermidis</i>	1	2	3	6
92/063.14	<i>S. epidermidis</i>	0	3	3	6
92/063.15	<i>S. epidermidis</i>	1	3	3	7
92/063.16	<i>S. epidermidis</i>	1	3	2	6
92/063.17	<i>S. epidermidis</i>	0	3	3	6
92/063.19	<i>S. epidermidis</i>	1	3	3	7
92/063.23	<i>S. epidermidis</i>	0	3	3	6
92/063.30	<i>S. aureus</i>	3	2	2	7
92/063.31	<i>S. aureus</i>	3	2	0	5
92/066.01 (6C)	<i>S. epidermidis</i>	3	3	3	9
92/066.02	<i>S. epidermidis</i>	0	2	1	3
92/066.03	<i>S. epidermidis</i>	3	0	1	4
92/066.04	<i>S. epidermidis</i>	3	3	2	8
92/066.05	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	0	0	2	2
92/066.07	<i>S. epidermidis</i>	1	3	3	7
92/066.08	<i>S. epidermidis</i>	2	2	1	5
92/066.12	<i>S. epidermidis</i>	3	2	2	7
92/066.13	<i>S. epidermidis</i>	1	3	2	6
92/066.14	<i>S. epidermidis</i>	2	2	1	5
92/066.15	<i>S. aureus</i>	0	3	2	5
92/066.16	<i>S. epidermidis</i>	3	0	0	3
92/080.01	<i>S. aureus</i>	3	3	3	9
92/080.02	<i>S. epidermidis</i>	2	3	2	7
92/080.03	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	0	0	1	1
92/080.05	<i>S. epidermidis</i>	2	3	2	7
92/080.06	<i>S. epidermidis</i>	1	2	1	4
92/080.07	<i>S. epidermidis</i>	1	2	3	6
92/080.08	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
92/080.09	<i>S. aureus</i>	1	0	1	2
92/080.10	<i>S. epidermidis</i>	0	1	2	3
92/080.11	<i>S. aureus</i>	2	3	3	8
92/080.13 (2C)	<i>S. aureus</i>	1	2	2	5
92/080.14	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
92/094.05	<i>S. aureus</i>	0	0	2	2
92/094.06	<i>S. xylosus</i>	3	3	3	9
92/101.05	<i>S. epidermidis</i>	2	2	2	6
92/101.08	<i>S. simulans</i>	0	0	0	0
92/140.02	<i>S. epidermidis</i>	0	1	3	4
92/140.09	<i>S. epidermidis</i>	0	2	3	5
92/140.12	<i>S. gallinarum</i>	2	3	3	8
92/140.15	<i>S. hominis</i>	0	3	2	5

Tabla R24. Resultados de la detección de la formación de *slime* con el método de Christensen (BHI, cristal violeta) (continuación).

REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN	Puntuación en Christensen			
		superficie	pared	fondo	Total
92/172.05	<i>S. aureus</i>	0	2	2	4
92/172.06	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
92/172.10	<i>S. aureus</i>	2	3	2	7
92/201.01	<i>S. aureus</i>	0	2	2	4
92/201.02	<i>S. aureus</i>	3	2	2	7
92/201.05	<i>S. xylosus</i>	3	0	0	3
92/201.06	<i>S. xylosus</i>	2	2	2	6
92/201.07	<i>S. xylosus</i>	1	0	3	4
92/201.08	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
92/201.09	<i>S. xylosus</i>	3	0	0	3
92/204.06	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
92/213.02	<i>S. epidermidis</i>	0	0	1	1
92/213.06	<i>S. epidermidis</i>	2	2	2	6
92/213.07	<i>S. epidermidis</i>	1	1	2	4
92/216.02	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
92/218.01	<i>S. aureus</i>	3	2	2	7
92/225.03	<i>S. epidermidis</i>	1	2	1	4
92/225.06	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0
92/225.11	<i>S. epidermidis</i>	1	0	0	1
92/225.15	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0
93/096.01	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
93/098.03	<i>S. epidermidis</i>	1	1	2	4
93/120.02	<i>S. xylosus</i>	0	0	0	0
93/129.02	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
93/160.05	<i>S. xylosus</i>	2	2	2	6
93/172	<i>S. aureus</i>	2	2	1	5
93/215.06	<i>S. simulans</i>	0	0	0	0
93/220.01	<i>S. aureus</i>	1	0	1	2
93/230.02	<i>S. xylosus</i>	2	0	0	2
93/231.c1	<i>S. xylosus</i>	3	3	2	8
93/231.c2	<i>S. xylosus</i>	3	2	2	7
93/231.c3	<i>S. aureus</i>	1	2	2	5
93/234.01	<i>S. xylosus</i>	2	0	2	4
93/234.02	<i>S. aureus</i>	2	0	2	4
93/234.03	<i>S. xylosus</i>	0	0	0	0
93/234.04	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	3
93/234.05	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0
93/234.08 (3C)	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
93/234.09	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
93/234.11	<i>S. aureus</i>	3	2	3	8
93/234.14	<i>S. epidermidis</i>	1	0	1	2
93/240.01	<i>S. simulans</i>	2	2	1	5
93/240.02	<i>S. epidermidis</i>	1	1	2	4
93/240.03	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
93/240.04	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
93/240.05	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
93/240.06	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	2	2	2	6

Resultados

Tabla R24. Resultados de la detección de la formación de *slime* con el método de Christensen (BHI, cristal violeta) (continuación).

REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN	Puntuación en Christensen			
		superficie	pared	fondo	Total
93/240.07	<i>S. epidermidis</i>	2	2	3	7
93/241.01 (5C)	<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0
93/251.02	<i>S. aureus</i>	3	2	3	8
93/251.03	<i>S. aureus</i>	3	2	2	7
93/251.06	<i>S. aureus</i>	1	3	2	6
93/256.01	<i>S. aureus</i>	1	2	3	6
93/256.02	<i>S. aureus</i>	1	3	2	6
93/256.03	<i>S. aureus</i>	1	2	1	4
93/257.02	<i>S. gallinarum</i>	0	0	0	0
93/257.05	<i>S. gallinarum</i>	0	1	1	2
93/273.03	<i>S. xylosus</i>	2	0	1	3
93/273.04	<i>S. epidermidis</i>	2	3	2	7
93/273.05	<i>S. epidermidis</i>	2	2	2	6
93/273.06	<i>S. epidermidis</i>	2	2	2	6
93/281.00	<i>S. xylosus</i>	1	0	1	2
93/281.01	<i>S. epidermidis</i>	1	2	1	4
93/281.02	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	3
93/281.03	<i>S. epidermidis</i>	2	3	2	7
93/281.04	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	3
93/281.12	<i>S. xylosus</i>	3	1	1	5
93/281.13	<i>S. simulans</i>	0	1	0	1
93/281.18	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	1	2	0	3
93/281.19	<i>S. epidermidis</i>	1	1	1	3
93/281.20	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
93/281.21	<i>S. aureus</i>	1	1	1	3
93/283.01	<i>S. aureus</i>	2	1	1	4
93/283.02	<i>S. aureus</i>	1	2	2	5
93/285.02	<i>S. epidermidis</i>	1	1	2	4
93/285.05	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
93/285.06	<i>S. gallinarum</i>	1	0	3	4
93/285bis	<i>S. aureus</i>	2	3	2	7
93/291.05	<i>S. xylosus</i>	2	1	1	4
93/303.03	<i>S. xylosus</i>	3	3	3	9
93/323.01	<i>S. xylosus</i>	0	1	2	3
93/323.04	<i>S. xylosus</i>	0	1	2	3
93/328.11	<i>S. epidermidis</i>	1	2	1	4
93/328.13	<i>S. haemolyticus</i>	3	1	3	7
93/328.14	<i>S. epidermidis</i>	1	1	3	5
93/354.03	<i>S. epidermidis</i>	0	1	1	2
93/354.06	<i>S. haemolyticus</i>	0	0	3	3
93/389.02	<i>S. aureus</i>	1	3	2	6
93/406.01 (1C)	<i>S. aureus</i>	0	2	1	3
93/406.02	<i>S. aureus</i>	0	2	1	3
93/406.03	<i>S. aureus</i>	0	2	1	3
93/469.02	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6

Tabla R24. Resultados de la detección de la formación de *slime* con el método de Christensen (BHI, cristal violeta) (continuación).

REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN	Puntuación en Christensen			
		Superficie	pared	fondo	Total
93/487.01	<i>S. aureus</i>	1	2	3	6
93/494.01	<i>S. aureus</i>	2	1	3	6
93/494.03	<i>S. xylosus</i>	3	0	2	5
93/500.00 (4C)	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
93/501.02	<i>S. aureus</i>	3	2	2	7
93/504.03	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
93/506.04	<i>S. epidermidis</i>	2	2	2	6
93/508.00	<i>S. xylosus</i>	1	0	0	1
93/510.03	<i>S. xylosus</i>	1	1	0	2
93/510.04	<i>S. xylosus</i>	2	0	0	2
93/512.01	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
93/520.01 (7C)	<i>S. xylosus</i>	0	0	2	2
94/023.02	<i>S. epidermidis</i>	1	2	2	5
94/023.03	<i>S. xylosus</i>	3	3	3	9
94/024.01	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
94/024.04	<i>S. xylosus</i>	0	0	1	1
94/025.01	<i>S. xylosus</i>	2	0	2	4
94/025.02	<i>S. xylosus</i>	3	2	3	8
94/025.04	<i>S. epidermidis</i>	1	2	3	6
94/032.00	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
94/034.02	<i>S. aureus</i>	1	2	3	6
94/034.05	<i>S. aureus</i>	1	2	3	6
94/092.04	<i>S. aureus</i>	1	1	1	3
94/092.05	<i>S. aureus</i>	0	2	1	3
94/093.01	<i>S. aureus</i>	0	2	2	4
94/093.02	<i>S. aureus</i>	0	1	2	3
94/108.06	<i>S. xylosus</i>	1	2	3	6
94/114.01	<i>S. gallinarum</i>	1	2	3	6
94/114.02	<i>S. gallinarum</i>	3	3	3	9
94/114.04	<i>S. gallinarum</i>	2	1	3	6
94/143.00	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
94/165.01 (8C)	<i>S. xylosus</i>	3	2	2	7
94/165.02	<i>S. aureus</i>	1	2	1	4
94/166.02	<i>S. hominis</i>	0	0	3	3
94/174.01	<i>S. gallinarum</i>	2	2	2	6
94/174.02	<i>S. gallinarum</i>	3	2	2	7
94/175.00	<i>S. aureus</i>	1	2	1	4
94/177.00	<i>S. aureus</i>	1	2	2	5
94/205.01	<i>S. aureus</i>	1	2	2	5
94/205.02	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
94/205.03	<i>S. aureus</i>	2	2	2	6
S01	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S02	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S03	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S04	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S06	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S07	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0

Resultados

Tabla R24. Resultados de la detección de la formación de *slime* con el método de Christensen (BHI, cristal violeta) (continuación).

REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN	Puntuación en Christensen			
		superficie	pared	fondo	Total
S08	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S09	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S10	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S12	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S13	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S14	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S15	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S16	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S18	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S19	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S20	<i>S. aureus</i>	1	0	0	1
S21	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S22	<i>S. aureus</i>	2	0	0	2
S23	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S24	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0
S25	<i>S. aureus</i>	0	0	0	0

Puntuaciones parciales		superficie	pared	fondo
	Cepas de 0	69	34	44
	Cepas de 1	88	95	97
	Cepas de 2	51	37	52
	Cepas de 3	38	80	53

Puntuaciones totales			Σ	%	
	Cepas con 0		25	10,2	
	Cepas con 1		25	10,2	
	Cepas con 2		18	7,3	
	Cepas con 3		28	11,4	
	Cepas con 4		31	12,6	
	Cepas con 5		29	11,8	
	Cepas con 6		52	21,1	
	Cepas con 7		25	10,2	
	Cepas con 8		7	2,8	
	Cepas con 9		6	2,4	
	TOTAL	246	246	246	100
Cepas con > 5 puntos			90	36,6	

De las 246 cepas estudiadas por este método, únicamente 90 (un 36,6%) presentan puntuaciones altas de formación de *slime* (más de 5). En la **Tabla R25** se presentan los resultados, agrupados por especies, en el caso de cepas *slime* positivas (con una puntuación en el método de Christensen de más de 5):

Tabla R25. Cepas con más de 5 puntos en el método de Christensen agrupadas por especies.

	Total de cepas de la especie	Cepas > 5 pts	% en la Especie	% en el total	% sobre cepas > 5 puntos
<i>S. aureus</i>	109	40	36,7	16,3	44,4
<i>S. epidermidis</i>	73	30	41,1	12,2	33,3
<i>S. xylosus</i>	41	12	29,3	4,9	13,3
<i>S. gallinarum</i>	9	6	66,7	2,4	6,7
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	5	1	20,0	0,4	1,1
<i>S. haemolyticus</i>	3	1	33,3	0,4	1,1
<i>S. simulans</i>	4	0	0,0	0,0	0,0
<i>S. hominis</i>	2	0	0,0	0,0	0,0
TOTALES	246	90	-	36,6	100,0

S. aureus es la especie más aislada en este trabajo y la que presenta, en cifras absolutas, más cepas productoras de *slime*. Sin embargo, *S. epidermidis* proporcionalmente, presenta más cepas productoras de *slime*, alcanzando un 41,1% de las cepas frente al 36,7% de las cepas de *S. aureus*. La tercera especie más aislada, *S. xylosus*, resulta tener muchas menos cepas productoras que las dos anteriores, llegando únicamente al 29,3%.

Considerando el total de puntuaciones obtenidas, de las tres especies predominantes, los resultados fueron los siguientes (**Tabla R26** y el **Gráfico R05**):

Tabla R26. Detalle de las puntuaciones de formación de *slime* de las especies más frecuentes.

Puntuación	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. xylosus</i>	Otros
0	14,7%	5,5%	4,9%	13,0%
1	14,7%	2,7%	9,8%	13,0%
2	6,4%	4,1%	14,6%	8,7%
3	7,3%	11,0%	22,0%	13,0%
4	11,9%	16,4%	9,8%	8,7%
5	8,3%	19,2%	9,8%	8,7%
6	24,8%	21,9%	12,2%	17,4%
7	8,3%	16,4%	4,9%	8,7%
8	2,8%	1,4%	4,9%	4,3%
9	0,9%	1,4%	7,3%	4,3%
	100%	100%	100%	100%

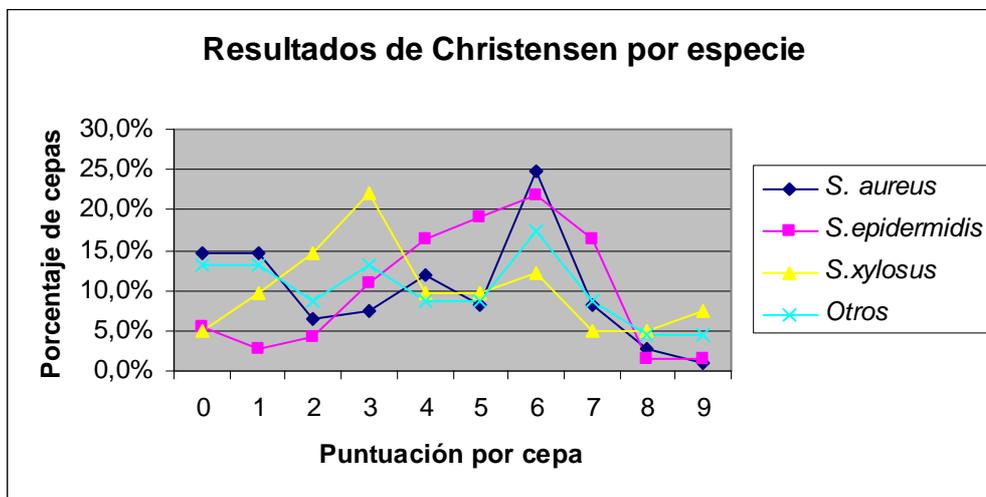


Gráfico R05. Porcentajes de cepas, por especie, respecto a la producción de *slime*.

Finalmente, como se observa en la **Tabla R27**, las cepas más productoras de *slime* (puntuación máxima de 9) solamente se obtuvieron en 4 especies, con un solo caso en *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. gallinarum*, mientras que de *S. xylosus* se obtuvieron 3 cepas con la máxima puntuación en producción de *slime*, lo que no deja de resultar llamativo, toda vez que ésta fue la especie que presentó el menor número de cepas productoras de *slime*.

Tabla R27. Cepas de máxima puntuación en la prueba de Christensen.

REFERENCIA	IDENTIFICACIÓN	Puntuación en la prueba de Christensen			
		Superficie	Pared	Fondo	Total
92/080.01	<i>S. aureus</i>	3	3	3	9
92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	3	3	3	9
94/114.02	<i>S. gallinarum</i>	3	3	3	9
92/094.06	<i>S. xylosus</i>	3	3	3	9
93/303.03	<i>S. xylosus</i>	3	3	3	9
94/023.03	<i>S. xylosus</i>	3	3	3	9

2.1.2.2.- Agar Rojo Congo

Este medio de cultivo fue desarrollado por Freeman *et al.*, en 1989 como medio diferencial para distinguir las cepas de estafilococos coagulasa negativos productores de *slime* de origen humano de los no productores, en especial *S. epidermidis*, y orientado a cepas relacionadas con la colonización de implantes.

El método resulta atractivo por su sencillez y porque permite distinguir en cultivos mixtos colonias productoras y no productoras. Sin embargo, en las primeras pruebas llevadas a cabo con cepas aisladas, se observó la aparición de aislados cuya apariencia colonial no coincidía con los tipos descritos originalmente por Freeman *et al.* (1989), pese a que se emplearon cepas productoras de *slime* (según determinación por el método de Christensen en tubo), por lo que se consideró necesario fijar las condiciones óptimas de empleo del agar Rojo Congo antes de utilizarlo con todas las cepas aisladas. A tal efecto se estudió la influencia de factores relacionados con la elaboración del medio, su composición y la incubación.

2.1.2.2.1.-Influencia del origen de las materias primas

Ya en las primeras pruebas en las que se empleó el medio, se encontró bastante disparidad entre los datos de adherencia según la técnica de Christensen en tubo y el uso del agar Rojo Congo pese a que ambas pruebas están recomendadas para la detección de cepas productoras de *slime*.

Puesto que en dichos ensayos preliminares se comenzó empleando materias primas de distinto proveedor al reseñado por los autores, se pensó que las diferencias que se observaban podían deberse a ello, por lo que se procedió a adquirir las materias primas originales y comprobar la diferencia que podía surgir del empleo de unas u otras.

Resultados

En esta prueba se elaboró el agar rojo congo con la composición descrita por los autores (Freeman *et al.*, 1989) pero en un caso se utilizaron las materias primas de los proveedores indicados en la cita (“Rojo Congo Clásico”, RCC) y alternativamente se utilizó los proveedores que normalmente veníamos empleando en los estudios preliminares (“Rojo Congo”, RC) tal como se detalla a continuación (**Tabla R28**):

Tabla R28. Composición de los agares Rojo Congo.

Rojo Congo Clásico (RCC)	Rojo Congo (RC)	g/litro
BHI Broth (Oxoid)	Caldo Infusión Cerebro-Corazón (Pronadisa)	37
Agar nº1 (Oxoid)	Agar industrial (Pronadisa)	10
	Sacarosa (Fluka)	50
	Rojo Congo (Merck)	0,8

En el estudio comparativo se utilizaron las 8 cepas empleadas en ensayos anteriores como cepas de prueba y se anotó la apariencia colonial a las 24 y 48 horas de incubación (**Tabla R29** y **Foto R10**):

Tabla R29. Aspecto colonial sobre agar Rojo Congo de cepas de *Staphylococcus* según las materias primas utilizadas en la elaboración del medio.

Código	Referencia	Identificación	24 horas a 37°C		24 horas a 37°C y 24 horas a 22°C	
			RCC	RC	RCC	RC
1C	93/406.01	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL-	RBL-	RBL-
2C	92/080.13	<i>S. aureus</i>	RBL-	cNSL	RBL-	NSL-
3C	93/234.08	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL-	RBL-	MSL-
4C	93/500	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL-	RBL-	NBL-
5C	93/241.01	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	RBL-	RBL-	RSL-
6C	92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	RBL-	RBL-	NBL-
7C	93/520.01	<i>S. xylosus</i>	SC	RBL-(d)	RBL-(d)	RBL-
8C	94/165.01	<i>S. xylosus</i>	SC	cNBL-	RBL-	NBL-

Clave: color-superficie-aspecto.

Color: Rojo, Negro, centro Negro, Marrón. **Superficie:** Brillante, Satinada. **Aspecto:** rugoso, Liso.

Precipitado: + presencia, - ausencia. (d) crecimiento débil. SC=sin crecimiento

En gris aparecen resaltados los cambios respecto al medio de Rojo Congo normal (RC) en el Rojo Congo Clásico (RCC).



Foto R10. Aspecto a las 48 horas de incubación de la cepa de *S.aureus* 92/080.13 (2C) sembrada en agar Rojo Congo clásico (izquierda) o normal (derecha). En ambos casos con colorante al 0,08%.

Como resultado, puede resumirse que las cepas:

- crecían mejor en el medio RC; de hecho, a las 24 horas alguna especie (*S. xylosus*) no crecía en el RCC.

- la característica diferencial del medio se apreciaba con mayor nitidez en el medio RC.

Como conclusión el hallazgo de aspectos coloniales diferentes de los descritos originalmente para agar Rojo Congo no se debe a la composición del mismo, sino probablemente a las propias características de las cepas empleadas, puesto que en el caso de Freeman *et al.* (1989) se emplearon cepas humanas. Sin embargo, es poco tranquilizadora la gran influencia que las materias primas utilizadas ejercen sobre las propiedades diferenciales del medio, lo que obliga a tener cepas control positivas y negativas a *slime* antes de adoptar cualquier decisión al respecto.

2.1.2.2.2.- Influencia de tiempo y temperatura de incubación

Otro aspecto que se investigó como posible causa de la diferencia encontrada en la descripción original (Freeman *et al.*, 1989) fue la posible influencia del tiempo y la temperatura de incubación, aspectos importantes ya que ciertas especies de las aisladas se mostraron con crecimiento lento o débil a las 24 horas (especialmente, *S. xylosus*).

Se comparó el aspecto colonial de una serie de 27 cepas (las cepas de prueba y otras cepas seleccionadas al azar entre los aislados) después de una incubación inicial a 37°C durante 24 horas y después de prolongar la incubación otras 24 horas a temperatura ambiente (indicada como 22°C). En la **Tabla R30** se recogen las variaciones en el aspecto

Resultados

de las colonias. Como medio de cultivo se utilizó agar Rojo Congo con el colorante rojo congo al 0,08% esterilizado con el medio (medio RC).

Tabla R30. Influencia del tiempo y temperatura de incubación en la apariencia colonial.

Ref	Identificación	24 horas a 37°C	24 horas a 37°C y 24 horas a 22°C
93/406.01 (1C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL-
92/080.13 (2C)	<i>S. aureus</i>	cNSL	NSL-
93/234.08 (3C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	MSL-
93/500 (4C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	NBL-
93/241.01 (5C)	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	RSL-
92/066.01 (6C)	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	NBL-
93/520.01 (7C)	<i>S. xylosus</i>	RBL-(d)	RBL-
94/165.01 (8C)	<i>S. xylosus</i>	cNBL-(d)	NBL-
89/304	<i>S. aureus</i>	RBL	RBL
92/002.03	<i>S. aureus</i>	VML	VML
92/003.04	<i>S. xylosus</i>	RBL	RBL
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	RBL	RML
92/051.01	<i>S. aureus</i>	RBL	RSL
92/052.02	<i>S. aureus</i>	RBL	VBR
92/052.05	<i>S. aureus</i>	RBL	RBL
92/062.03	<i>S. aureus</i>	RBL	MML
92/063.12	<i>S. epidermidis</i>	RBL	RBL
92/063.30	<i>S. aureus</i>	cNMR	NMR
92/066.12	<i>S. epidermidis</i>	RBL	RBL
92/094.06	<i>S. xylosus</i>	RBL	RBL
92/172.10	<i>S. aureus</i>	rBL	rBL
93/231C.02	<i>S. xylosus</i>	RBL (d)	RBL
93/273.04	<i>S. epidermidis</i>	RBL	RBL
93/273.06	<i>S. epidermidis</i>	RML	RBR
93/281.21	<i>S. aureus</i>	RBL	RBL
93/285 bis	<i>S. aureus</i>	RBL	RBL
93/303.03	<i>S. xylosus</i>	RML	MML

Clave: Color-superficie-aspecto. Color: Rojo, rosa, Negro, Variantes, centro Negro, Marrón. Superficie: Brillante, Satinada, Mate. Aspecto: Rugoso, Liso. (d): crecimiento débil.
las diferencias aparecen sombreadas.

Como resultado del estudio se observó que:

-el desarrollo de algunas cepas era débil a las 24 horas, aunque se desarrollan bien a las 48 horas.

-se producía variación en ciertos aspectos de la morfología colonial, como el color o el aspecto de la superficie si se prolongaba la incubación, lo que determinaba que en algunos casos se pudieran diferenciar, en el mismo aislado, colonias con aspecto diferente (variantes coloniales).

Como conclusión, la prolongación del tiempo de incubación favorecía el carácter diferencial del medio.

2.1.2.2.3.-Influencia del modo de esterilización del colorante

En ciertos casos, los colorantes se ven afectados por la esterilización térmica o bien al ser esterilizados por calor junto con otros componentes del medio (Anónimo, 1984).

En este estudio comparamos el efecto de la esterilización por calor del colorante por separado o simultáneamente con el resto de los componentes del agar Rojo Congo (con un 0,08% de colorante) así como la esterilización por filtración y la adición sobre el medio previamente esterilizado por calor empleando 18 cepas, las de prueba habitualmente utilizadas por nosotros y una serie de cepas de *S. aureus* elegidas al azar.

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla R31**.

Tabla R31. Influencia del modo de esterilización del colorante Rojo Congo en el aspecto de las colonias de algunas cepas de *Staphylococcus sp.*

Cepa	Identificación	Método de esterilización del colorante		
		con el medio	por separado	por filtración
93/406.01 (1C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL+	RBL+
92/080.13 (2C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	cNBL+	cNBL-
93/234.08 (3C)	<i>S. aureus</i>	RSL-	RSL+	MSL+
93/500 (4C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL+	cNBL-
93/241.01 (5C)	<i>S. epidermidis</i>	RSL-	RSL+	RSL+
92/066.01 (6C)	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	cNSL-	RBL-
93/520.01 (7C)	<i>S. xylosum</i>	RBL-	MSL-	MSL-
94/165.01 (8C)	<i>S. xylosum</i>	cNSL-	NSL+	NSL+
S01	<i>S. aureus</i>	cNBLd	RBL+	cNBLd
S02	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL+	MBL-
S03	<i>S. aureus</i>	cNBLd	RBL+	cNBLd
S04	<i>S. aureus</i>	cNBL+	MSL+	MSL+d
S06	<i>S. aureus</i>	NMr+	MSL+	MSL+d
S07	<i>S. aureus</i>	cNBL-	cNBL+	cNBL-
S08	<i>S. aureus</i>	cNBLd	RSL+	cNBLd
S15	<i>S. aureus</i>	RSL-	RSL+	MBL-
S16	<i>S. aureus</i>	NLB-	NLB-	NLB-

Clave: Color-Superficie-Aspecto-Precipitado.

Color: Rojo, Negro, centro Negro, Marrón. Superficie: Brillante, Satinada, Mate. Aspecto: Rugoso, Liso. Precipitado: + Presencia, - Ausencia, d Presencia Débil.

En gris aparecen resaltados los cambios respecto al medio con el colorante incluido antes de autoclavar.

Resultados

Concluida la prueba, se observó la máxima diferencia entre cepas productoras de *slime* o no, en el caso de que el colorante se sometiera a tratamiento del autoclave separado del medio y se añadiera después. Sin embargo, pudo comprobarse que la mayor parte de estas diferencias se debían a la presencia de mayor cantidad de precipitado oscuro en el medio (Foto R11), hecho no descrito antes (Freeman *et al.*, 1989).

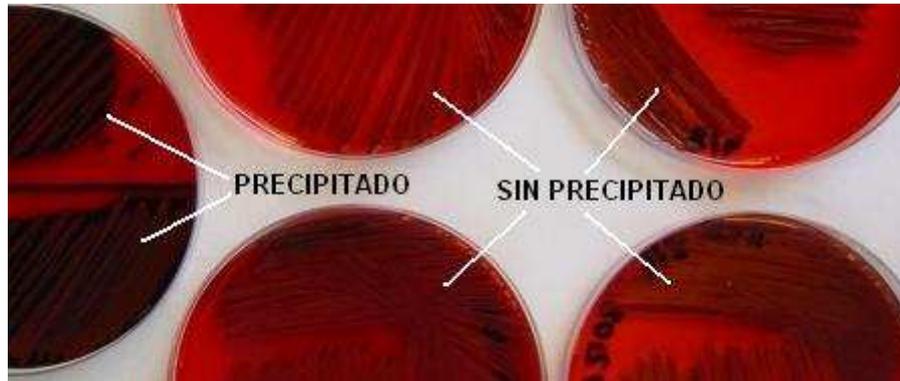


Foto R11. Precipitado en agar Rojo Congo.

El único caso en el que se observó entre estas cepas una morfología colonial como la descrita clásicamente en el caso de cepas formadoras de *slime* (cepa S06) se produjo con el medio en el que el colorante se esterilizaba en autoclave conjuntamente con el medio de cultivo.

Como conclusión, el procesado por separado del colorante no suponía ninguna ventaja discriminativa, aunque sí influía en el aspecto del crecimiento conseguido.

2.1.2.2.4.- Influencia del aumento de la concentración de ClNa sobre la morfología colonial en agar Rojo Congo.

Se comparó el aspecto de las colonias de las cepas tipo en medio rojo congo con un 0,08% del colorante con (RCS) o sin (RCC) la adición de un 3% de ClNa. La incorporación de esta concentración de ClNa ha sido descrita como favorecedora de la producción de polisacáridos, al menos en el caso de *S. aureus* (Sompolinsky *et al.*, 1985). Como en el caso anterior, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y las siguientes 24 horas a 22°C. Los resultados se presentan en la **Tabla R32**.

Tabla R32. Influencia de la adición de ClNa al medio agar Rojo Congo en el aspecto de las colonias de varias cepas.

Cód.	Referencia	Identificación	Datos de superficie		COMPARATIVA	
			SSA (cápsula)	Christensen (<i>adh.</i>)	RCC	RCS
1C	93/406.01	<i>S. aureus</i>	+	-	RBL	RBL
2C	92/080.13	<i>S. aureus</i>	+	+	NSL	MSL
3C	93/234.08	<i>S. aureus</i>	-	-	RSL	MSL
4C	93/500	<i>S. aureus</i>	-	+	NSL	RBL
5C	93/241.01	<i>S. epidermidis</i>	NP	-	cRSL	RBL
6C	92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	NP	+	NBL	MML
7C	93/520.01	<i>S. xyloso</i>	NP	-	RSL	MML
8C	94/165.01	<i>S. xyloso</i>	NP	+	NSL	MML

Clave: color-superficie-aspecto.

Color: Rojo, centro Rojizo, Negro, Marrón. Superficie: Brillante, Satinada, Mate. Aspecto: Liso.

En gris aparecen resaltados los cambios respecto al medio RCC. NP: No Procede.

Como se describe en esta comparativa y contrariamente a lo esperado según lo descrito por Sompolinsky *et al.* (1985), la adición de ClNa hace que la apariencia colonial se transforme hacia un “fenotipo” menos asociado a la producción de *slime*, lo que puede deberse a una menor producción real del mismo, o bien a que la apariencia sobre el medio con más cantidad de ClNa varíe con respecto al medio normal (**Foto R12**). Por otra parte, hay que recordar que los caldos BHI incluyen ya una proporción del 0,5% de ClNa por litro de medio completo.

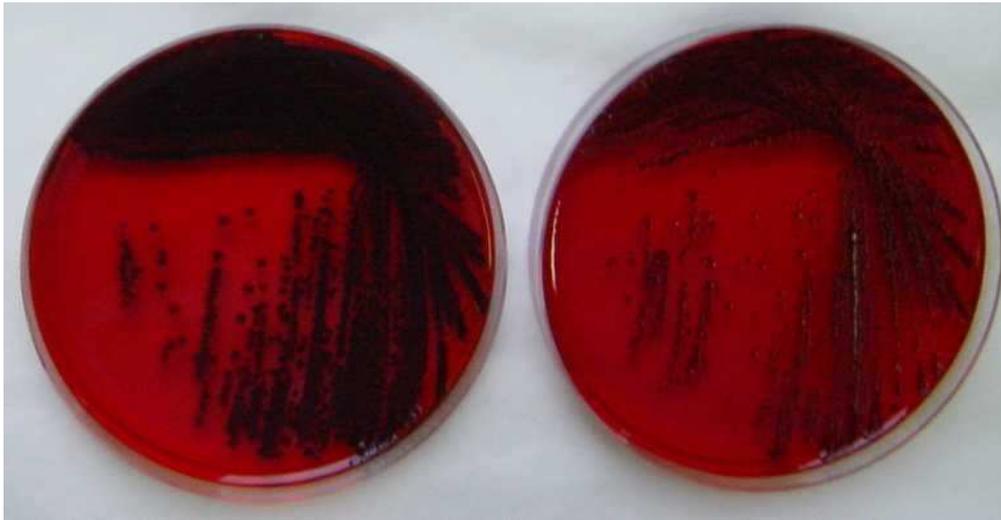


Foto R12. Aspecto a las 24 horas de incubación de la cepa de *S.aureus* 92/080.13 (2C) sembrada en agar Rojo Congo al 0,08% sin (izquierda) o con (derecha) la adición de un 3% de ClNa.

En resumen, la adición de ClNa al agar Rojo Congo no mejora la respuesta del mismo como medio diferencial.

2.1.2.2.5.- Influencia del contenido en colorante Rojo Congo y de la incubación

La disponibilidad comercial de Rojo Congo varía en riqueza entre el 50 y el 75%; en consecuencia, el uso de un tipo u otro proporciona una concentración en el medio final del 0,08 ó 0,12%, según el caso. Freeman *et al.*(1989) no aportan este dato, por lo que pareció conveniente esclarecer su influencia en el resultado final.

Para la prueba se emplearon 19 cepas; las 8 cepas de prueba y 11 cepas elegidas al azar. En este caso se combinó la observación del efecto que se producía modificando la proporción de colorante y la incubación.



Foto R13. Aspecto a las 48 horas de incubación de la cepa Mardi de *S.aureus* sembrada en agar Rojo Congo con un 0,08% (izquierda) o un 0,12% (derecha) de colorante.

Tal como era esperable, esta modificación influyó drásticamente en la apariencia de las colonias que se obtuvieron (**Foto R13**), tal como se refleja en la **Tabla R33**.

Tabla R33. Influencia de las condiciones de incubación y de la proporción de colorante en los resultados de la prueba del agar Rojo Congo.

Referencia	Identificación	24 horas a 37°C		24 horas a 37°C y 24 horas a 22°C	
		0,08 %	0,12 %	0,08 %	0,12 %
92/002.07	<i>S. aureus</i>	RSr-	NSr-	VSr-	NSr-
92/047.08	<i>S. aureus</i>	cNSL-	NSL-	VSL-	VSL-
92/66.01 (6C)	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	RBL-	RBL-	NBL-
92/80.13 (2C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	cNSL-	RSL-	cNBL-
92/218.01	<i>S. aureus</i>	RBL-	NSL-	VSL-	NSL-
93/234.8 (3C)	<i>S. aureus</i>	RSL-	MSL+	RSL-	RSL+
93/240.01	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	RBL-	RBL-	RBL-
93/241.01 (5C)	<i>S. epidermidis</i>	RBL-	RBL-	RSL-	RSL+
93/251.02	<i>S. epidermidis</i>	NSr-	NSr-	NSr-	NSr-
93/251.03	<i>S. epidermidis</i>	NSr-	-	NSr-	NSr-
93/406.1 (1C)	<i>S. aureus</i>	RBL-	RBL-	RBL-	RBL-
93/500 (4C)	<i>S. aureus</i>	MSL-	MSL-	MSL-	cNSL-
93/520.01 (7C)	<i>S. xyloso</i>	(d)	(d)	RSL-	RBL-
94/025.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	RSL-	RSL-	RSL-	RSL-
94/165.01 (8C)	<i>S. xyloso</i>	RSL-	RSL-	RBL-	NSL-
Smith	<i>S. aureus</i>	NSL-	NSL-	NSL-	NSL-
Mardi	<i>S. aureus</i>	RSR-	MSR-	RSR-	NSR-
7007	<i>S. aureus</i>	NSR-	NSR-	NSR-	NSR-

Clave: Color-Superficie-Aspecto. Color: Rojo, centro Rojizo, Negro, centro Negro, Marrón. Superficie: Brillante, Satinada. Aspecto: Rugoso, Liso. En gris resaltados los cambios respecto a la incubación de 24 horas. (d): crecimiento débil.

El efecto observado tras aumentar la concentración del colorante, el tiempo de incubación o ambos fue la intensificación del color de las colonias en el caso de aquellas que finalmente presentaron un color negro, mientras que la mayoría de las cepas no formadoras de *slime* no vieron modificadas las características coloniales. Por tanto, tras el

análisis de los datos obtenidos en estas pruebas, adoptamos la decisión de que las pruebas con el agar Rojo Congo se efectuarían con una proporción del colorante empleado por nosotros del 0,12%, incubando las placas durante 48 horas.

2.1.2.2.6.- Resultados del agar Rojo Congo

Los resultados de las pruebas con el agar Rojo Congo sobre las 246 cepas se presentan resumidos a continuación en la **Tabla R34**.

Tabla R34. Resumen de los resultados sobre agar Rojo Congo.

Característica	Cepas positivas	% sobre el total
<i>Color</i>		
<i>Rojas</i>	182	74,0
<i>Negras</i>	30	12,2
<i>Variantes</i>	13	5,3
<i>Grises</i>	14	5,7
<i>Marrones</i>	7	2,8
TOTAL	246	100,0
<i>Superficie</i>		
<i>Brillante</i>	150	61,0
<i>Satinada</i>	31	12,6
<i>Mate</i>	63	25,6
<i>Variantes</i>	2	0,8
TOTAL	246	100,0
<i>Aspecto</i>		
<i>Rugoso</i>	35	14,2
<i>Liso</i>	205	83,3
<i>Intermedio</i>	5	2,0
<i>Variantes</i>	1	0,4
TOTAL	246	100,0
<i>Precipitado</i>		
<i>Presencia</i>	209	85,0
<i>Ausencia</i>	37	15,0
TOTAL	246	100,0

Tal como se aprecia, teniendo en cuenta que la descripción inicial de las colonias de cepas productoras de *slime* suponía que debían ser colonias negras, mates y de “aspecto cristalino” (superficie rugosa), no existía coincidencia entre los porcentajes de aparición de estos factores. Sin embargo, si nos ceñimos sólo al color de la colonia como indicador de producción de *slime*, comparándolo con la prueba de Christensen, sí que se encuentra una

cierta similitud entre las cepas productoras según la prueba en tubo (con una puntuación mayor de 5) y las cepas que presentan colonias de color negro en el agar Rojo Congo.

La distribución por especies de las cepas que presentan un color diferente del rojo y que, por tanto, podrían ser productoras de *slime* figura en la **Tabla R35**.

Tabla R35. Distribución de la aparición de colonias de color diferente al rojo en agar Rojo Congo.

	Total cepas	Negras	Grisas	Marrones	Con variantes	Total no rojas
<i>S. aureus</i>	109	20	7	3	11	41 (37,61 %)
<i>S. epidermidis</i>	73	1	3	1	1	6 (8,21 %)
<i>S. gallinarum</i>	9	0	2	2	0	4 (44,44 %)
<i>S. haemolyticus</i>	3	0	1	0	0	1 (33,33 %)
<i>S. hyicus</i> subesp <i>chromogenes</i>	5	0	0	0	0	0 (0,00 %)
<i>S. hominis</i>	2	1	0	0	0	1 (50,00%)
<i>S. simulans</i>	4	1	0	0	0	1 (25,00 %)
<i>S. xylosum</i>	41	7	1	1	1	10 (24,39 %)
Totales	246	30	14	7	13	64 (26,01 %)

En estos resultados resulta destacable la bajísima representación de cepas de *S. epidermidis* con colonias de color diferente del rojo y que, por ello, pudiera suponerse productoras de *slime*, representando tan sólo un 8,21% de los aislados de esta especie, lo que destaca frente al 37,61% de *S. aureus*.

2.1.3.- Hidrofobicidad. Medida de la hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana se ha postulado como un posible factor de virulencia ya que de ella depende la adherencia debida a fuerzas electrostáticas de la bacteria a las superficies vivas o inertes. Existen disponibles varios métodos para determinar la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y en este trabajo se probaron los métodos que conllevan la utilización del *p*-xileno y el hexadecano.

2.1.3.1.- Puesta a punto de la determinación de la hidrofobicidad mediante el uso de *p*-xileno y hexadecano

Existen referencias en la bibliografía consultada de la existencia de ciertos factores que influyen la ejecución de estas pruebas, por lo que realizamos una serie de ensayos previos para determinar dicho influjo y establecer las condiciones de partida.

2.1.3.1.1.- Comprobación de la influencia del método de cultivo.

Se ensayaron varias condiciones de cultivo diferentes.

2.1.3.1.1.1.- Pruebas preliminares desde el cultivo en caldo BHI de 24 horas

Puesto que las cepas se habían subcultivado el mínimo número de pases desde su aislamiento, se consideraron convenientes para ser utilizadas en esta prueba. Por tanto, comenzamos a realizar las pruebas de puesta a punto de la técnica partiendo de la cepa congelada que se cultivaba en BHI a 37°C durante 24 horas en estático y luego se mezcló en distintas proporciones con *p*-xileno:

- 1:1. Esta prueba se efectuó con 115 cepas.

- 1:6 (0,25 ml + 1,50 ml de suspensión). Esta prueba se efectuó con 32 cepas.

- 1:4 (0,25 ml + 1,00 ml de suspensión). Esta prueba se efectuó con 18 cepas.

En cualquiera de las pruebas las cepas mostraron una de hidrofobicidad inferior al 40%, por lo que en teoría todas eran hidrofílicas. Dicho de otro modo, si se cultivaban las cepas durante 24 horas en BHI no se obtenían resultados de hidrofobicidad aceptables aunque se partiera de las cepas originales mantenidas congeladas.

2.1.3.1.1.2.- Pruebas preliminares desde el cultivo en caldo BHI de 48 horas

Se llevó a cabo una prueba con 12 cepas para comprobar que las incubaciones prolongadas suelen empeorar los resultados de hidrofobicidad. Los resultados obtenidos confirmaron efectivamente esta sospecha.

2.1.3.1.1.3.- Pruebas comparativas entre el uso de *p*-xileno y hexadecano en BHI

En este punto del estudio, se planteó la duda de si el uso de *p*-xileno era la causa de la no obtención de resultados apropiados en la medida de hidrofobicidad, por lo que se realizó una última prueba comparando el uso de *p*-xileno y de hexadecano para determinar

esta característica. Para ello, se partió para cada cepa de una suspensión única inicial, parte de la cual fue empleada con cada uno de los compuestos. Los resultados obtenidos aparecen en la **Tabla R36**.

Tabla R36. Comparativa entre las pruebas de *p*-xileno y hexadecano.

Cepa		DO fase acuosa				Hidrofobicidad	
		Inicial		Final			
Ref.	Identificación	xileno	hexadecano	xileno	hexadecano	xileno	hexadecano
92/201.08	<i>S. epidermidis</i>	1,689	1,581	1,574	1,506	6,8	4,7
92/201.09	<i>S. xylosus</i>	1,746	1,827	1,768	1,818	-1,3	0,5
92/204.06	<i>S. aureus</i>	1,807	2,059	1,810	2,035	-0,2	1,2
92/213.02	<i>S. epidermidis</i>	1,755	1,722	1,750	1,706	0,3	0,9
92/213.06	<i>S. epidermidis</i>	1,748	1,794	1,733	1,764	0,9	1,7
92/213.07	<i>S. epidermidis</i>	1,771	1,811	1,782	1,791	-0,6	1,1
92/216.02	<i>S. aureus</i>	1,659	1,987	1,644	1,969	0,9	0,9
92/218.01	<i>S. aureus</i>	1,525	1,850	1,512	1,807	0,9	2,3
92/225.03	<i>S. epidermidis</i>	1,695	1,874	1,695	1,817	0,0	3,0
92/225.06	<i>S. epidermidis</i>	1,749	1,793	1,744	1,712	0,3	4,5
92/225.11	<i>S. epidermidis</i>	1,764	1,978	1,815	1,912	-2,9	3,3
92/225.15	<i>S. epidermidis</i>	1,772	1,687	1,765	1,627	0,4	3,6
93/096.01	<i>S. aureus</i>	1,555	2,075	1,538	2,029	1,1	2,2
93/098.03	<i>S. epidermidis</i>	1,711	1,816	1,710	1,758	0,1	3,2
93/120.02	<i>S. xylosus</i>	1,687	1,694	1,690	1,623	-0,2	4,2
93/160.05	<i>S. xylosus</i>	1,721	1,629	1,740	1,533	-1,1	5,9
93/172	<i>S. aureus</i>	1,852	1,771	1,850	1,710	0,1	3,4
93/215.06	<i>S. simulans</i>	1,609	1,984	1,611	1,910	-0,1	3,7
93/220.01	<i>S. aureus</i>	1,813	1,765	1,801	1,695	0,7	4,0

Observando los resultados, se dedujo que, pese a suponer que las cepas eran adecuadas para estudiar su hidrofobicidad en BHI, la prolongación del cultivo en caldo empeoraba la situación y que el hexadecano parecía comportarse más favorablemente que el *p*-xileno a la hora de efectuar las determinaciones, ya que se conseguían menos resultados negativos .

2.1.3.1.1.4.- Influencia del doble pase previo en agar Columbia sangre y prueba comparativa entre el uso de *p*-xileno y hexadecano.

Por tanto, se procedió a comprobar el efecto de subcultivar las cepas antes de realizar las determinaciones de hidrofobicidad, llevando a cabo un doble pase (dos subcultivos de 24 horas) de las cepas en agar Columbia sangre antes de lavarlas en PBS y realizar la determinación. Esta prueba se llevó a cabo sobre 24 cepas escogidas al azar

Resultados

(Tabla R37). El resultado fue un claro aumento de los valores de hidrofobicidad en las cepas estudiadas.

Tabla R37. Prueba comparativa de la determinación de la hidrofobicidad mediante el uso de hexadecano o *p*-xileno en cepas sometidas a dos pases en agar Columbia sangre.

Cepa	Identificación	DO fase acuosa				Hidrofobicidad	
		Inicial		Final		<i>p</i> -xileno	hexadecano
		<i>p</i> -xileno	hexadecano	<i>p</i> -xileno	hexadecano		
92/201.2	<i>S. aureus</i>	0,551	0,551	0,048	0,309	91,3	43,9
92/201.5	<i>S. xylosus</i>	0,611	0,583	0,093	0,271	84,8	53,5
93/230.2	<i>S. xylosus</i>	1,111	1,132	0,599	0,974	46,1	14,0
93/231.c1	<i>S. xylosus</i>	1,524	1,523	1,111	1,441	27,1	5,4
93/231.c2	<i>S. xylosus</i>	1,526	1,529	0,868	1,337	43,1	12,6
93/234.11	<i>S. aureus</i>	1,369	1,650	1,170	1,566	14,5	5,1
93/234.14	<i>S. epidermidis</i>	0,862	0,859	0,323	0,702	62,5	18,3
93/240.1	<i>S. simulans</i>	1,436	1,445	1,354	1,428	5,7	1,2
93/240.2	<i>S. epidermidis</i>	0,885	0,901	0,454	0,738	48,7	18,1
93/240.3	<i>S. epidermidis</i>	0,952	1,304	0,278	0,680	70,8	47,9
93/240.4	<i>S. epidermidis</i>	0,733	0,715	0,216	0,624	70,5	12,7
93/240.5	<i>S. epidermidis</i>	1,273	1,324	0,700	1,129	45,0	14,7
93/240.6	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	0,666	0,683	0,216	0,498	67,6	27,1
93/240.7	<i>S. epidermidis</i>	0,973	0,960	0,464	0,788	52,3	17,9
93/241.1	<i>S. epidermidis</i>	0,896	0,897	0,734	0,879	18,1	2,0
93/251.2	<i>S. aureus</i>	0,742	0,743	0,527	0,749	29,0	-0,8
93/251.3	<i>S. aureus</i>	1,403	1,403	0,887	1,261	36,8	10,1
93/251.6	<i>S. aureus</i>	1,505	1,491	0,995	1,371	33,9	8,0
93/281.3	<i>S. epidermidis</i>	0,385	0,395	0,052	0,229	86,5	42,0
93/281.4	<i>S. epidermidis</i>	1,260	1,390	1,072	1,353	14,9	2,7
93/281.12	<i>S. xylosus</i>	1,294	1,302	1,127	1,264	12,9	2,9
93/281.13	<i>S. simulans</i>	1,413	1,498	0,981	1,441	30,6	3,8
93/281.18	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	1,350	1,351	1,301	1,302	3,6	3,6
93/281.19	<i>S. epidermidis</i>	0,897	0,887	0,302	0,716	66,3	19,3

p-xileno cepa: **hidrofóbica, intermedia.**
hexadecano, hidrofobicidad: **fuerte, moderada.**

2.1.3.1.1.5.- Prueba comparativa de la utilización del *p*-xileno con o sin pase de las cepas en agar Columbia sangre.

Puesto que los resultados obtenidos en el apartado anterior contradecían los que habían sido obtenidos previamente, se procedió a llevar a cabo el pase de una serie de cepas en agar Columbia sangre para comparar estos nuevos resultados con los obtenidos con las mismas cepas sin haber sido sometidas a pases. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla R38**.

Tabla R38. Comparación de la determinación de la hidrofobicidad usando *p*-xileno en cepas sometidas o no a 2 pases en agar Columbia sangre.

Ref.	Identificación	DO inicial		DO final		Hidrofobicidad	
		Sin pase	Con pase	Sin pase	Con pase	Sin pase	Con pase
93/281.20	<i>S. aureus</i>	1,756	1,938	1,794	1,629	-2,2	15,9
93/281.21	<i>S. aureus</i>	1,747	1,785	1,772	1,499	-1,4	16,0
93/283.01	<i>S. aureus</i>	1,714	1,510	1,693	1,196	1,2	20,8
93/283.02	<i>S. aureus</i>	1,958	1,557	1,986	1,354	-1,4	13,0
93/285.02	<i>S. epidermidis</i>	1,599	1,336	1,647	0,967	-3,0	27,6
93/285.05	<i>S. epidermidis</i>	1,651	1,770	1,677	1,539	-1,6	13,1
93/285.06	<i>S. gallinarum</i>	1,408	1,932	1,417	1,747	-0,6	9,6
93/285bis	<i>S. aureus</i>	1,870	2,020	1,884	1,824	-0,7	9,7
93/291.05	<i>S. xylosus</i>	0,982	2,055	1,136	2,021	-15,7	1,7
93/303.03	<i>S. xylosus</i>	2,085	1,832	2,096	1,559	-0,5	14,9
93/323.01	<i>S. xylosus</i>	1,582	2,056	1,653	1,996	-4,5	2,9
93/323.04	<i>S. xylosus</i>	1,432	1,951	1,469	1,703	-2,6	12,7
93/328.11	<i>S. epidermidis</i>	1,649	1,302	1,676	1,139	-1,6	12,5
93/328.13	<i>S. haemolyticus</i>	1,663	1,467	1,758	0,662	-5,7	54,9
93/328.14	<i>S. epidermidis</i>	1,563	1,395	1,597	0,834	-2,2	40,2
93/354.03	<i>S. epidermidis</i>	1,603	1,729	1,661	1,401	-3,6	19,0
93/354.06	<i>S. haemolyticus</i>	1,626	1,395	1,678	0,886	-3,2	36,5
93/389.02	<i>S. aureus</i>	2,000	1,992	2,027	1,735	-1,4	12,9
93/406.01	<i>S. aureus</i>	1,725	1,664	1,764	1,267	-2,3	23,9
93/406.02	<i>S. aureus</i>	1,708	1,801	1,737	1,426	-1,7	20,8
93/406.03	<i>S. aureus</i>	1,761	1,708	1,814	1,353	-3,0	20,8
93/469.02	<i>S. aureus</i>	2,107	1,967	2,113	1,639	-0,3	16,7
93/487.01	<i>S. aureus</i>	2,046	1,838	2,038	1,312	0,4	28,6
93/494.01	<i>S. aureus</i>	1,885	1,889	1,921	1,592	-1,9	15,7

Leyenda: hidrofobicidad **intermedia**.

De su análisis, se aprecia claramente el efecto causado por el pase de las cepas en agar Columbia sangre. Este rejuvenecimiento de los cultivos parece que produce la variación de sus propiedades de superficie por lo que, probablemente, resulten más próximas a cómo se manifiestan en condiciones naturales.

2.1.3.2.- Cálculo de la hidrofobicidad mediante el uso de *p*-xileno y hexadecano

Resuelta la incógnita de la influencia de la edad de la cepa de prueba y una vez pasada 2 veces por agar Columbia sangre, se partió de una única suspensión bacteriana de partida para comparar el uso de ambos productos.

En la **Tabla R39** se muestra el resumen de los datos obtenidos .

Resultados

Tabla R39. Resultados por especie de la medida de la hidrofobicidad con *p*-xileno o hexadecano en la prueba comparada tras un doble pase en agar Columbia sangre.

	Prueba de hidrofobicidad					
	<i>p</i> - xileno			hexadecano		
	Hidrófobas	Intermedias	Total	Hidrófobas	Intermedias	Total
<i>S. aureus</i>	19 (17,4 %)	34 (31,2%)	53 (48,6%)	9 (8,3 %)	28 (25,7%)	37 (33,9%)
<i>S. epidermidis</i>	4 (5,5 %)	16 (21,9 %)	20 (27,4%)	2 (2,7 %)	20 (27,4%)	22 (30,1%)
<i>S. xylosus</i>	2 (4,9 %)	4 (9,8 %)	6 (14,6%)	0 (0,0 %)	1 (2,4 %)	1 (2,4%)
<i>S. haemolyticus</i>	0 (0,0 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3%)	0 (0,0 %)	1 (33,3 %)	1 (33,3%)
<i>S. hominis</i>	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0%)
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	0 (0,0 %)	2 (40,0 %)	2 (40,0%)	0 (0,0 %)	2 (40,0 %)	2 (40,0%)
<i>S. simulans</i>	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0%)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0%)
<i>S. gallinarum</i>	3 (33,3 %)	2 (22,2 %)	5 (55,6%)	3 (33,3%)	0 (0,0 %)	3 (33,3%)
Totales	28 (11,4 %)	69 (28,0 %)	97 (39,4%)	14 (5,7 %)	52 (22,1 %)	66 (26,8%)

Los datos de hidrofobicidad de las cepas obtenidos con *p*-xileno y hexadecano en la prueba realizada en paralelo no fueron coincidentes, de forma que con el primer producto aparecen más cepas con carácter hidrofóbico que cuando se emplea el hexadecano. En el **Gráfico R06** puede observarse no sólo la diferencia entre ambos, sino que también se aprecia que la respuesta a la utilización de uno u otro producto no parece ser homogénea en todas las especies estudiadas, sino que algunas resultan proporcionalmente más hidrófobas, según el producto utilizado.

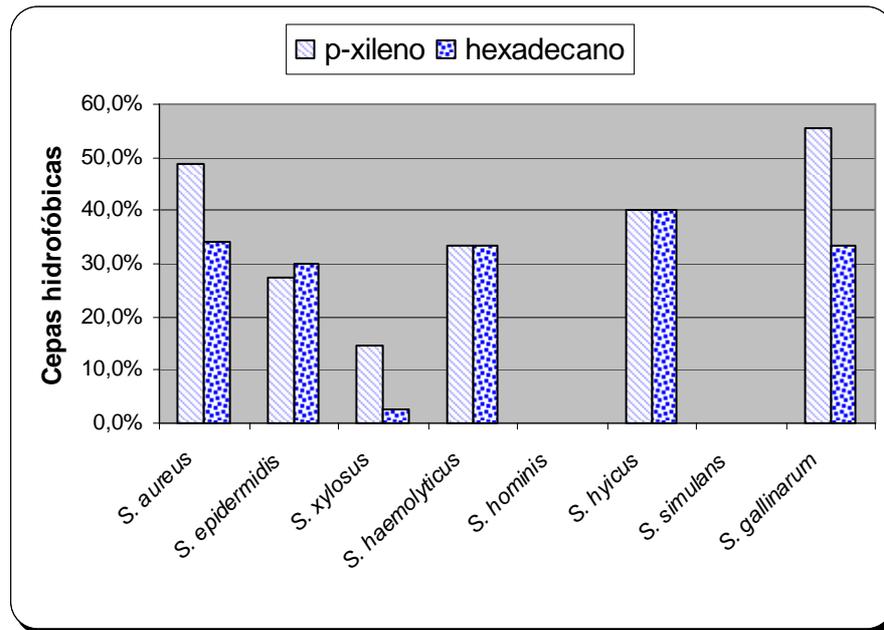


Gráfico R06. Respuesta de cada especie de *Staphylococcus* a la prueba de hidrofobicidad con *p*-xileno o con hexadecano.

Considerando las especies más frecuentes, parece ser que la prueba con *p*-xileno detecta mayor hidrofobicidad en *S. aureus* y *S. xylosus*, mientras que con hexadecano se observan más cepas hidrofóbicas en la especie *S. epidermidis*.

2.1.4.- Determinación de la presencia de genes de factores de superficie

Como se expone en el capítulo de “Material y Métodos”, la detección del conjunto de 10 genes de factores de adherencia se llevó a cabo utilizando 4 mezclas múltiples de PCR. En las fotos que siguen se incluyen, a modo de ejemplo, geles de cada una de las cuatro PCR múltiples:

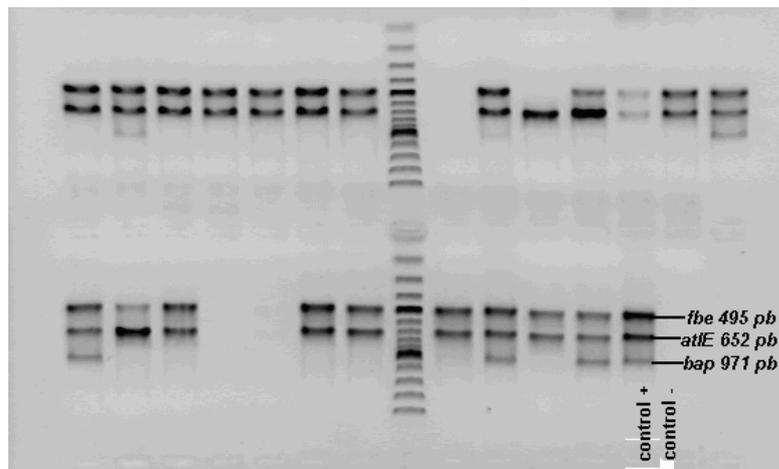


Foto R14. Detección de los genes de *fbe* (495pb), *atIE* (682 pb) y *bap* (971) ciclo ADH03T.

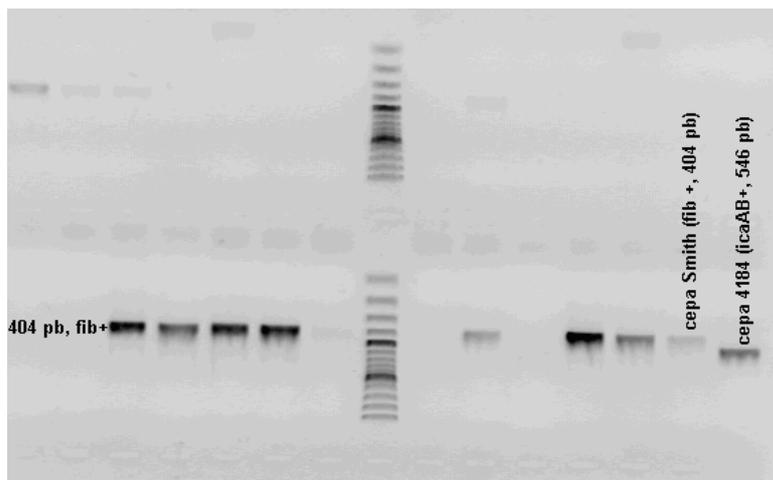


Foto R15. Detección de los genes de *fib* (404 pb) e *icaAB* (546 pb) ciclo ADH07T.

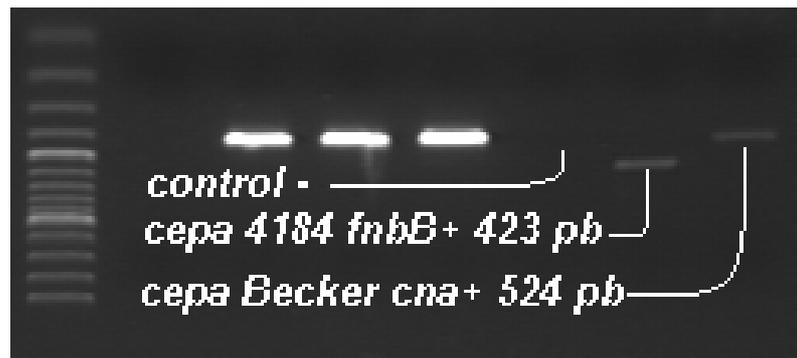


Foto R16. Gel de la reacción de PCR para la detección de los genes de *cna* (524 pb) y *fnbB* (423 pb) ciclo ADH017T.

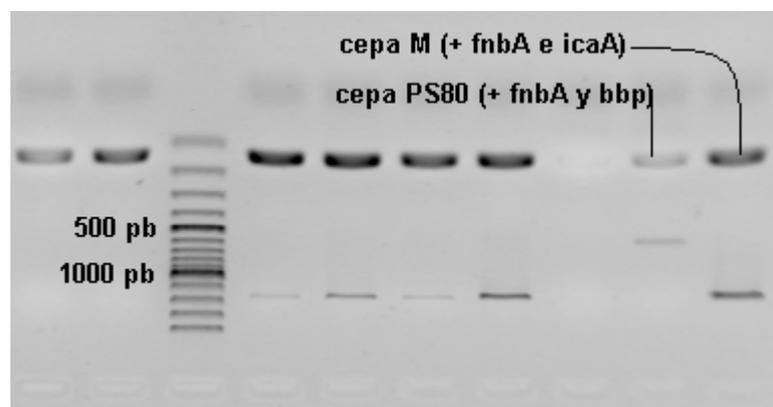


Foto R17. Gel de la reacción de PCR para la detección de los genes de *fnbA* (127 pb), *bbp* (575 pb) e *icaA* (1315 pb) ciclo ADH018T.

Los resultados correspondientes a las cepas objeto de estudio, se resumen en la **Tabla R40**.

Resultados

Tabla R40. Resultados de la detección de genes de factores de adherencia en las cepas aisladas.

Factor Especie (n)	Para <i>S. aureus</i>							Para <i>S. epidermidis</i>			Por especie (media) ¹
	<i>bap</i>	<i>bbp</i>	<i>cna</i>	<i>fib</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>icaA</i>	<i>icaAB</i>	<i>atlE</i>	<i>fbe</i>	
<i>S. aureus</i> (109)											
positivos	0	1	13	65	98	0	15	0	7	8	207 (2,01)
porcentaje	0,00	0,92	11,93	59,63	89,91	0,00	13,76	0,00	6,42	7,34	
<i>S. epidermidis</i> (73)											
positivos	15	0	6	5	11	0	1	0	63	57	158 (2,16)
porcentaje	20,55	0,00	8,22	6,85	15,07	0,00	1,37	0,00	86,30	78,08	
<i>S. haemolyticus</i> (3)											
positivos	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3 (1,00)
porcentaje	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>S. hominis</i> (2)											
positivos	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (0,50)
porcentaje	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>S. hyicus</i> subs. <i>chro</i> (5)											
positivos	1	0	1	1	3	0	1	0	1	1	9 (1,80)
porcentaje	20,00	0,00	20,00	20,00	60,00	0,00	20,00	0,00	20,00	20,00	
<i>S. xyloso</i> (41)											
positivos	9	0	2	2	16	0	3	0	8	6	46 (1,12)
porcentaje	21,95	0,00	4,88	4,88	39,02	0,00	7,32	0,00	19,51	14,63	
<i>S. gallinarum</i> (9)											
positivos	2	0	2	0	6	0	0	0	4	3	17 (1,88)
porcentaje	22,22	0,00	22,22	0,00	66,67	0,00	0,00	0,00	44,44	33,33	
<i>S. simulans</i> (4)											
positivos	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (0,25)
porcentaje	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Total (246)	27 10,98	1 0,41	24 9,76	73 29,67	139 56,50	0 0,00	20 8,13	0 0,00	83 33,74	75 30,49	317 (1,29)

Leyenda de las proteínas codificadas por cada gen: *bap* (asociada al biofilm); *bbp* (unión a la sialoproteína del hueso); *cna* (unión al colágeno); *fib* (unión al fibrinógeno); *fnbA* y *fnbB* (unión a la fibronectina); *icaA* e *icaAB* (adhesinas intercelulares); *atlE* (unión a la vitronectina); *fbe* (unión al fibrinógeno).

(celda sombreada = factor detectado) ⁽¹⁾ suma de efectos por especie y media de efectos por cepa

Considerando los factores cuya presencia se ha estudiado a través de los genes correspondientes, resultan más frecuentes los siguientes:

- *fnbA* : que codifica para una proteína de unión a la fibronectina, que aparece en el 56,5% de las cepas estudiadas, destacando que aparece en casi un 90% de las cepas de *S. aureus*, pero también se encuentra en las especies restantes en porcentajes apreciables.
- *atlE*: que codifica para una proteína de unión a la vitronectina, encontrado en el 33,74% de todos los aislados y que es más abundante entre cepas de *S. epidermidis* (86,30%) pero que aparece también *S. gallinarum* (44,44%), *S. hyicus*

subesp. *chromogenes* (20,00%), entre los *S. xylosum* (19,51%) y en *S. aureus* (6,42%).

- *fbe* : codifica la proteína de unión al fibrinógeno, que aparece en un 30,49 % de las cepas, con mayor frecuencia entre los *S. epidermidis* (78,08 %) seguido de *S. aureus* (10,67%), *S. xylosum* (8,00%), *S. gallinarum* (4,00%) y *S. hyicus* subesp. *chromogenes* (1,33%).
- *fib*: el gen que codifica para una proteína de unión al fibrinógeno se ha detectado en un 29,67% de las cepas, mayoritariamente en *S. aureus* (89,04% de las cepas positivas) y con mucha menor frecuencia aparece en cepas de *S. epidermidis* (6,84%), *S. xylosum* (2,74%) y *S. hyicus* subesp. *chromogenes* (1,37%).
- *bap*: el gen que codifica para la proteína asociada a la formación del biofilm aparece en un 10,98% de las cepas estudiadas, en especial en *S. epidermidis* (que representan el 55,55% de las cepas positivas) seguido por *S. xylosum* (33,33%), *S. gallinarum* (7,41%) y finalmente *S. hyicus* subesp. *chromogenes* (3,70% de los aislados positivos).
- *cna*: el gen de la proteína de unión al colágeno fue detectado en un 9,76% de las cepas estudiadas, siendo más frecuente entre *S. aureus* (54,17% de las cepas positivas), luego en *S. epidermidis* (22,22%), *S. xylosum* y *S. gallinarum* (con una representación de cada especie del 8,33%) y finalmente, *S. hyicus* subesp. *chromogenes* (4,17%).
- *icaA*: el gen del locus *icaABCD*, responsable de la adhesina intercelular, se detectó mayoritariamente entre *S. aureus* (representando el 75,00% de las detecciones), luego entre *S. xylosum* (15,00%) y, finalmente en *S. hyicus* subesp. *chromogenes* y *S. epidermidis* en un 5,00% de los casos positivos.
- *bbp*: este gen codifica para una proteína de unión a la sialoproteína ósea y sólo se detectó en una cepa de la especie *S. aureus*, lo que supone tan sólo un 1,25% del total de las cepas aisladas en este estudio.

Ninguna de las cepas estudiadas ha resultado positiva a *fnbB* (gen de una proteína de unión a la fibronectina) ni a *icaAB* (gen del locus *icaAB* de *S. epidermidis*) según la técnica empleada.

Resultados

Considerando cada una de las especies analizada, ninguna ha resultado negativa a todos los factores. Sin embargo, en algunas cepas de ciertas especies no hemos detectado la presencia de ninguno de los genes investigados, en concreto:

- 9 cepas de *S. aureus*, un 8,25 % de los aislados de esta especie.
- 5 cepas de *S. epidermidis* , un 6,84 %.
- 1 cepa de *S. hominis*, un 50 %.
- 1 cepa de *S. hyicus* subesp. *chromogenes*, un 20 %.
- 3 cepas de *S. simulans*, un 75%.
- 16 cepas de *S. xylosum*, un 39,02 % de los aislados de esta especie.

Todas las cepas de *S. gallinarum* resultaron positivas al menos a un factor.

2.2.- Estudio de otros factores de virulencia

2.2.1.- Determinación de factores de virulencia en estafilococos (distintos de *S. aureus*)

Puesto que tanto los resultados de la valoración de la adherencia a superficies inertes como de la capacidad de formación de *slime* han sido presentados previamente en la sección 2.1.2., en la **Tabla 41** se resumen los resultados, por especies, de las factores de tipo enzimático de las 137 cepas de estafilococos distintos de *S. aureus* (SNA) incluidas en este estudio:

Tabla R41. Resultados de los factores de virulencia de tipo enzimático estudiados.

	DNAsa	Fosfatasa	Hialuronidasa	Fibrinolisisina	Ureasa	Gelatina	Caseína	Lipasa	Lecitinasa
<i>S. epidermidis</i> (n=73)									
Positivos	26	73	18	6	72	58	39	63	62
% positivos	35,62	100,00	24,66	15,38	98,63	79,45	53,42	86,30	84,93
<i>S. gallinarum</i> (n=9)									
Positivos	7	9	1	0	9	4	3	2	2
% positivos	77,78	100,00	11,11	0,00	100,00	44,44	33,33	22,22	22,22
<i>S. haemolyticus</i> (n=3)									
Positivos	0	0	0	1	3	1	0	0	2
% positivos	0,00	0,00	0,00	33,33	100,00	33,33	0,00	0,00	66,67
<i>S. hominis</i> (n=2)									
Positivos	1	0	0	0	2	0	2	0	0
% positivos	50,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	0,00
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> (n=5)									
Positivos	5	5	2	2	5	3	3	2	5
% positivos	100,00	100,00	40,00	40,00	100,00	60,00	60,00	40,00	100,00
<i>S. simulans</i> (n=4)									
Positivos	2	1	1	0	4	2	3	3	4
% positivos	50,00	25,00	25,00	0,00	100,00	50,00	75,00	75,00	100,00
<i>S. xylosus</i> (n=41)									
Positivos	5	13	24	7	40	26	19	18	28
% positivos	12,20	31,71	58,54	17,07	97,56	63,41	46,34	43,90	68,29
Totales (n=137)	46	101	46	16	135	94	69	88	103
	33,58%	73,72%	33,58%	27,59%	98,54%	68,61%	50,36%	64,23%	75,18%

Resultados

Cabe destacar la mayor frecuencia de aparición de algunos factores de virulencia como la producción de ureasa (98,54% de las cepas SNA la producen), seguida de la lecitinasa (75,18%) y fosfatasa (73,72). Entre los factores encontrados con menor frecuencia destacan la DNAsa y hialuronidasa (ambas en un 33,58% de los aislados) y la fibrinolisisina (un 27,59%). La comparación de estos resultados en el caso de la especie más aislada en este estudio y que está más relacionada con mastitis clínicas, *S. aureus*, figuran en la **Tabla R42**:

Tabla R42. Comparación de los resultados de los SNA y *S. aureus* de los factores de virulencia de tipo enzimático estudiados.

	DNAsa	Fosfatasa	Hialuronidasa	Fibrinolisisina	Ureasa	Gelatina	Caseina	Lipasa	Lecitinasa
SNA (n=137)	46 33,58%	101 73,72%	46 33,58%	16 27,59%	135 98,54%	94 68,61%	69 50,36%	88 64,23%	103 75,18%
<i>S. aureus</i> (n=109)	107 98,17%	106 97,25%	88 80,73%	8 24,24%	109 100,00%	100 91,74%	95 87,16%	27 24,77%	86 78,90%

Se observa que la ureasa es la más frecuente en ambos casos, seguida por la lecitinasa y la fosfatasa en los SCN y la DNAsa y fosfatasa en el caso de *S. aureus*. Una diferencia llamativa entre los resultados del grupo de SNA y *S. aureus* consiste en que los primeros presentan lipasas mucho más frecuentemente que el último (64,23% frente al 24,77%), diferencia aún más marcada en el caso particular de *S. epidermidis*, que también presenta mayor actividad lecitinasa (84,93% frente al 78,90%). En el sentido opuesto, *S. aureus* presenta más frecuentemente DNAsa (98,17% frente al 33,58%) y hialuronidasa (80,73% frente a un 33,58%) que el grupo de SNA.

2.2.2.- Detección de bacteriocinas

Previamente a la realización de los estudios de detección se comparó la influencia de varios factores en la producción, incluyendo métodos de siembra de la cepa de *Cellulomonas fimi* y la temperatura de incubación :

2.2.2.1.- Método de siembra de la cepa de *Cellulomonas fimi*

El estudio de la influencia del método de siembra se llevó a cabo, inicialmente, con 4 cepas de *S. aureus*, los aislados 89/304, 92/2.3, 92/2.5 y 92/2.6, de manera que se comparó la siembra por inundación con la siembra en superficie con un hisopo impregnado con la suspensión bacteriana (hisopado).

En el caso del método por inundación, las cepas se sembraron depositando una gota de 10 µl de una suspensión de cada cepa en 4 puntos de una placa de Mueller-Hinton. La placa así sembrada se dejó incubar 24 horas antes de inundarla con una suspensión de *Cellulomonas fimi*, preparada y titulada con anterioridad, mantenida alicuotada y congelada a -80°C. Dicha suspensión presentaba una concentración de $2,2 \times 10^8$ UFC / ml. La placa se inundó con 3 ml de dicha suspensión y el exceso fue después recogido y eliminado. Tras secarse en cabina de flujo laminar, la placa se incubó según lo recomendado por De Oliveira *et al.*, (1998) .

Transcurrido el tiempo de incubación requerido, se observó que el crecimiento resultante consistía en una mezcla de las cepas de prueba y el de *C. fimi* de difícil valoración (**Foto R18**).

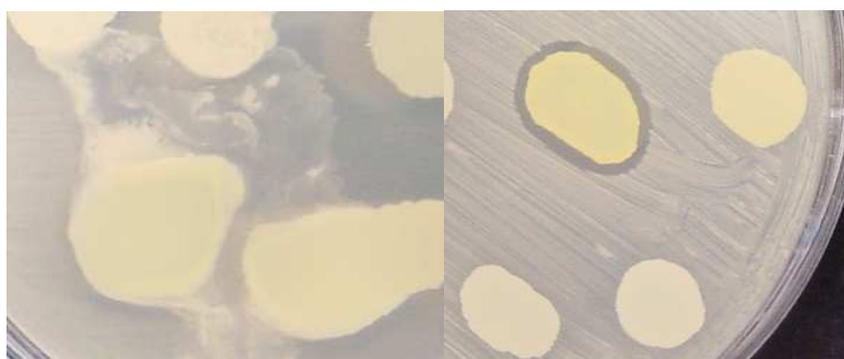


Foto R18. Resultado de la siembra de la cepa de *C. fimi* : por inundación (izquierda) o con hisopo (derecha).

En estas condiciones, se procedió a probar el método de siembra con hisopo directo de la cepa de *C. fimi* y posterior siembra de las cepas de prueba, con los resultados que se

Resultados

muestran en la **Tabla R43** en la que se puede apreciar que esta variante constituía la mejor opción (**Foto R18**), que permitía resultados claros, e incluía 24 horas a una temperatura de incubación de 37°C seguida de otro periodo adicional de incubación a 30°C, nuevamente de 24 horas.

Tabla R43. Comparación de dos métodos de siembra.

ref.	Identificación	Hisopado (24+24 horas)		Inundación (24+24 horas)
		30°C+30°C	37°C+30°C	
89/304.00	<i>S. aureus</i>	-	+	NA
92/002.03	<i>S. aureus</i>	-	+	NA
92/002.05	<i>S. aureus</i>	-	-	NA
92/002.06	<i>S. aureus</i>	-	-	NA
92/002.07	<i>S. aureus</i>	NR	-	NR
92/003.04	<i>S. xyloso</i>	NR	+	NR
92/003.05	<i>S. xyloso</i>	NR	-	NR
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	NR	+	NR
92/021.04	<i>S. aureus</i>	NR	-	NR
92/022.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	NR	-	NR

Legenda: NA: no apreciable, el crecimiento de *C. fimi* es irregular si se siembra por inundación. NR: no realizado. +: inhibición. -: sin inhibición

A la vista de los resultados obtenidos, se adoptó el método del hisopado de la cepa de *C. fimi* en todos los trabajos posteriores.

2.2.2.2.- Temperaturas de incubación

Como en el caso anterior, se compararon varias alternativas de combinación de temperaturas para la incubación de las placas de la prueba: 37°-37°C, 30°-30°C, 37°-30°C y 30°-37°C. Para la elección de la temperatura óptima de incubación, se procedió a llevar a cabo una prueba inicial con 50 cepas seleccionadas de manera que tuvieran diversos orígenes y pertenecieran a distintas especies.

Los resultados figuran en la **Tabla R44**.

Tabla R44. Comparación de temperaturas de incubación.

Ref	Identificación	Temperatura de incubación en °C (24+24 horas)			
		37+30	37+37	30+37	30+30
89/304.00	<i>S. aureus</i>	+ / ++	+ / +	- / -	- / -
92/002.03	<i>S. aureus</i>	+ / ++	+ / +	- / -	- / -
92/002.05	<i>S. aureus</i>	- / ++	- / +	- / -	- / -
92/002.06	<i>S. aureus</i>	- / ++	- / +	- / -	- / -
92/002.07	<i>S. aureus</i>	- / ++	+ / ++	- / -	- / -
92/003.04	<i>S. xyloso</i>	+ / ++	+ / +++	- / ++	+ / ++
92/003.05	<i>S. xyloso</i>	- / d	- / -	- / +	+ / +
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	+ / ++	+ / ++	- / +	+ / +
92/021.04	<i>S. aureus</i>	- / -	- / -	- / -	- / -
92/022.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	- / -	- / -	- / -	- / -
92/024.01	<i>S. aureus</i>	+ / ++	+ / +	- / -	- / -
92/024.03	<i>S. aureus</i>	+ / ++	+ / +	- / -	- / -
92/024.04	<i>S. aureus</i>	+ / ++	+ / +	+ / ++	+ / ++
92/024.05	<i>S. aureus</i>	+ / ++	+ / +	+ / ++	- / ++
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	- / +	+ / +	+ / +	+ / +
92/032.01	<i>S. xyloso</i>	+ / -	- / -	- / d	- / -
92/032B	<i>S. haemolyticus</i>	- / -	- / +	- / d	- / +
92/039.01	<i>S. aureus</i>	+ / ++	- / ++	- / -	- / -
92/039.02	<i>S. aureus</i>	+ / ++	+ / ++	- / -	- / -

Resultados

Tabla R44. Comparación de temperaturas de incubación (continuación).

Ref	Identificación	Temperatura de incubación en °C (24+24 horas)			
		37+30	37+37	30+37	30+30
92/039.03	<i>S. aureus</i>	+/++	+/++	-/-	-/-
92/039.05	<i>S. epidermidis</i>	+/++	+/++	-/-	-/-
92/040.03	<i>S. aureus</i>	+/++	+/++	-/+	-/++
92/040.05	<i>S. aureus</i>	+/++	+/++	+/+	+/++
92/040.07	<i>S. xyloso</i>	-/+	+/d	-/-	-/-
92/042.01	<i>S. aureus</i>	-/-	-/-	+/++	+/+++
92/046.03	<i>S. xyloso</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/047.01	<i>S. xyloso</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/047.02	<i>S. xyloso</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/047.03	<i>S. xyloso</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/047.04	<i>S. xyloso</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/047.08	<i>S. epidermidis</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/047.11	<i>S. epidermidis</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/047.14	<i>S. xyloso</i>	+/++	+/+	-/++	+/++
92/051.01	<i>S. aureus</i>	+/++	+/+	+/-	-/-
92/051.02	<i>S. aureus</i>	+/++	+/+	-/-	-/-
92/051.03	<i>S. xyloso</i>	+/++	+/+	+/++	+/++
92/052.01	<i>S. aureus</i>	+/++	+/++	-/++	+/++
92/052.02	<i>S. aureus</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/052.04	<i>S. aureus</i>	-/d	-/d	-/-	-/-
92/052.05	<i>S. aureus</i>	-/++	+/++	-/-	-/d
92/052.06	<i>S. aureus</i>	-/d	-/d	-/-	-/-
92/052.08	<i>S. aureus</i>	-/d	-/d	-/-	-/-
92/062.03	<i>S. aureus</i>	-/d	+/d	+/++	-/+
92/063.01	<i>S. epidermidis</i>	-/d	-/d	-/-	-/-
92/063.04	<i>S. epidermidis</i>	-/-	-/-	-/-	-/-
92/063.06	<i>S. epidermidis</i>	-/+	+/+	+/+++	+/+++

Tabla R44. Comparación de temperaturas de incubación (continuación).

Ref	Identificación	Temperatura de incubación en °C (24+24 horas)			
		37+30	37+37	30+37	30+30
92/063.08	S. epidermidis	+/+	-/+	-/-	-/-
92/063.10	S. epidermidis	+/+	-/+	-/+	-/d
92/063.11	S. epidermidis	-/+	+/+	+/+++	-/+
92/063.12	S. epidermidis	+/+++	+/+++	+/+	-/+
Resultados positivos /total					
a 48 horas		36/50	36/50	19/50	19/50
a 24 horas		23	26	11	11

Leyenda: -: sin inhibición; +: inhibición clara; ++: halo de inhibición claro y traslúcido; +++: halo >2 mm d: inhibición débil.

Con estos resultados, se aprecia claramente que cualquiera de las combinaciones en las que, al menos durante las primeras 24 horas, se realiza una incubación a 37°C, la proporción de cepas que muestran capacidad inhibitoria es mayor (23 y 26 frente a 11 si se incuba inicialmente a 30°C).

El segundo periodo de 24 horas de incubación aumenta el número de resultados positivos, de manera que en las combinaciones con la primera incubación a 37°C se llega a 36 positivos de los 50 posibles (72%) mientras que si la primera incubación es de 30°C sólo se alcanzan 19 resultados positivos entre las 50 cepas (38%).

Puesto en que en la combinación de los dos días a 37°C el crecimiento de la cepa tipo era menos abundante (**Foto R19**), se optó por emplear una pauta de incubación a 37°C las primeras 24 horas y continuar a 30°C las siguientes 24 horas.



Foto R19. Detección de bacteriocinas: combinaciones de temperaturas de incubación de 3 cepas diferentes.

2.2.2.3.- Resultados de la detección de bacteriocinas.

Finalmente, fijadas las condiciones de siembra e incubación, se realizó la prueba con todas las cepas aisladas. Los resultados se recogen a continuación en la **Tabla R45**.

Tabla R45. Resultados de la prueba de detección de inhibición de *C. fimi*

Referencia	Identificación	Inhibición de <i>C. fimi</i>
89/304.00	<i>S. aureus</i>	++
92/002.03	<i>S. aureus</i>	++
92/002.05	<i>S. aureus</i>	++
92/002.06	<i>S. aureus</i>	++
92/002.07	<i>S. aureus</i>	++
92/003.04	<i>S. xylosus</i>	++
92/003.05	<i>S. xylosus</i>	D
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	++
92/021.04	<i>S. aureus</i>	-
92/022.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	-
92/024.01	<i>S. aureus</i>	++
92/024.03	<i>S. aureus</i>	++
92/024.04	<i>S. aureus</i>	++
92/024.05	<i>S. aureus</i>	++
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	+
92/032.01	<i>S. xylosus</i>	-
92/032B	<i>S. haemolyticus</i>	-
92/039.01	<i>S. aureus</i>	++
92/039.02	<i>S. aureus</i>	++
92/039.03	<i>S. aureus</i>	++
92/039.05	<i>S. epidermidis</i>	++
92/040.03	<i>S. aureus</i>	++
92/040.05	<i>S. aureus</i>	++
92/040.07	<i>S. xylosus</i>	+
92/042.01	<i>S. aureus</i>	-
92/046.03	<i>S. xylosus</i>	-
92/047.01	<i>S. xylosus</i>	-
92/047.02	<i>S. xylosus</i>	-
92/047.03	<i>S. xylosus</i>	-
92/047.04	<i>S. xylosus</i>	-
92/047.08	<i>S. epidermidis</i>	-
92/047.11	<i>S. epidermidis</i>	-
92/047.14	<i>S. xylosus</i>	++
92/051.01	<i>S. aureus</i>	++
92/051.02	<i>S. aureus</i>	++
92/051.03	<i>S. xylosus</i>	++
92/052.01	<i>S. aureus</i>	++
92/052.02	<i>S. aureus</i>	-
92/052.04	<i>S. aureus</i>	d
92/052.05	<i>S. aureus</i>	++
92/052.06	<i>S. aureus</i>	d
92/052.08	<i>S. aureus</i>	d
92/062.03	<i>S. aureus</i>	d

Tabla R45. Resultados de la prueba de detección de inhibición de *C. fimi* (continuación)

Referencia	Identificación	Inhibición de <i>C. fimi</i>
92/063.01	<i>S. epidermidis</i>	d
92/063.04	<i>S. epidermidis</i>	-
92/063.06	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.08	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.10	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.11	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.12	<i>S. epidermidis</i>	++
92/063.13	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.14	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.15	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.16	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.17	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.19	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.23	<i>S. epidermidis</i>	+
92/063.30	<i>S. aureus</i>	+
92/063.31	<i>S. aureus</i>	++
92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	-
92/066.02	<i>S. epidermidis</i>	+++
92/066.03	<i>S. epidermidis</i>	++
92/066.04	<i>S. epidermidis</i>	++
92/066.05	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	+
92/066.07	<i>S. epidermidis</i>	-
92/066.08	<i>S. epidermidis</i>	-
92/066.12	<i>S. epidermidis</i>	-
92/066.13	<i>S. epidermidis</i>	-
92/066.14	<i>S. epidermidis</i>	-
92/066.15	<i>S. aureus</i>	-
92/066.16	<i>S. epidermidis</i>	d
92/080.01	<i>S. aureus</i>	-
92/080.02	<i>S. epidermidis</i>	++
92/080.03	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	-
92/080.05	<i>S. epidermidis</i>	++
92/080.06	<i>S. epidermidis</i>	+
92/080.07	<i>S. epidermidis</i>	+
92/080.08	<i>S. epidermidis</i>	+
92/080.09	<i>S. aureus</i>	+
92/080.10	<i>S. epidermidis</i>	++
92/080.11	<i>S. aureus</i>	-
92/080.13	<i>S. aureus</i>	-
92/080.14	<i>S. epidermidis</i>	-
92/094.05	<i>S. aureus</i>	-
92/094.06	<i>S. xyloso</i>	-
92/101.05	<i>S. epidermidis</i>	d
92/101.08	<i>S. sciuri</i>	-
92/140.02	<i>S. epidermidis</i>	d
92/140.09	<i>S. simulans</i>	-
92/140.12	<i>S. epidermidis</i>	+

Tabla R45. Resultados de la prueba de detección de inhibición de *C. fimi* (continuación)

Referencia	Identificación	Inhibición de <i>C. fimi</i>
92/140.15	<i>S. hominis</i>	-
92/172.05	<i>S. aureus</i>	-
92/172.06	<i>S. aureus</i>	-
92/172.10	<i>S. aureus</i>	-
92/201.01	<i>S. aureus</i>	+
92/201.02	<i>S. aureus</i>	-
92/201.05	<i>S. xylosus</i>	-
92/201.06	<i>S. xylosus</i>	-
92/201.07	<i>S. xylosus</i>	-
92/201.08	<i>S. epidermidis</i>	+
92/201.09	<i>S. xylosus</i>	+
92/204.06	<i>S. aureus</i>	+
92/213.02	<i>S. epidermidis</i>	d
92/213.06	<i>S. epidermidis</i>	-
92/213.07	<i>S. epidermidis</i>	-
92/216.02	<i>S. aureus</i>	++
92/218.01	<i>S. aureus</i>	d
92/225.03	<i>S. epidermidis</i>	-
92/225.06	<i>S. epidermidis</i>	++
92/225.11	<i>S. epidermidis</i>	-
92/225.15	<i>S. epidermidis</i>	++
93/096.01	<i>S. aureus</i>	+
93/098.03	<i>S. epidermidis</i>	+
93/120.02	<i>S. xylosus</i>	-
93/129.02	<i>S. aureus</i>	-
93/160.05	<i>S. xylosus</i>	-
93/172	<i>S. aureus</i>	+
93/215.06	<i>S. simulans</i>	+++
93/220.01	<i>S. aureus</i>	+
93/230.02	<i>S. xylosus</i>	++
93/231.c1	<i>S. xylosus</i>	++
93/231.c2	<i>S. xylosus</i>	+
93/231.c3	<i>S. aureus</i>	++
93/234.01	<i>S. xylosus</i>	-
93/234.02	<i>S. aureus</i>	-
93/234.03	<i>S. xylosus</i>	-
93/234.04	<i>S. epidermidis</i>	-
93/234.05	<i>S. epidermidis</i>	-
93/234.08	<i>S. aureus</i>	+
93/234.09	<i>S. aureus</i>	+
93/234.11	<i>S. aureus</i>	-
93/234.14	<i>S. epidermidis</i>	++
93/240.01	<i>S. simulans</i>	++
93/240.02	<i>S. epidermidis</i>	++
93/240.03	<i>S. epidermidis</i>	+
93/240.04	<i>S. epidermidis</i>	-
93/240.05	<i>S. epidermidis</i>	-

Tabla R45. Resultados de la prueba de detección de inhibición de *C. fimi* (continuación)

Referencia	Identificación	Inhibición de <i>C. fimi</i>
93/240.06	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	++
93/240.07	<i>S. epidermidis</i>	++
93/241.01	<i>S. epidermidis</i>	+
93/251.02	<i>S. aureus</i>	-
93/251.03	<i>S. aureus</i>	++
93/251.06	<i>S. aureus</i>	-
93/256.01	<i>S. aureus</i>	+
93/256.02	<i>S. aureus</i>	++
93/256.03	<i>S. aureus</i>	+
93/257.02	<i>S. gallinarum</i>	d
93/257.05	<i>S. gallinarum</i>	-
93/273.03	<i>S. xylosum</i>	-
93/273.04	<i>S. epidermidis</i>	-
93/273.05	<i>S. epidermidis</i>	-
93/273.06	<i>S. epidermidis</i>	-
93/281.00	<i>S. xylosum</i>	-
93/281.01	<i>S. epidermidis</i>	+
93/281.02	<i>S. epidermidis</i>	+
93/281.03	<i>S. epidermidis</i>	-
93/281.04	<i>S. epidermidis</i>	+++
93/281.12	<i>S. xylosum</i>	-
93/281.13	<i>S. simulans</i>	-
93/281.18	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	-
93/281.19	<i>S. epidermidis</i>	+
93/281.20	<i>S. aureus</i>	++
93/281.21	<i>S. aureus</i>	++
93/283.01	<i>S. aureus</i>	+
93/283.02	<i>S. aureus</i>	d
93/285.02	<i>S. epidermidis</i>	+
93/285.05	<i>S. epidermidis</i>	+
93/285.06	<i>S. gallinarum</i>	-
93/285bis	<i>S. aureus</i>	-
93/291.05	<i>S. xylosum</i>	-
93/303.03	<i>S. xylosum</i>	+
93/323.01	<i>S. xylosum</i>	-
93/323.04	<i>S. xylosum</i>	-
93/328.11	<i>S. epidermidis</i>	++
93/328.13	<i>S. haemolyticus</i>	+++
93/328.14	<i>S. epidermidis</i>	+
93/354.03	<i>S. epidermidis</i>	+
93/354.06	<i>S. haemolyticus</i>	d
93/389.02	<i>S. aureus</i>	++
93/406.01	<i>S. aureus</i>	++
93/406.02	<i>S. aureus</i>	++
93/406.03	<i>S. aureus</i>	++
93/469.02	<i>S. aureus</i>	++
93/487.01	<i>S. aureus</i>	++
93/494.01	<i>S. aureus</i>	++
93/494.03	<i>S. xylosum</i>	-

Tabla R45. Resultados de la prueba de detección de inhibición de *C. fimi* (continuación)

Referencia	Identificación	Inhibición de <i>C. fimi</i>
93/500.00	<i>S. aureus</i>	++
93/501.02	<i>S. aureus</i>	+
93/504.03	<i>S. aureus</i>	+
93/506.04	<i>S. epidermidis</i>	-
93/508.00	<i>S. xylosus</i>	d
93/510.03	<i>S. xylosus</i>	-
93/510.04	<i>S. xylosus</i>	-
93/512.01	<i>S. aureus</i>	++
93/520.01	<i>S. xylosus</i>	-
94/023.02	<i>S. epidermidis</i>	-
94/023.03	<i>S. xylosus</i>	-
94/024.01	<i>S. aureus</i>	+
94/024.04	<i>S. xylosus</i>	-
94/025.01	<i>S. xylosus</i>	-
94/025.02	<i>S. xylosus</i>	-
94/025.04	<i>S. epidermidis</i>	-
94/032.00	<i>S. aureus</i>	++
94/034.02	<i>S. aureus</i>	-
94/034.05	<i>S. aureus</i>	-
94/092.04	<i>S. aureus</i>	++
94/092.05	<i>S. aureus</i>	++
94/093.01	<i>S. aureus</i>	++
94/093.02	<i>S. aureus</i>	++
94/108.06	<i>S. xylosus</i>	+
94/114.01	<i>S. gallinarum</i>	-
94/114.02	<i>S. gallinarum</i>	-
94/114.04	<i>S. gallinarum</i>	d
94/143.00	<i>S. aureus</i>	++
94/165.01	<i>S. xylosus</i>	-
94/165.02	<i>S. aureus</i>	+
94/166.02	<i>S. hominis</i>	-
94/174.01	<i>S. gallinarum</i>	-
94/174.02	<i>S. gallinarum</i>	d
94/175.00	<i>S. aureus</i>	++
94/177.00	<i>S. aureus</i>	++
94/205.01	<i>S. aureus</i>	++
94/205.02	<i>S. aureus</i>	++
94/205.03	<i>S. aureus</i>	++
S01	<i>S. aureus</i>	++
S02	<i>S. aureus</i>	++
S03	<i>S. aureus</i>	++
S04	<i>S. aureus</i>	+
S06	<i>S. aureus</i>	+
S07	<i>S. aureus</i>	+
S08	<i>S. aureus</i>	d
S09	<i>S. aureus</i>	++
S10	<i>S. aureus</i>	++
S12	<i>S. aureus</i>	++

Tabla R45. Resultados de la prueba de detección de inhibición de *C. fimi* (continuación)

Referencia	Identificación	Inhibición de <i>C. fimi</i>
S13	<i>S. aureus</i>	++
S14	<i>S. aureus</i>	++
S15	<i>S. aureus</i>	++
S16	<i>S. aureus</i>	-
S18	<i>S. aureus</i>	++
S19	<i>S. aureus</i>	++
S20	<i>S. aureus</i>	++
S21	<i>S. aureus</i>	++
S22	<i>S. aureus</i>	++
S23	<i>S. aureus</i>	++
S24	<i>S. aureus</i>	++
S25	<i>S. aureus</i>	++

De modo resumido, en la **Tabla R46** se presentan los resultados agrupados por especies:

Tabla R46. Resultados de la producción de bacteriocinas agrupados por especie.

Actividad	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>Chromogenes</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. xyloso</i>	Totales
+++	0 (0,00%)	2 (2,74%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (25,00%)	0 (0,00%)	3 (1,22%)
++	62 (56,88%)	14 (19,18%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (20,00%)	1 (25,00%)	5 (12,20%)	84 (34,15%)
+	19 (17,43%)	26 (35,62%)	1 (11,11%)	1 (33,33%)	0 (0,00%)	1 (20,00%)	0 (0,00%)	5 (12,20%)	52 (21,14%)
-	21 (19,27%)	26 (35,62%)	5 (55,56%)	1 (33,33%)	2 (100,00%)	3 (60,00%)	2 (50,00%)	29 (70,73%)	89 (36,18%)
D	7 (6,42%)	5 (6,85%)	3 (33,33%)	1 (33,33%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (4,88%)	18 (7,32%)
Total	109	73	9	3	2	5	4	41	246

Leyenda: -: sin inhibición ; +: inhibición clara; ++: halo de inhibición claro y traslúcido; +++: halo >2 mm; d: inhibición débil

La actividad frente a *C. fimi* se ha encontrado en 157 de las cepas, lo que representó que un 63,82 % de las cepas presentaban actividad de producción de bacteriocinas. De entre estas cepas, 88 pertenecían a la especie *S. aureus* de las que el 80,73 % presentan bacteriocinas. La mayor actividad de producción de bacteriocinas se encontró, sin embargo, entre las cepas pertenecientes a las especies *S. epidermidis* y *S. simulans*. En cuanto al resultado negativo, la especie *S. xyloso* es la que mayor proporción de cepas negativas presenta, suponiendo más de un 70% de los aislados.

VIII.- Discusión

1.- Cepas aisladas en este estudio

1.1.- Identificación, distribución territorial y temporal de las cepas aisladas

El uso de métodos moleculares de identificación se está afianzando en los laboratorios aunque algunos autores indican que la identificación genotípica basada en las secuencias del rRNA 16S posee una baja capacidad de discriminación entre especies próximas y las del género *Staphylococcus* (Heikens *et al.*, 2005) debido a la escasa calidad de algunas de las secuencias depositadas en las bases de datos. Por otro lado, la identificación fenotípica sigue siendo actualmente de ayuda, especialmente si se combina con algunos de dichos métodos (O’Gara y Humphreys, 2001). Los métodos bacteriológicos de rutina utilizados sin almacenamiento previo de los aislados, tal como se han llevado a cabo en este trabajo, son apropiados para el aislamiento e identificación de los patógenos mamarios de los ovinos (Clemens *et al.*, 2003).

En cualquier caso, pese a las consideraciones respecto de la naturaleza estéril de la leche, se han publicado estudios originalmente referidos a diversas especies, que tratan sobre las bacterias aisladas de la leche de animales clínicamente sanos, como el de Rather *et al.* en bovino (1986) o Burriel en ovino (1998). En ganado ovino se sabe que los estafilococos pueden ser aislados del esfínter y canal del pezón en ausencia de mamitis (Mavrogianni *et al.*, 2007), por lo que desde aquí podrían llegar a las muestras de leche que se remitan al laboratorio sin relación con procesos clínicos de la mama. También se conoce que en ovino los microorganismos más relevantes como causa de mastitis proceden principalmente de los propios animales y no del medio circundante (Marco *et al.*, 1992b; Mavrogianni *et al.*, 2007) y que su difusión se produce durante el ordeño (Bergonier *et al.*, 2003) a diferencia de lo que ocurre en ganado vacuno. En definitiva, los estafilococos aislados de leche de ovejas asintomáticas pueden ser potencialmente patógenos, por lo que como tal han de ser considerados, lo que justifica su interés y, particularmente, cuanto se refiere a su caracterización en lo que a factores de virulencia se refiere.

La etiología más frecuente de las mastitis ovinas se debe a miembros del género *Staphylococcus* (Rupp *et al.*, 2009) y se reconoce mundialmente que, entre ellos, *S. aureus* es el principal patógeno mamario en el ganado ovino (Mørk *et al.*, 2007; Vautor *et al.*, 2009), siendo también en nuestro caso la especie más frecuentemente aislada (44,31% del total de aislados, **Tabla D04**). Las muestras utilizadas en nuestro trabajo fueron obtenidas

de los servicios de diagnóstico indicados en Material y Métodos y, aunque muchas de las cepas de los años 1992 a 1994 responden a muestras de ovejas sanas o con mastitis subclínicas, las de otros años procedían fundamentalmente de ovejas con un grado variable de patología mamaria, de manera que muchas proporcionaron cepas de *S. aureus*. Por lo tanto, las cepas aisladas en los años 1989 y 2001 a 2005 deben considerarse obtenidas de la toma de muestras de ovejas con mastitis clínicas en las que se buscaron patógenos mamarios principales (en especial *S. aureus*). Sin embargo, entre las muestras analizadas en el trienio 1992 a 1994 se encuentran las procedentes de individuos con condiciones clínicas variadas, desde mastitis clínica hasta ausencia total de alteraciones, pasando por mastitis subclínicas. En este periodo se llegaron a analizar hasta 16 muestras individuales por caso. En la **Tabla D01** se muestra la distribución de cepas aisladas por año y por caso en este estudio:

Tabla D01. Resumen de las cepas de estafilococos estudiadas, agrupadas por año de aislamiento, indicando los casos estudiados por año y detallando los aislados obtenidos por caso.

Año	Nº casos	Nº cepas	Nº máximo de aislados por caso	Media de aislados por caso
1989	1	1	1	1
1992	29	110	16	3,79
1993	38	84	11	2,21
1994	16	29	3	1,81
2001	3	3	1	1
2002	2	2	1	1
2003	1	1	1	1
2004	10	10	1	1
2005	6	6	1	1
Totales	106	246		2,32

En el trienio 1992-1994, en el que se concentra el mayor número de cepas (223 cepas, el 90,6% del total de aislados), la distribución de especies (**Tabla D02**) permite observar que los SCN son las especies más frecuentemente aisladas (55,69%), seguidas por *S. aureus* (44,31%). En estos años se colaboró muy estrechamente con veterinarios interesados en estudiar a fondo los rebaños de su responsabilidad, en la detección y diagnóstico de mamitis subclínicas, procesando un número alto de muestras por caso con el fin de poder valorar el estado sanitario de rebaños sin manifestaciones clínicas, aunque con recuentos de células somáticas que hacían sospechar la existencia de cuadros subclínicos.

Tabla D02. Distribución de los aislados, por especie (1992 – 1994).

	1992		1993		1994	
	N	%	N	%	N	%
<i>S. aureus</i>	40	36,36	31	36,90	15	51,72
SCN	70	63,64	53	63,10	14	48,28
<i>S. epidermidis</i>	47	42,73	24	28,57	2	6,90
<i>S. gallinarum</i>	1	0,91	3	3,57	5	17,24
<i>S. haemolyticus</i>	1	0,91	2	2,38	0	0,00
<i>S. hominis</i>	1	0,91	0	0,00	1	3,45
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	3	2,73	2	2,38	0	0,00
<i>S. simulans</i>	1	0,91	3	3,57	0	0,00
<i>S. xylosus</i>	16	14,55	19	22,62	6	20,69
total	110		84		29	

Bergonier *et al.* (2003) consideraron que en el ganado ovino, *S. aureus* es el agente principal de la mastitis aguda, mientras que los SCN son los causantes de los cuadros subclínicos. En su amplio estudio de mastitis subclínicas en esta especie animal, Watkins *et al.* (1991) concluyen que los SCN suponen la mayoría de las bacterias aisladas de leche de ovejas con un resultado negativo en la prueba Whiteside, mientras que sólo representan el 33% de los aislados en casos de mastitis subclínicas. Ese mismo año, Jarp estudió los SCN aislados de mastitis clínicas y subclínicas en ganado bovino afirmando que las que presentaban mayores signos locales de inflamación se asociaban con *S. haemolyticus*, *S. xylosus* y *S. simulans*. Pengov (2001) señala que los SCN son los agentes patógenos más frecuentemente aislados en leche de ovino, conclusión que coincide con otros estudios realizados en nuestro país (Gonzalo *et al.*, 2002). En lo que respecta al tipo de bacterias aisladas de muestras procedentes de individuos clínicamente sanos, Rather *et al.*, (1986), aislaron de leche de vacas sanas mayoritariamente SCN (72,6%), mientras que Bergonier *et al.* (2003), en ganado ovino, aislaron tanto SCN como *S. aureus*. En España, varios estudios han puesto de manifiesto mayoritariamente SCN en el caso de ovejas clínicamente sanas, en porcentajes variables: 65,28 % (García, 1990), 58,70% (Marco *et al.*, 1992a), 78,83% (De la Cruz *et al.*, 1993).

En la **Tabla D02** puede observarse que en nuestro caso los SCN superan a *S. aureus* en los años 1992 y 1993 y prácticamente los igualan en 1994, cuando el número de aislados obtenidos fue mucho menor que en los anteriores. Respecto de la distribución de

cepas aisladas por caso, (**Tabla D01**), también se aprecia que durante los años 1992 y 1993 fue cuando se aisló más por número de cepas de media por caso.

Varios autores han descritoSe ha indicado diversas especies de SCN como las más frecuentemente aisladas en casos de mastitis ovinas, incluyendo *S. simulans* y *S. xylosum* (Fthenakis *et al.*, 1994), *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. chromogenes* y *S. simulans* (Bergonier *et al.*, 2003). En nuestro estudio se obtiene también un elevado porcentaje de cepas de SCN (55,28%), siendo *S. epidermidis* y *S. xylosum* las especies más prevalentes (representan un 83,82% de los SCN aislados). Maisi y Riipinen (1991) demostraron que algunas cepas de estas especies son capaces de provocar alteraciones subclínicas en las mamas caprinas, especialmente si aparecen en poblaciones mixtas.

Lamentablemente, la distinción entre bacterias patógenas o saprofitas en el caso de las cepas de SCN aisladas no resulta tarea sencilla, especialmente si hay que basarse en caracteres fenotípicos, como indican Souto *et al.* (1991) en cepas de *S. epidermidis* de origen humano, aisladas en hospitales. En ellas, entre otros factores, se estudió la formación de *slime*, característica que abordaremos más adelante. En Veterinaria podemos encontrar el mismo problema, puesto que se sabe que *S. epidermidis* posee una importante capacidad de supervivencia y de producir infecciones mamarias subclínicas en ovejas (Winter y Colditz, 2002).

La sensibilidad o resistencia a la novobiocina, aparte de ser un carácter de interés taxonómico, resulta una característica que puede permitir la clasificación de los SCN en dos subgrupos que difieren en su virulencia para la glándula mamaria ovina (Gonzalo *et al.*, 2002) como agentes causales de mastitis subclínica: los SCN sensibles a la novobiocina (SCNSN), consistentemente más patógenos, mientras que los SCN resistentes (SCNRN), forman parte de los patógenos menores (menos virulentos).

La **Tabla D03** recoge los datos de aislamientos llevados a cabo a partir de leche de ovejas clínicamente sanas según referencia de varios autores agrupados según este criterio, incluyendo también los de *S. aureus*, como patógeno principal en las mastitis ovinas (Gonzalo *et al.*, 2002).

Tabla D03. Distribución en subgrupos de las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas en España de leche de ovejas sanas (datos de varios autores).

	Nº cepas y % sobre el total de cepas aisladas		
	García (1990)	Marco <i>et al.</i> (1992a)	De la Cruz <i>et al.</i> (1993)
<i>Staphylococcus</i> spp.	190 (87,96)	34 (73,91)	123 (89,78)
<i>S. aureus</i>	49 (22,69)	7 (15,22)	7 (5,11)
SCN	141 (65,28)	27 (58,70)	108 (78,83)
SCNSN	76 (35,19)	27 (58,70)	93 (67,88)
SCNRN	65 (30,09)	0 (0,00)	15 (10,95)

SCNSN: estafilococos coagulasa negativa sensibles a la novobiocina.
 SCNRN: estafilococos coagulasa negativa resistentes a la novobiocina.

Según puede verse, entre las cepas aisladas en España de leche de ovejas clínicamente sanas, abundan los SCN y, en especial, los de especies sensibles a la novobiocina, que llegan a representar el 100% de los estafilococos aislados distintos de *S. aureus*. Los resultados obtenidos en este trabajo se recogen en la **Tabla D04**, con expresión del número y porcentaje de cepas según la sensibilidad o resistencia a la novobiocina.

Tabla D04. Cepas identificadas en este estudio, reagrupando los SCN según su sensibilidad a la novobiocina.

Identificación	Nº de aislados	% sobre el total de aislados
<i>S. aureus</i>	109	44,31
SCN	(137)	(55,69)
<i>S. epidermidis</i>	73	29,67
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	5	2,03
<i>S. simulans</i>	4	1,63
<i>S. haemolyticus</i>	3	1,22
<i>S. hominis</i>	2	0,81
SCNSN	(87)	(35,37)
<i>S. xylosus</i>	41	16,67
<i>S. gallinarum</i>	9	3,66
SCNRN	(50)	(20,33)
Total:	246	100,00

SCNSN: estafilococos coagulasa negativa sensibles a la novobiocina.
 SCNRN: estafilococos coagulasa negativa resistentes a la novobiocina.

Los SCN representan las especies más frecuentemente aisladas en nuestro estudio (55,69%), seguidas por *S. aureus*, especie causante de mastitis clínicas graves en ganado ovino, con un predominio de especies sensibles a la novobiocina (SCNSN), que representan un 63,50% del total de SCN. Como se ha señalado antes, estas cepas están potencialmente relacionadas con situaciones de mastitis subclínicas, destacando la

presencia de *S. epidermidis*. Fragkou *et al.*, (2007), concluyen que la presencia de una alta concentración de estafilococos en el canal del pezón de la mama ovina puede proporcionar cierta protección frente a microorganismos invasores; sin embargo, los mismos autores apuntan que si fallan las defensas de la mama, dichas bacterias pueden invadir el parénquima y causar mastitis clínica. Según esto, las bacterias aisladas por nosotros podrían considerarse, en condiciones naturales, potenciales patógenos.

En la **Tabla D05** se recoge la distribución de los aislados en el periodo 1992-1994, al que nos hemos referido anteriormente señalando el interés por el estudio de mastitis subclínicas.

Tabla D05. Distribución de los aislados por especies en los años 1992 a 1994, reordenando las cepas de los SCN según su sensibilidad a la novobiocina .

	1992		1993		1994	
	N	%	N	%	N	%
<i>S. aureus</i>	40	36,36	31	36,90	15	51,72
SCN	70	63,64	53	63,10	14	48,28
<i>S. epidermidis</i>	47	42,73	24	28,57	2	6,90
<i>S. haemolyticus</i>	1	0,91	2	2,38	0	0,00
<i>S. hominis</i>	1	0,91	0	0,00	1	3,45
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	3	2,73	2	2,38	0	0,00
<i>S. simulans</i>	1	0,91	3	3,57	0	0,00
SCNSN	(53)	(48,18)	(31)	(36,90)	(3)	(10,34)
<i>S. gallinarum</i>	1	0,91	3	3,57	5	17,24
<i>S. xylosum</i>	16	14,55	19	22,62	6	20,69
SCNRS	(17)	(15,45)	(22)	(26,19)	(11)	(37,93)
total	110		84		29	

Frente a la media general de los SCNSN de todo el estudio (35,37%), al menos en los dos años del periodo con mayor número de casos y aislados, el porcentaje de las cepas de SCN sensibles a la novobiocina alcanzó valores de 48,18 y 36,90% de los aislados, coincidiendo con la mayor proporción de rebaños estudiados para la detección de mastitis subclínicas.

Concluyendo, en el estudio se diferencian dos periodos en relación con el objetivo del análisis: unos años estuvieron dedicados fundamentalmente al aislamiento de *S. aureus* en relación con el diagnóstico y tratamiento de las mastitis clínicas; en el otro periodo se prestó atención particular a la detección de agentes causantes de mastitis subclínicas. Esta razón hizo que en este periodo se aislase un porcentaje relativamente alto de SCN, en

particular especies de SCN sensibles a la novobiocina, habitualmente consideradas agentes relacionados con mastitis subclínicas en la especie ovina, resultado que podría considerarse normal y esperado.

1.2.- Fagotipado de las cepas de *S. aureus*

El fagotipado de *S. aureus* fue posible desde que Fisk en 1942 descubrió un conjunto de fagos una actividad específica que muchos de los estafilococos coagulasa positivos eran portadores de fagos, aunque fueron Wilson y Atkinson en 1945 quienes dispusieron el primer *set* de fagos para la clasificación de *S. aureus* (Parker, 1983).

Poco después, en 1952, Oeding consideró que el fagotipado de los estafilococos podría resultar una técnica poco práctica, debido a que un número relativamente alto de cepas de estafilococos no eran fagotipables. Por otro lado, algunos autores señalaron que las cepas de *S. aureus* capsuladas no eran fagotipables (Finkelstein y Sulkin, 1958; Koenig y Melly, 1965; Yoshida y Takeuchi, 1970; Wu y Park, 1971; Lee *et al.*, 1987a), aunque más adelante pudo demostrarse que esto no siempre es así (Wilkinson, 1983); en estudios sobre cepas de *S. aureus* aisladas de ganado ovino tanto cutáneas como aisladas de queso de leche de oveja, se ha llegado a fagotipar hasta el 90,4% de las cepas (Hájek, 1978). Además, ha podido detectarse la presencia de cápsula en el caso de ciertas cepas propagadoras de fagos, lo que demuestra que las cepas capsuladas son fagotipables (Sompolinsky *et al.*, 1985). El estudio de referencia, realizado sobre aislados de origen principalmente humano se determinó que una serie de cepas propagadoras de fagos presentaban polisacáridos capsulares aunque se cultivaran en medios de propagación, de manera que la adición de Cl_2Ca en el medio no evitaba la formación de cápsula, que el 60% de las cepas eran capsuladas y sensibles a fagos, aunque no encontraron correspondencia alguna entre serotipo capsular y fagotipo, como también habían indicado Arbeit *et al.* (1984), con cepas únicamente de origen humano.

Lamentablemente, la mayoría de los estudios de detección y caracterización de fagos se han llevado a cabo en Medicina Humana, con fines epidemiológicos. En Veterinaria, los investigadores han trabajado mayoritariamente con fagos de origen bovino (Lorbacher, 1967; Das *et al.*, 1990; Nag *et al.*, 1990, Yamada *et al.*, 2005), siendo muy escasos los estudios publicados hasta la fecha sobre cepas de origen ovino.

En 1978, Hájek estudió 127 cepas de *S. aureus* aisladas de ganado ovino; 83 de ellas habían sido aisladas de fosas nasales y mastitis purulentas, y 44 fueron obtenidas de

queso elaborado con leche ovina. El citado autor realizó el fagotipado con el *set* básico internacional completado con el bovino, además de emplear también una serie de fagos accesorios. Globalmente, las cepas aisladas mostraron algún efecto a RTD ó 100 RTD a los fagos 78, 55 y 3A, aunque en el caso de las aisladas en queso, fueron destacables los 78, 3C y 42E.

En la **Tabla D06** resumimos los efectos a 100 RTD obtenidos en las 109 cepas de *S. aureus* aisladas en nuestro estudio utilizando el *set* internacional (humano).

Tabla D06. Resultados del fagotipado a 100 RTD con el *set* internacional de las cepas del estudio.

efecto	Fagos																		Σ (%) ¹	
	3A	3C	6	29	42E	52 A	53	54	55	71	75	77	79	80	81	83 A	84	95		96
LC	2	2	2	3	1	4	1	1	0	0	1	0	1	1	2	1	1	1	2	26 (23,85)
++	0	0	3	4	0	1	0	0	0	0	1	1	3	2	0	0	0	0	0	15 (13,76)
+	0	0	1	3	1	3	1	3	1	0	1	0	1	1	2	2	0	3	1	24 (22,02)
d	3	4	2	4	3	5	3	2	0	2	3	2	4	3	3	4	0	2	7	56 (51,38)
Σ	5	6	8	14	5	13	5	6	1	2	6	3	9	7	7	7	1	6	10	121
%	4,59	5,50	7,34	12,84	4,59	11,93	4,59	5,50	0,92	1,83	5,50	2,75	8,26	6,42	6,42	6,42	0,92	5,50	9,17	

Legenda: LC: lisis confluyente, ++: 50 ó más placas de lisis, +: 20-50 placas de lisis, d: menos de 20 placas.
(¹) Suma de efectos y porcentaje de cepas que lo presentan.

Los fagos que se mostraron más activos a 100 RTD fueron el 29 (12,84%), el 52A (11,93%) y el 96 (9,17%). Por otro lado, las lisis completas se obtuvieron en 26 casos (23,85%), estando bastante uniformemente repartidas (sólo 3 fagos no mostraron lisis completa en ningún caso), pese a ser más frecuentes con los fagos 29 y 52 A.

Los aislados obtenidos en nuestro estudio fueron en general resistentes a los fagos estándar empleados, de manera que sólo ocho cepas mostraron lisis completa a alguna de las cepas del *set* internacional a 100 RTD (7,34% del total de *S. aureus* aislados), mientras que de ellas sólo dos (1,83%) fueron sensibles a RTD con algunos de los fagos del *set* internacional, tal como se indicada en el capítulo de Resultados.

Cabe señalar, por otra parte, que algunas cepas de origen humano sensibles a los fagos 80/81 se han relacionado epidemiológicamente en la década de 1950 con infecciones hospitalarias muy graves, especialmente en recién nacidos (Parker, 1983).

Pese a la relativa resistencia a los fagos estándar, las cepas aisladas en este estudio, sí se mostraron moderadamente sensibles a los fagos aislados en el curso del trabajo: el 57,80% de las cepas resultaron sensibles al fago 21.4, el 43,12 % al 304 y el 32,11 % al 21.4.

En cuanto a la relación entre la sensibilidad a fagos y la capsulación de las cepas, ninguna de las dos cepas que mostraron sensibilidad fágica a RTD era capsulada (negativas a los métodos del SSA así como por PCR). Por otro lado, las cepas lisógenas originales de los tres fagos aislados en este estudio tampoco eran capsuladas. De Magalhaes *et al.* (1990) trabajaron con *S. aureus* de origen bovino y, pese a no estudiar la relación entre la presencia de cápsula y el fagotipo, sí que determinaron que en total, el 87,4% de las cepas eran fagotipables, con el *set* humano (30,7%) o el bovino (15,7%), siendo más sensibles a los fagos específicos de bovino (40,9%), lo que coincidiría en cierto modo con el hecho de que las cepas de este estudio fueron considerablemente más sensibles a los fagos de origen ovino aislados durante el mismo, que al *set* internacional (49 cepas sensibles a RTD frente a sólo 2). Estudios similares, como el de Das *et al.* (1990), sitúan en sólo un 24,4% las cepas de origen vacuno fagotipables con el *set* bovino, mientras que Nag y Ghosh-Ray, en el mismo año, fueron capaces de fagotipar hasta el 90,8% de las cepas con el *set* bovino.

En la **Tabla D07** se muestra la sensibilidad a los fagos utilizados de las cepas posiblemente capsuladas, según SSA y que presentan alguna calva, y su comparación con las dos cepas más sensibles a los fagos del *set* internacional.

Tabla D07. Fagotipado de las dos cepas más sensibles al *set* internacional y de las cepas que no presentan morfología compacta en SSA y son sensibles a algún fago empleado en este estudio.

	SSA	FAGOS																						
		3A	3C	6	29	42E	52A	53	54	55	71	75	77	79	80	81	83A	84	95	96	304	21.4	281	
SENSIBLES																								
92/052.01	C	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC			LC	++	++	LC	LC	LC	LC	LC	LC				
S23	C	LC	LC		LCt	d									LCt	LC				LC			LCt	
CAPSULADAS																								
92/080.11	D			+	++																			
92/094.05	P				+																	++	++	
94/024.01	M			++	++		LC		d			d		d	d	d								
94/093.01	D																					LCt		
94/165.02	P																					LC	LC	LCt
94/175	P																					LC	LC	LCt
S06	D																					LC	LC	LCt
S07	D																					LCt	LC	
S11	P	++	+	d	d																	D	LC	
S20	D																					LC	LC	

Leyenda: LC: lisis confluyente, ++: 50 ó más placas de lisis, +: 20-50 placas de lisis, d: menos de 20 placas. C: compacta, D: difusa, P: pseudodifusa, M: mixta.

De los resultados obtenidos, se desprende que también algunas de las cepas capsuladas de nuestro estudio son sensibles a fagos, tanto a los del *set* internacional como a los nuestros, circunstancia que apoya las observaciones citadas por los autores referidos.

Finalmente, con respecto a la relevancia de los bacteriófagos de *S. aureus* en aspectos no taxonómicos, conviene recordar el papel que se les ha atribuido en la transmisión horizontal de genes de leucotoxinas entre cepas (Yamada *et al.*, 2005).

2.- Estudio de los factores de virulencia

2.1.- Factores de superficie

Puesto que la superficie es la primera parte de la bacteria que entra en contacto con el medio que la rodea, el estudio de sus características no sólo tiene importancia taxonómica, de virulencia y epidemiológica, sino que puede ayudar a una mejor comprensión de las interacciones bacteria-hospedador (Sompolinsky *et al.*, 1985); de hecho, la expresión de ciertos factores de superficie es una respuesta directa a estímulos externos a la bacteria (Whitfield, 1988). Los factores de superficie más relevantes, en el caso de los estafilococos, incluyen las estructuras de recubrimiento (cápsula, *slime*), varios tipos de adhesinas y la hidrofobicidad superficial. Entre los miembros del género, se sabe que *S. aureus* está bien provisto de componentes de superficie y secretados que pueden comprometer la respuesta inmune innata, especialmente la actuación de los neutrófilos (Foster, 2009), situación que podría darse también en otras especies del género.

La presencia de estos factores de superficie está condicionada inicialmente a que se encuentren codificados en el genoma de la bacteria, mientras que los factores ambientales y de cultivo pueden influir decisivamente en, por ejemplo, la formación de biofilme *in vitro* (Clutterbuck *et al.*, 2007), la producción de cápsula (Opdebeeck *et al.*, 1987) o la expresión de los genes capsulares (Ouyang *et al.*, 1999); de hecho, se ha demostrado que el crecimiento en leche o en suero de leche induce la expresión de ciertos genes de un modo similar al que se produce durante la patogénesis de la mastitis (Lammers *et al.*, 2000), y algunos medios artificiales, como el agar Columbia o el agar m110, favorecen la expresión antigénica (Opdebeeck *et al.*, 1987; Han *et al.*, 2000).

El método directo de detección capsular mediante tinción negativa en *S. aureus*, ha sido reconocido como el único válido por autores como Anderson, en 1984, pese a que se

ha descrito por otros autores que las cápsulas deben superar los 200 nm de grosor para poder ser vistas mediante microscopía óptica (Rather *et al.*, 1986). Otros autores indican que aunque no se pueda observar cápsula alguna mediante microscopía convencional, ésta puede existir y ser detectada por otros métodos, como la fluorescencia (Sompolinsky *et al.*, 1985). Además, los métodos de detección visual de algunas de estas estructuras son delicados en su realización y, en ciertos casos, poco fiables debido a la labilidad de alguna de estas estructuras; por ejemplo, la cápsula se puede dañar en el curso de la realización de la técnica (Beveridge y Graham, 1991), y no resultar visibles por microscopía óptica, por lo que estas técnicas no son muy fiables.

2.1.1.- Cápsula

Basándonos en la definición de Mudd (1965), la cápsula es una capa de polisacáridos bien organizada, fijada a la pared celular y que rodea completamente la bacteria. Es una estructura que confiere resistencia a la fagocitosis (Koenig *et al.*, 1962; DeLeo *et al.*, 2009) y se opone a la activación del sistema complemento siendo, por tanto, un factor de virulencia, razón por la que su detección es importante, habiéndose empleado aproximaciones diferentes para conseguirla.

En su investigación sobre 775 cepas, Smith *et al.* (1971) propusieron la determinación de la presencia de *clumping factor* como una técnica válida para el *screening* de cepas capsuladas de *S. aureus* de origen humano, de manera que las cepas negativas debían ser cultivadas en SSA y observadas en tinción negativa y puesto que, según ellos, las positivas al *clumping factor* nunca eran capsuladas, no necesitaban más investigación. Odierno *et al.* (1995) compararon 11 métodos de detección de cápsula en *S. aureus*, determinando que los más precisos eran la microscopía electrónica de transmisión, la determinación de la morfología en SSA, la detección de la presencia del *clumping factor*, la estimación del volumen celular y la tinción con safranina. La determinación del *clumping factor* era rápida y eficaz para el diagnóstico presuntivo, pero debía ser confirmada por otro método. El resto de métodos analizados fueron la tinción negativa, el uso de antiseros capsulares, la determinación de virulencia en ratón, la susceptibilidad a la lisostafina, la resistencia a fagos y la resistencia a la fagocitosis, que resultaron, según los autores, demasiado lentos o laboriosos.

En este estudio se ha determinado la presencia de cápsula en cepas de *S. aureus* mediante dos técnicas clásicas; por un lado, la detección de la presencia de *clumping factor*

y, por otro, la observación de la morfología colonial en agar blando suero (*Serum Soft Agar*, SSA). Puesto que el *clumping factor* se encuentra situado en la superficie bacteriana, puede resultar enmascarado si la bacteria se encuentra rodeada por alguna estructura y, por tanto, la cepa capsulada será negativa al *clumping factor*. En el caso del SSA, la aparición de colonias difusas se produce debido a que la sustancia activa formadora de colonias compactas (CCFAS) también se encuentra oculta por la cápsula.

2.1.1.1.- Presencia del *clumping factor*

La presencia o no del *clumping factor* en *S. aureus*, que fue primitivamente denominado “coagulasa ligada” por Duthie en 1954 (aunque se determinó finalmente que no estaba relacionado con la coagulasa libre adoptándose finalmente la denominación actual), se ha relacionado con la existencia o ausencia de cápsula en *S. aureus* (Smith *et al.*, 1971). El *clumping factor* es un componente de la pared celular y está presente en el 97% de las cepas de estafilococos coagulasa positivos, y en un 3% de SCN (Jeljaszewicz *et al.*, 1983).

En la década de 1950 el *clumping factor* se consideró factor de virulencia, aunque finalmente se confirmó que, precisamente, las cepas de *S. aureus* que carecían de él eran las más virulentas (Anderson, 1976). Más tarde, en su estudio sobre la relación entre el *clumping factor*, el SSA y la virulencia de *S. aureus*, Yoshida y Ekstedt (1968) relacionaron la morfología difusa en el medio SSA con una reacción negativa al *clumping factor*, aunque señalaron que el lavado de las bacterias en solución salina convertía las cepas negativas en positivas, indicando la presencia de una capa de polisacárido (*slime*) alrededor de las bacterias que se perdía mediante el tratamiento. Por tanto, la aparente falta de *clumping factor* en cepas de *S. aureus* virulentas se debía a su ocultamiento por la presencia de cápsula (Jeljaszewicz *et al.*, 1983), que realmente era el factor de virulencia. En estudios posteriores con cepas mutantes respecto al *clumping factor*, parecía bastante claro que si se tratase de un factor de virulencia, su importancia individual resulta limitada (Entenza *et al.*, 2000). Finalmente se ha reconocido su importancia como adhesina (Schaffer *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, se determinó la presencia del *clumping factor* en todas las cepas de *S. aureus* aisladas, con los resultados recogidos en la **Tabla R13** del capítulo de Resultados.

Según estas cifras, considerando que el *clumping factor* es un integrante de la estructura de la pared de la mayoría de cepas de *S. aureus* (presente en un 97% de las cepas según Jeljaszewicz *et al.*, 1983) y que su no detección se asocia a que se encuentra oculto por alguna estructura superpuesta (Risley *et al.*, 2007), en nuestro caso habría que pensar que en la mayoría de las 29 cepas negativas a este factor podrían encontrarse estructuras superficiales externas a la pared que lo ocultarían, como sucedería en el caso de la cápsula. Ello supondría que un 26,60% de los *S. aureus* aislados serían capsulados. Sin embargo, como indicaron Odierno *et al.* (1995), es preciso corroborar estos datos mediante la utilización de otra prueba confirmatoria, que en nuestro caso fue la utilización del SSA.

2.1.1.2.- Crecimiento en agar blando suero (Serum Soft Agar, SSA)

La técnica del agar blando-suero (*Serum-soft agar*, SSA) fue desarrollada por Finkelstein y Sulkin en 1958, con el propósito de poder distinguir, mediante cultivo, los estafilococos coagulasa positivos de los coagulasa negativos. En su trabajo, la mayoría de los primeros ofrecían una morfología colonial compacta si se cultivaban en dicho medio, mientras que los últimos presentaban un crecimiento con colonias de aspecto difuso. En ciertos casos, algunas cepas mostraban una mezcla de colonias compactas y difusas, lo que interpretaron como variantes, llegando a considerarlas cepas diferentes, no relacionando esta circunstancia con la existencia en una misma cepa de clones capsulados. Más tarde, con la aparición de cepas como *S. aureus* Smith, se empezó a relacionar la existencia de variantes (Yoshida y Takeuchi, 1970) y el crecimiento difuso de *S. aureus* en SSA como indicativo de capsulación (Yoshida y Takeuchi, 1970; Smith *et al.*, 1971), aunque algunos autores lo relacionaron con la existencia de *slime* y no de cápsula (Rather *et al.*, 1986).

Más adelante, se describieron ciertas cepas virulentas de *S. aureus* en las que, aunque no se llegaba a detectar cápsula mediante microscopía óptica, sí mostraban morfología difusa en SSA (Mamo *et al.*, 1991a), lo que avala el uso de esta técnica para detectar cepas capsuladas de esta especie bacteriana, aunque Anderson en 1984 pusiera en duda su fiabilidad. Sin embargo, hay que recordar que el tamaño de la cápsula parece estar en relación directa con la virulencia, al menos en ratón (Yoshida y Takeuchi, 1970), por lo que las cepas que presentasen una microcápsula podrían ser de nula o baja virulencia aunque presentaran morfología difusa (indicadora de la presencia de cápsula) en SSA (Lee *et al.*, 1987a).

Aunque algunos autores relacionaron, en un primer momento, el crecimiento compacto de *S. aureus* en SSA con la presencia de *clumping factor* (Yoshida y Ekstedt,

1968), o de reacción de la proteína A con la fracción Fc de los anticuerpos (Forsum *et al.*, 1972), estudios posteriores han demostrado que en realidad existe en la superficie de ciertas cepas de estafilococos un carbohidrato termoestable y lábil a los ácidos denominado “sustancia activa formadora de colonias compactas” (*compact-colony forming active substance*, CCFAS), responsable de este efecto en SSA (Yoshida *et al.*, 1977; Jeljaszewicz *et al.*, 1983).

El 26,6% de nuestros aislados de *S. aureus* parecen estar capsulados según el SSA, lo que supone un porcentaje relativamente elevado comparado con los datos hallados en cepas bovinas por Yokomizo, en 1977 (un 1,18%) y Opdebeeck *et al.* en 1987, que indicaban que en torno al 4% de los aislados eran difusos. Aparte de la diferencia de especie de origen, en unos resultados tan bajos pudo influir el que sus cepas habían sufrido abundantes pases *in vitro*, que en el caso de Yokomizo (1977) consistieron en pases seriados en agar inclinado durante seis meses. Esta influencia del subcultivo *in vitro* sobre la expresión de cápsula fue demostrada por los mismos Opdebeeck *et al.* (1987), al conseguir elevar el porcentaje de cepas capsuladas al 75% tras subcultivos rápidos de cepas de origen bovino; de hecho, Poutrel *et al.* (1988) consiguieron serotipar la cápsula de un 78,8% de sus aislados de mastitis ovina, y Johne *et al.* (1989) encontraron cápsula en todos sus aislados clínicos de *S. aureus* procedentes de mastitis bovinas, mientras que Odierno *et al.* (1992), también en cepas de origen bovino, detectaron más de un 78 % de cepas de *S. aureus* con crecimiento difuso en SSA.

Se observa en nuestros resultados que no hay una equivalencia directa entre las cepas de *S. aureus* que son *clumping factor* negativas con las que presentan morfología difusa con la técnica del SSA, aunque en ambos casos se trate de 29 aislados, puesto que no son las mismas cepas. Hay que tener en cuenta que en ambas pruebas no se valora la existencia de la misma estructura superficial: en un caso se trata del *clumping factor*, que reacciona con la cadena γ del fibrinógeno, y en el otro, se evalúa la presencia de la sustancia activa formadora de colonias compactas (CCFAS), que interacciona con el fibrinógeno para formar fibrina (Jeljaszewicz *et al.*, 1983). Ambas sustancias se distribuyen de forma desigual entre los aislados, por lo que hay cepas de *S. aureus* que producen una y no otra (Jeljaszewicz *et al.*, 1983).

Tal como se expuso en el capítulo de Material y Métodos, la prueba del SSA se efectuó sobre la totalidad de las cepas aisladas, independientemente de su adscripción a

una u otra especie. La **Tabla R14** recoge y resume los resultados obtenidos con la técnica del SSA en las 246 cepas estudiadas.

Los casos en los que se observa una morfología compacta en especies diferentes a *S. aureus* (9 de un total de 73 compactas) pueden tratarse de estafilococos que no presenten cápsula pero sí algún factor similar a la CCFAS presente en la superficie de *S. aureus*. En general, las especies de *Staphylococcus* que no son *S. aureus* presentan un crecimiento difuso en el medio SSA clásico (Szücs *et al.*, 1993), aunque esta técnica, convenientemente modificada, se ha empleado para detectar la presencia de cápsula en SCN. En el caso de *S. epidermidis* se ha empleado también la técnica de SSA y se ha encontrado cepas con morfología difusa y compacta (Yoshida *et al.* 1971), llegando estas últimas a representar el 25,8% de las aisladas en su estudio. Ohshima *et al.* (1987) investigaron la cápsula de una cepa de *S. epidermidis* y descubrieron que era similar a la de *S. aureus*. En nuestro caso, sólo aparece una cepa compacta de esta especie, aunque hay otras 8 (siete cepas de *S. xylosus* y una de *S. hominis*). Este tipo de aislados no *S. aureus* que presentan morfología compacta en el SSA, aunque poco frecuentes, ya han sido descritos en la bibliografía (Yoshida *et al.*, 1971) en un porcentaje variable de cepas de SCN (2%, Forsgren *et al.*, 1983; 18%, Szücs *et al.*, 1993); mientras que en nuestro caso representan globalmente un 6,61% del total de SCN (**Tabla R15**), correspondiendo mayoritariamente a la especie *S. xylosus* y, en menor medida, a *S. epidermidis* y *S. hominis*. En su estudio, Szücs *et al.* (1993) señalaron que las cepas compactas pertenecían mayoritariamente a la especie *S. haemolyticus*.

La aparición de colonias compactas y difusas en una misma cepa, reflejada en la **Tabla R15** como morfología colonial mixta, se puede relacionar con la existencia de variantes capsuladas y no capsuladas, como ya describieron Hunt y Moses en 1958 con la cepa Smith. La existencia de cepas que presentan una morfología colonial mixta, con colonias difusas y compactas, también puede explicarse, según el estudio llevado a cabo por Poutrel *et al.* en 1997, por la existencia de grandes variaciones de producción de polisacárido capsular entre bacterias individuales procedentes de una sola colonia original. En nuestro caso, miembros de las tres especies más frecuentes del estudio presentan este tipo de crecimiento “mixto”, suponiendo tan sólo un 3,66% de los aislados.

Finalmente, hay que recordar el papel que desempeñan las cápsulas como determinantes de virulencia (Wiley y Maverakys, 1974; Anderson, 1976; Lin *et al.*, 1994), procurando más resistencia a fagocitosis y a la actividad bactericida del complemento

(Blobel *et al.*, 1980) al enmascarar físicamente los C3b fijados a la pared celular (Wilkinson *et al.*, 1979; Mamo *et al.*, 1991b). Se sabe que ratones inmunizados con *S. aureus* capsulados, o con sobrenadantes de sus cultivos, son inmunes de manera homóloga y es posible conseguir una inmunidad pasiva, mientras que las variantes no capsuladas no protegen frente al desafío con cepas capsuladas (Lee *et al.*, 1987b). En otros estudios, la cápsula de polisacárido impidió la adherencia a células epiteliales y colágeno (Cifrian *et al.*, 1995).

Pese a que Sompolinsky *et al.* (1985) manifiestan que sus datos no indican que la cápsula se pierda por efecto del subcultivo, se acepta que la determinación de la presencia de cápsula por métodos fenotípicos como el cultivo, o bien ópticos, está muy influida por las condiciones de cultivo (Christensen *et al.*, 1982; Sutra *et al.*, 1990; O’Riordan y Lee, 2004), por lo que la utilización de métodos moleculares resulta de gran ayuda.

2.1.1.3.- Tipado capsular

Se han realizado numerosas aproximaciones al serotipado de los estafilococos (Oeding, 1983) siendo el serotipado capsular uno de los que mayor interés ha merecido (Wilkinson, 1983; Karakawa *et al.*, 1985; Sompolinsky *et al.*, 1985; Baselga y Amorena, 1994).

Inicialmente, Yoshida describió tres tipos serológicos en 1971 denominados A, B y C ampliando el esquema con el serotipo D, posteriormente. Más adelante, Karakawa y Vann (1982) llegaron a identificar 8 serotipos capsulares y más tarde se llegó a describir hasta 11 (Sompolinsky *et al.*, 1985), aunque ciertos autores dudan de la existencia real de algunos de ellos (Jean-Michel Fournier, 1996, comunicación personal; Cocchiario *et al.*, 2006). Sin embargo, lo que si se reconoce es que existe un claro predominio de los serotipos 5 y 8 entre los descritos, tanto en cepas de origen humano (Arbeit *et al.*, 1984; Karakawa *et al.*, 1985; Boutonnier *et al.*, 1989), como animal (Poutrel *et al.*, 1988; Poutrel y Sutra, 1993). En el caso de los rumiantes, se ha descrito la predominancia del serotipo 5 en ganado bovino mientras que tanto en ovino como en caprino abunda más el serotipo 8 (Poutrel *et al.*, 1988; Sutra *et al.*, 1990). Por otra parte, se ha llegado a describir grados de virulencia distintos según el serotipo capsular (Watts *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo el serotipado capsular se han empleado métodos variados, como la aglutinación (Oeding, 1952), la inmunodifusión (Karakawa *et al.*, 1985), la inmunoelectroforesis (Karakawa y Vann, 1982), la precipitación (Fournier *et al.*, 1984), el

ELISA (Gray, 1979; Lee *et al.*, 1987b; Poutrel *et al.*, 1988) y, últimamente, dada la influencia de factores externos en la expresión de la cápsula, se está procediendo al tipado con la ayuda de técnicas moleculares (Salasia *et al.*, 2004; Cocchiaro *et al.*, 2006). Como se ha señalado, en este estudio se eligió inicialmente llevar a cabo la tipificación mediante el método ELISA, y posteriormente se llevó a cabo un estudio mediante PCR.

2.1.1.3.1.- Serotipado

Puesto que se deseaba efectuar un serotipado capsular mediante una técnica ELISA, era necesario emplear sueros anticapsulares específicos, que no se encontraban disponibles comercialmente, planificándose entonces la hiperinmunización de conejos con extractos capsulares elaborados a partir de las cepas tipo de *S. aureus* obtenidas de varios investigadores (**Anexo M01**).

Las cepas tipo se cultivaron en agar Columbia suplementado con un 2% de NaCl, como recomiendan Karakawa *et al.* (1985), para la elaboración de sueros hiperinmunes para el tipado capsular de *Staphylococcus*. Por otra parte, se llevó a cabo la multiplicación de las cepas tipo en medio sólido, dado que se ha demostrado que se produce más antígeno capsular en este medio que en el líquido (Lee *et al.*, 1993). Para la extracción del polisacárido capsular se empleó el método de ebullición, como en su momento utilizaron autores como Karakawa y Vann (1982), y se siguió la recomendación de los autores en cuanto a la minimización de los pases en cultivo para conseguir una expresión capsular óptima. Para la purificación parcial de los polisacáridos capsulares seguimos el método de Fournier *et al.* (1987).

Desde el punto de vista de las normas de Bienestar Animal, para llevar a cabo la hiperinmunización de los conejos frente a los polisacáridos capsulares se siguieron las recomendaciones del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, Leenars *et al.*, 1999), mientras que se adoptaron los consejos de Johnston *et al.* (1991) en cuanto al adyuvantado y ritmo de inmunización. El seguimiento comenzó a efectuarse mediante electroforesis sérica hasta poner a punto un ELISA indirecto, siguiendo el método de Lee *et al.* (1985). En paralelo al seguimiento por electroforesis sérica, se llevaron a cabo varias pruebas utilizando el método de SSA empleado por Yoshida en 1971.

Los conejos inoculados mostraron respuestas individuales considerablemente diferentes, aunque previsibles, puesto que la aparición de respuestas individuales en los

procedimientos de hiperinmunización es un hecho reconocido en la bibliografía, tal como indican Barber y Taga en 1965. Por otro lado, la respuesta obtenida fue débil y de lento desarrollo y, en algunos individuos, escasa, circunstancia que se puede explicar al haberse utilizado polisacáridos purificados no conjugados a proteínas, pues se ha descrito en humanos y en ratones la aparición de periodos refractarios de larga duración tras la administración de preparados similares (González *et al.*, 2008) e incluso con ciertos preparados antigénicos de cepas capsuladas se ha llegado a observar parálisis inmune (Fisher *et al.*, 1963). En este caso, la decisión de emplear un inmunógeno más purificado, libre de las células completas y sin asociar a proteínas, para obtener sueros más potentes y específicos, produjo peores resultados. Este punto es coincidente con lo expresado por Fattom *et al.* en 1993, que indicaron que la inmunogenicidad de los polisacáridos es independiente de las células T y que usualmente no se observan respuestas *booster*. Las investigaciones de los últimos años sobre la inmunogenicidad de los estafilococos y la elaboración de vacunas, han llevado a investigadores como Pérez *et al.* (2009) a señalar que se obtiene la mejor respuesta protectora utilizando las bacterias enteras rodeadas de polisacárido más que empleando los polisacáridos purificados.

Los sueros obtenidos fueron titulados mediante ELISA llegándose a conseguir títulos relativamente elevados (hasta 1:12.800) pero, al analizar su especificidad utilizando polisacáridos heterólogos con respecto al empleado durante la hiperinmunización, se obtuvieron muchas reacciones cruzadas que imposibilitaron su uso para el serotipado capsular de competición que se planteaba llevar a cabo, pese a los intentos de purificación, siguiendo las recomendaciones de Mittal *et al.* (1982) para la eliminación de reacciones inespecíficas. Por tanto, los sueros obtenidos no pudieron ser empleados para llevar a cabo el serotipado capsular, ni mediante la técnica del SSA ni mediante ELISA de competición, lo que nos condujo a llevar a cabo la detección de los genes capsulares mediante técnicas de Biología Molecular.

2.1.1.3.2.- Tipado utilizando técnicas de PCR

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral era la detección de cepas capsuladas de *S. aureus* y su serotipado. La detección se logró mediante la combinación del estudio de la presencia de *clumping factor* y la técnica del SSA. Para el serotipado, se llevó a cabo lo descrito previamente en el punto anterior, lo que condujo a la obtención de sueros policlonales pero que presentaron las suficientes reacciones cruzadas como para hacerlos inservibles para el fin previsto. Finalmente, decidimos proceder a detectar la presencia de

los genes específicos de los tipos capsulares que se encontraban secuenciados hasta el momento: los correspondientes a los serotipos 1, 5 y 8.

2.1.1.3.2.1.- Diseño y puesta a punto de la PCR múltiple

Para conseguir una economía de recursos y esfuerzos, se planteó poner a punto una única reacción de PCR que nos permitiera detectar la presencia de cualquiera de los tres tipos capsulares. Para su puesta a punto nos servimos del llamado método Taguchi: este sistema es empleado ampliamente como base de los ensayos de desarrollo durante el diseño de procesos industriales. Al contrario de las estrategias convencionales, cuenta con unas matrices de experimentación que revelan simultáneamente los efectos e interacciones de varios componentes de la reacción utilizando pocas pruebas, evitando utilizar una gran cantidad de experimentos para la puesta a punto de un método experimental. Con este sistema se puede determinar con relativa sencillez qué componentes de la mezcla de PCR afectan al rendimiento de la reacción (Cobb y Clarkson, 1994).

2.1.1.3.2.2. - Resultados de la PCR capsular múltiple

Es conocido que, en algunos casos, se pueden detectar antígenos capsulares en cepas aparentemente no capsuladas (Yoshida *et al.*, 1974) y que, por el contrario, algunas cepas capsuladas puedan no resultar serotipables (Tollersrud *et al.*, 2000), aunque efectivamente posean genes capsulares (Verdier *et al.*, 2007), es decir, que tengan la potencialidad de presentar cápsula en las condiciones adecuadas. En previsión de ello, en nuestro estudio se efectuó la PCR capsular de todas las cepas de *S. aureus* obtenidas, presentarán o no morfología difusa en SSA, considerada como la prueba estándar de detección de cápsula (Yoshida, 1971). De esta forma, se determinó que 3 cepas que presentaron morfología compacta en SSA (siendo *clumping factor* positivas) eran positivas a los genes del serotipo 8, pese a no presentar cápsula detectable en las condiciones del estudio.

En nuestro trabajo hemos utilizado la reacción de PCR para poder detectar genes de los tipos capsulares más habituales, en particular los tipos 5 y 8. En un estudio con 246 cepas clínicas humanas de *S. aureus*, Arbeit *et al.* (1984) determinaron que el 67% de las cepas pertenecían a los grupos capsulares 5 y 8, siendo menos del 1% de los serotipos 1 y 2, mientras que el 26,4% pertenecían al serogrupo 5, y al 8 el 40,7%. Por otra parte, Poutrel *et al.* (1988), determinaron que entre sus cepas de rumiantes, tanto en ovino (75,8%) como en caprino (68,5%) predominaba el serotipo 8, siendo respectivamente un

21,2% y 18,5% de las cepas no tipables, mientras que en bovino el 51,4% de las cepas eran del serotipo 5 y el 30,6% no tipables. Entre nuestras 109 cepas de *S. aureus*, 15 fueron positivas a la PCR, todas pertenecientes al serotipo 8. En la **Tabla D08** se muestran los resultados de PCR, de la detección de *clumping factor* y crecimiento en SSA.

Tabla D08. Resultados relativos a la detección capsular de *S. aureus* (PCR capsular, *clumping factor* y SSA).

Cepa	Especie	SSA	PCR	<i>Clumping factor</i>
89/304.00	<i>S. aureus</i>	C		+
92/002.03	<i>S. aureus</i>	M		+
92/002.05	<i>S. aureus</i>	C		+
92/002.06	<i>S. aureus</i>	C		+
92/002.07	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	+
92/021.04	<i>S. aureus</i>	D		-
92/024.01	<i>S. aureus</i>	C		+
92/024.03	<i>S. aureus</i>	C		+
92/024.04	<i>S. aureus</i>	C		+
92/024.05	<i>S. aureus</i>	C		+
92/039.01	<i>S. aureus</i>	C		+
92/039.02	<i>S. aureus</i>	C	PCR-8	d
92/039.03	<i>S. aureus</i>	C		d
92/040.03	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	+
92/040.05	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	+
92/042.01	<i>S. aureus</i>	C		+
92/051.01	<i>S. aureus</i>	C		+
92/051.02	<i>S. aureus</i>	C		-
92/052.01	<i>S. aureus</i>	C		-
92/052.02	<i>S. aureus</i>	C		+
92/052.04	<i>S. aureus</i>	D		-
92/052.05	<i>S. aureus</i>	C		+
92/052.06	<i>S. aureus</i>	C		+
92/052.08	<i>S. aureus</i>	C	PCR-8	+
92/062.03	<i>S. aureus</i>	M		-
92/063.30	<i>S. aureus</i>	D		-
92/063.31	<i>S. aureus</i>	M		-
92/066.15	<i>S. aureus</i>	C		+
92/080.01	<i>S. aureus</i>	C		+
92/080.09	<i>S. aureus</i>	D		-
92/080.11	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	-
92/080.13	<i>S. aureus</i>	D		-
92/094.05	<i>S. aureus</i>	P		+
92/172.05	<i>S. aureus</i>	D		-
92/172.06	<i>S. aureus</i>	C		+
92/172.10	<i>S. aureus</i>	D		+
92/201.01	<i>S. aureus</i>	D		+
92/201.02	<i>S. aureus</i>	C		+
92/204.06	<i>S. aureus</i>	C		+
92/216.02	<i>S. aureus</i>	C	PCR-8	+
92/218.01	<i>S. aureus</i>	C		+

Tabla D08. Resultados relativos a la detección capsular de *S. aureus* (PCR capsular, *clumping factor* y SSA). (continuación)

Cepa	Especie	SSA	PCR	<i>Clumping factor</i>
93/096.01	<i>S. aureus</i>	P		d
93/129.02	<i>S. aureus</i>	C		+
93/172	<i>S. aureus</i>	C		+
93/220.01	<i>S. aureus</i>	C		+
93/231.c3	<i>S. aureus</i>	C		+
93/234.02	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	-
93/234.08	<i>S. aureus</i>	C		+
93/234.09	<i>S. aureus</i>	C		-
93/234.11	<i>S. aureus</i>	M		+
93/251.02	<i>S. aureus</i>	C		-
93/251.03	<i>S. aureus</i>	C		+
93/251.06	<i>S. aureus</i>	C		+
93/256.01	<i>S. aureus</i>	C		+
93/256.02	<i>S. aureus</i>	C		+
93/256.03	<i>S. aureus</i>	C		+
93/281.20	<i>S. aureus</i>	C		+
93/281.21	<i>S. aureus</i>	C		+
93/283.01	<i>S. aureus</i>	C		+
93/283.02	<i>S. aureus</i>	C		+
93/285bis	<i>S. aureus</i>	M		d
93/389.02	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	-
93/406.01	<i>S. aureus</i>	D		-
93/406.02	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	-
93/406.03	<i>S. aureus</i>	D		-
93/469.02	<i>S. aureus</i>	C		+
93/487.01	<i>S. aureus</i>	C		+
93/494.01	<i>S. aureus</i>	D		+
93/500.00	<i>S. aureus</i>	C		+
93/501.02	<i>S. aureus</i>	C		-
93/504.03	<i>S. aureus</i>	C		d
93/512.01	<i>S. aureus</i>	C		+
94/024.01	<i>S. aureus</i>	M		+
94/032.00	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	+
94/034.02	<i>S. aureus</i>	C		+
94/034.05	<i>S. aureus</i>	C		+
94/092.04	<i>S. aureus</i>	D		-
94/092.05	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	-
94/093.01	<i>S. aureus</i>	D		-
94/093.02	<i>S. aureus</i>	D		-
94/143.00	<i>S. aureus</i>	C		+
94/165.02	<i>S. aureus</i>	P		+
94/175.00	<i>S. aureus</i>	P		-
94/177.00	<i>S. aureus</i>	P	PCR-8	-
94/205.01	<i>S. aureus</i>	P		-
94/205.02	<i>S. aureus</i>	P	PCR-8	-

Tabla D08. Resultados relativos a la detección capsular de *S. aureus* (PCR capsular, *clumping factor* y SSA). (continuación)

Cepa	Especie	SSA	PCR	<i>Clumping factor</i>
94/205.03	<i>S. aureus</i>	P		-
S01	<i>S. aureus</i>	D		+
S02	<i>S. aureus</i>	P		+
S03	<i>S. aureus</i>	C		+
S04	<i>S. aureus</i>	D		+
S06	<i>S. aureus</i>	D		+
S07	<i>S. aureus</i>	D		+
S08	<i>S. aureus</i>	C		+
S09	<i>S. aureus</i>	C		+
S10	<i>S. aureus</i>	C		+
S12	<i>S. aureus</i>	P		+
S13	<i>S. aureus</i>	C		+
S14	<i>S. aureus</i>	C		+
S15	<i>S. aureus</i>	C		+
S16	<i>S. aureus</i>	C		+
S18	<i>S. aureus</i>	C		+
S19	<i>S. aureus</i>	C		+
S20	<i>S. aureus</i>	D	PCR-8	+
S21	<i>S. aureus</i>	C		+
S22	<i>S. aureus</i>	C		-
S23	<i>S. aureus</i>	C		+
S24	<i>S. aureus</i>	C		+
S25	<i>S. aureus</i>	D		+

Leyenda: C=compacta, D=difusa, P=pseudodifusa, d= débil.

Podemos agrupar las cepas según estos tres factores (**Tabla D09**).

Tabla D09. Resultados relativos a la detección capsular de *S. aureus* combinando los resultados posibles de los tres análisis practicados (PCR capsular, *clumping factor* y SSA).

PCR	SSA	<i>clumping factor</i>	Número de cepas (%) ¹	Combinación
Positivo	Difuso	Neg	7 (6,42)	A1
	Difuso	Pos	3 (2,75)	A2
	Compacto	Neg	0	A3
	Compacto	Pos	5 (4,59)	A4
Negativo	Difuso	Neg	16 (14,68)	B1
	Difuso	Pos	17 (15,60)	B2
	Compacto	Neg	6 (5,50)	B3
	Compacto	Pos	55 (50,46)	B4

Leyenda: (1) sobre el total de *S. aureus* (109).

Se distinguen 8 combinaciones según los tres factores que consideramos, aunque en un caso (A3) no encontramos cepas que la presentaran, y existen dos posibilidades

representadas por aquellas cepas no capsuladas, algunas que son también negativas al *clumping factor* (B3) y otras que sí presentan dicho factor (B4). Las combinaciones A representan cepas con genes de los tipos capsulares 1, 5 y 8 detectables mediante la PCR que hemos desarrollado, mientras que las cepas B han resultado negativas a dicha PCR. Las combinaciones restantes existentes se interpretan como sigue:

- A1: cepas que presentan crecimiento difuso en SSA y son negativas al *clumping factor*. Son cepas que presentan cápsula fenotípicamente.
- A2: cepas difusas en SSA y positivas al *clumping factor*. Son cepas que, presentando genes capsulares, o bien no presentan la sustancia activa formadora de colonias compactas (CCFAS), o puede que presenten una cápsula irregular, o bien que dependa su expresión del medio de cultivo, ya que la detección del *clumping factor* y el crecimiento en SSA se realizan sobre crecimientos obtenidos en medios de cultivo diferentes.
- A4: cepas que, pese a presentar genes capsulares, no expresan la cápsula fenotípicamente, debido a condiciones de cultivo o a problemas de expresión del operón.
- B1: cepas que fenotípicamente son capsuladas al crecer de forma difusa en SSA y ser *clumping factor* negativas, aunque no sean positivas a la PCR. Puede tratarse de cepas capsuladas no pertenecientes a ninguno de los serotipos probados por PCR (1, 5 y 8)
- B2: cepas que, o bien no presentan la sustancia activa formadora de colonias compactas (CCFAS), o bien poseen algún tipo de estructura superficial que la cubre, o son cepas capsuladas de otro tipo.

Sólo 7 de las 15 cepas positivas por PCR son negativas al *clumping factor* y presentan morfología difusa en el SSA (A1), es decir que fenotípicamente se pueden clasificar como capsuladas. De las 8 restantes, 3 son compactas en SSA y positivas al *clumping factor* (A2), por tanto, fenotípicamente no son capsuladas, aunque sí presentan genes capsulares. Evidentemente, puede ocurrir que el resto del *operon ica* que poseen esté incompleto o dañado, lo que explicaría que fenotípicamente no presenten cápsula, aunque también podría ocurrir que las condiciones de cultivo no hayan permitido que expresaran la cápsula correspondiente. Sin embargo, existe la posibilidad de que contemos con cepas capsuladas no pertenecientes a los tipos 1, 5 u 8 comprobados mediante PCR, que podrían

encontrarse en el grupo B1, con lo que el total de cepas capsuladas probablemente sea de 26 sin incluir las que, pese a poseer genes de los tipos capsulares estudiados, no se encuentran capsuladas fenotípicamente (grupo A4, 5 cepas).

Aparte de los serotipos capsulares clásicos, en los últimos años se ha descrito la existencia de un “serotipo 336”, al que parecen corresponder muchas cepas capsuladas que no eran serotipables por los métodos estándar (Guidri *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2000). En 1998, Guidry *et al.* determinaron en *S. aureus* de mastitis clínicas de vacas europeas que el 70% pertenecían a los serotipos 5 u 8 a partes iguales y, el resto de los aislados, al “serotipo 336”. Sin embargo, en el estudio de Salasia *et al.* (2004) con *S. aureus* aislados en mastitis subclínicas bovinas, las cepas de Indonesia fueron todas del serotipo 5, mientras que las de Alemania eran todas del serotipo 8. Según otros autores, las cepas de los serotipos 5, 8, o “336” suponen el 98% de las causantes de mamitis bovina en USA o Europa. Además, las bacterinas con esta composición han resultado eficaces frente al desafío con cepas virulentas, de manera que sólo el 6% de los cuarterones de las vacas vacunadas mostraban mastitis clínica, frente al 100% de los cuarterones de las vacas control no vacunadas (Ma *et al.*, 2004).

Pese a todo ello, en estudios posteriores se ha descubierto que el antígeno del “serotipo capsular” 336 es realmente un polímero que contiene *N*-acetilglucosamina y que no sólo está presente en estafilococos no capsulados, sino que también lo aparece en algunas cepas de los serotipos capsulares 5 y 8, como era de esperar dado que su composición corresponde al peptidoglicano. Verdier *et al.* (2007), trabajando con cepas humanas de origen clínico, lograron serotipar con antisueros específicos frente a los tipos 5, 8 y 336 sólo un 87% de los aislados, mientras que mediante la utilización de PCR lograron tipar el 100%. Por otro lado, las cepas “tipables” con el antisuero 336, se adscribieron mediante PCR a los tipos 5 (46%) u 8 (54%), lo que corrobora la teoría de que el “serotipo 336” no se corresponde con un serotipo capsular. En su estudio, Cocchiario *et al.* (2006) abundan en este punto, indicando que las cepas capsuladas que se suelen clasificar como no tipables al no reaccionar frente a antisueros o anticuerpos monoclonales, realmente no expresan cápsula pese a poseer los genes necesarios, debido a mutaciones, por lo que resulta dudosa la existencia de más tipos capsulares aparte del 1, 2, 5 y 8.

En conclusión, del total de 109 *S. aureus* aislados por nosotros, 26 (23,85%) fueron fenotípicamente capsulados, mientras que 5 cepas más presentaron genes capsulares

detectados por PCR aunque no se demostró la presencia de cápsula por métodos fenotípicos. En cuanto al tipo capsular, las 15 cepas positivas a la PCR capsular pertenecieron al serotipo 8.

Finalmente, aparte de la relevancia de la cápsula como factor de virulencia en cepas de origen ovino al dificultar la fagocitosis (Baselga y Amorena, 1994) y oponerse al sistema del complemento, hay que recordar que las cepas capsuladas son capaces de generar, en condiciones adecuadas, una respuesta protectora homóloga eficaz (Yoshida *et al.*, 1987) y que, por otro lado, ciertos polisacáridos capsulares poseen la capacidad de inhibir la formación de biofilmes de otras cepas bacterianas (Valle *et al.*, 2006), lo que puede representar para ellas una ventaja competitiva en su medio ambiente natural.

2.1.2.- *Slime*

El *slime* es una capa de polisacáridos que rodea las bacterias de ciertas cepas de estafilococos y de otras especies bacterianas, que son capaces de producirla bajo ciertas condiciones ambientales. Las bacterias se hallan inmersas en dicha matriz que, aunque no se encuentra fijada firmemente a la superficie celular (Beveridge y Graham, 1991), les proporciona capacidad de adherencia a las superficies inertes (Giridhar *et al.*, 1994; Cifrian *et al.*, 1995) y favorece la formación de un biofilme.

La importancia de la presencia de *slime* no sólo reside en que sea parcialmente responsable de la capacidad de adherencia a superficies inertes (Bayston y Penny, 1972; Christensen *et al.*, 1982; Ziebuhr *et al.*, 1997), sino a que puede interferir en la actividad de los fagocitos (Johnson *et al.*, 1986), o de los antibióticos o de las inmunoglobulinas con actividad anticuerpo, haciendo que las cepas productoras de *slime* sean más resistentes que sus variantes no productoras (Souto *et al.*, 1989; Baselga *et al.*, 1991). En este estudio, no hemos llevado a cabo la valoración de la sensibilidad de los aislados productores de *slime* a antimicrobianos ni de su resistencia a la fagocitosis, pero es una posibilidad a tener en cuenta a la hora de valorar la posible patogenicidad de las cepas aisladas en este estudio.

Este tipo de características han hecho interesante el estudio del *slime* e importante la detección de cepas que lo produzcan, especialmente entre los aislados de mastitis (Oliveira *et al.*, 2006). Para la detección de la formación de dicha capa de polisacáridos se han empleado numerosos métodos, entre los que hemos utilizado los más habituales: el método de Christensen (Christensen *et al.*, 1982; Hébert *et al.*, 1988; Arciola *et al.*, 2001) y

el agar Rojo Congo (Freeman *et al.*, 1989; Woznicova *et al.*, 1993; Vancraeynest *et al.*, 2004).

2.1.2.1.- Método de Christensen

El método de Christensen se basa en la detección visual del cúmulo bacteriano adherido en las paredes del tubo de ensayo, mediante la tinción del mismo.

En nuestro caso, se ha llevado a cabo la incubación de las cepas en estático 48 horas para favorecer dicha observación (Christensen *et al.*, 1982), coincidiendo con lo indicado por estudios posteriores que indican que la máxima adherencia se produce en la fase estacionaria (Pöhlmann-Dietze *et al.*, 2000) que, según aparece en el **Gráfico R04** del capítulo de **Resultados**, se ha alcanzado a las 48 horas y se debe, al menos en *S. aureus*, a la expresión postexponencial de factores de adherencia.

Por otro lado, comparamos tres caldos de cultivo en cuanto a sus cualidades de favorecer la formación de *slime* (TSB, HHW y BHI) y, tras confirmar que las diferencias observadas entre ellos en cuanto al *slime* formado no se debían a que sus cualidades nutritivas favorecieran un crecimiento más abundante, decidimos emplear el caldo BHI en las pruebas restantes, como previamente utilizaron otros autores (Christensen *et al.*, 1982; Bayston y Rodgers, 1990; Arciola *et al.*, 2001), pese a que algunos recomendaran la utilización del medio químicamente definido HHW (Hussain *et al.*, 1991; Hussain *et al.*, 1992), que en nuestras manos proporcionó peores resultados.

Puesto que la detección del cúmulo bacteriano adherido a la pared del tubo se realiza visualmente, se compararon varios de los colorantes empleados en la bibliografía [(Hogt *et al.* (1983): azul alcian; Christensen *et al.* (1985): tripán azul; Hébert (1988): safranina; Freeman *et al.* (1989): tripán azul; Souto *et al.* (1989): azul alcian o safranina; Chilek y Simurda (2003): cristal violeta; Fox *et al.* (2005): cristal violeta], para finalmente elegir el cristal violeta al considerarlo el colorante que permitía una mejor observación del crecimiento adherido.

Se estableció una puntuación en tres localizaciones, de manera que se valoró la densidad de los cúmulos bacterianos en tres lugares del tubo: a la altura de la superficie del caldo de cultivo, a mitad de la pared y en el fondo. Métodos similares de valoración han sido empleados por muchos otros autores (Hébert *et al.*, 1988; Souto *et al.*, 1989). La abundancia del cúmulo que se encontraba en cada localización se puntuó de 0 a 3 y se

obtuvo una cifra final por cepa que osciló entre 0 y 9, considerando como cepas productoras aquéllas que obtuvieron globalmente más de 5 puntos.

Utilizando el método de Christensen, un 36,8% de las cepas de *S. aureus* de nuestro estudio se pueden considerar adherentes, mientras que en el caso de *S. epidermidis* lo sería un 41,1%. Hébert *et al.* (1988), en un estudio con más de mil cepas humanas de origen clínico, describieron como adherentes un 73% de los *S. aureus*, un 83% de los *S. epidermidis*, un 85% de los *S. xylosum*, un 56% de los *S. hominis* y un 42% de los *S. haemolyticus*. Por su parte, Oliveira *et al.*, en su estudio publicado en 2006 con cepas de mastitis subclínicas bovinas, detectaron que un 37,5% de las cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* eran productoras de *slime* mediante su técnica FISH (*fluorescent in situ hybridisation*).

Indudablemente, la formación de *slime* favorece la persistencia de SCN en los hospedadores, como indicaron Davenport *et al.* (1986). En su estudio sobre infecciones hospitalarias, sólo el 32% de las infecciones debidas a SCN *slime* positivos consiguieron ser resueltas únicamente mediante antibioterapia, mientras que el 100% de las producidas por cepas no productoras de *slime* consiguieron mejorar únicamente con antibióticos. Por otro lado, los SCN productores de *slime* se habían asociado previamente con infecciones con sintomatología clínica en los estudios de Christensen *et al.* (1983), que también relacionaron la presencia de *slime* con la resistencia a la gentamicina. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en toda población de SCN coexisten individuos formadores y no formadores de *slime*: según las pruebas de desafío experimental, los formadores de *slime* presentan una mayor capacidad de adherencia, mientras que los no formadores son más virulentos y menos adherentes (Baselga *et al.*, 1993). Sin embargo, aunque en ciertas cepas, si se produce *slime*, la cepa es adherente (Hussain *et al.*, 1992), hay que considerar también que la producción de *slime* no se correlaciona de forma directa con la adherencia (Ikeda *et al.*, 1991; Hussain *et al.*, 1993). En algunos modelos animales se ha demostrado que la formación de *slime* favorece la persistencia de la bacteria en el lugar de infección durante meses, pero esto no supone necesariamente que se produzca un cuadro clínico de importancia, sino que, a veces simplemente se detecta una leve neutropenia (Gallimore *et al.*, 1991).

2.1.2.2.- Agar Rojo Congo

La capacidad de producción de *slime* por parte de los estafilococos es considerada como un factor de virulencia por autores como Johnson *et al.* (1986), que opinan que la interacción del *slime* con los PMN puede ser perjudicial para las defensas del hospedador.

Un método frecuentemente empleado para detectar las cepas de *Staphylococcus* productoras de *slime* es el del cultivo sobre agar Rojo Congo, descrito inicialmente por Freeman *et al.* (1989). Sobre este agar, los autores describen que las cepas adherentes, productoras de *slime*, desarrollan colonias negras de aspecto “cristalino”, mientras que las colonias de cepas no productoras aparecen de color rojo.

Sin embargo, al comenzar a emplear este medio de cultivo con cepas de varias especies de estafilococos, encontramos que la respuesta obtenida no era siempre la esperada puesto que descubrimos más variedad de aspectos coloniales que los descritos, como también indican otros autores (Arciola *et al.*, 2002ab; Cucarella *et al.*, 2004; Vancraeynest *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta las diferencias encontradas, estudiamos la influencia de varios factores en los resultados obtenidos con el agar Rojo Congo, utilizando para ello una serie de cepas modelo de las tres especies aisladas más frecuentemente en este estudio (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. xylosus*, **Apéndice M01**).

2.1.2.2.1.-Influencia del origen de las materias primas

Como punto de partida de las pruebas se procedió a comparar los resultados obtenidos al emplear en la elaboración del medio exactamente las mismas materias primas utilizadas por Freeman *et al.* (1989), o bien las del que veníamos empleando habitualmente en el laboratorio. Como resultado se observó que el medio utilizado habitualmente permitía un desarrollo mejor de las cepas de algunas especies frente al clásico (en especial *S. xylosus*) y que las diferencias entre cepas productoras y no productoras se apreciaban también mejor en dicho medio frente al descrito por Freeman *et al.*, por lo que las diferencias de aspecto colonial podían deberse más a las especies y cepas empleadas, que a la utilización o no de la composición exacta del medio.

2.1.2.2.2.- Influencia de tiempo y temperatura de incubación

Puesto que algunas especies mostraban un crecimiento lento o débil en el medio original de Rojo Congo (en especial, *S. xylosus*), se valoró los resultados obtenidos tras prolongar la incubación hasta las 48 horas, como aconsejan algunos autores (Arciola *et al.*, 2001). Los resultados mostraron que prolongando el periodo de incubación se favorece el

desarrollo de las colonias de las especies de crecimiento lento, así como la diferenciación de variantes, con lo que mejoran las características diferenciales del medio de cultivo.

2.1.2.2.3.-Influencia del modo de esterilización del colorante

Las pruebas realizadas esterilizando el colorante Rojo Congo por métodos diferentes demostraron que las características diferenciales del agar Rojo Congo no se veían influenciadas de forma decisiva por el método de esterilización, así que se continuó esterilizando conjuntamente con el resto de los componentes (Christensen *et al.*, 1982).

2.1.2.2.4.- Influencia del aumento de la concentración de ClNa sobre la morfología colonial en agar Rojo Congo.

Según nuestros resultados, el aumento de concentración de NaCl en el medio de cultivo no favorece el carácter diferencial del mismo, sino todo lo contrario. Aunque fue referente a la estimulación de la formación de cápsula y no de *slime*, Opdebeeck *et al.* (1987) ya observaron que el cloruro sódico tenía un efecto estimulante mínimo.

2.1.2.2.5.- Influencia del contenido en colorante Rojo Congo y de la incubación

La concentración del colorante original no se había definido en la fórmula original y, al existir preparados de riqueza diferente, comprobamos formulaciones con dos concentraciones diferentes. Al aumentarla hasta el 0,12%, se consiguió realzar el efecto diferencial del medio, así que se mantuvo para el resto de las pruebas.

2.1.2.2.6.- Resultados del agar Rojo Congo

La utilización de medios con un alto contenido en NaCl ha sido aconsejada por algunos autores para favorecer la expresión de factores de superficie en *S. aureus* (West y Apicella, 1984) o en *S. epidermidis* (Knobloch *et al.*, 2001). En nuestro estudio, sin embargo, hemos observado que, al menos en el caso del agar Rojo Congo, dicha propiedad no favorecía la característica diferencial del medio, así que empleamos como medio de rutina agar Rojo Congo sin adición de NaCl. Por otra parte, ciertas concentraciones de NaCl podrían impedir el desarrollo de ciertas especies sensibles no *aureus*: en nuestro caso, hemos detectado que ciertas cepas de *S. xylosus* crecían lentamente en este medio. Pese a la alta reproductibilidad del método del agar Rojo Congo, afirmada por Freeman *et al.* en 1989, en nuestro estudio demostramos que la técnica adolece de una serie de debilidades que pueden llevarnos a contar con abundantes falsos negativos como, por ejemplo, al cambiar el origen de las materias primas utilizadas. Esta variabilidad de los

resultados obtenidos con la utilización del agar Rojo Congo ya fue descrita por otros autores, como Yazdani *et al.* en 2006, que ya indicaban que la aparición del color negro aparecía antes en *S. epidermidis* que en *S. aureus*, por lo que en su estudio prolongaron la incubación de las placas sembradas hasta las 72 horas. En otros casos, se ha propuesto escalas de color de hasta 6 tonalidades para intentar utilizar este medio de cultivo (Arciola *et al.*, 2002a).

Considerando como productoras de *slime* sólo a las cepas que presentan el color negro en el agar Rojo Congo (o bien presentando variantes), los datos obtenidos se recogen en la **Tabla D10**:

Tabla D10. Distribución de las cepas productoras de *slime* de este estudio según el método del agar Rojo Congo.

Especie / grupo	Total Cepas	Negras	Con variantes	Total (%) ¹
<i>S. epidermidis</i>	73	1	1	2 (2,74)
<i>S. gallinarum</i>	9	0	0	0 (0,00)
<i>S. haemolyticus</i>	3	0	0	0 (0,00)
<i>S. hyicus</i> subesp <i>chromogenes</i>	5	0	0	0 (0,00)
<i>S. hominis</i>	2	1	0	1 (50,00)
<i>S. simulans</i>	4	1	0	1 (25,00)
<i>S. xylosum</i>	41	7	1	8 (19,51)
No- <i>S. aureus</i>	137	10	2	12 (8,76)
<i>S. aureus</i>	109	20	11	31 (28,44)
Totales	246	30	13	43(17,47)

(¹): porcentaje sobre el número total de cepas de la especie, o del grupo, considerados

Al menos entre los aislados en este estudio, hay más productores de *slime* entre las cepas de *S. aureus* (el 28,44% de las cepas) que entre el resto de las cepas (8,76%). Nuestros resultados indican que el 12,2% de las cepas son formadoras de *slime* según el color negro de las colonias, y un 17,47% si también se consideran positivas las cepas que presentan variantes, aunque otras características de las colonias no coincidan totalmente con la descripción original de Freeman *et al.* (1989).

Por otro lado, es llamativo en nuestro estudio el bajísimo porcentaje de cepas de *S. epidermidis* con colonias negras, que se adapten a la definición “clásica” de cepa productora de *slime* (1,37%) en agar Rojo Congo, frente a una tasa alta de cepas de *S. aureus* (18,35%) o *S. xylosum* (17,07%) que sí lo hacían.

La existencia de cepas que presentan variantes coloniales, es decir, que tienen clones productores y no productores de *slime*, ha sido descrita también por otros autores

(Baddour *et al.* 1990; Baselga *et al.* 1993). Las diferencias entre variantes productoras y no productoras encontradas por Baselga *et al.* (1993) puede coincidir con las indicadas por Watson (1989), que afirmó que más del 80% de los *S. aureus* de mastitis bovinas cultivadas *in vivo* producen exopolisacáridos, pero que esta proporción desciende hasta el 10% tras el subcultivo en medios normales de laboratorio; de hecho, la elevada tasa de paso de variantes productoras a no productoras puede deberse a la existencia de un mecanismo de variación de fase. Estas observaciones sugieren que pequeñas cantidades de bacterias no productoras pueden surgir de una población productora, originando una mayor población no productora que pueda tener una tasa de replicación mayor. Esta ventaja puede explicar por qué las cepas de *S. aureus* de mastitis pierden rápidamente la capa de *slime* por subcultivo en laboratorio y la baja frecuencia de cepas productoras de *slime* en cepas que han sufrido pases en medios artificiales.

En cuanto a la diferenciación entre cepas patógenas y saprofitas, según la capacidad de formación de *slime*, en piodermas de perro por *S. intermedius*, se observó que las cepas "clínicas" se distinguían de las otras al adherirse en mayor proporción a las proteínas de la matriz extracelular y menos al poliestireno. Sin embargo, ni la capacidad formadora de *slime* ni la hidrofobicidad difieren entre ambos grupos (Cree y Noble, 1995). La baja proporción de cepas productoras de *slime* detectadas puede deberse a la adaptación a las condiciones de cultivo en laboratorio, junto con una alta tasa de reversión del fenotipo productor al no productor (De la Cruz *et al.*, 1993). Sin embargo, no hay que olvidar que en SCN las variantes formadoras se consideran de baja patogenicidad y capaces de producir mastitis subclínicas, mientras que las no formadoras serían responsables de los brotes clínicos (Albizu *et al.*, 1993).

En conclusión, la técnica del agar Rojo Congo es de utilidad para el *screening* de la expresión fenotípica de la producción de *slime*, pero siempre que el método esté bien establecido (Arciola *et al.*, 2002ab) y cuente con los controles positivos y negativos adecuados (R. Baselga, comunicación personal).

2.1.3.- Hidrofobicidad

Como hemos indicado previamente, la hidrofobicidad superficial bacteriana influye en la capacidad de adherencia de los estafilococos a las superficies inertes (Jarp, 1990; Baselga *et al.*, 1992), fase preliminar indispensable para la colonización (Galliani *et al.*, 1994; Ljungh y Wadstrom, 1995). La adherencia temprana de *S. epidermidis* a las

superficies de polímeros parece depender fundamentalmente de la hidrofobicidad y es normalmente interferida por las proteínas plasmáticas albúmina, fibrinógeno y fibronectina, en una proporción variable según la cepa; sin embargo, la producción de *slime* es posterior a la adhesión inicial (Galliani *et al.*, 1994). Estas características se han estudiado por su importancia en aislados de origen animal perteneciente a especies como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. xyloso*, *S. haemolyticus* y otros (Jarp, 1989; Mamo *et al.*, 1991b; Baselga *et al.*, 1992), por lo que en este trabajo también se llevó a cabo su determinación.

Para el estudio de la hidrofobicidad se han empleado métodos variados, adhesión microbiana a solventes (MATS) (Rosenber *et al.*, 1980; Beck *et al.*, 1988a; Baleona *et al.*, 2001; Kouidhi *et al.*, 2010), aglutinación de soluciones salinas (Ljungh *et al.*, 1985; Greene *et al.*, 1992), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (Baselga *et al.*, 1992; Molnàr *et al.*, 1994) o adherencia a proteínas de la matriz extracelular (Cree *et al.*, 1994). En nuestro estudio empleamos dos sistemas basados en el empleo de solventes orgánicos (MATS), una de las técnicas más empleadas.

2.1.3.1.- Puesta a punto de la determinación de la hidrofobicidad mediante el uso de *p*- xileno y hexadecano

El subcultivo de los aislados por dos veces en un medio como el agar Columbia sangre puede haber acercado las condiciones de la superficie de las cepas a las que originalmente tuvieron en su medio natural (Ziebuhr *et al.*, 1997). Este tipo de cultivo con sustancias naturales favorece la aparición de estructuras superficiales en otras bacterias aisladas en leche también, como se ha observado en *S. aureus* (Opdebeeck *et al.* 1987, Mamo *et al.*, 1991b) o en *Streptococcus uberis* por Matthews *et al.* en 1994. Sin embargo, otros autores indican que, evidentemente, las cepas capsuladas tienen un marcado carácter hidrofílico mientras que si se pierde la expresión de los polisacáridos capsulares, las proteínas de la pared quedan expuestas y, por tanto, las cepas se tornan más hidrofóbicas (Johne *et al.*, 1989).

La superficie celular de *S. aureus*, como la mayoría de las bacterias, tiene una carga neta moderadamente negativa a pH neutro, que es posiblemente debida al hecho de que los ácidos teicoicos contienen menos radicales de *D*-alanina cargados positivamente que grupos fosfato cargados negativamente. Sin embargo, *S. aureus* puede adherirse a superficies hidrofóbicas o débilmente negativas como el poliestireno o el cristal, respectivamente. La interacción directa de las bacterias con las superficies depende de las

fuerzas de Van der Waals, que son generalmente de atracción, y de las fuerzas interiónicas que pueden ser de atracción o repulsión. Aunque estas fuerzas puedan superar las repulsiones entre bacterias y superficies cargadas similarmente y producir la adhesión, las variaciones de la composición proteica de la superficie bacteriana pueden comprometer o alterar las interacciones con las superficies (Gross *et al.*, 2001).

En este trabajo procedimos finalmente a efectuar un doble pase por agar Columbia sangre, para estabilizar las características superficiales de las cepas aisladas, y partimos de una única suspensión bacteriana para poder comparar las determinaciones con ambos productos.

2.1.3.2.- Resultados del cálculo de la hidrofobicidad

Entre sus cepas aisladas de mastitis bovinas, Mamo *et al.* (1988) detectaron que la mayoría de las cepas de *S. aureus* (63%) eran hidrofóbicas, mientras que en este estudio el porcentaje de cepas hidrofóbicas de dicha especie osciló entre un 33,9 y un 48,6%, en dependencia del método de determinación elegido. Sin embargo, éste resultado coincide con los datos de Jonsson y Wadström (1984), que señalaron a *S. aureus* como la especie más hidrofóbica de entre los estafilococos. De hecho, en nuestro caso, las otras dos especies más frecuentemente aisladas tienen menos cepas hidrofóbicas: *S. epidermidis* (un 27,4 a un 30,1% de las cepas) y *S. xylosus* (entre un 14,6 y un 2,40%).

En cuanto a los SCN, la hidrofobicidad en este estudio osciló entre un 0% y un 55,6% de las cepas, mientras que Mamo *et al.* (1988) la situaron en un 56%. Evidentemente, aunque el porcentaje de mayor positividad se encuentre entre las cepas de *S. gallinarum*, la escasa proporción de esta especie en el total de los aislados convierte en poco significativo este dato.

2.1.4.- Determinación de la presencia de los genes de factores de adherencia

Otros factores de adherencia importantes, aparte de los ya estudiados *slime* e hidrofobicidad, están representados por varias MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). Este tipo de componentes de la superficie, como el *clfA*, la proteína A y la cápsula, comprometen el reconocimiento de las opsoninas de la superficie bacteriana, mientras que varias proteínas secretadas interfieren con las convertasas del complemento C3 y C5 (Foster, 2009), de forma que su detección es importante a la hora de valorar el potencial patógeno de una cepa concreta.

En este trabajo se han estudiado estos factores, determinando la presencia de sus genes mediante PCR, utilizando cebadores descritos en la bibliografía, ya que la sólo detección de dichos genes se considera como un importante indicador de virulencia (Zmantar *et al.*, 2008) y su estudio puede aportar información sobre la distribución de *S. aureus* y ayudar al establecimiento de medidas de control de mastitis (Kalorey *et al.*, 2007).

El par de primers *icaAB* F y R, empleado en nuestro estudio, se había utilizado para detectar los genes *icaAB* del operón *ica* en cepas humanas de *S. epidermidis* procedentes de hemocultivos y mucosas (Ziebuhr *et al.*, 1997), e implantes (Martin López *et al.*, 2004), entre otros. Este locus está asociado a la adhesina PS/A del polisacárido capsular en *S. epidermidis* (McKenney *et al.*, 1998). En nuestro estudio, no hemos encontrado ninguna cepa positiva a *icaAB*, lo que coincide con las pocas cepas de *S. epidermidis* productoras de *slime* halladas según el método del agar Rojo Congo. Ni siquiera la cepa de *S. epidermidis* productora de *slime*, según el método del agar Rojo Congo, es positiva a este gen, aunque se sabe que hay más genes responsables en la adherencia en esta especie aparte del *icaAB* (Mack *et al.*, 1994; Heilmann *et al.*, 1996). Como cepa positiva para la PCR utilizamos la cepa de referencia 4184, productora de *slime*.

En el caso de *S. aureus*, se utilizaron los cebadores *icaA* para detectar la presencia de dicho gen. En nuestra investigación, el 12,8% de las cepas de esta especie son portadoras de este gen, que también se detectó en cepas de *S. epidermidis*, *S. hyicus* subesp. *chromogenes* y *S. xylosus*, lo que representa que se detectó en el 7,72% de cepas del estudio. Entre sus 142 cepas de *S. aureus* aisladas de canales de cerdo (Nitzsche *et al.* 2007), no aparecen cepas portadoras del gen *bap* aunque todas llevaban los genes *ica* (A y D), lo mismo que ocurre entre las cepas aisladas de aves por Nematí *et al.* (2009). Los genes *ica* se han encontrado en un 85% de cepas de *S. epidermidis* procedentes de hemocultivos humanos frente a un 15% en cepas saprofitas (O’Gara y Humphreys, 2001). En otros estudios se correlaciona positivamente la presencia de este gen con la capacidad invasiva de dicha especie, al aparecer más en cepas invasivas que en contaminantes (Barbier *et al.*, 2000) y en infecciones de catéteres (Arciola *et al.*, 2001). Sin embargo, en estudios con cepas mutadas, se ha demostrado que es el gen *sarA* y no el *ica* el que influye decisivamente sobre la formación de biofilm, tanto *in vitro* como *in vivo* (Beenken *et al.*, 2004), de manera que parece que el locus *ica* puede eliminarse sin influir excesivamente en la producción de *slime* (Tu *et al.*, 2007), lo que confirmaría la hipótesis de que la

producción de *slime* está bajo control poligenómico (Fox *et al.*, 2005) y que la relevancia del gen como marcador de patogenicidad no es tanta como se había defendido (Rohde *et al.*, 2004), aunque proporcione resistencia frente a los péptidos antimicrobianos catiónicos (AMP, *neutrophil antimicrobial peptides*) de los neutrófilos (DeLeo *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la fibronectina (proteína plasmática mayoritaria y presente en el tejido conectivo) se une a *S. aureus*. En su estudio, Switalski *et al.* (1983) prueban la capacidad de varias especies de estafilococos de fijarla, clasificando como fuertemente fijadoras las siguientes: *S. aureus*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* y *S. simulans*. Sólo tres especies aparecieron como fijadoras débiles: *S. capitis*, *S. xylosus* y *S. cohnii*. La presencia de la adhesina de unión a la fibronectina (*Fnb*) favorece la unión de los estafilococos a las células epiteliales y su posterior internalización, de manera que las cepas mutantes carentes de dichas proteínas se internalizaban un 60% menos que las cepas parentales salvajes (Brouillette *et al.*, 2003); sin embargo, también se sabe que los anticuerpos frente a esta adhesina favorecen la fagocitosis (Rennermalm *et al.*, 2004). En este estudio, el 56,5% de las cepas son portadoras del gen *fnbA*, mayoritariamente *S. aureus* (70,50%) aunque están representadas también el resto de las especies. El que ninguna cepa de las *fnbA* positivas presente el gen *fnbB* no debería llevarnos a cuestionar que se encuentre afectada su capacidad de unión al fibrinógeno, a la elastina ni como agregador plaquetario (Clarke y Foster, 2006). Dicho gen se considera un importante factor de virulencia en *S. aureus*, junto con los genes *cna* e *ica*, que fueron más frecuentes en aislados invasivos humanos (Peacock *et al.*, 2002). Por otro lado, en un estudio comparativo entre aislados de *S. aureus* de mastitis subclínicas bovinas de Indonesia y Alemania, Salasia *et al.* (2004) encontraron también que los aislados eran todos positivos a *fnbA* y mayoritariamente negativos a *fnbB*, situación que Nemati *et al.* (2009) también hallan entre sus *S. aureus* aislados de aves y Vautor *et al.* (2009) en sus cepas productoras de mastitis clínicas en ovejas. En los últimos años se ha descrito que la expresión del fibrinógeno aumenta durante fases de estrés e infección, de forma que no es extraño que ciertas cepas de bacterias puedan interactuar con él y manipular su biología (Rivera *et al.*, 2007).

Sólo una cepa del total de las estudiadas, de *S. aureus*, fue positiva a *bbp*, gen codificante de la proteína de fijación a la sialoproteína ósea (*Bbp*), mientras que en cepas humanas clínicas o de portadores se alcanza hasta el 22% (Tristan *et al.*, 2003), de manera que los anticuerpos frente a la *Bbp* se consideran indicadores de osteomielitis infecciosa en

humanos (Persson *et al.*, 2009) mientras que, sin embargo, entre 90 aislados de tenosinovitis y artritis aviarias Nemati *et al.* (2009) no encuentran ni una cepa portadora de este gen. Esta diferencia en la tasa de aislamiento puede deberse al distinto origen de especie y tipo de muestra entre dichos estudios. En otras especies, como el conejo, la presencia del gen *bbp* se asocia a cepas de alta virulencia, productoras de estafilococias invasivas (Vancraeynest *et al.*, 2006).

En nuestro estudio, un 10,98% de los aislados son positivos al gen *bap*, aunque ninguna de las cepas positivas perteneció a la especie *S. aureus*, siendo mayoritariamente *S. epidermidis* (55,55% de las cepas *bap* positivas), por delante de *S. xylosus* (33,33%), *S. gallinarum* (7,41%) y *S. hyicus* subesp. *chromogenes* (3,70%). Este gen codifica la proteína asociada al biofilme *Bap*, que en estudios de otros autores estaba presente en un 5% de los *S. aureus* aislados de mastitis bovina, aunque ausente en aislados humanos; además, todos los aislados que lo poseían eran muy adherentes (Cucarella *et al.* 2001). En el caso de *S. aureus* aislados de conejo, Vancraeynest *et al.* (2004) no encontraron ninguna cepa positiva a este factor, aunque sí había algunas *slime* positivas en agar Rojo Congo. Entre sus aislados de aves, Nemati *et al.* (2009) tampoco encontraron ningún positivo a *bap* entre sus 171 cepas. En nuestro caso, de 27 cepas positivas a *bap*, sólo 9 eran fuertes productoras de *slime* según el método de Christensen. Por otro lado, 15 eran *S. epidermidis* aunque sólo 4 eran productoras, mientras que de 9 cepas de *S. xylosus* la tercera parte eran fuertemente productoras de *slime*. Cabe citar que este gen está situado en una isla de patogenicidad, que podría intervenir en una transferencia horizontal entre *S. aureus* y otros miembros del género, como ciertas especies de SCN (Tormo *et al.*, 2005) y que parece existir una variación de fase sobre *Bap* que podría favorecer que las variantes *Bap*-negativas se pudieran liberar del biofilme para colonizar otras localizaciones mientras que las *Bap*-positivas fueran persistentes en su entorno (Tormo *et al.*, 2007).

Se ha postulado que la única adhesina de *S. aureus* responsable de su unión al colágeno está codificada por el gen *cna*, que además no codifica ningún otro factor de virulencia. El único ejemplo en el que no hay correlación con la fijación es el de las cepas fuertemente capsuladas, como las cepas M y Smith, que no se fijan al colágeno al cubrir la cápsula la adhesina (Smeltzer y Gillaspay, 2000). En este estudio, el 11,93% de las cepas de *S. aureus* presentan dicho gen, de las que el 61,53% son difusas en SSA, por lo que podrían estar capsuladas y, por tanto, no tener dichas adhesinas expuestas.

Ciertos factores encontrados en *S. epidermidis*, como *fbe* y *atlE*, se han relacionado directamente con cepas invasivas y virulentas (Klug *et al.*, 2003) en los seres humanos. De hecho, autores como Sivadon *et al.* (2009) proponen la detección del gen *atlE* como marcador de patogenicidad en cepas aisladas de implantes al aislarse significativamente con más frecuencia en éstas que en cepas aisladas de piel, mientras que el gen *ica* no se detecta en un tercio de las cepas patógenas, por lo que opinan que su importancia como marcador de patogenicidad debería replantearse. En nuestro estudio, se detectó el gen *fbe* en un 30,49% del total de cepas, fundamentalmente en *S. epidermidis* (78,08% de los positivos). Por otro lado, el gen *atlE* se detectó en un 33,74% de los aislados, mayoritariamente en *S. epidermidis* (86,30%).

En numerosos estudios, especialmente de Medicina Humana, se ha llevado a cabo la búsqueda de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), debido a la problemática nosocomial con este tipo de estafilococos. En nuestro caso no llevamos acabo esta determinación al considerar que este tipo de cepas son de poca relevancia en el entorno veterinario, como indican varios autores (Van Duijkeren *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2009) al concluir que las cepas MRSA tienen una prevalencia muy baja en aislados procedentes de rumiantes.

2.1.5.- Comparación de los resultados de la determinación de los factores de adherencia estudiados

Gran parte del trabajo desarrollado en este estudio está relacionado la investigación de varios factores de adherencia de las cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche ovina. Se ha investigado la hidrofobicidad superficial mediante MATS empleando xileno o hexadecano, la adherencia a superficies inertes por el método de Christensen, la producción de *slime* en agar Rojo Congo y la presencia de genes de adherencia por PCR. En la **Tabla D11** se muestran estos resultados, cepa a cepa, para analizar las relaciones entre ellos en las páginas siguientes.

Tabla D11. Cepas estudiadas y resultados de las pruebas MATS, Christensen, Rojo Congo y PCR.

REF.	Identificación	MATS		Christensen	Rojo Congo	fbc	atlE	bap	fib	icaAB	fnbB	cna	fnbA	bbp	icaA
		HEX	XIL												
89/304.00	<i>S. aureus</i>	28,7	79,2	4	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/002.03	<i>S. aureus</i>	3,2	62,8	6	V	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/002.05	<i>S. aureus</i>	80,8	88,8	6	G	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/002.06	<i>S. aureus</i>	81,0	84,4	6	G	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/002.07	<i>S. aureus</i>	16,9	63,9	6	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/003.04	<i>S. xylosus</i>	20,8	7,1	1	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/003.05	<i>S. xylosus</i>	4,4	12,3	5	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/020.03	<i>S. epidermidis</i>	72,0	96,8	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/021.04	<i>S. aureus</i>	56,9	69,1	6	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/022.02	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	1,1	4,7	4	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
92/024.01	<i>S. aureus</i>	23,2	45,6	5	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/024.03	<i>S. aureus</i>	16,0	59,4	4	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/024.04	<i>S. aureus</i>	16,4	65,2	4	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/024.05	<i>S. aureus</i>	6,4	47,6	6	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	2,2	7,0	5	V	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
92/032.01	<i>S. xylosus</i>	1,2	25,5	3	R	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
92/032B	<i>S. haemolyticus</i>	-0,1	62,5	1	G	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/039.01	<i>S. aureus</i>	9,9	45,9	2	G	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/039.02	<i>S. aureus</i>	8,7	33,0	0	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/039.03	<i>S. aureus</i>	6,0	34,9	2	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/039.05	<i>S. epidermidis</i>	2,9	-13,6	3	R	1	1	1	1	0	0	d	1	0	0
92/040.03	<i>S. aureus</i>	16,5	1,5	1	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
92/040.05	<i>S. aureus</i>	34,8	50,2	1	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
92/040.07	<i>S. xylosus</i>	0,8	0,8	6	V	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
92/042.01	<i>S. aureus</i>	39,4	40,5	2	G	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/046.03	<i>S. xylosus</i>	1,7	0,1	1	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/047.01	<i>S. xylosus</i>	1,2	-4,5	3	R	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
92/047.02	<i>S. xylosus</i>	1,4	14,6	3	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/047.03	<i>S. xylosus</i>	0,4	-0,4	2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/047.04	<i>S. xylosus</i>	0,5	-1,6	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/047.08	<i>S. epidermidis</i>	2,3	11,9	7	N	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
92/047.11	<i>S. epidermidis</i>	0,7	-0,3	2	R	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
92/047.14	<i>S. xylosus</i>	4,1	18,3	6	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/051.01	<i>S. aureus</i>	4,7	20,1	4	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/051.02	<i>S. aureus</i>	6,7	0,4	6	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/051.03	<i>S. xylosus</i>	13,1	72,9	5	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/052.01	<i>S. aureus</i>	12,7	57,6	7	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/052.02	<i>S. aureus</i>	26,3	60,1	4	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/052.04	<i>S. aureus</i>	5,9	49,2	6	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/052.05	<i>S. aureus</i>	5,1	16,6	3	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/052.06	<i>S. aureus</i>	2,5	36,1	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/052.08	<i>S. aureus</i>	2,5	23,4	7	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

Tabla D11. Cepas estudiadas y resultados de las pruebas MATS, Christensen, Rojo Congo y PCR (continuación).

REF.	Identificación	MATS		Christensen	Rojo Congo	fbc	atlE	bap	fib	icaAB	fnbB	cna	fnbA	bbp	icaA
		HEX	XIL												
92/062.03	<i>S. aureus</i>	5,2	36,7	6	N	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/063.01	<i>S. epidermidis</i>	2,1	28,1	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/063.04	<i>S. epidermidis</i>	-2,3	38,9	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.06	<i>S. epidermidis</i>	7,6	28,2	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.08	<i>S. epidermidis</i>	5,3	2,8	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.10	<i>S. epidermidis</i>	15,1	58,0	4	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.11	<i>S. epidermidis</i>	10,9	11,9	5	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.12	<i>S. epidermidis</i>	5,1	20,1	5	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.13	<i>S. epidermidis</i>	19,8	56,3	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.14	<i>S. epidermidis</i>	12,1	39,0	6	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
92/063.15	<i>S. epidermidis</i>	6,4	24,0	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.16	<i>S. epidermidis</i>	5,9	23,6	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.17	<i>S. epidermidis</i>	3,9	21,4	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/063.19	<i>S. epidermidis</i>	7,0	32,0	7	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
92/063.23	<i>S. epidermidis</i>	11,1	28,5	6	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
92/063.30	<i>S. aureus</i>	41,0	59,8	7	N	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/063.31	<i>S. aureus</i>	43,5	79,8	5	N	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	-0,8	3,4	9	R	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
92/066.02	<i>S. epidermidis</i>	-0,2	17,0	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.03	<i>S. epidermidis</i>	6,0	22,0	4	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.04	<i>S. epidermidis</i>	17,1	47,9	8	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.05	<i>S. hyicus</i> <i>subesp. chromogenes</i>	7,7	40,1	2	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/066.07	<i>S. epidermidis</i>	20,6	55,1	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.08	<i>S. epidermidis</i>	2,1	32,8	5	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.12	<i>S. epidermidis</i>	0,1	8,4	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.13	<i>S. epidermidis</i>	49,3	68,1	6	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.14	<i>S. epidermidis</i>	38,0	62,7	5	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/066.15	<i>S. aureus</i>	16,3	48,5	5	N	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
92/066.16	<i>S. epidermidis</i>	8,0	34,6	3	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.01	<i>S. aureus</i>	12,4	51,9	9	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/080.02	<i>S. epidermidis</i>	-0,5	15,8	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.03	<i>S. hyicus</i> <i>subesp. chromogenes</i>	8,6	48,9	1	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.05	<i>S. epidermidis</i>	7,4	37,8	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.06	<i>S. epidermidis</i>	28,8	78,2	4	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.07	<i>S. epidermidis</i>	27,2	52,9	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.08	<i>S. epidermidis</i>	41,7	58,0	5	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.09	<i>S. aureus</i>	6,4	44,1	2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.10	<i>S. epidermidis</i>	25,6	58,8	3	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/080.11	<i>S. aureus</i>	35,3	67,8	8	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
92/080.13	<i>S. aureus</i>	11,1	27,5	5	N	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
92/080.14	<i>S. epidermidis</i>	12,9	51,2	5	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla D11. Cepas estudiadas y resultados de las pruebas MATS, Christensen, Rojo Congo y PCR (continuación).

REF.	Identificación	MATS		Christensen	Rojo Congo	fbc	atlE	bap	fib	icaAB	fnbB	cna	fnbA	bbp	icaA
		HEX	XIL												
92/094.05	<i>S. aureus</i>	33,9	79,8	2	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
92/094.06	<i>S. xyloso</i>	13,4	76,8	9	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/101.05	<i>S. epidermidis</i>	6,8	17,0	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/101.08	<i>S. simulans</i>	1,7	1,8	0	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/140.02	<i>S. epidermidis</i>	-2,0	1,2	4	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/140.09	<i>S. epidermidis</i>	-1,2	1,3	5	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/140.12	<i>S. gallinarum</i>	-0,7	-4,1	6	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/140.15	<i>S. hominis</i>	0,8	-12,0	5	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/172.05	<i>S. aureus</i>	3,1	0,9	4	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/172.06	<i>S. aureus</i>	26,2	63,1	0	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/172.10	<i>S. aureus</i>	22,2	50,9	7	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/201.01	<i>S. aureus</i>	20,4	50,5	4	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/201.02	<i>S. aureus</i>	39,5	77,0	7	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
92/201.05	<i>S. xyloso</i>	0,9	21,4	3	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/201.06	<i>S. xyloso</i>	6,2	0,5	6	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/201.07	<i>S. xyloso</i>	6,1	1,9	4	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/201.08	<i>S. epidermidis</i>	10,6	58,2	5	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/201.09	<i>S. xyloso</i>	1,3	2,2	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/204.06	<i>S. aureus</i>	4,4	40,9	6	M	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
92/213.02	<i>S. epidermidis</i>	24,4	76,7	1	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/213.06	<i>S. epidermidis</i>	2,7	36,4	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/213.07	<i>S. epidermidis</i>	3,4	37,5	4	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/216.02	<i>S. aureus</i>	2,1	37,2	0	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
92/218.01	<i>S. aureus</i>	3,3	55,9	7	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92/225.03	<i>S. epidermidis</i>	13,3	-57,2	4	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
92/225.06	<i>S. epidermidis</i>	28,0	55,6	0	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
92/225.11	<i>S. epidermidis</i>	41,5	86,3	0	G	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
92/225.15	<i>S. epidermidis</i>	16,3	46,8	0	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/096.01	<i>S. aureus</i>	3,4	47,0	1	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/098.03	<i>S. epidermidis</i>	4,4	29,9	4	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/120.02	<i>S. xyloso</i>	2,4	44,1	0	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
93/129.02	<i>S. aureus</i>	39,3	53,6	0	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
93/160.05	<i>S. xyloso</i>	17,0	62,5	6	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/172	<i>S. aureus</i>	19,1	56,2	5	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
93/215.06	<i>S. simulans</i>	-0,5	-6,7	4	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/220.01	<i>S. aureus</i>	18,8	52,9	2	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
93/230.02	<i>S. xyloso</i>	2,1	27,1	2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/231.c1	<i>S. xyloso</i>	-1,4	-10,3	8	G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/231.c2	<i>S. xyloso</i>	0,3	0,9	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/231.c3	<i>S. aureus</i>	14,3	-5,1	5	N	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
93/234.01	<i>S. xyloso</i>	5,1	8,8	4	N	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
93/234.02	<i>S. aureus</i>	27,0	-18,5	4	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla D11. Cepas estudiadas y resultados de las pruebas MATS, Christensen, Rojo Congo y PCR (continuación).

REF.	Identificación	MATS		Christensen	Rojo Congo	fbc	atlE	bap	fib	lcaAB	fnbB	cna	fnbA	bbp	icaA	
		HEX	XIL													
93/234.03	<i>S. xylosus</i>	1,4	-4,9	0	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/234.04	<i>S. epidermidis</i>	30,8	30,8	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/234.05	<i>S. epidermidis</i>	17,8	30,2	0	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/234.08	<i>S. aureus</i>	0,9	8,8	1	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/234.09	<i>S. aureus</i>	7,5	0,1	1	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/234.11	<i>S. aureus</i>	38,1	15,4	8	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93/234.14	<i>S. epidermidis</i>	13,5	-19,2	2	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/240.01	<i>S.simulans</i>	0,4	-23,0	5	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/240.02	<i>S. epidermidis</i>	1,9	15,4	4	G	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/240.03	<i>S. epidermidis</i>	33,8	26,1	5	G	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
93/240.04	<i>S. epidermidis</i>	40,5	-27,1	5	R	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
93/240.05	<i>S. epidermidis</i>	39,7	29,2	5	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/240.06	<i>S. hycus</i> subesp.chromogenes	43,2	-10,9	6	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/240.07	<i>S. epidermidis</i>	15,0	-2,3	7	R	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
93/241.01	<i>S. epidermidis</i>	42,8	-9,1	0	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93/251.02	<i>S. aureus</i>	48,1	27,7	7	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/251.03	<i>S. aureus</i>	7,7	0,0	7	N	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/251.06	<i>S. aureus</i>	6,7	16,3	6	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93/256.01	<i>S. aureus</i>	6,4	5,1	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/256.02	<i>S. aureus</i>	8,1	5,8	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/256.03	<i>S. aureus</i>	3,9	16,5	4	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/257.02	<i>S.gallinarum</i>	1,2	-0,4	0	G	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
93/257.05	<i>S.gallinarum</i>	9,0	1,4	2	G	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
93/273.03	<i>S. xylosus</i>	4,2	12,3	3	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/273.04	<i>S. epidermidis</i>	6,0	3,6	7	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/273.05	<i>S. epidermidis</i>	10,1	-4,8	6	R	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/273.06	<i>S. epidermidis</i>	49,5	-4,7	6	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/281.00	<i>S. xylosus</i>	-1,1	2,2	2	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93/281.01	<i>S. epidermidis</i>	-0,5	9,3	4	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/281.02	<i>S. epidermidis</i>	32,4	23,1	3	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/281.03	<i>S. epidermidis</i>	67,7	31,9	7	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/281.04	<i>S. epidermidis</i>	37,0	21,5	3	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/281.12	<i>S. xylosus</i>	13,3	13,0	5	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93/281.13	<i>S.simulans</i>	2,1	-12,9	1	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93/281.18	<i>S. hycus</i> subesp.chromogenes	1,0	6,3	3	R	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
93/281.19	<i>S. epidermidis</i>	19,5	-15,4	3	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
93/281.20	<i>S. aureus</i>	11,5	3,7	1	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/281.21	<i>S. aureus</i>	13,3	-11,8	3	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
93/283.01	<i>S. aureus</i>	16,6	19,6	4	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93/283.02	<i>S. aureus</i>	4,9	23,1	5	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Tabla D11. Cepas estudiadas y resultados de las pruebas MATS, Christensen, Rojo Congo y PCR (continuación).

REF.	Identificación	MATS		Christensen	Rojo Congo	fbe	atlE	bap	fib	icaAB	fnbB	cna	fnbA	bbp	icaA
		HEX	XIL												
93/285.02	<i>S. epidermidis</i>	13,6	4,5	4	R	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
93/285.05	<i>S. epidermidis</i>	2,1	21,4	5	M	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
93/285.06	<i>S. gallinarum</i>	-1,8	4,4	4	R	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
93/285bis	<i>S. aureus</i>	26,8	11,7	7	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/291.05	<i>S. xyloso</i>	1,2	-9,1	4	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/303.03	<i>S. xyloso</i>	16,8	7,6	9	R	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
93/323.01	<i>S. xyloso</i>	2,2	-1,3	3	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/323.04	<i>S. xyloso</i>	0,2	6,8	3	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/328.11	<i>S. epidermidis</i>	22,8	12,5	4	R	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
93/328.13	<i>S. haemolyticus</i>	19,8	15,0	7	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/328.14	<i>S. epidermidis</i>	4,2	-2,6	5	R	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/354.03	<i>S. epidermidis</i>	3,7	0,0	2	R	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
93/354.06	<i>S. haemolyticus</i>	22,6	24,9	3	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/389.02	<i>S. aureus</i>	1,2	12,9	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
93/406.01	<i>S. aureus</i>	2,5	11,4	3	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
93/406.02	<i>S. aureus</i>	4,0	10,9	3	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
93/406.03	<i>S. aureus</i>	6,5	14,8	3	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
93/469.02	<i>S. aureus</i>	20,2	5,7	6	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/487.01	<i>S. aureus</i>	8,4	13,1	6	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/494.01	<i>S. aureus</i>	2,7	5,2	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
93/494.03	<i>S. xyloso</i>	2,1	1,1	5	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/500.00	<i>S. aureus</i>	19,1	8,5	6	N	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
93/501.02	<i>S. aureus</i>	19,2	18,9	7	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
93/504.03	<i>S. aureus</i>	4,8	14,2	6	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
93/506.04	<i>S. epidermidis</i>	27,9	7,7	6	R	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
93/508.00	<i>S. xyloso</i>	0,0	5,9	1	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93/510.03	<i>S. xyloso</i>	5,0	9,7	2	R	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
93/510.04	<i>S. xyloso</i>	0,4	10,2	2	R	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
93/512.01	<i>S. aureus</i>	5,7	6,3	6	G	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
93/520.01	<i>S. xyloso</i>	5,1	15,1	2	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94/023.02	<i>S. epidermidis</i>	3,3	10,4	5	R	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
94/023.03	<i>S. xyloso</i>	17,2	15,5	9	M	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
94/024.01	<i>S. aureus</i>	6,9	13,7	6	M	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
94/024.04	<i>S. xyloso</i>	2,3	-0,9	1	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
94/025.01	<i>S. xyloso</i>	2,8	9,9	4	N	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
94/025.02	<i>S. xyloso</i>	8,2	2,9	8	N	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
94/025.04	<i>S. epidermidis</i>	16,4	16,2	6	R	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
94/032.00	<i>S. aureus</i>	4,3	6,5	6	R	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
94/034.02	<i>S. aureus</i>	7,1	6,8	6	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
94/034.05	<i>S. aureus</i>	5,9	4,5	6	N	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
94/092.04	<i>S. aureus</i>	4,0	5,3	3	R	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
94/092.05	<i>S. aureus</i>	2,8	4,9	3	R	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1

Tabla D11. Cepas estudiadas y resultados de las pruebas MATS, Christensen, Rojo Congo y PCR (continuación).

REF.	Identificación	MATS		Christensen	Rojo Congo	fbe	atlE	bap	fib	icaAB	fnbB	cna	fnbA	bbp	icaA
		HEX	XIL												
94/093.01	<i>S. aureus</i>	4,4	8,7	4	N	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
94/093.02	<i>S. aureus</i>	8,4	6,8	3	N	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1
94/108.06	<i>S. xyloso</i>	0,8	42,9	6	R	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
94/114.01	<i>S.gallinarum</i>	57,0	94,7	6	M	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
94/114.02	<i>S.gallinarum</i>	84,7	96,2	9	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
94/114.04	<i>S.gallinarum</i>	58,1	95,3	6	M	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
94/143.00	<i>S. aureus</i>	52,4	69,7	0	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
94/165.01	<i>S. xyloso</i>	4,3	48,3	7	R	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
94/165.02	<i>S. aureus</i>	13,2	37,3	4	R	d	0	0	1	0	0	0	1	0	1
94/166.02	<i>S. hominis</i>	1,7	-0,4	3	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
94/174.01	<i>S.gallinarum</i>	15,8	67,2	6	R	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
94/174.02	<i>S.gallinarum</i>	14,5	69,9	7	R	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
94/175.00	<i>S. aureus</i>	8,1	17,3	4	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
94/177.00	<i>S. aureus</i>	28,0	43,3	5	G	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
94/205.01	<i>S. aureus</i>	12,7	75,0	5	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
94/205.02	<i>S. aureus</i>	21,8	75,4	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
94/205.03	<i>S. aureus</i>	15,4	52,0	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S01	<i>S. aureus</i>	7,2	22,1	0	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S02	<i>S. aureus</i>	9,5	74,3	0	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S03	<i>S. aureus</i>	43,2	49,3	0	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S04	<i>S. aureus</i>	19,9	57,8	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S06	<i>S. aureus</i>	13,8	53,1	0	V	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S07	<i>S. aureus</i>	77,2	92,0	0	G	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S08	<i>S. aureus</i>	55,4	85,1	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S09	<i>S. aureus</i>	54,7	79,1	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
S10	<i>S. aureus</i>	41,1	80,7	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S12	<i>S. aureus</i>	40,1	83,0	1	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S13	<i>S. aureus</i>	20,3	78,5	1	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S14	<i>S. aureus</i>	71,9	89,6	1	N	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S15	<i>S. aureus</i>	8,6	56,7	1	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S16	<i>S. aureus</i>	73,1	91,0	0	R	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S18	<i>S. aureus</i>	40,0	78,0	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
S19	<i>S. aureus</i>	43,8	5,4	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S20	<i>S. aureus</i>	17,0	36,0	1	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S21	<i>S. aureus</i>	34,3	56,6	0	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
S22	<i>S. aureus</i>	20,1	45,1	2	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
S23	<i>S. aureus</i>	-0,5	40,2	0	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
S24	<i>S. aureus</i>	7,0	36,4	0	V	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
S25	<i>S. aureus</i>	10,9	50,0	0	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Leyenda: MATS: adhesión microbiana a solventes (sombreado = fuertemente adherente, negrita = moderadamente adherente); Hex: hexadecano; Xil: xileno; ADH: adherencia; Chri: método de Christensen; RC: agar Rojo Congo (color de la colonia: Rojo, Negro, Gris, Marrón, presencia de Variantes); Proteínas codificadas por los genes detectados por PCR: bap (asociada al biofilm); bbp (unión a la sialoproteína del hueso); cna (unión al colágeno); fib (unión al fibrinógeno); fnbA y fnbB (unión a la fibronectina); icaA e icaAB (adhesinas intercelulares); atlE (unión a la vitronectina); fbe (unión al fibrinógeno). En cada columna se resaltan los resultados positivos en el color del título de columna.

En su amplio estudio con cepas clínicas humanas, Hébert *et al.* (1988) establecen, mediante la técnica de Christensen, una adherencia a superficies inertes de sus cepas de un 82,7% para *S. epidermidis*; un 56,3%, para *S. hominis*; un 84.6%, para *S. xylosum*; un 70,8 %, para *S. simulans* y un 73,4%, para *S. aureus*; en dicho trabajo, el 69% de los aislados eran adherentes, aunque sólo el 18% eran fuertemente positivos, frente a nuestro 36,6% de cepas adherentes si consideramos como tales aquéllas de puntuación alta en la prueba de Christensen (puntuando más de 5), de forma que la distribución de cepas adherentes por especie es como figura en la **Tabla D12**.

Tabla D12. Resumen por especie de las cepas adherentes halladas en este estudio según el método de Christensen.

	N	Adherentes (% de la especie)	% Adherentes sobre el total de adherentes	% Adherentes sobre el total de cepas
<i>S. aureus</i>	109	40 (36,7)	44,4	16,3
<i>S. epidermidis</i>	73	30 (41,1)	33,3	12,2
<i>S. xylosum</i>	41	12 (29,3)	13,3	4,9
<i>S. gallinarum</i>	9	6 (66,7)	6,7	2,4
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	5	1 (20,0)	1,1	0,4
<i>S. haemolyticus</i>	3	1 (33,3)	1,1	0,4
<i>S. simulans</i>	4	0	0,0	0,0
<i>S. hominis</i>	2	0	0,0	0,0
Totales	246	90	100,0	36,6

Comparando su investigación y nuestros resultados, las diferencias existentes entre los datos de Hébert *et al.* (1988) y los nuestros pueden deberse a factores como el origen de las cepas (de origen humano en su caso) y, en particular, al sistema de valoración de la adherencia. En el método de Christensen, la valoración del cúmulo bacteriano en las paredes de los tubos se realiza partiendo de unas categorías establecidas de manera arbitraria (adherencia débil, moderada y fuerte en su caso; puntuación de 0 a 3 en el nuestro) y la asignación del cúmulo observado en una cepa a un grupo u otro es subjetiva, por lo que la comparación de resultados es imprecisa. Sin embargo, si comparamos qué especie resulta más adherente en cada uno de ambos estudios, podemos comparar los resultados entre especies, de forma que tanto en su trabajo como en el nuestro se observa que *S. epidermidis* es la especie más adherente, seguida por *S. aureus*.

Uno de los aspectos que se descubren al consultar la bibliografía de la investigación realizada sobre la adherencia de los estafilococos, es la confusión o imprecisión existente debida a que, en muchos casos, se equipara los resultados de adherencia obtenidos con el método de Christensen con los del agar Rojo Congo, de forma que se considera la adherencia y la producción de *slime* como sinónimos cuando, evidentemente, no lo son. La primera cualidad es valorada mediante el método de Christensen, y la segunda se valora mediante el método del agar Rojo Congo, aunque influye en la anterior. Sin embargo, puesto que ambas características están relacionadas, se han realizado comparaciones entre ambos métodos. Sobre la concordancia entre los resultados del método de Christensen y el agar Rojo Congo, Baselga *et al.* (1992) encuentran, entre 125 cepas de mastitis ovina y bovina sólo 15 (12%) positivas según ambos métodos. Woznicova *et al.* (1993), estudiando aislados clínicos de hemocultivos humanos de SCN, encontraron que el 13% de las cepas eran adherentes por los dos métodos, de forma que determinaron que la sensibilidad y especificidad del agar Rojo Congo frente al método de Christensen se situaba en un 85% y un 99%, respectivamente. En nuestro caso, las coincidencias entre las 43 cepas que consideramos como productoras de *slime*, según el método del agar Rojo Congo (**Tabla D09**), y sus respectivas puntuaciones en el método de Christensen (que valora, de forma general, la adherencia a superficies inertes), se recogen en la **Tabla D13**.

Tabla D13. Cepas productoras de *slime* en agar Rojo Congo y datos según el método de Christensen.

Cepa	Identificación	Christensen	Rojo Congo	
92/002.03	<i>S. aureus</i>	6	V	
92/002.07	<i>S. aureus</i>	6	N	
92/062.03	<i>S. aureus</i>	6	N	
92/063.30	<i>S. aureus</i>	7	N	
92/063.31	<i>S. aureus</i>	5	N	
92/066.15	<i>S. aureus</i>	5	N	
92/080.13	<i>S. aureus</i>	5	N	
92/201.01	<i>S. aureus</i>	4	N	
92/218.01	<i>S. aureus</i>	7	N	
93/231.c3	<i>S. aureus</i>	5	N	
93/251.02	<i>S. aureus</i>	8	N	
93/251.03	<i>S. aureus</i>	7	N	
93/251.06	<i>S. aureus</i>	6	N	
93/283.01	<i>S. aureus</i>	4	N	
93/283.02	<i>S. aureus</i>	5	N	
93/285bis	<i>S. aureus</i>	7	N	
93/500.00	<i>S. aureus</i>	6	N	
94/034.05	<i>S. aureus</i>	6	N	
94/093.01	<i>S. aureus</i>	4	N	
94/093.02	<i>S. aureus</i>	3	N	
S04	<i>S. aureus</i>	0	V	
S06	<i>S. aureus</i>	0	V	
S08	<i>S. aureus</i>	0	V	

Tabla D13. Cepas productoras de *slime* en agar Rojo Congo y datos según el método de Christensen (continuación).

Cepa	Identificación	Christensen	Rojo Congo	
S09	<i>S. aureus</i>	0	V	
S10	<i>S. aureus</i>	0	V	
S12	<i>S. aureus</i>	1	V	
S13	<i>S. aureus</i>	1	V	
S14	<i>S. aureus</i>	1	N	
S18	<i>S. aureus</i>	0	V	
S19	<i>S. aureus</i>	0	V	
S24	<i>S. aureus</i>	0	V	
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	4	V	
92/047.08	<i>S. epidermidis</i>	7	N	
94/166.02	<i>S. hominis</i>	3	N	
93/240.01	<i>S. simulans</i>	5	N	
92/051.03	<i>S. xylosus</i>	5	N	
92/040.07	<i>S. xylosus</i>	6	V	
93/291.05	<i>S. xylosus</i>	4	N	
93/234.01	<i>S. xylosus</i>	4	N	
93/323.01	<i>S. xylosus</i>	3	N	
93/323.04	<i>S. xylosus</i>	3	N	
94/025.01	<i>S. xylosus</i>	4	N	
94/025.02	<i>S. xylosus</i>	8	N	
	Más de 5 puntos:	14	30	Negras
			13	Variantes
			43	Total
Coincidencias (%):	Total de cepas	N + >5	12	12/30 (40,00)
		V + >5	2	2/13 (15,38)
	<i>S. aureus</i>	N + >5	10	10/12 (83,33)
		V + >5	1	1/2 (50,00)
	<i>S. epidermidis</i>	N + >5	1	1/12 (8,33)
		V + >5	0	0,00
<i>S. xylosus</i>	N + >5	1	1/12 (8,33)	
	V + >5	1	1/2 (50,00)	

Notas: **N;** colonia negra en agar Rojo Congo; **V;** presencia de variantes en agar Rojo Congo. **N+>5;** cepas negras y positivas en Christensen; **V+>5:** cepas con variantes y positivas en Christensen. **Sombreado;** coincidencias.

Según el método de Christensen, únicamente consideramos adherentes 12 de las cepas *slime* positivas según el método del agar Rojo Congo, lo que supone una coincidencia del 40% entre ambos métodos, mientras que entre las cepas con variantes ésta coincidencia desciende al 15,38%, que es similar a los datos de otros autores, como los de Baselga *et al.* (1992). Si valoramos en qué especies se encuentran mayores coincidencias, es en *S. aureus* en la que se concentra el 83,33%, mientras que *S. epidermidis* y *S. xylosus* sólo coinciden en un 8,33% de los casos.

En la **Tabla D14** se recogen los resultados obtenidos sobre agar Rojo Congo de las 90 cepas adherentes según el método de Christensen.

Tabla D14. Cepas adherentes según Christensen, indicando el color de sus colonias en agar Rojo Congo.

	<i>Especie (%sobre las adherentes)</i>					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	<i>S. xylosus</i>
Negras	10 (25,00)	1 (3,33)	0	0	0	1 (8,33)
Variantes	1 (2,50)	0	0	0	0	1 (8,33)
Mixtas	3 (7,50)	0	2 (33,33)	0	0	1 (8,33)
Grises	3 (7,50)	0	0	0	0	1 (8,33)
Rojas	23 (57,50)	29 (96,67)	4 (66,67)	1(100,00)	1	8 (66,67)
Total	40	30	6	1	1	12

Se observa un considerable porcentaje de las cepas adherentes según la prueba de Christensen y, sin embargo, no presentan el color negro de las productoras de *slime* según el agar Rojo Congo: si sólo consideramos colonias rojas (clásicamente consideradas no productoras de *slime*) la proporción oscila desde el 57,50% en *S. aureus* hasta el 96,67% de las cepas de *S. epidermidis* o incluso el 100% entre *S. haemolyticus*.

En la **Tabla D15** se compara el número de cepas de cada especie que son adherentes según Christensen, productoras de *slime* según el agar Rojo Congo, se calcula sus porcentajes con respecto al número total de cepas de cada especie y también el porcentaje de coincidencias entre ambas técnicas. Se detecta un número de cepas adherentes (90) mucho más alto que de cepas productoras de *slime* según el método del agar Rojo Congo (30), ya que una cantidad abundante de cepas adherentes, incluso con puntuaciones altas, presentan colonias rojas en agar Rojo Congo, por lo que no son productoras de *slime* (**Tabla R24** de Resultados).

Tabla D15. Cepas adherentes según Christensen, productoras de *slime* en agar Rojo Congo y coincidencias entre ambos métodos.

	N	Christensen		Rojo Congo		Coincidencia	
		>5	% ¹	n	% ¹	n y >5	% ²
<i>S. aureus</i>	109	40	36,70%	20	18,35%	10	25,00%
<i>S. epidermidis</i>	73	30	41,10%	1	1,37%	1	3,33%
<i>S. gallinarum</i>	9	6	66,67%	0	0,00%	0	0,00%
<i>S. haemolyticus</i>	3	1	33,33%	0	0,00%	0	0,00%
<i>S. hyicus</i>	5	1	20,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>S. hominis</i>	2	0	0,00%	1	50,00%	0	0,00%
<i>S. simulans</i>	4	0	0,00%	1	25,00%	0	0,00%
<i>S. xylosus</i>	41	12	29,27%	7	17,07%	1	8,33%
Total	246	90		30		12	

Notas: (1) % sobre el total de cepas de la especie; (2) % entre colonias negras y adherentes

Por otro lado, las cepas que presentan colonias de color negro no son adherentes según la técnica de Christensen (**Tabla D12**), por lo que nuestros datos indican que hay poca relación entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos. El máximo de coincidencias se obtiene en *S. aureus*, un 25,00%, mientras que entre las cepas de *S. epidermidis*, pese a que porcentualmente es de las especies que más cepas adherentes presenta (41,10% frente al 36,70% de *S. aureus*), sólo presenta una cepa positiva al agar Rojo Congo. Es llamativo el hecho de que entre las cepas de *S. xylosum* se encuentra un elevado número de cepas adherentes (29,27%), bastantes cepas *slime* positivas (el 17,07%) pero, de nuevo, un escaso porcentaje de coincidencias (8,33%). En conclusión, no encontramos coincidencia entre ambos métodos, como indican otros autores en cepas aisladas de mastitis bovinas (Vasudevan *et al.*, 2003).

En lo referente a la concordancia entre la adherencia e hidrofobicidad, Molnàr *et al.* (1994), estudiando aislados clínicos de SCN, no encuentran relación entre ambas características. En nuestro caso, si observamos tan sólo el resumen de los resultados de hidrofobicidad por los métodos de adhesión microbiana a solventes (MATS) obtenidos (**Tabla D15**), se puede concluir que prácticamente tampoco existe concordancia con la determinación de la producción de *slime* según el método del agar Rojo Congo: 43 cepas positivas en el mejor caso, un 17,47% del total.

Tabla D16. Resumen de los resultados de hidrofobicidad mediante MATS

Especie	MATS					
	Xileno			Hexadecano		
	hidrófobas	intermedias	total	hidrófobas	intermedias	Total
<i>S. aureus</i>	19	34	53	9	28	37
<i>S. epidermidis</i>	4	16	20	2	20	22
<i>S. xylosum</i>	2	4	6	0	1	1
<i>S. haemolyticus</i>	0	1	1	0	1	1
<i>S. hominis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	0	2	2	0	2	2
<i>S. simulans</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. gallinarum</i>	3	2	5	3	0	3
Totales	28	69	97	14	52	66
%	11,38	28,05	39,43	5,69	21,14	26,83

MATS: adhesión microbiana a solventes.

Si estudiamos ahora también la capacidad de adherencia a superficies inertes determinada según el método de Christensen, tenemos 90 adherentes, lo que supone un 36,6% de los aislados, como aparecía en la **Tabla D11**, en la que se mostraban los resultados de MATS (hexadecano y xileno), adherencia (Christensen), producción de *slime* (agar Rojo Congo) y los factores de adherencia determinados mediante PCR. Si observamos los resultados de las 246 cepas, sólo 20 (8,13 %) de ellas son negativas a todos los factores estudiados.

Si observamos las cepas que han resultado positivas a los factores *ica*, que se han relacionado con la producción de *slime* (Ziebuhr *et al.*, 1997; McKenney *et al.*, 1998), aparecen las siguientes (**Tabla D17**):

Tabla D17. Cepas positivas a genes *ica*.

REF.	Identificación	MATS		Christensen	Rojo congo	fbc	atlE	bap	fib	icaAB	fmbB	cna	fmbA	bbp	icaA
		HEX	XIL												
92/025.03	<i>S. epidermidis</i>	2,2	7,0	5	V	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
92/032.01	<i>S. xyloso</i>	1,2	25,5	3	R	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
92/040.03	<i>S. aureus</i>	16,5	1,5	1	R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
92/040.05	<i>S. aureus</i>	34,8	50,2	1	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
92/047.01	<i>S. xyloso</i>	1,2	-4,5	3	R	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
93/494.01	<i>S. aureus</i>	2,7	5,2	6	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
93/500.00	<i>S. aureus</i>	19,1	8,5	6	N	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
93/512.01	<i>S. aureus</i>	5,7	6,3	6	G	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
94/092.04	<i>S. aureus</i>	4,0	5,3	3	R	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
94/092.05	<i>S. aureus</i>	2,8	4,9	3	R	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
94/093.01	<i>S. aureus</i>	4,4	8,7	4	N	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
94/093.02	<i>S. aureus</i>	8,4	6,8	3	N	1	1	0	1	0	0	0	1	d	1
92/094.05	<i>S. aureus</i>	33,9	79,8	2	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
94/143.00	<i>S. aureus</i>	52,4	69,7	0	R	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
94/165.02	<i>S. aureus</i>	13,2	37,3	4	R	D	0	0	1	0	0	0	1	0	1
S09	<i>S. aureus</i>	54,7	79,1	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
S18	<i>S. aureus</i>	40,0	78,0	0	V	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
S24	<i>S. aureus</i>	7,0	36,4	0	V	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
92/022.02	<i>S. hyicus sub.chr</i>	1,1	4,7	4	R	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
94/025.02	<i>S. xyloso</i>	8,2	2,9	8	N	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1

Leyenda: MATS: adhesión microbiana a solventes (sombreado = fuertemente adherente, negrita = moderadamente adherente); Hex: hexadecano; Xil: xileno; ADH: adherencia; Chri: método de Christensen; RC: agar Rojo Congo (color de la colonia: Rojo, Negro, Gris, Marrón, presencia de Variantes); Proteínas codificadas por los genes detectados por PCR: *bap* (asociada al biofilm); *bbp* (unión a la sialoproteína del hueso); *cna* (unión al colágeno); *fib* (unión al fibrinógeno); *fmbA* y *fmbB* (unión a la fibronectina); *icaA* e *icaAB* (adhesinas intercelulares); *atlE* (unión a la vitronectina); *fbc* (unión al fibrinógeno). En cada columna se resaltan los resultados positivos en el color del título de columna.

De las 20 cepas positivas a *icaA*, sólo cuatro son adherentes según Christensen y dos de ellas, además, producen slime en agar Rojo Congo. De las 16 cepas restantes, dos presentan colonias negras aunque no son adherentes ni hidrofóbicas, mientras que cuatro exhiben variantes, siendo dos de ellas fuertemente hidrofóbicas. Por tanto, siete de las 20 cepas (35,00%) positivas a *icaA* son hidrofílicas, no adherentes y no producen slime, por lo que fenotípicamente no expresan dicho gen. Vasudevan et al. (2003) encontraron en cepas de mastitis bovinas portadoras del gen *ica* que el 31,42% no formaban slime in vitro, por lo que parece que la equivalencia entre presencia de *ica* y formación de slime no es tan directa como se pensó en un principio (Beenken et al., 2004; Yazdani et al., 2006; Tu Quoc et al., 2007).

Tras observar estos resultados, queda patente que la adherencia de los estafilococos no se debe a un solo factor (Molnàr *et al.*, 1994), sino que es un proceso multifactorial que, según Parisi (1985), en el caso de *S. epidermidis* incluiría la producción de *slime*, tensión superficial, energía libre de superficie, carga superficial e hidrofobicidad, a lo que podemos añadir la existencia de adhesinas, muy relacionadas con todos los factores antedichos.

2.2.- Estudio de otros factores de virulencia

Aparte de las características ya expuestas, existen otros factores de virulencia investigados en esta Tesis Doctoral, que incluyen los pertenecientes a estafilococos distintos de *S. aureus*, y la producción de bacteriocinas.

2.2.1.- Determinación de otros factores de virulencia en estafilococos distintos de *S. aureus*

La determinación los factores de virulencia de las bacterias patógenas resulta crítica para comprender su patogénesis, para la identificación de dianas terapéuticas y para el diseño de nuevas vacunas (Otto, 2004; Wu *et al.*, 2008). Los SCN han sido identificados como agentes etiológicos de diversas infecciones y actualmente son los microorganismos aislados más frecuentemente de infecciones nosocomiales (Barretti *et al.*, 2009), aunque se conoce poco de los factores de virulencia que producen y que contribuyen a la patogénesis de las infecciones causados por estos microorganismos. De hecho, todas las especies de SCN aisladas en el ser humano han sido relacionadas con alguna enfermedad (Otto, 2008). Sin embargo, algunos de ellos, como *S. epidermidis*, parecen haber evolucionado más para convivir con su hospedador que para causarle enfermedades (Otto, 2009) y, de hecho, la

producción de alguno de estos factores no se corresponde siempre con la virulencia del aislado (Lambe *et al.*, 1990).

Pese a ello, Ribeiro *et al.* (2006) descubrieron que eran las cepas de *S. epidermidis* de su estudio las que mostraban más factores de virulencia entre los SCN, detectando la presencia de uno o más en el 77,8% de los aislados de SCN, lo que parece proporcionarles ventajas adaptativas para la colonización (Otto, 2004).

En este trabajo se han estudiado nueve factores de virulencia enzimáticos que, resumidamente, se comparan entre los de las cepas de *S. aureus* con los correspondientes a las otras cepas no-*aureus* (**Tabla R42**).

En cuanto a la actividad DNAsa en nuestro estudio, el 35,62% de las cepas de *S. epidermidis* son positivas a esta enzima y el 98,17% de los *S. aureus*. La presencia de dicho factor de virulencia en la primera especie es muy variada; en dependencia de los autores oscila entre el 0,3 y el 60,2% (Gemmell, 1983), aunque Males *et al.* (1975) hallaron más frecuentemente esta enzima en las cepas de *S. epidermidis* procedentes de hemocultivos humanos (54,1%). En cepas hospitalarias humanas de SNC, Ribeiro *et al.* (2006) llegan a detectar producción de este enzima en un 15,4% de los aislados, incluyendo cepas positivas de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis*. Sin embargo, Barretti *et al.* (2009), en sus cepas de *S. epidermidis* humanas, no detectaron cepas positivas a este enzima, sí en un 14,8% de otros SCN. Ducha y Latre (1989), en cepas aisladas de leche ovina, sólo la encontraron en cepas de *S. hyicus*, mientras que en nuestro caso se obtuvieron cepas productoras de todas las especies salvo de *S. haemolyticus*; en el extremo opuesto se encontró que todas las cepas de *S. hyicus* fueron positivas a esta enzima.

En el estudio citado, de Ducha y Latre (1989), encontraron que un 10% de sus SCN de origen ovino producían hialuronidasa, frente a un 33,58% en nuestro caso. Hart *et al.* (2009) sólo encuentran actividad hialuronidasa en el 93% de cepas clínicas de *S. aureus* de origen humano y en ninguna de las cepas de SCN de colección, por lo que deducen que la falta de este enzima es más prevalente en *S. aureus* de lo esperado y opinan que quizá no sea un factor de virulencia importante en dicha especie. El 83,73% de nuestras cepas de *S. aureus* la presentan.

Ducha y Latre encontraron en 1989 un 20% de las cepas de ovino, frente a un 27,59% en nuestro caso, que es similar a los datos de Karadzhev *et al.*, que en 1981 obtuvieron un 27,8% de cepas con actividad de fibrinolisisina entre SCN procedentes de

mastitis subclínicas bovinas. Las cepas de *S. aureus* de nuestro estudio presentaron fibrinolisisina en un 24,24% de los casos.

En el estudio sobre SCN de origen clínico en la especie humana, Fule *et al.* (1996) encuentran un 58,97% de las cepas positivas a fosfatasa. Ducha y Latre (1989) observaron que sus cepas de origen ovino producían fosfatasa en un 55% de los aislados mientras que nosotros encontramos esta actividad en un 73,72% de las cepas de SNA y en un 97,25% de los aislados de *S. aureus*. Nuestros resultados, en concreto sobre las cepas de *S. epidermidis* (100% de cepas positivas), están en línea con los de Hébert *et al.* (1988), que encontraron un 90% de cepas clínicas positivas.

Coincidiendo con Ducha y Latre (1989), el factor encontrado más frecuentemente fue el de la ureasa, que en nuestro caso se situó en un 98,54% de los SNA y en un 100% de los *S. aureus*, mientras que ellos la encontraron en un 60% de las cepas de SCN. Males *et al.* (1975) destacaron la frecuencia de esta enzima en cepas virulentas de *S. epidermidis* de origen humano.

En relación con la gelatinasa, Ducha y Latre (1989) no la pudieron detectar en sus cepas; mientras que en nuestro caso un 68,61% de las cepas resultaron productoras, así como el 91,64% de las de *S. aureus*.

Males *et al.* (1975) encuentran que más del 50% de las cepas clínicas de *S. epidermidis* estudiadas poseen caseinasa. Ducha y Latre (1989), sin embargo, encontraron que el 30% de sus cepas produjeron esta enzima, frente al 50,36% en los SNA de nuestro estudio y el 87,16% de las de *S. aureus*.

Según Rollof *et al.* (1988), inicialmente la lipasa de *S. aureus* es intensamente quimiotáctica, aunque luego acaba inhibiendo los granulocitos, sin ser todo el efecto debido únicamente a la actividad enzimática, siendo por ello un importante factor de virulencia. Por tanto, puede que en SCN también tenga este carácter de factor de virulencia, tal como afirman Lambe *et al.* (1990). De hecho, Long y Kapral (1993) demostraron que los SCN productores de lipasa sobrevivían mejor en abscesos, aunque Molnàr *et al.* (1994) prácticamente no la detectan entre sus cepas de hemocultivos. Barretti *et al.* (2009) detectan un 16,7% de las cepas procedentes de peritonitis de *S. epidermidis*, y un 18,5% de otros SCN, positivas a este enzima. Ducha y Latre (1989) indicaron que la producción de lipasa puede ser responsable de la generación de lesiones supurativas: en su estudio, el 50% de las cepas la producen, alcanzándose en nuestro caso hasta el 64,23% en SNA y disminuyendo hasta el 24,77% entre las cepas de *S. aureus*. Ribeiro *et al.* (2006), en su estudio con cepas hospitalarias, indican que el 11,53% presentan dicho enzima.

La lecitinasa, factor que tradicionalmente se asocia con *S. aureus*, fue encontrada en el 30% de las cepas ovinas estudiadas por Ducha y Latre (1989). En este estudio fue detectada en el 75,18% de las cepas de SNA y en el 78,90% de las de *S. aureus*. Sin embargo, Ribeiro *et al.* (2006), en su investigación con cepas hospitalarias, sólo detectan esta actividad en un 1,92% de sus aislados.

Como se puede observar, la mayoría de los SNA aislados en este trabajo presentan factores de virulencia enzimáticos con una frecuencia relativamente elevada, que puede representar un signo de virulencia que añadir a los factores de adherencia estudiados.

2.2.2.- Bacteriocinas

La prolongación del periodo de incubación hasta las 48 horas tuvo por objeto para lograr que la observación de los halos de inhibición fuera más sencilla, posiblemente debido al lento desarrollo de las colonias de la cepa de prueba de *Cellulomonas fimi* y a que las bacteriocinas suelen producirse hacia la fase estacionaria del crecimiento de *Staphylococcus* (Rogolsky y Wiley, 1977).

En sus estudios sobre colonización de mucosas y piel en humanos, Shinefield *et al.* (1975) sugerían que la colonización llevada a cabo por una cepa de *S. aureus* impedía la de otra cepa, mientras que los SCN ejercían un efecto similar aunque algo más débil. No conocían el mecanismo que producía este hecho, pero entre las hipótesis causales incluían el que se producían condiciones de crecimiento desfavorables debido a la colonización inicial, incluyendo la producción de inhibidores, obtención de condiciones de pH o redox desfavorables, acumulación de metabolitos tóxicos o producción de sustancias bacterianas. Las comunidades de estafilococos en el interior de biofilmes, a diferencia de lo que ocurre con otras bacterias, están integradas por una sólo especie, lo que podría deberse a señales *quorum-sensing*, que incluso podrían producir la inhibición de la expresión de factores de virulencia (Otto, 2008). De modo similar, se ha postulado que se podrían introducir cepas productoras de bacteriocinas, de aparente baja virulencia, en poblaciones bacterianas establecidas con el fin de interferir la colonización por cepas virulentas (De Oliveira *et al.*, 1998). De hecho, hay que considerar que la piel de los mamíferos, los epitelios y varios tipos celulares de los mamíferos producen péptidos antimicrobianos defensivos tales como las defensinas, protegrinas y proteínas microbicidas plaquetarias en respuesta a la infección por *S. aureus*, mientras que esta bacteria excreta productos con estructura y actividad

similares, llamados bacteriocinas, que inhiben los microorganismos competidores (Peschel y Collins, 2001).

En nuestro caso, el 56,50% de las cepas estudiadas mostraron cierta actividad de bacteriocinas, siendo *S. epidermidis* y *S. simulans* las especies que presentaron la actividad máxima, aunque más del 30% de las cepas que mostraron alguna actividad pertenecían a la especie *S. aureus*. En un estudio efectuado en 2005 por Dos Santos *et al.* en cepas de SCN aisladas en mastitis bovinas, se encontró que únicamente el 6,4% de las cepas producían bacteriocinas. Esta diferencia con nuestros datos puede deberse al tipo de muestra (especie de origen, mastitis subclínicas) aunque si se valoran únicamente los resultados de producción en los SCN de nuestro investigación, realmente el porcentaje desciende hasta el 42,33% de cepas con alguna actividad. Si sólo contemplamos las cepas de SCN con actividad marcada, obtuvimos un 10,21% de cepas positivas, un dato más cercano al obtenido por dichos autores.

IX.- Conclusiones

Primera

Aunque *Staphylococcus aureus* es la especie aislada con más frecuencia en las muestras de leche ovina, independientemente de la condición de los animales de origen (sanos o con mastitis clínica), el conjunto de especies coagulasa negativas (SCN) ha sido porcentualmente el más abundante, lo que pone de manifiesto el interés de su estudio en muestras de leche de oveja.

Segunda

El fagotipado de cepas de *S. aureus* de origen ovino aisladas de muestras de leche, utilizando el *set* internacional, resulta de poca utilidad práctica, debido a la escasa sensibilidad observada en las cepas estudiadas.

Tercera

El uso combinado de la determinación del *clumping factor* y el crecimiento en SSA es un método práctico y fiable para la detección de las cepas capsuladas de *S. aureus*.

Cuarta

El uso de polisacáridos capsulares semipurificados potenciados con adyuvante de Freund, resulta poco eficaz en términos cuantitativos (título de anticuerpos específicos) en la hiperinmunización de conejos, y los sueros obtenidos presentan abundantes reacciones cruzadas, lo que los hace inadecuados en técnicas de serotipado capsular.

Quinta

La detección de la presencia de los genes capsulares de los tipos 1, 5 y 8 de *S. aureus* mediante PCR múltiple permite descubrir cepas con la potencialidad de presentar cápsula, lo que puede ser utilizado como un sistema de confirmación de otras metodologías de tipo fenotípico.

Sexta

Aunque no existe concordancia en los resultados de detección de cepas adherentes a superficies inertes utilizando el método de Christensen y las formadoras de *slime* con el uso del agar Rojo Congo, se consigue optimizar ambos procedimientos independientemente si se utiliza caldo BHI y tinción con cristal violeta en el método de Christensen y si en la preparación del agar Rojo Congo se utiliza un 1,2% de colorante sin incorporación de ClNa. En cualquier caso, es recomendable la incubación de los cultivos durante 48 h a 37°C en el método de Christensen y, en el caso del agar Rojo Congo, 24 h a 37°C seguidas de otras 24 h adicionales a temperatura ambiente, y el uso de controles adecuados.

Séptima

La determinación de la hidrofobicidad bacteriana mediante la adhesión a los solventes (MATS) xileno y hexadecano, plantea diferencias en los resultados, como con los de determinación de adherencia (método de Christensen y agar Rojo Congo). En cualquier caso, la hidrofobicidad aumenta con el subcultivo de la cepa en agar Columbia sangre.

Octava

La presencia de genes asociados a la adherencia o a la formación de *slime* (*bap*, *ica*) no se corresponde con la determinación fenotípica de tales características, lo que hace conveniente la práctica de nuevos estudios.

Novena

Entre los estafilococos coagulasa negativos (SCN), la presencia de factores de virulencia resulta más importante de lo esperado, lo que permite suponer su potencialidad como agentes de mastitis en ganado ovino.

Décima

Considerando que una importante proporción de las cepas aisladas, independientemente de su especie (*S. aureus* o SCN) producen bacteriocinas, parece pertinente señalar que su estudio y mejor conocimiento podría ayudar a establecer estrategias de control de las mastitis del ganado ovino.

X.- Apéndices

APÉNDICE M01: Cepas tipo utilizadas

1.- Cepas capsuladas de referencia

Referencia	Identificación	Observaciones
M	<i>S. aureus</i>	cápsula tipo 1 ⁽¹⁾
Smith	<i>S. aureus</i>	cápsula tipo 2 ⁽¹⁾
Mardi	<i>S. aureus</i>	cápsula tipo 3 ⁽²⁾
7007	<i>S. aureus</i>	cápsula tipo 4 ⁽²⁾
PS30	<i>S. aureus</i>	cápsula tipo 5 ⁽³⁾
Reynolds	<i>S. aureus</i>	cápsula tipo 5 ⁽¹⁾
Becker	<i>S. aureus</i>	cápsula tipo 8 ⁽¹⁾

- (1) Cepas cedidas amablemente por el Dr. Jean C. Lee, Harvard Medical School, Boston, EEUU.
 (2) Cepas cedidas amablemente por el Dr. Chia Lee, University of Kansas Medical Center, Kansas City, EEUU.
 (3) Cepa cedida amablemente por el Dr. Fernando de Oliveira e Noronha, Cornell University, Ithaca, EEUU.

2.- Cepas control en la identificación

Estas cepas fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Lucas Domínguez, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

Referencia	Identificación
Tipo 1	<i>S. hominis</i> 27844
Tipo 2	<i>S. warneri</i> 27836
Tipo 3	<i>S. capitis</i> 27840
Tipo 4	<i>S. cohnii</i> 29974
Tipo 5	<i>S. haemolyticus</i> 29970
Tipo 6	<i>S. saprophyticus</i> 15305
Tipo 7	<i>S. aureus</i> 12600
Tipo 8	<i>S. aureus</i> 12661

3.- Cepa control de bacteriocinas

Referencia	Identificación	Observaciones
<i>C. fimi</i>	<i>Cellulomonas fimi</i> CECT 4283	Cepa tipo sensible a bacteriocinas

4.- Cepas de *S. epidermidis* control positivo y negativo de *slime*

Referencia	Identificación	Observaciones
4184	<i>S. epidermidis</i> CECT4184	formadora de slime
231	<i>S. epidermidis</i> CECT231	no formadora de slime

5.- Cepas empleadas en el fagotipado

Todas estas cepas fueron cedidas amablemente por la Dra. Ana Vindel, del Instituto de Salud Carlos III.

Referencia	Identificación	Observaciones
3A	<i>S. aureus</i>	Cepas propagadoras de fago
3C	<i>S. aureus</i>	
6	<i>S. aureus</i>	
29	<i>S. aureus</i>	
42E	<i>S. aureus</i>	
47	<i>S. aureus</i>	
52	<i>S. aureus</i>	
52A	<i>S. aureus</i>	
53	<i>S. aureus</i>	
54	<i>S. aureus</i>	
55	<i>S. aureus</i>	
71	<i>S. aureus</i>	
75	<i>S. aureus</i>	
77	<i>S. aureus</i>	
80	<i>S. aureus</i>	
81	<i>S. aureus</i>	
83 A	<i>S. aureus</i>	
84	<i>S. aureus</i>	
85	<i>S. aureus</i>	
94	<i>S. aureus</i>	
95	<i>S. aureus</i>	
96	<i>S. aureus</i>	
1030	<i>S. aureus</i>	Cepas control de fagos
W57	<i>S. aureus</i>	
18042	<i>S. aureus</i>	
2009	<i>S. aureus</i>	

6.- Cepa de *Pasteurella multocida* para la prueba de la hialuronidasa

Referencia	Identificación	Observaciones
<i>P. multocida</i> A	<i>P. multocida</i> NCTC10322	Cepa con cápsula de ácido hialurónico

7.- Cepas utilizadas como control positivo para las PCR de los factores de adherencia

Referencia	Identificación	Observaciones
639	<i>S. aureus</i> 639/46/05	<i>cna</i> ¹
25923	<i>S. aureus</i> 25923	<i>fnbA</i> ¹
761	<i>S. aureus</i> 761/38/05	<i>fnbB</i> ¹
Smith	<i>S. aureus</i> Smith	<i>fib</i>
4184	<i>S. epidermidis</i> 4184	<i>icaAB, fnbB</i>
Becker	<i>S. aureus</i> Becker	<i>Cna</i>
M	<i>S. aureus</i> M	<i>fnbA, icaA</i>
PS80	<i>S. aureus</i> PS80	<i>fnbA, bbp</i>
93/240.07	<i>S. epidermidis</i>	<i>fbe, atlE, bap</i>

(¹) Cepas cedidas amablemente por el Dr. Lämmler, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, D-35392 Giessen, Alemania.

8.- Cepas seleccionadas para hacer las comparaciones de detección fenotípica de *slime*.

Tipo	cód	referencia	Identificación	Capsulación		Adherencia y <i>slime</i>	
				<i>clumping</i>	SSA	Σ BHI	RC
I	1C	93/406.01	S. aureus	-	D	≤ 5	R
II	2C	92/080.13	<i>S. aureus</i>	-	D	≥ 5	N
III	3C	93/234.08	<i>S. aureus</i>	+	C	≤ 5	R
IV	4C	93/500	<i>S. aureus</i>	+	C	≥ 5	N
V	5C	93/241.01	<i>S. epidermidis</i>	NP	NP	≤ 5	R
VI	6C	92/066.01	<i>S. epidermidis</i>	NP	NP	≥ 5	N
VII	7C	93/520.01	<i>S. xylosus</i>	NP	NP	≤ 5	R
VIII	8C	94/165.01	<i>S. xylosus</i>	NP	NP	≥ 5	N

Notas:

tipo: establecemos estos 8 tipos como criterio de trabajo.

cód: cada cepa tipo se identifica en ciertas pruebas como 1C a 8C.

Σ BHI: suma de la puntuación en la prueba clásica de Christensen sobre caldo BHI.

RC: color en agar Rojo Congo (N=Negro, R=Rojo).

NP: no procede.

APÉNDICE M02 : Medios, soluciones y reactivos empleados

1.- Medio de conservación de cepas

Leche descremada (Merck)	20 g
Triptona (Pronadisa)	10 g
Glicerol (Sigma)	80 ml
Agua destilada	320 ml
Esterilizar a 110°C durante 10 minutos	

2.- Tinción de Gram (modificada por Hucker)

2.1. Reactivos:

Solución de cristal violeta

Cristal violeta (PANREAC)	2,0 g
Etanol (PANREAC), al 95%	10 ml

Solución de oxalato

Amonio oxalato 1-hidrato (PANREAC)	1,0 g
Agua destilada	100 ml

Solución de lugol

Yodo (PANREAC)	1 g
Yoduro potásico (PANREAC)	2 g
Agua destilada	300 ml

Añadir unos ml de agua destilada al yodo y yoduro potásico, mezclar a fondo añadiendo poco a poco más agua destilada hasta que se disuelvan y aforar finalmente a 300 ml.

Solución de safranina

Safranina (PANREAC)	25 g
Etanol (PANREAC), al 95%	10 ml
Agua destilada	90 ml

2.2. Método

Preparar un frotis sobre un portaobjetos. Fijar suavemente a la llama. Teñir 1 minuto con una mezcla de un volumen de solución de cristal violeta mezclado con 4 volúmenes de solución de oxalato amónico. Lavar con agua. Añadir la solución de lugol durante un

minuto. Lavar con agua y decolorar con etanol. Lavar con agua y teñir con la solución de safranina durante 1 minuto.

3.- Solución de lisostafina.

Partiendo de un vial de lisostafina (Lysostaphin, Sigma L-7386, 1000 unidades), se procedió al arrastre y rehidratación de su contenido liofilizado, utilizando PBS pH 7,2 hasta llevarlo a un volumen final de 18,5 ml.

Esta solución se alicuotó en eppendorf estériles a razón de 500 µl/ eppendorf y se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.- Agar con furazolidona (De la Fuente, 1985)

Una vez esterilizado el medio base (TSA), se saca del autoclave y se coloca en un baño a 48-50°C.

A 900 ml de este medio basal se añaden asépticamente 100 ml de una solución de furazolidona al 0,025 % en acetona y se homogeneiza suavemente. Antes de distribuirlo en placas se deja el matraz que contiene el medio ligeramente abierto en el baño durante unos 10 minutos para permitir la evaporación de la acetona.

5.- Agar base con púrpura (Difco)

Bacto Purple Agar Base (x litro)

Peptona Proteosa n°3 de Difco	10 g
Extracto de carne	1 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
pH final 6,8 ± 0,2 a 25°C	

6.- Medio fluido con tioglicolato (Difco)

Bacto Fluid Thioglycollate Medium (x litro)

Extracto de levadura	5 g
Casitona	15 g
Dextrosa	5,5 g
Cloruro sódico	2,5 g
L-cistina, Difco	0,5 g
Tioglicolato sódico	0,5 g
Agar	0,75 g
Resazurina	0,001 g
pH final 7,1 ± 0,2 a 25°C	

7.- Medio MR-VP (Difco)*Bacto MR-VP Medium*

Peptona tamponada	7 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Dextrosa.....	5 g
Agua destilada	1.000 ml

pH 6,9 ± 0,2 a 25°C

Se distribuye en tubos de hemólisis a razón de 3 ml/ tubo y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

8.- Reactivos de la prueba de Voges-Proskauer (Lányi, 1987)Reactivo A:

1-naftol (MERCK).....	5 g
Etanol absoluto (Panreac).....	100 ml

Reactivo B:

NaOH (Prolabo).....	40 g
Agua destilada	100 ml

9.- Caldo base con púrpura (Difco)*Bacto Purple Broth Base (x litro)*

Peptona Proteosa n°3 de Difco	10 g
Extracto de carne	1 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g

pH final 6,8 ± 0,2 a 25°C

10.- Caldo con nitrato (Difco)*Bacto nitrate broth*

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Nitrato potásico	1 g
Agua destilada	1.000 ml

pH final 7,0 ± 0,2 a 25°C

11.- Reactivos de Griess-Ilosvay para la prueba de nitratos

(Harrigan y McCance, 1966)

Reactivo I:

Ácido sulfanílico (Panreac)	0,8 g
Ácido acético (Sigma), 5 N	100 ml

Reactivo II:

1-naftilamina (MERCK)	0,5 g
Ácido acético (Sigma), 5 N	100 ml

12.- Agar para la prueba de DNAsa (Difco)

Bacto DNase Test Agar

Triptosa.....	20 g
ADN	2 g
ClNa	5 g
Agar	15 g
pH final 7,3 ± 0,2 a 25°C	

13.- Agar blando suero (Serum Soft Agar, SSA)

(Finkelstein y Sulkin, 1958).

Triptona (Pronadisa).....	10 g/l
Extracto de levadura (Difco)	5 g/l
Glucosa (Sigma).....	5 g/l
K ₂ HPO ₄ (Merck)	5 g/l
Agar Bacteriological N°1(Oxoid)	1,5 g/l

14.- Agar Rojo Congo “Clásico” (RCC)

BHI Broth (Oxoid)	37 g/l
Sacarosa (Fluka).....	50 g /l
Agar Bacteriological N°1(Oxoid).....	10 g /l

Al medio anterior se le añadía, tras autoclavar, una solución esterilizada por calor de Rojo Congo (Merck) a 0,8 g/l y se distribuía directamente en placas de uso inmediato.

15.- Agar Rojo Congo (RC)

Caldo Infusión Cerebro-Corazón (Pronadisa)	37 g/l
Sacarosa (Fluka).....	50 g /l
Agar industrial (Pronadisa)	10 g /l

Al medio anterior se le añadía inicialmente, tras autoclavar, una solución esterilizada por calor de Rojo Congo (Merck) a 0,8 g/l y se distribuía directamente en placas de uso inmediato. Finalmente se empleó una solución a 1,2 g/l.

16.- Caldo HHW (Hussein *et al.*, 1991)

Dada su complejidad, el medio se elaboraba preparando varias soluciones por separado, para aforar finalmente a 1.000 ml, siguiendo las recomendaciones de los autores.

Componente	mg/L
Grupo 1	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (Merck)	10.000,0
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	3.000,0
Acido aspártico (L) (Sigma)	150,0
L-Alanina (Sigma)	100,0
L-Arginina (Sigma)	100,0
L-Cistina (Sigma)	50,0
Glicina (Sigma)	100,0
Acido glutámico (L) (Sigma)	150,0
L-Histidina (Sigma)	100,0
L-Isoleucina (Sigma)	150,0
L-Lisina (Sigma)	100,0
L-Leucina (Sigma)	150,0
L-Metionina (Sigma)	100,0
L-Fenilalanina (Sigma)	100,0
L-Prolina (Sigma)	150,0
L-Serina (Sigma)	100,0
L-Treonina (Sigma)	150,0
L-Triptófano (Sigma)	100,0
L-Tirosina (Sigma)	100,0
L-Valina (Sigma)	150,0
<i>Disuelto en (ml)</i>	700,0
Grupo 2	
Glucosa (Sigma)	10.000,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500,0
<i>Disuelto en (ml)</i>	100,0
Grupo 3	
Biotina (Sigma)	0,1
Acido nicotínico (Sigma)	2,0
Acido D-pantoténico, sal cálcica (Sigma)	2,0
Piridoxal (Sigma)	4,0
Piridoxamina dihidrocloruro (Sigma)	4,0
Riboflavina (Sigma)	2,0
Tiamina hidrocloreuro (Sigma)	2,0
<i>Disuelto en (ml)</i>	10
Grupo 4	
Adenina sulfato (Sigma)	20,0
Guanina (Sigma)	20,0
<i>Disuelto en (ml)</i>	50,0
Grupo 5	
CaCl ₂ ·6H ₂ O (Merck)	10,0
MnSO ₄ (Merck)	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ ·FeSO ₄ ·6H ₂ O (Sigma)	6,0
<i>Disuelto en (ml)</i>	10

17.- Medio para la prueba rápida de ureasa

(Lányi, 1987)

Solución A:

Urea (Serva)	2 g
Etanol (Panreac), al 95%	2 ml
Agua destilada	4 ml
Esterilizar por filtración, mantener a 4°C.	

Solución B:

KH ₂ PO ₄ (Panreac)	0,1 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0,1 g
NaCl (Fluka).....	0,5 g
Sol Rojo Fenol Difco (al 0,2%).....	1 ml
Agua destilada	100 ml
Esterilizar a 115°C durante 15 minutos.	

El medio se preparaba mezclando 1 volumen de la solución A con 19 volúmenes de la solución B.

18.-Agar para la prueba de la gelatinasa

BHI (Pronadisa).....	5 g
Gelatina (Sigma)	12 g
Agua destilada	1000 ml

19.- Agar para la detección de caseinasa

Agar de Mueller Hinton (Pronadisa)....	200 ml
Leche descremada (Fluka) al 10%.....	23 ml

20.- Agar nutritivo con iones

Agar nutritivo (Biolife)	1000 ml
Cl ₂ Ca (Merck) 1M.....	1 ml
Cl ₂ Mg (Sigma)1M.....	1 ml

21.- Agar semisólido de propagación de fagos.

Agar industrial (Pronadisa)	7,5 g
Triptona (Pronadisa).....	8,0 g
NaCl (Fluka))	5,0 g
Agua destilada	1000 ml

22.- Colorantes para el método de Christensen.Solución de safranina (tinción de Gram, ver 2).Solución de tripán azul

Tripán azul (Merck)	0,4 g
Agua destilada	100 ml

Solución de azul de toluidina

Azul de toluidina (Merck)	1 g
Isopropanol (Aldrich) al 50% en agua.....	100 ml

Solución de cristal violeta de la tinción de Gram (tinción de Gram, ver 2).**23.- Tampón Tris-Borato (TBE) para electroforesis (5x).**

Tris base (TRIZMA) (Sigma).....	54,0 g
Ácido bórico (Fluka)	27,5 g
EDTA (Sigma) 0,5 M pH 8,0	20,0 ml
Agua MQ hasta.....	1000,0 ml

24.- Tampón de carga para electroforesis (6x) (Sambrook *et al.*, 1989)

Azul de bromofenol (Sigma)	0,25 %
Xilencianol (Sigma).....	0,25%
Sacarosa (Fluka) al 40% p/v en agua	

REACTIVOS Y MATERIALES EMPLEADOS

- Ácido acético glacial. Sigma. Código A-6283.
- Ácido aspártico (L). Sigma. Código A-9256.
- Ácido bórico. Fluka. Código 15663.
- Ácido glutámico (L). Sigma. Código G-6904.
- Ácido nicotínico. Sigma. Código N-4126.
- Ácido *D*-pantoténico, sal cálcica. Sigma. Código P-5710.
- Ácido sulfanílico. Panreac. Código 131057.
- Adenina sulfato. Sigma. Código A-9126.
- Adyuvante completo de Freund. Sigma. Código F-5881.
- Adyuvante incompleto de Freund. Sigma. Código F-5506.
- Agar industrial. Pronadisa. Código 1804.00.
- Agar bacteriológico (Agar N°1). Oxoid. Código LP0011.
- Agar Columbia +5% de sangre de cordero. bioMérieux. Código 43 041.
- Agar de Mueller Hinton. Pronadisa. Código 1058.00.
- Agarosa D-1 medium EEO. Pronadisa. Código 8023.
- *L*-Alanina. Sigma. Código A-5824.
- Amonio oxalato 1-hidrato. Panreac. Código 141136.
- *L*-Arginina. Sigma. Código A-5006.
- Azul de bromofenol. Sigma. Código B-8026.
- Azul de toluidina. Merck. Código 15930.
- Azul de metileno. Merck. Código 1.59270.
- Agar base con púrpura. Difco. Código 222810.
- Caldo base con púrpura. Difco. Código 222710.
- Agar para la prueba de DNAsa. Difco. Código 211179.
- Medio fluido con tioglicolato. Difco. Código 225650.
- Medio para la prueba del MR-VP. Difco. Código 211383.
- Caldo nitrato. Difco. Código 226810.
- Base de Agar Columbia. Pronadisa. Código 1104.00.
- Biotina. Sigma. Código B-4501.
- Caldo infusión cerebro-corazón. Oxoid. Código CM225.
- Caldo infusión de Cerebro Corazón (BHI). Pronadisa. Código 1400.00.
- Caldo Soja Tripticaseína (TSB). Pronadisa. Código 1224.00.

- Cloruro cálcico dihidrato. Merk. Código 156182.
- Cloruro magnésico. Sigma. Código M-8266.
- Cloruro sódico. Fluka. Código 71381.
- Cristal violeta. Panreac (CI 42555) Código 251762.
- *L*-Cistina. Sigma. Código C-6195.
- EDTA. Sigma, Código E-5134.
- Egg Yolk Emulsion. Fluka. Código 17148.
- Etanol absoluto. Panreac. Código 141086.
- *L*-Fenilalanina. Sigma. Código P-8324.
- *O*-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD). Sigma. P-1526.
- Fosfato dipotásico trihidrato ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$). Merck. Código 1.05099.
- Fosfato disódico dihidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$). Merck. Código 1.06580.
- Fosfato potásico (KH_2PO_4). Panreac. Código 141509.
- Fosfato sódico monobásico 1 hidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$). Panreac
- Gelatina. Sigma. Código G-6144.
- Glicerol. Sigma. Código G-7757.
- Glicina. Sigma. Código G-7403.
- D(+)- Glucosa. Sigma. Código G-7528.
- Guanina. Sigma. Código G-0381.
- Hexadecano. Sigma. Código H-0255.
- Hidrógeno peróxido 30% p/v (100 vol.) estabilizado PRS. Panreac. Código 141076.
- Hidróxido sódico. Prolabo. Código 28 244.295.
- *L*-Histidina. Sigma. Código H-8776.
- Ig de cabra anti Ig de conejo. Sigma. Código A-9169.
- *L*-Isoleucina. Sigma. Código I-2752
- Isopropanol. Aldrich. Código 19076-4.
- Leche descremada. Merck. Código 1.15363.
- *L*-Lisina. Sigma. Código L-5626
- Lisostafina. Sigma Código L-7386.
- *L*-Metionina. Sigma. Código M-6039.
- 1-naftol. Merck. Código 106223.
- 1-naftilamina. Merck. Código 822291.
- Nutrient Agar. Biolife. Código 401810.
- Nutrient Broth. Biolife. Código 401815.

- Leche en polvo desnatada. Fluka. Código 70166.
- *L*-Leucina. Sigma . Código L-8000.
- Lisostafina. Sigma. Código L-7386.
- Piridoxal. Sigma. Código P-9130.
- Piridoxamina dihidrocloruro. Sigma. Código P-9380.
- Placas PolySorp. Nunc. Código 735-0033.
- Plasma de conejo. bioMérieux. Código 55181.
- *L*-Prolina. Sigma. Código P-8449.
- Proteasa. Sigma. Código P-5147.
- Riboflavina. Sigma. Código R-4500.
- Rojo Congo (CI 22120). Merck. Código 101340.
- Rojo Fenol. Difco. Código 220310.
- Sacarosa. Fluka. Código 84100.
- Safranina. Panreac. Código 251622.
- *L*-Serina. Sigma. Código S-8407.
- Solución colorante negro amido para electroforesis. Biosystems. Código 20009.
- D(+)- Sucrosa (Sacarosa). Fluka. Código 84100.
- Sulfato amónico. Sigma. Código A-2939.
- Sulfato amonico ferroso hexahidrato ((NH₄)₂SO₄.FeSO₄.6H₂O). Sigma. Código F-3754.
- Sulfato magnésico. Sigma. Código A-2939.
- Sulfato de manganeso monohidrato. Merck. Código 5960.
- Tampón nº1 para electroforesis. Biosystems. Código 20000.
- Tiamina hidrocloreuro. Sigma. Código T-4625.
- Tiras CELLOGEL para electroforesis 2,5 x 17 cm, 220-250 µm. Atom. Código 1900.
- *L*-Tirosina. Sigma. Código T-8909.
- Tween-20 Sigma. Código P-1369.
- Tripán Azul. Merck. Código 11732.
- *L*-Tryptófano .Sigma. Código T-0254.
- Triptona. Pronadisa. Código 1612.00.
- Tris base (TRIZMA). Sigma. Código T-1503.
- Urea. Serva. Código 24524.
- *L*-Valina . Sigma. Código V-0500.
- Xilencianol. Sigma. Código X-4126.

- *p*-Xileno. Calidad HPLC. Aldrich. Código 31,719-5 .
- Yodo. Panreac. Código 141771.
- Yoduro potásico. Panreac. Código 131542.

APÉNDICE M03: Códigos de identificación

En el listado se relacionan los códigos tipo empleados en la identificación de las cepas aisladas. La metodología empleada se detalla en el apartado 1.1.2. del capítulo de Material y Métodos .

Los códigos generados se identifican con las siguientes pruebas bioquímicas:

Tioglicolato	Voges-Proskauer	Xilosa	Sacarosa	Maltosa	Manitol	Manosa	Trehalosa	Lactosa	Nitratos	Fosfatasa	Coagulasa	DNAsa	Novobiocina
--------------	-----------------	--------	----------	---------	---------	--------	-----------	---------	----------	-----------	-----------	-------	-------------

Especie	Código Tipo
<i>S. aureus</i>	11011111111110
<i>S. aureus</i>	11010110111110
<i>S. aureus</i>	11011110111110
<i>S. aureus</i>	11011111111010
<i>S. auricularis</i>	01011001010000
<i>S. auricularis</i>	00011001010000
<i>S. auricularis</i>	00011001000000
<i>S. auricularis</i>	01001001010000
<i>S. auricularis</i>	01001001000000
<i>S. auricularis</i>	01011001000000
<i>S. auricularis</i>	00001001010000
<i>S. capitis</i>	11010110010010
<i>S. capitis</i>	10010110010010
<i>S. capitis</i>	11010110000010
<i>S. capitis</i>	10010110000010
<i>S. caprae</i>	11000111111010
<i>S. caprae</i>	11001011111010
<i>S. caprae</i>	11001111111010
<i>S. caprae</i>	11000011111010
<i>S. carnosus</i>	11000110111010
<i>S. carnosus</i>	11000111011010
<i>S. carnosus</i>	11000111111010
<i>S. carnosus</i>	11000110011010
<i>S. caseolyticus</i>	00001000111000
<i>S. caseolyticus</i>	00011001110010
<i>S. caseolyticus</i>	00001000110000
<i>S. caseolyticus</i>	00001000110010
<i>S. caseolyticus</i>	00001000111010
<i>S. caseolyticus</i>	00001001110000
<i>S. caseolyticus</i>	00001001110010
<i>S. caseolyticus</i>	00001001111000

Especie	Código Tipo
<i>S. caseolyticus</i>	00011000110000
<i>S. caseolyticus</i>	00011000111000
<i>S. caseolyticus</i>	00011001110000
<i>S. caseolyticus</i>	00001001111010
<i>S. caseolyticus</i>	00011001111000
<i>S. caseolyticus</i>	00011001111010
<i>S. caseolyticus</i>	00011000111010
<i>S. caseolyticus</i>	00011000110010
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01001001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00000111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10000111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10001001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10001101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10001111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11000001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10000001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01001111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00000101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01001011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10000101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01000111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01000101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10000011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01000011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01000001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00001111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11000011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00001101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00001001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00001011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	01001101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11001001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00000011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11001111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	10001011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11001011000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11000111000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11000101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	00000001000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 1	11001101000001
<i>S. cohnii</i> subesp. 2	11001011100001
<i>S. cohnii</i> subesp. 2	10001111100001
<i>S. cohnii</i> subesp. 2	11001111100001
<i>S. cohnii</i> subesp. 2	10001011100001

Especie	Código Tipo
<i>S. epidermidis</i>	11011010111000
<i>S. epidermidis</i>	11011010011000
<i>S. epidermidis</i>	11011011111000
<i>S. epidermidis</i>	11011000111000
<i>S. epidermidis</i>)	11011010111010
<i>S. epidermidis</i>	10011010111010
<i>S. epidermidis</i>	10011010111000
<i>S. epidermidis</i>	11010110011010
<i>S. gallinarum</i>	10111111111011
<i>S. gallinarum</i>	10111111111001
<i>S. gallinarum</i>	10111111011011
<i>S. gallinarum</i>	10111111011001
<i>S. haemolyticus</i>	10011001010000
<i>S. haemolyticus</i>	11011001010000
<i>S. haemolyticus</i>	10011001000000
<i>S. haemolyticus</i>	10011001000010
<i>S. haemolyticus</i>	11011001100000
<i>S. haemolyticus</i>	11011101110010
<i>S. haemolyticus</i>	11011101110000
<i>S. haemolyticus</i>	11011101100010
<i>S. haemolyticus</i>	11011101100000
<i>S. haemolyticus</i>	11011101010010
<i>S. haemolyticus</i>	11011101010000
<i>S. haemolyticus</i>	11011101000010
<i>S. haemolyticus</i>	11011101000000
<i>S. haemolyticus</i>	11011001110010
<i>S. haemolyticus</i>	11011001000000
<i>S. haemolyticus</i>	11011001100010
<i>S. haemolyticus</i>	10011001010010
<i>S. haemolyticus</i>	11011001010010
<i>S. haemolyticus</i>	10011101010010
<i>S. haemolyticus</i>	11011001000010
<i>S. haemolyticus</i>	10011101110010
<i>S. haemolyticus</i>	10011101110000
<i>S. haemolyticus</i>	10011101100000
<i>S. haemolyticus</i>	10011101010000
<i>S. haemolyticus</i>	10011101000010
<i>S. haemolyticus</i>	10011101000000
<i>S. haemolyticus</i>	10011001110000
<i>S. haemolyticus</i>	10011001100010
<i>S. haemolyticus</i>	10011001100000
<i>S. haemolyticus</i>	11011001110000
<i>S. haemolyticus</i>	10011101100010
<i>S. hominis</i>	01011001000000

Especie	Código Tipo
<i>S. hominis</i>	01011001010000
<i>S. hominis</i>	01011001100000
<i>S. hominis</i>	01011001110000
<i>S. hominis</i>	00011001100000
<i>S. hominis</i>	00011001010000
<i>S. hominis</i>	00011000000000
<i>S. hominis</i>	00011001000000
<i>S. hominis</i>	00011000110000
<i>S. hominis</i>	00011000100000
<i>S. hominis</i>	00011001110000
<i>S. hominis</i>	01011000100000
<i>S. hominis</i>	01011000110000
<i>S. hominis</i>	01011000000000
<i>S. hominis</i>	00011000010000
<i>S. hominis</i>	01011000010000
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011111111010
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10010011111000
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10010011111010
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10010111111000
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10010111111010
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011011111000
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011011111010
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>chromogenes</i>	10011111111000
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>hyicus</i>	10010011111110
<i>S. hyicus</i> subesp. <i>hyicus</i>	10010011111010
<i>S. intermedius</i>	10010111111110
<i>S. intermedius</i>	10010111011110
<i>S. intermedius</i>	10010011011110
<i>S. intermedius</i>	10010011111110
<i>S. lentus</i>	00010111111011
<i>S. lentus</i>	00011111011011
<i>S. lentus</i>	00001111111101
<i>S. lentus</i>	00010111011011
<i>S. saccharolyticus</i>	10000010010000
<i>S. saccharolyticus</i>	10000010010010
<i>S. saccharolyticus</i>	11000010010010
<i>S. saccharolyticus</i>	10000010011000
<i>S. saccharolyticus</i>	11000010011000
<i>S. saccharolyticus</i>	11000010011010
<i>S. saccharolyticus</i>	10000010011010
<i>S. saccharolyticus</i>	11000010010000
<i>S. saprophyticus</i>	11011001000001
<i>S. saprophyticus</i>	11011101000001
<i>S. sciuri</i>	10011101011011

Especie	Código Tipo
<i>S. sciuri</i>	10010111011011
<i>S. sciuri</i>	10011111011011
<i>S. sciuri</i>	10010101011011
<i>S. simulans</i>	10010111111010
<i>S. simulans</i>	10010101111010
<i>S. simulans</i>	10010110111010
<i>S. simulans</i>	10010100111010
<i>S. simulans</i>	10010101110000
<i>S. simulans</i>	10011111110000
<i>S. warneri</i>	11011001100010
<i>S. warneri</i>	11011001000000
<i>S. warneri</i>	11011001100000
<i>S. warneri</i>	11011101000000
<i>S. warneri</i>	11011101000010
<i>S. warneri</i>	11011101100000
<i>S. warneri</i>	11011101100010
<i>S. warneri</i>	11011001000010
<i>S. xylosus</i>	11111111000001
<i>S. xylosus</i>	001110111111001
<i>S. xylosus</i>	111110111111001
<i>S. xylosus</i>	11111011000001
<i>S. xylosus</i>	11111011001001
<i>S. xylosus</i>	11111011010001
<i>S. xylosus</i>	11111011011001
<i>S. xylosus</i>	11111011111001
<i>S. xylosus</i>	00111011001001
<i>S. xylosus</i>	00111011000001
<i>S. xylosus</i>	111111111110001
<i>S. xylosus</i>	11111111101001
<i>S. xylosus</i>	11111111100001
<i>S. xylosus</i>	001111111001001
<i>S. xylosus</i>	111111111010001
<i>S. xylosus</i>	111111111001001
<i>S. xylosus</i>	00111011010001
<i>S. xylosus</i>	00111011011001
<i>S. xylosus</i>	00111011100001
<i>S. xylosus</i>	00111011101001
<i>S. xylosus</i>	001110111110001
<i>S. xylosus</i>	001111111000001
<i>S. xylosus</i>	001111111010001
<i>S. xylosus</i>	111111111011001
<i>S. xylosus</i>	01111111101001
<i>S. xylosus</i>	00111111100001
<i>S. xylosus</i>	10111011100001

Especie	Código Tipo
<i>S. xylosus</i>	00111111011001
<i>S. xylosus</i>	10111011010001
<i>S. xylosus</i>	10111011001001
<i>S. xylosus</i>	10111011000001
<i>S. xylosus</i>	10111011110001
<i>S. xylosus</i>	01111111110001
<i>S. xylosus</i>	10111011101001
<i>S. xylosus</i>	01111111100001
<i>S. xylosus</i>	01111111011001
<i>S. xylosus</i>	01111111010001
<i>S. xylosus</i>	01111111001001
<i>S. xylosus</i>	01111111000001
<i>S. xylosus</i>	01111011011001
<i>S. xylosus</i>	01111011111001
<i>S. xylosus</i>	01111011000001
<i>S. xylosus</i>	01111011001001
<i>S. xylosus</i>	01111111111001
<i>S. xylosus</i>	11111011101001
<i>S. xylosus</i>	01111011010001
<i>S. xylosus</i>	00111111101001
<i>S. xylosus</i>	00111111110001
<i>S. xylosus</i>	00111111111001
<i>S. xylosus</i>	01111011100001
<i>S. xylosus</i>	01111011101001
<i>S. xylosus</i>	10111011011001
<i>S. xylosus</i>	01111011110001
<i>S. xylosus</i>	10111011111001
<i>S. xylosus</i>	11111011100001
<i>S. xylosus</i>	10111111111001
<i>S. xylosus</i>	10111111110001
<i>S. xylosus</i>	10111111101001
<i>S. xylosus</i>	10111111100001
<i>S. xylosus</i>	10111111011001
<i>S. xylosus</i>	10111111010001
<i>S. xylosus</i>	10111111001001
<i>S. xylosus</i>	11111111111001
<i>S. xylosus</i>	10111111000001
<i>S. xylosus</i>	00110111111001
<i>S. xylosus</i>	11111111111011

APÉNDICE M04: Secuencias utilizadas de las cepas tipo capsuladas

1.- Serotipo capsular 1

LOCUS U10927 456 bp DNA linear BCT 11-JAN-2007

DEFINITION *Staphylococcus aureus* M type 1 capsular polysaccharide biosynthesis gene cluster, complete sequence and unknown genes.

ACCESSION U10927 REGION: 18496..18951

VERSION U10927.2 GI:16579831

KEYWORDS .

SOURCE *Staphylococcus aureus*

ORGANISM *Staphylococcus aureus*
Bacteria; Firmicutes; Bacillales; *Staphylococcus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 456)

AUTHORS Luong,T.T., Ouyang,S., Bush,K. and Lee,C.Y.

TITLE Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element

JOURNAL J. Bacteriol. 184 (13), 3623-3629 (2002)

PUBMED 12057957

REFERENCE 2 (bases 1 to 456)

AUTHORS Luong,T.T., Shu,O., Bush,K. and Lee,C.Y.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-NOV-2001) Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center, 3901 Rainbow Blvd., Kansas City, KS 66106,USA

REMARK Sequence update by submitter

COMMENT On Nov 1, 2001 this sequence version replaced gi:567035.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..456
/organism="Staphylococcus aureus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="M"
/db_xref="taxon:1280"

gene <1..>456
/gene="cap1H"
/note="ORF CM22"

CDS <1..>456
/gene="cap1H"
/note="CapH"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="type 1 capsule synthesis gene"
/protein_id="AAA64647.1"
/db_xref="GI:506704"

1 aaggggcgaa ttgatgatg aattagaatc tatgggtatt acgatacatt atttagatat
61 taaaaaattt agttttcctt tcaagttcat aaagttattg aaaaagaaaa atatagatgt
121 tgtacatagt cacatacttt ttatgagtgg attgattcaa ttactttcct ttccagcaaa
181 tgtaagaaat agaataacac actttagaac ttccaaagat agtaaagaac aatataataa
241 aataagaaaa gctagaaata agtactgaa agccattata gaaatcitta gtacgaaaaa
301 cttatatgta agtaatatag caaataggaa tttaatctca atgaaacttt ttccgaaaaa
361 acataaaact atttacaatg gatttgaat aagtaatata aacaaaaatt ttaaaaaaga
421 ggaaaatagt tttatttatg tcggtaggtt cattca

2.- Serotipo capsular 5

LOCUS SAU81973 18131 bp DNA linear BCT 10-FEB-1998

DEFINITION Staphylococcus aureus capsule gene cluster Cap5A through Cap5P genes, complete cds.

ACCESSION U81973

VERSION U81973.1 GI:1773339

KEYWORDS .

SOURCE Staphylococcus aureus

ORGANISM [Staphylococcus aureus](#)

Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 18131)

AUTHORS **Sau,S., Bhasin,N., Wann,E.R., Lee,J.C., Foster,T.J. and Lee,C.Y.**

TITLE **The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes**

JOURNAL **Microbiology 143 (Pt 7), 2395-2405 (1997)**

MEDLINE [97388587](#)

PUBMED [9245821](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 18131)

AUTHORS Kiser,K.B. and Lee,J.C.

TITLE Staphylococcus aureus cap50 and cap5P genes functionally complement mutations affecting enterobacterial common-antigen biosynthesis in Escherichia coli

JOURNAL J. Bacteriol. 180 (2), 403-406 (1998)

MEDLINE [98101481](#)

PUBMED [9440531](#)

REFERENCE 3 (bases 1 to 18131)

AUTHORS Bhasin,N., Albus,A., Michon,F., Livolsi,P.J., Park,J.S. and Lee,J.C.

TITLE Identification of a gene essential for O-acetylation of the Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide

JOURNAL Mol. Microbiol. 27 (1), 9-21 (1998)

MEDLINE [98125727](#)

PUBMED [9466251](#)

REFERENCE 4 (bases 1 to 18131)

AUTHORS Bagga,N., Wann,E.R., Foster,T.J. and Lee,J.C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (11-DEC-1996) Medicine, Brigham and Women's Hospital, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..18131
 /organism="Staphylococcus aureus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="Reynolds and Newman"
 /serotype="5"
 /db_xref="taxon:1280"
 /note="SmaI G fragment; capsule gene cluster"

gene 6500..7624

/gene="cap5G"

CDS

6500..7624
 /gene="cap5G"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="Cap5G"
 /protein_id="AAC46090.1"
 /db_xref="GI:1773346"

gene 7627..8253

CDS

```

/ gene="cap5H"
7627..8253
/ gene="cap5H"
/ note="putative O-acetyltransferase"
/ codon_start=1
/ transl_table=11
/ product="Cap5H"
/ protein_id="AAC46091.1"
/ db_xref="GI:1773347"

```

```

6481 tttcttgag gtatagcgca tggaaaaact gaaattaatg acaatagttg gtacaaggcc
6541 tgaaatcatt cgtttatcat caacgattaa agcatgtgat caatacttta atcagatatt
6601 agtacacact ggtcaaaatt atgattatac attgaaatca attttctttg atgatttggg
6661 attaagacaa cgggaccact acttagaggg agttggaagt aaccttgagg aaacgatggg
6721 gaatattatt gcgaagacat atgacgtttt attacgcgaa caaccagatg cacttttaat
6781 tcttggtgat acaaatagtt gtttagcagc agtatctgct aaacgattaa agattcctgt
6841 gttccacatg gaagcgggta atagatgctt tgatcagaat gtacctgaag aaatcaatcg
6901 taaaattggt gaccatgtca gtgatgtgaa tctaccttat acggaacata gcagacgta
6961 tttattagat gaaggcttca ataaagcgaa tatctttgtg acaggatcac cgatgacaga
7021 agtgatagaa gcgcatcgag ataaaattaa tcacagtgc gttttaaata aactaggatt
7081 agaatcgcaa caatacattt tagtatctgc gcatagagaa gagaatatcg ataatgaaa
7141 gaattttaa tcattaatga atgcgataaa tgatattgcc aaaaagtata aaatgcctgt
7201 gatttattca acgcatcaa gaagtggaa gaaaattgaa gaaagtaaat ttgaattga
7261 tccattagtt aaacagttaa agccatttgg tttctttgat tataatgcat tgcaaaaaga
7321 tgcatttgtt gtgctatcag atagtggaa attgtcagaa gagtcgtcta tttgaaagt
7381 ccttggtgct cttattcgaa cttccacaga aagaccggaa gtactagata aaggtacggt
7441 tattgtaggt ggtattacct ataacaatct aatccaatcc gttgaactag caagagagat
7501 gcaaaacaat aacgaaccga tgattgatgc tattgattat aaagacacta acgtttcgac
7561 aaaggtagtt aaaattatc aaagctataa agatattatc aatcgaaata cttggaggaa
7621 atgacgatga ggatagcgat tgaaaagata attggtttgc tgaaaaacca gtcctctaaa
7681 gaatcgaatg ttaagattca tcgcttggcg tatattacaa actcaaaatt tgatggcaat
7741 aactatatag atagatgggt taaaatcagg aattctcaca ttgggtgaata cagttatatt
7801 ggatttggta gtgattttaa taatgtagaa gtaggaagat attgttcgat atcttcggat
7861 gtaaaaattg ggttaggaaa acatcctaca cactttttta gctcatcacc gattttttat
7921 totaataata atccatttaa cataaagcaa aagtttatag actttaatga ccaaccaagc
7981 cgtacaacaa ttaaaaatga tgtgtggatt ggtgcaaatg taattattat ggatggttta
8041 acaataaata ctggtgcagt catagcagcc ggctcagttg ttactaaaaa tgtaggagca
8101 tatgaggttg ttggtgggt tctgcacaaa gtgattaaga agcgatttga caataaaaca
8161 attgaaaaac ttttgaaaag caagtgtgtg gagaaaacgc ctgataaact aaaaggattt
8221 tcggttgaat atttaataa aaaggatact taa

```

3.- Serotipo capsular 8

LOCUS SAU73374 17539 bp DNA linear BCT 13-MAR-1997

DEFINITION Staphylococcus aureus type 8 capsule genes, cap8A, cap8B, cap8C, cap8D, cap8E, cap8F, cap8G, cap8H, cap8I, cap8J, cap8K, cap8L, cap8M, cap8N, cap8O, cap8P, complete cds.

ACCESSION U73374

VERSION U73374.1 GI:1657639

KEYWORDS .

SOURCE Staphylococcus aureus

ORGANISM [Staphylococcus aureus](#)

Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 17539)

AUTHORS Sau, S. and Lee, C.Y.

TITLE Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*

JOURNAL J. Bacteriol. 178 (7), 2118-2126 (1996)

MEDLINE [96178981](#)

PUBMED [8606192](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 17539)

AUTHORS Sau, S., Sun, J. and Lee, C.Y.

TITLE Molecular characterization and transcriptional analysis of type 8 capsule genes in *Staphylococcus aureus*

JOURNAL J. Bacteriol. 179 (5), 1614-1621 (1997)

MEDLINE [97197525](#)

PUBMED [9045821](#)

REFERENCE 3 (bases 1 to 17539)

AUTHORS Sau, S. and Lee, C.Y.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-OCT-1996) Microbiology, Molecular Genetics and Immunology, University of Kansas Medical Center, 3901 Rainbow Blvd, Kansas City, KS 66160, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..17539
 /organism="Staphylococcus aureus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="Becker"
 /db_xref="taxon:1280"

[gene](#) 6570..7694
 /gene="cap8G"
[CDS](#) 6570..7694
 /gene="cap8G"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="Cap8G"
 /protein_id="[AAB49436.1](#)"
 /db_xref="GI:1657646"

[gene](#) 7697..8776
 /gene="cap8H"
[CDS](#) 7697..8776
 /gene="cap8H"
 /codon_start=1
 /transl_table=[11](#)
 /product="Cap8H"
 /protein_id="[AAB49437.1](#)"
 /db_xref="GI:1657647"

6541 cagatacgta tttcttgag gatatgcgca tggaaaaact aaaattaatg acaatagttg

```

6601 gtacaaggcc tgaaatcatt cgtttatcat caacgattaa agcatgtgat caatatttta
6661 atcagatatt agtacacact ggtcaaaatt atgattatac attgaatcaa attttctttg
6721 atgatttggg attaagacaa ccggaccact acttagaggc tgttggaagt aacctcggag
6781 aaacgatggg gaatattatt gcgaagacgt atgacgtttt attacgcgaa caaccggatg
6841 cacttttaat tcttggtgat acaaatagtt gtttagcagc agtatctgct aaacgattaa
6901 agattcctgt gtttcatatg gaagcgggta atagatgctt tgatcagaat gtacctgaag
6961 aatcaatcg taaaattggt gaccatgtca gtgatgtgaa tctaccttat acggaacata
7021 gcagacggta tttattagat gaaggcttca ataaagcgaa tatcttttg acaggatcac
7081 cgatgacaga agtgatagaa gcgcatecag ataaaattaa tcacagtgac gttttaaata
7141 aactaggatt agaaccgcaa caatacattt tagtatctgc gcataagaaa gagaatatcg
7201 ataataaaaa gaattttaaa tcattaatga atgcgataaa tgatattgcc aaaaagtata
7261 aatgcctgt gatttattca acgcatccaa gaagttggaa gaaaattgaa gaaagtaaat
7321 ttgaatttga tccattagtt aaacagttaa agccatttgg tttctttgat tataatgcat
7381 tgcaaaaaaga tgcatttgtt gtgctatcag atagtggaa attgtcagaa gagtcgtcta
7441 ttttgaagtt ccctgggtgc cttatctcga cttccacaga aagaccgaa gtactagata
7501 aaggtacggg tattgtaggt ggtattacct ataacaatct aatccaatcc gttgaactag
7561 caagagagat gcaaaacaat aacgaaccga tgattgatgc tattgattat aaagacata
7621 acgtttcgac aaaggtagtt aaaattattc aaagctataa agatattatc aatcgaataa
7681 cttggaggaa atgacgatga ggatagcgat tcttggcgc acaaacatta agcatatgtc
7741 attattatca cattatttaa accatattga tttgaacatt aatgaagtgg acattatata
7801 tactgacaaa tatgatatcg aagaacatat ccaaggcatt aataattact ataaatatag
7861 agtagatatt aaagaagatt ggtcttttat caaaaaagct attgcttact atcgatttag
7921 accatattgcc aagaaaattc ttgaagaaaa tcattatgat tttgtcatag tatggggaag
7981 ttacacaggc cacttattta aaaggtttct agaaaagaagc tacaagata aatttatttt
8041 aatatcaga gattattttt ttgaaaataa taaacttatt aagtatagaa tgaaaaagat
8101 tgttgatgcc agcaggctaa caacattatc ttcagaaggt tttcttaaat ttttacctaa
8161 atctgaaaaa tatagaatta tttatagtta taacatgaat attattagag aaagtaatgt
8221 gagcgaagaa ttcaaaaaac gatggccaat taatataggt tttataggca atggttagatt
8281 taacgagata aatcaaaaagt tgataaagga actggcaaat gattcaaggt tccatattgca
8341 atattttgga acagggctcg aagaattaga agcctttgca cgagaaaatt atattaataa
8401 tgtaacgttt tctgggtggg ttgatttgaa agaaacaccg aaatatttaa atgaaattga
8461 tatacttaat aatttgtttg gtaatcaaaa tattgcttta gatactgctt tatccataag
8521 aatgtattat gcgttgtttt taaataaacc tattattaca acagatgata cattcaccgc
8581 tacagaagct aataaattcg gactgggttt tagtattaat ccagaaaatt taaaaggtat
8641 tggatgatgaa ttgatggatt ggtataacaa tttggatgta attgacatta atcataaaag
8701 agaagcttat agaaatgatg taattggaaa taataaacag ttctatcaag agataggcag
8761 gatatttaat gagtaa

```


XI.- Resumen

La microbiota bacteriana que se ha aislado a partir de la leche de origen ovino es muy variada, siendo capaz parte de ella dar lugar al desarrollo de patologías variadas, con consecuencias de tipo sanitario y, especialmente, con repercusiones económicas de importancia. Las bacterias que se encuentran en la leche de los pequeños rumiantes proceden fundamentalmente del ambiente que rodea a los animales y también de su piel, pudiendo además ser transmitidas fácilmente de forma mecánica entre individuos, siendo incluso vehiculadas por insectos de animal a animal, como se ha demostrado en ganado vacuno.

El género *Staphylococcus* es el más frecuentemente aislado de leche ovina. Se caracteriza por una gran versatilidad metabólica, lo que le permite una buena supervivencia en las condiciones ambientales y también, en ciertas ocasiones, hace que pueda hallarse en la leche y acabar provocando procesos patológicos en la ubre, que lleguen incluso a causar la muerte del animal afectado. Esta característica facilita su gran adaptabilidad al entorno, lo que explicaría la capacidad de estas bacterias para infectar tejidos diferentes y dar lugar a patología variadas, entre las que destacan las mamitis.

Se ha llevado a cabo numerosos estudios sobre la etiología de las mamitis estafilocócicas, especialmente las mamitis clínicas y en particular las ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, que son las que suelen revestir mayor gravedad. Sin embargo, al disminuir la aparición de mastitis clínicas, con la mejora de los programas sanitarios y profilácticos, y las mayores exigencias de calidad en la producción láctea, las mastitis de tipo subclínico causadas por estafilococos coagulasa negativos (SCN) han ido ganando importancia, e interés los aspectos relativos a su conocimiento con vistas a su prevención. Todo ello ha producido un considerable estímulo en el estudio de miembros del género distintos de *S. aureus*, globalmente denominados SCN, como causantes de procesos morbosos menos evidentes. A partir de dichas investigaciones, se ha demostrado la implicación en ciertos tipos de mastitis subclínicas de diversas especies de SCN que, aunque en general no provocan cuadros clínicos agudos, sí ocasionan procesos de tipo crónico y subclínico que causan importantes pérdidas económicas.

Fruto de alguno de dichos estudios ha sido el descubrimiento de que la capacidad de permanencia de estos microorganismos en la ubre ovina puede relacionarse con la presencia, rodeando a las células de las cepas implicadas, de ciertos polisacáridos (cápsula, *slime*), que podrían ser factores de virulencia asociados a la resistencia a la opsonización, fagocitosis y al aumento de la capacidad de adherencia de los estafilococos a diversas

estructuras del hospedador. Estos polisacáridos incluso han sido asociados a una mayor resistencia a los tratamientos antibióticos.

La descripción de tales estructuras, junto con la existencia de otros factores de virulencia en cepas de especies no consideradas patógenas *per se*, ha favorecido un resurgimiento en el estudio de los mecanismos básicos de patogenicidad y factores de virulencia de los estafilococos. Por otro lado, los datos que se han ido obteniendo en lo relativo a las infecciones hospitalarias están impulsando el estudio en profundidad de dichas especies bacterianas y de sus factores de virulencia asociados. La descripción de resistencias bacterianas relacionadas con la presencia de estructuras superficiales como el mucus o *slime*, impulsa el aumento del volumen de investigación relacionada con el control inmunológico de dichas infecciones.

Existe una gran cantidad de estudios efectuados en medicina humana sobre la existencia de cepas de *S. aureus* capsuladas, la predominancia de ciertos serotipos capsulares, y la capacidad de otras especies de estafilococos, en especial *S. epidermidis*, de adherirse de forma tenaz a soportes inertes. Por el contrario, son escasos los efectuados en medicina veterinaria sobre cepas aisladas de la especie ovina.

Puesto que opinamos que el estudio de la existencia de dichas estructuras y otros posibles factores de virulencia en cepas aisladas de leche ovina facilitará un mayor conocimiento sobre los posibles agentes causales de mamitis ovinas, el propósito de este trabajo se centró en su detección en cepas de *Staphylococcus* aisladas de leche de ovejas de aptitud láctea y en la observación de la influencia de factores nutricionales sobre el desarrollo y permanencia de dichas estructuras en las cepas aisladas.

Hemos llevado a cabo el aislamiento, utilizando metodología microbiológica convencional, de 246 cepas del género *Staphylococcus* presentes en muestras individuales o colectivas de leche ovina procedentes de ovejas de aptitud lechera que presentaban mastitis clínica, subclínica, o de individuos sanos, como control de la microbiota presente. Las cepas aisladas fueron conservadas tras el mínimo de pases en medios de cultivo de laboratorio y se identificaron utilizando una combinación de catorce pruebas bioquímicas principales. Se aislaron cepas pertenecientes a 8 especies: *S. aureus* (44,31%), *S. epidermidis* (29,67%), *S. xylosum* (16,67%), *S. gallinarum* (3,66%), *S. hyicus* subesp. *chromogenes* (2,03%), *S. simulans* (1,63%), *S. haemolyticus* (1,22%) y *S. hominis* (0,81%).

Las cepas de *S. aureus* fueron fagotipadas con el *set* internacional y con tres fagos aislados de cepas lisógenas del propio estudio, siendo en general poco sensibles a RTD a los fagos del *set* internacional (sólo 2 cepas, el 0,81%) mientras que sí lo fueron a los fagos de ovino aislados (entre el 32,11 y el 57,80% de las cepas sensibles, según el fago considerado).

Los factores de virulencia estudiados comprendieron factores de superficie (cápsula, *slime*, hidrofobicidad y otros), factores de virulencia enzimáticos y la producción de bacteriocinas.

La detección de cápsula en las cepas de *S. aureus* se efectuó mediante métodos fenotípicos (detección de la presencia de *clumping factor*, crecimiento en agar blando suero –SSA–), y moleculares (PCR frente a los serotipos capsulares 1, 5 y 8). Se determinó que 29 cepas (26,60%) eran capsuladas; mediante la PCR *multiplex* capsular puesta a punto en este estudio, 15 de las 109 cepas de *S. aureus* eran portadoras de los genes del serotipo 8 (13,76%), uno de los dos más frecuentemente aislados en leche de pequeños rumiantes. El intento de obtener sueros hiperinmunes en conejo para llevar a cabo el serotipado capsular fue infructuoso.

La adherencia a superficies inertes se valoró empleando el método de Christensen, cultivando las cepas aisladas en caldo BHI, incubando durante 48 horas, tiñendo el cúmulo bacteriano con cristal violeta y valorando su cantidad mediante una baremación en tres puntos, de manera que se consideró adherente toda cepa con una puntuación mayor que 5. Siguiendo esta metodología, 90 cepas resultaron adherentes (36,58%), de las que la mayoría era *S. aureus* (44,44% de las adherentes) aunque la especie que presentaba más cepas adherentes fue *S. epidermidis* (41,09% de las de su especie). De las 6 cepas de puntuación máxima, la mitad era *S. xyloso*.

Para la determinación de la formación de *slime* se utilizó el agar Rojo Congo. Puesto que la respuesta inicial no era la esperada, se estudió la influencia que las materias primas, la proporción y el método de esterilización del colorante, el tiempo y temperatura de incubación, así como la concentración de ClNa ejercían sobre las características diferenciales del medio. Una vez estudiadas dichas variables, se determinó que, para obtener los mejores resultados, el agar Rojo Congo se debía elaborar con las materias primas habituales, con el colorante al 0,12% esterilizado con el medio, sin ClNa añadido y realizando una incubación a 37°C durante 24 horas, seguida de otras 24 horas a temperatura ambiente. Utilizado de esta manera, sólo 30 (12,19%) de los aislados podían considerarse productores de *slime* según el criterio clásico; de ellos, 20 pertenecían a la

especie *S. aureus*. Comparando estos resultados con los de adherencia a superficies inertes, según el método de Christensen, sólo 12 de las cepas eran productoras de *slime* y adherentes (4,87% del total).

La hidrofobicidad de los aislados se determinó por la técnica MATS, utilizando *p*-xileno y hexadecano tras dos pases rápidos en agar Columbia sangre, llevando a cabo la prueba simultáneamente partiendo de una suspensión común. El porcentaje de cepas hidrófobas o de hidrofobicidad intermedia fue superior utilizando *p*-xileno (39,4%) que hexadecano (26,8%), con algunas diferencias interespecíficas.

La detección de genes de factores de adherencia se efectuó empleando varias PCR múltiples. Ninguna de las especies resultó negativa a todos ellos, aunque no se detectó ninguna cepa positiva a los factores *fnbB* e *icaAB*. El porcentaje de cepas positivas, en orden decreciente de frecuencia, fue: *fnbA* (56,50%), *atlE* (33,74%), *fbe* (30,49%), *fib* (29,67%), *bap* (10,98%), *cna* (9,76%), *icaA* (8,13%) y *bbp* (0,41%). Proporcionalmente, *S. epidermidis* fue la especie en la que más genes se detectaron, seguida de *S. aureus*. Por otro lado, el 39,02% de aislados de *S. xylosus* fueron negativos a todos los factores. No parece haber correlación entre los genes de los factores de adherencia detectados y la detección fenotípica de la adherencia a superficies inertes o la producción de *slime*.

Puesto que no son sólo las propiedades de superficie los únicos factores de virulencia que considerar entre los estafilococos, se determinó la existencia de algunos otros de tipo enzimático, comparando su frecuencia relativa entre los aislados de *S. aureus* con respecto al resto de cepas. La ureasa resultó el factor más frecuente: todos los *S. aureus* la presentaron y un 98,54% del resto de los aislados, seguida por la lecitinasa y fosfatasa, entre los SCN, y la DNAsa y fosfatasa en *S. aureus*. Los SCN presentaron globalmente más frecuentemente lipasas, y *S. epidermidis* lecitinasa, que *S. aureus*, mientras que éste presentó más actividad DNAsa y hialuronidasa que el resto de las especies.

La detección de bacteriocinas se efectuó mediante el uso de una cepa de *Cellulomonas fimi*, sembrada por hisopado y con incubación de 48 horas, las 24 primeras a 37°C y las últimas a 30°C. El 63,82% de las cepas presentaron actividad, especialmente intensa entre *S. epidermidis* y *S. simulans*, aunque fue entre los miembros de la especie *S. aureus* donde apareció el mayor porcentaje de cepas positivas (el 80,73% de la especie).

XII.- Bibliografía

- Albizu, I.; Baselga, R.; De la Cruz, M.; Monleón, E.; Amorena B. 1993. Implicaciones ecológicas de la producción de exopolisacárido en *Staphylococcus aureus*. V Jornadas sobre producción animal. Zaragoza 11-13 de mayo de 1993: 525-527.
- Albus, A.; Arbeit, R.D.; Lee, J.C. 1991. Virulence of *Staphylococcus aureus* mutants altered in type 5 capsule production. *Infect. Immun.* **59(3)**: 1008-1014.
- Alves, P.D.; McCulloch, J.A.; Even, S.; Le Maréchal, C.; Thierry, A.; Grosset, N.; Azevedo, V.; Rosa, C.A.; Vautor, E.; Le Loir, Y. 2009. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. *Vet. Microbiol.* **137**: 190-195.
- Anderson, J.C. 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Br. Vet. J.* **132**: 229-243.
- Anderson, J.C. 1983. Veterinary aspects of staphylococci. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and staphylococcal infections*. London. Academic Press; pp. 193-242.
- Anderson, J.C. 1984. Absence of encapsulation in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* **37**: 359-361.
- Anónimo. 1984. Manual Difco. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. Difco Laboratories Inc. Detroit. Michigan .USA. 10ª edición.
- Arbeit, R.D.; Karakawa, W.W.; Vann, W.F.; Robbins, J.B. 1984. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2**:85-91.
- Arciola, C.R.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2151-2156.
- Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Gamberini, S.; Cervellati, M.; Donati, E.; Montanaro, L. 2002a. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* **23**: 4233-4239.
- Arciola, C.R.; Campoccia, D.; Montanaro, L. 2002b. Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **2**: 478-484.
- Baddour, L.M.; Barker, L.P.; Christensen, G.D.; Parisi, J.T.; Simpson, W.A. 1990. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 676-679.
- Baird-Parker, A.C. 1974. Genus II. *Staphylococcus*. En: Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E.(eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8ª Edición. Part 14. pp. 483-489. Williams & Wilkins. Baltimore.

- Baldassarri, L.; Donelli, G.; Gelosia, A.; Simpson, A.W.; Christensen, G.D. 1997. Expression of slime interferes with *in vitro* detection of host protein receptors of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **65**: 1522-1526.
- Baleona, M.C.; Moriñigo, M.A.; Borrego, J.J. 2001. Hydrophobicity and adhesion to fish cells and mucus of *Vibrio* strains isolated from infected fish. *Int. Microbiol.* **4**:21-26.
- Barber, C.; Taga, S. 1965. Contribution a l'étude des antigènes des staphylocoques. III. Variations quantitatives et qualitatives des antigènes de souches appartenant a des lysotypes différents. Modifications qualitatives et quantitatives des antigènes d'une même souche. *Ann. Inst. Pasteur* **109**: 487-498.
- Barbier Frebourg, N.; Lefevre, S.; Baert, S.; Lemeland, J.F. 2000. PCR-based assay for discriminating between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 877-880.
- Barker, L.P.; Simpson, W.A.; Christensen, G.D. 1990. Differential production of slime under aerobic and anaerobic conditions. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2578-9.
- Barretti, P.; Montelli, A.C.; Batalha, J.E.N.; Caramori, J.C.T.; Cunha, M.L. 2009 . The role of virulence factors in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients. *BMC Infect. Dis.* **9**:212.
- Baselga, R.; Penadés, J.R.; Albizu, I.; Amorena, B. 1991. Comparación entre cepas mucosas de *Staphylococcus aureus* y sus variantes no mucosas con respecto a la sensibilidad a antibióticos. *ITEA* **11**: 754-756.
- Baselga, R.; Albizu, I.; Penadés, J.R.; Aguilar, B.; Iturralde, M.; Amorena, B. 1992. Hydrophobicity of ruminant mastitis *Staphylococcus aureus* in relation to bacterial aging and slime production. *Curr. Microbiol.* **25**: 173-179.
- Baselga, R.; Albizu, I.; de la Cruz, M.; del Cacho, E.; Barberan, M.; Amorena, B. 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. *Infect. Immun.* **61**: 4857-4862
- Baselga, R.; Amorena, B. 1994 . *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. *Vet. Microbiol.* **39**: 195-204.
- Bayles, K.W.; Wesson, C.A.; Liou, L.E.; Fox, L.K.; Bohach, G.A.; Trumble, W.R. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**: 336-342.
- Bayston, R.; Penny, S.R. 1972. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus* SIIA: a possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev. Med. Child. Neurol.* **14**: 25-28.
- Bayston, R.; Rodgers, J. 1990. Production of extra-cellular slime by *Staphylococcus epidermidis* during stationary phase of growth: its association with adherence to implantable devices. *J. Clin. Pathol.* **43**: 866-870.

- Beck, G.; Puchelle, E.; Plotkowsky, C.; Peslin, R. 1988a. Effect of growth on surface charge and hydrophobicity of *Staphylococcus aureus*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **139**: 655-664.
- Beck, G.; Puchelle, E.; Plotkowski, C.; Peslin, R. 1988b. *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* surface properties in relation to their adherence to human buccal epithelial cells. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **140**: 563-567.
- Beenken, K.E.; Dunman, P.M.; McAleese, F.; Macapagal, D.; Murphy, E.; Projan, S.J.; Blevins, J.S.; Smeltzer, M.S. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* **186**(14): 4665-4684.
- Begun, J.; Gaiani, J.M.; Rohde, H.; Mack, D.; Calderwood, S.B.; Ausubel, F.M.; Sifri, C.D. 2007. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog.* **3**: 526-540.
- Bergonier, D.; de Crémoux, R.; Rupp, R.; Lagriffoul, G.; Berthelot, X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* **34**: 689-716.
- Beveridge, T.J.; Graham, L.L. 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**: 684-705.
- Blobel, H.; Brückler, J.; Kitzrow, D.; Schaeg, W. 1980. Antiphagocytic factors of *Staphylococcus aureus*. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **3**: 447-453.
- Boutonnier, A.; Nato, F.; Bouvet, A.; Lebrun, L.; Audurier, A.; Mazie, J.C.; Fournier, J.M. 1989. Direct testing of blood cultures for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 989-993.
- Brouillette, E.; Grondin, G.; Shkreta, L.; Lacasse, P.; Talbot, B.G. 2003. *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb. Pathog.* **35**: 159-168.
- Burriel, A.R. 1997. Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. *Vet. Rec.* **140**: 419-423.
- Burriel, A.R. 1998. Isolation of coagulase-negative staphylococci from the milk and environment of sheep. *J. Dairy Res.* **65**: 139-142.
- Burriel, A.R.; Scott, M. 1998. A comparison of methods used in species identification of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of sheep. *Vet. J.* **155**: 183-188.
- Bykowska, K.; Ludwicka, A.; Wegrzynowicz, Z.; Lopaciuk, S.; Kopec, M. 1985. Anticoagulant properties of extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Thromb. Haemost.* **54**: 853-856.
- Cameron, C.M. 1966. The immunizing properties of a *Staphylococcus aureus* variant possessing surface antigen. *Onderst. J. Vet. Res.* **33**: 25-38.

- Chilek, K.; Simurda, M.C. 2003. *Serratia marcescens*: morphological studies on swarming motility and biofilm formation. [http:// thecollege.wlu.edu / research_service / RELee /Bio2003 /ChilekFinal.asp](http://thecollege.wlu.edu/research_service/RELee/Bio2003/ChilekFinal.asp).
- Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Bisno, A.L.; Beachey, E.H. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* **37**: 318-326.
- Christensen, G.D.; Parisi, J.T.; Bisno, A.L.; Simpson, W.A.; Beachey, E.H. 1983. Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 258-269.
- Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M.; Beachey, E.H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 996-1006.
- Christensson, B. ; Boutonnier, A.; Ryding, U.; Fournier, J.M. 1991. Diagnosing *Staphylococcus aureus* endocarditis by detecting antibodies against *S. aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8. *J. Infect. Dis.* **163**: 530-533.
- Christie, R.; Wilson, H. 1941. A test of staphylococcal fibrinolysis. *Aust. J. Expl. Biol. Med. Sci.* **19**: 329-332
- Cifrian, E.; Guidry, A.J.; O'Brien, C.N.; Marquardt, W.W. 1995. Effect of alpha-toxin and capsular exopolisaccharide on the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured teat; ductal and secretory mammary epithelial cells. *Res. Vet. Sci.* **58**: 20-25.
- Clarke, S.R.; Foster, S.J. 2006. Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Adv. Microb. Physiol.* **51**: 187-225.
- Clements, A.C.; Taylor, D.J.; Fitzpatrick J.L. 2003. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *J. Dairy Res.* **70**: 139-148.
- Clutterbuck, A.L.; Woods, E.J.; Knottenbelt, D.C.; Clegg, P.D.; Cochrane, C.A.; Percival, S.L. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* **121**:1-17.
- Cobb, B.D.; Clarkson, J.M. 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res.* **22**: 3801-3805.
- Cocchiario, J.L.; Gomez, M.I.; Risley, A.; Solinga, R.; Sordelli, D.O.; Lee, J.C. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **59**: 948-960.
- Corrales, J.C.; Sánchez, A.; Luengo, C.; Contreras, A. 1999. Variación en la prevalencia; etiología y resistencia antibiótica entre rebaños caprinos sometidos a control de mamitis. *Med. Vet.* **16**: 187-195.

- Corstvet, R.E.; Gentry, M.J.; Newman, P.R.; Rummage, J.A.; Confer, A.W. 1982. Demonstration of age-dependent capsular material on *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 1123-1126.
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-22.
- Craven, N.; Williams, M.R. 1985. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet. Immun. Immunopathology* **10**: 71-127.
- Cree, R.G.; Aleljung, P.; Paulsson, M.; Witte, W.; Noble, W.C.; Ljungh, A.; Wadström, T. 1994. Cell surface hydrophobicity and adherence to extra-cellular matrix proteins in two collections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol. Infect.* **112**: 307-314.
- Cree, R.G.; Noble, W.C. 1995. *In vitro* indices of tissue adherence in *Staphylococcus intermedius*. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 168-170.
- Cucarella, C.; Solano, C.; Valle, J.; Amorena, B.; Lasa, I.; Penadés, J.R. 2001. *Bap*; a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**: 2888-2896.
- Cucarella, C.; Tormo, M.A.; Knecht, E.; Amorena, B.; Lasa, I.; Foster, T.J.; Penadés, J.R. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.* **70**: 3180-3186.
- Cucarella, C.; Tormo, M.A.; Úbeda, C.; Trotonda, M.P.; Monzón, M.; Peris, C.; Amorena, B.; Lasa, I.; Penadés, J.R. 2004. Role of biofilm-associated protein *Bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **72**: 2177-2185.
- Dall, L.; Wang, J.; Herndon, B.; Suvarna, P. 1984. Bacterial characterization in *Staphylococcus epidermidis* septicemia. *J. Lab. Clin. Med.* **124**: 802-807.
- Das, A.K.; Panda, S.N.; Kar, B.C. 1990. Studies on *Staphylococcus aureus* of bovine origin including phage typing. *Ind. J. Anim. Hlth.* June: 17-22.
- Daum, R.S.; Fattom, A.; Freese, S.; Karakawa, W. 1994. Capsular polysaccharide serotypes of coagulase-positive staphylococci associated with tenosynovitis; osteomyelitis; and other invasive infections in chickens and turkeys: evidence for new capsular types. *Avian Dis.* **38**: 762-771.
- Davenport, D.S.; Massanari, R.M.; Pfaller, M.A.; Bale, M.J.; Streed, S.A.; Hierholzer, W.J.Jr. 1986. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J. Infect. Dis.* **153**: 332-339.

- Davies, A.J.; Stone, J.W. 1987. Problemas habituales de la quimioterapia de las infecciones por estafilococos coagulasa negativos. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* **2**: 351-355.
- De la Cruz, M.; Baselga, R.; Albizu, I.; Monleón, E.; Marco, J.; Contreras, A.; Montoro, V.; Amorena, B. 1993. Producción y variación de fase del exopolisacárido de estafilococos coagulasa-negativos aislados de mamitis. V Jornadas sobre producción animal. Zaragoza. 11-13 de mayo de 1993: pp. 522-524.
- De la Fuente López R. Estudio del género *Staphylococcus* (Rosenbach 1884) en ovinos (estirpes coagulasa negativas y agente etiológico de la enfermedad de los abscesos). Tesis doctoral, Facultad de veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.(1985)
- De Magalhães Lopes, C.A.; Moreno, G.; Curi, P.A.; Gottschalk, A.F.; Modolo, J.R.; Horacio, A.; Correa, A.; Pavan, C. 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. *Br. Vet. J.* **146**: 443-448.
- De Oliveira, S.S.; Abrantes, J.; Cardoso, M.; Sordelli, D.; Bastos, M.C.F. 1998 Staphylococcal strains involved in bovine mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 287-291.
- DeLeo, F.R.; Diep, B.A.; Otto, M. 2009. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **23**: 17-34.
- Devriese, L.A. 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. Appl. Bacteriol.* **56**: 215-220.
- Dos Santos Nascimento, J.; Carlin Fagundes, P.; Vasconcelos de Paiva Brito, M.A.; Netto dos Santos, K.R.; de Freire Bastos, M.C. 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **106**: 61-71.
- Ducha, J.; Latre, M.V. 1992. Factores de virulencia en cepas de estafilococos coagulasa negativos aislados de mamitis ovinas. En: Amorena, B.; Baselga, R.; Marco, J.C., (eds). Mamitis Ovina I. *Ovis* , **21**: 45-58.
- Ekstedt, R.D. 1963a. Studies on immunity to staphylococcal infection in mice. I. Effect of dosage; viability; and interval between immunization and challenge on resistance to infection following injection of whole cell vaccines. *J. Infect. Dis.* **112**: 143-151.
- Ekstedt, R.D. 1963b. Studies on immunity to staphylococcal infection in mice. II. Effect of immunization with fractions of *Staphylococcus aureus* prepared by physical and chemical methods. *J. Infect. Dis.* **112**: 152-157.
- Entenza, J.M.; Foster, T.J.; Ni Eidhin, D.; Vaudaux, P.; Francioli, P.; Moreillon, P. 2000. Contribution of clumping factor b to pathogenesis of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **68**: 5443-5446.

- Fattom, A.; Shepherd, S.; Karakawa, W. 1992. Capsular polysaccharide serotyping scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 3270-3272.
- Fattom, A.; Schneerson, R.; Watson, D.C.; Karakawa, W.W.; Fitzgerald, D.; Pastan, I.; Li, X.; Shiloach, J.; Bryla, D.A. 1993. Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A. *Infect. Immun.* **61**: 1023-1032.
- Fattom, A.I.; Sarwar, J.; Ortiz, A.; Naso, R. 1996. A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. *Infect. Immun.* **64**: 1659-1665.
- Filloux, A.; Vallet, I. 2003. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Med./Scie.* **19**: 77-83.
- Finkelstein, R.A.; Sulkin, S.E. 1958. Characteristics of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci in serum-soft agar. *J. Bacteriol.* **75**:339-344.
- Fisher, M.W.; Devlin, H.B.; Erlandson, A.L. 1963. A new staphylococcal antigen. *Nature* (London) **199**: 1074-1075.
- Fisher, S. 1960. A heat stable protective staphylococcal antigen. *Aust. J. Exp. Biol.* **38**: 479-486.
- Fluckiger, U.; Ulrich, M.; Steinhuber, A.; Döring, G.; Mack, D.; Landmann, R.; Goerke, C.; Wolz, C. 2005. Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect. Immun.* **73**: 1811-1819.
- Forsgren, A.; Ghetie, V.; Lindmark, R.; Sjöquist, J. 1983. Protein A and its exploitation. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Vol.2. The Organism *In Vivo* and *In Vitro*. Academic Press.
- Forsum, U.; Forsgren, A.; Hjelm, E. 1972. Role of protein A in the serum-soft agar technique. *Infect. Immun.* **6**: 583-586.
- Foster, T.J. 2009. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol.* **20**: 456-70.
- Fournier, J.M.; Vann, W.F.; Karakawa, W.W. 1984. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* type 8 capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **45**: 87-93.
- Fournier, J.M.; Hannon, K.; Moreau, M.; Karakawa, W.W.; Vann, W.F. 1987. Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **138**: 561-567.
- Fox, K.F.; Stewart, G.C.; Fox, A. 1998. Synthesis of microcapsule by *Staphylococcus aureus* is not responsive to environmental phosphate concentrations. *Infect. Immun.* **66**: 4004-4007.

- Fox, L.K.; Zadoks, R.N.; Gaskins, C.T. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* **107**: 295-299.
- Fragkou, I.A.; Mavrogianni, V.S.; Cripps, P.J.; Gougoulis, D.A.; Fthenakis, G.C. 2007. The bacterial flora in the teat duct of ewes can protect against and can cause mastitis. *Vet. Res.* **38**: 525-545.
- Freeman, D.J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **42**: 872-874.
- Fthenakis, G.C.; Jones, J.E.T. 1990. The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. *J. Comp. Path.* **102**: 211-219.
- Fthenakis, G.C.; Marples, R.R.; Richardson, J.F.; Jones, J.E. 1994. Some properties of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of ovine mastitis. *Epidemiol. Infect.* **112**: 171-176.
- Fule, R.P.; Iyer, L.; Saoji, A.M. 1996. Study of pathogenicity markers of staphylococci isolated from clinical specimens. *Ind. J. Pathol. Microbiol.* **39**: 127-130.
- Galliani, S.; Viot, M.; Cremieux, A.; Van der Auwera, P. 1994. Early adhesion of bacteremic strains of *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene: influence of hydrophobicity; slime production; plasma; albumin; fibrinogen; and fibronectin. *J. Lab. Clin. Med.* **123**: 685-692.
- Gallimore, B.; Gagnon, R.F.; Subang, R.; Richards, G.K. 1991. Natural history of chronic *Staphylococcus epidermidis* foreign body infection in a mouse model. *J. Infect. Dis.* **164**: 1220-1223.
- García Armesto, M.R. 1990. *Calidad higiénica y sanitaria de la leche de oveja en Castilla y León*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Gemmell, C.G. 1983. Extracellular toxins and enzymes of coagulase-negative staphylococci. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and staphylococcal infections*. London. Academic Press; pp. 809-827.
- Gilbert, I. 1931. Dissociation in an encapsulated staphylococcus. *J. Bacteriol.* **21**: 157-160.
- Gillespie, B.E.; Owens, W.E.; Nickerson, S.C.; Oliver, S.P. 1999. Deoxyribonucleic acid fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from heifer mammary secretions and from horn flies. *J. Dairy Sci.* **82**: 1581-1585.
- Giridhar, G.; Kreger, A.S.; Myrvik, Q.N.; Gristina, A.G. 1994. Inhibition of *Staphylococcus* adherence to biomaterials by extracellular slime of *S. epidermidis* RP12. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**: 1289-1294.
- González-Fernández, A.; Faro, J.; Fernández, C. 2008. Immune responses to polysaccharides: Lessons from humans and mice. *Vaccine* **26**: 292-300.

- González Rodríguez, M.C. 1995. *Etiología y diagnóstico de las mastitis subclínicas en el ganado ovino de aptitud láctea*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Gonzalo, C.; Ariznabarreta, A.; Carriedo, J.A.; San Primitivo, F. 2002. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* **85**: 1460-1467.
- Goñi, P.; Vergara, Y.; Ruiz, J.; Albizu, I.; Vila, J.; Gómez-Lus, R. 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **23**: 268-272.
- Gray, B.M. 1979. ELISA methodology for polysaccharide antigens: protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes. *J. Immun. Methods* **28**: 187-192.
- Greene, R.T.; Lammler, C.; Schmitt, M. 1992. Surface hydrophobicity of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus*. *Res. Vet. Sci.* **52**: 90-96.
- Gross, M.; Cramton, S.E.; Götz, F.; Peschel, A. 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**: 3423-3426.
- Guérin-Faubleé, V.; Brun, Y. 1999. La résistance aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale. *Rev. Méd. Vét.* **150**: 299-312.
- Guidri, A.; Fattom, A.; Patel, A.; O'Brien, C.; Sheperd, S.; Lohuis, J. 1998. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Am. J. Vet. Res.* **59**: 1537-1539.
- Guidry, A.J.; Oliver, S.P.; Squiggins, K.E.; Erbe, E.F.; Dowlen, H.H.; Hambleton, C.N.; Berning, L.M. 1991. Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* **74**: 3360-3369.
- Guidry, A.J.; O'Brien, C.N.; Oliver, S.P.; Dowlen, H.H.; Douglass, L.W. 1994. Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. *J. Dairy Sci.* **77**: 2965-2974.
- Hájek, V. 1978. Identification of enterotoxigenic staphylococci from sheep and sheep cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 264-268.
- Han, H.R.; PaK, S.I.; Kang, S.W.; Jong, W.S.; Youn, C.J. 2000. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine development. I. Capsular polysaccharide typing; isolation and purification of the strains. *J. Vet. Sci.* **1**: 53-60.
- Hancock, I.C. 1989. Encapsulation of coagulase-negative staphylococci. *Zentralbl. Bakteriol.* **272**: 11-18.
- Harraghy, N.; Hussain, M.; Hagggar, A.; Chavakis, T.; Sinha, B.; Herrmann, M.; Flock, J.I. 2003. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* **149**: 2701-2707.

- Harrigan, W.F; McCance, M.E. 1966. *Laboratory methods in Microbiology*. Academic Press. London & New York.
- Hart, M.E.; Hart, M.J.; Roop, A.J. 2009. Genotypic and phenotypic assessment of hyaluronidase among type strains of a select group of staphylococcal species. *Int. J. Microbiol.* Article ID 614371 doi: 10.1155/2009/614371.
- Hartford, O.; McDevitt, D.; Foster, T.J. 1999. Matrix-binding proteins of *Staphylococcus aureus*: functional analysis of mutant and hybrid molecules. *Microbiology* **145**: 2497-2505.
- Hébert, G.A.; Crowder, C.G.; Hancock, G.A.; Jarvis, W.R.; Thornsberry, C. 1988. Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and others members of the family Micrococcaceae. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1939-1949.
- Heikens, E.; Fleer, A.; Paauw, A.; Florijn, A.; Fluit, A.C. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2286-2290.
- Heilmann, C.; Schewitzer, O.; Gerke, C.; Vanittanalom, N.; Mack, D.; Götz, F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **20**: 1083-1091.
- Hjelm, E.; Lundell Etherden, I. 1991. Slime production by *Staphylococcus saprophyticus*. *Infect. Immun.* **59**: 445-448.
- Hochkeppel, H.K.; Braun, D.G.; Vischer, W.; Imm, A.; Sutter, S.; Staeubli, U.; Guggenheim, R.; Kaplan, E.L.; Boutonnier, A.; Fournier, J.M. 1987. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to polysaccharide types 5 and 8. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 526-530.
- Hogt, A.H.; Dankert, J.; Feijen, J. 1983. Encapsulation; slime production and surface hydrophobicity of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **18**: 211-215.
- Hunt, G.A.; Moses, A.J. 1958. Acute infection of mice with Smith strain of *Staphylococcus aureus*. *Science* **128**: 1574-1575.
- Hussain, M.; Hastings, J.G.; White, P.J. 1991. A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **34**: 143-147.
- Hussain, M.; Wilcox, M.H.; White, P.J.; Faulkner, M.K.; Spencer, R.C. 1992. Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. *J. Hosp. Infect.* **20**: 173-184.
- Hussain, M.; Wilcox, M.H.; White, P.J. 1993. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol. Rev.* **10**: 191-207.

- Ichiman, Y. 1984. Applications of fluorescent antibody for detecting capsular substances in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Appl. Bacteriol.* **56**: 311-316.
- Ikeda, F.; Yokota, Y.; Mine, Y. 1991. Formation of biofilm by slime producing *Staphylococcus epidermidis* and bactericidal activity of cefazolin. *Kansenshogaku-Zasshi.* **65**: 875-82
- Ishak, M.A.; Groschel, D.H.; Mandell, G.L.; Wenzel, R.P. 1985. Association of slime with pathogenicity of coagulase negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 1025-9.
- Jarp, J. 1989. Surface properties of *Staphylococcus aureus* isolated from caprine mastitis. *Acta vet.scand.* **30**: 335-339.
- Jarp, J. 1990. Staphylococci from mastitis in ruminants: virulence properties and classification of species. *Dissert. Abstr. Intern. C.Worldwide* **51**: 209-C.
- Jarp, J. 1991. Classification of coagulase - negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.* **27**: 151-158.
- Jeljaszewicz, J.; Switalski, L.M.; Adlam, C. 1983. Staphylocoagulase and clumping factor. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Vol. 2. The Organism *In Vivo* and *In Vitro*. Academic Press.
- Johne, B.; Jarp, J.; Haaheim, L.R. 1989. *Staphylococcus aureus* exopolysaccharide *in vivo* demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1631-1635.
- Johnson, G.M.; Lee, D.A.; Regelman Gary E.D.; Peters, G.; Quie, P.G. 1986. Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect. Immun.* **54**: 13-20.
- Johnston, B.A.; Eisen, H.; Fry, D. 1991. An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Laboratory Animal Science* **41**: 15-21.
- Jones, J.E.T. 1991. Mastitis in sheep. En: Owen, J.B.; Axford, R.F.E. (eds). *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. pp. 412-423. Wallingford; UK. CAB International.
- Jonsson, P.; Wadström, T. 1984. Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT). *Curr. Microbiol.* **10**: 203-210.
- Julianelle, L.A.; Weighard, C.W. 1934. Immunological specificity of carbohydrates derived from staphylococci. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* **31**: 947-949.
- Kalorey, D.R.; Shanmugam, Y.; Kurkure, N.V.; Chousalkar, K.K.; Barbuddhe, S.B. 2007. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *J. Vet. Sci.* **8**: 151-154.

- Karadzhev, I.; Mekhandzhiiska, L.; Gerganova, E. 1981. Coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of cows with subclinical mastitis. *Vet. Med. Nauki* **18**: 51-54.
- Karakawa, W.W.; Young, D.A. 1979. Immunological specificity of heat-stable opsonins in immune and nonimmune sera and their interaction with non-encapsulated and encapsulated strains of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **25**: 175-186.
- Karakawa, W.W.; Vann, W.F. 1982. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Semi. Infect. Disease* **4**: 285-293.
- Karakawa, W.W.; Fournier, J.M.; Vann, W.F.; Arbeit, R.; Schneerson, R.S.; Robbins, J.B. 1985. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 445-447.
- Kenny, G.E.; Foy, H.M. 1975. Detection and quantitation of circulating polysaccharide in pneumococcal pneumonia by immunoelectroosmophoresis (counterelectrophoresis) and rocket electrophoresis. En: Schlessinger, D. (ed.). *Rapid diagnostic techniques in clinical microbiology*. pp. 97-102. American Society for Microbiology. Washington; D.C.
- Kenny, K.; Reiser, R.F.; Bastida-Corcuera, F.D.; Norcross, N.L. 1993. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 706-707.
- Klug, D.; Wallet, F.; Kacet, S.; Courcol, R.J. 2003. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3348-3350.
- Knobloch, J.K-M; Bartscht, K.; Sabottke, A.; Rohde, H.; Feucht, H-H.; Mack, D. 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional *RsbU*, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bact.* **183**: 2624-2633.
- Koenig, M.G. 1962. Factors relating to the virulence of Staphylococci. I. Comparative studies on two colonial variants. *Yale J. Biol. Med.* **34**: 537-559.
- Koenig, M.G.; Melly, M.A.; Rogers, D.E. 1962. Factors relating to the virulence of staphylococci. *J. Exp. Med.* **116**: 601-610.
- Koenig, M.G.; Melly, M.A. 1965. The importance of surface antigens in staphylococcal virulence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **128**: 231-250.
- Kouidhi, B.; Zmantar, T.; Hentati, H.; Bakhrouf, A. 2010. Cell surface hydrophobicity; biofilm formation; adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. *Microb. Pathog.* Mar.16.
- Lafi, S.Q.; Al-Majali, A.M.; Rousan, M.D.; Alawneh, J.M. 1998. Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* **33**: 171-181.

- Lambe, D.W.; Ferguson, K.P.; Keplinger, J.L.; Gemmell, C.G.; Kalbfleish, J.H. 1990. Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi*, and three other coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors. *Can. J. Microbiol.* **36**: 455-463.
- Lammers, A.; Kruijt, E.; Van de Kuijt, C.; Nuijten, P.J.M.; Smith, H.E. 2000. Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis? *Microbiology* **146**: 981-987.
- Lányi, B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. En: Colwell, R.R. ; Grigorova, R. (eds). *Methods in microbiology*. Vol 19. Current Methods for classification and identification of microorganisms. Academic Press.
- Lee, J.C.; Betley, M.J; Hopkins, C.A.; Perez, N.E.; Pier, G.B. 1987a. Virulence studies; in mice; of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. *J. Infec. Dis.* **156**: 741-750.
- Lee, J.C.; Michon, F.; Perez, N.E.; Hopkins, C.A.; Pier, G.B. 1987b. Chemical characterization and immunogenicity of capsular polysaccharide isolated from mucoid *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **55**: 2191-2197.
- Lee, J.C.; Takeda, S.; Livolsi, P.J.; Paoletti, L.C. 1993. Effects of *in vitro* and *in vivo* growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **61**: 1853-1858.
- Lee, J.C. 1996. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **4**:162-166.
- Lee, J.C.; Hopkins, C.A.; Pier, G.B. 1985. The role of the *Staphylococcus aureus* capsule in abscess formation. En: Jeljaszewicz, J. (ed) The Staphylococci. *Zbl. Bakt. Suppl.***14**: pp. 219-224. Gustav Fischer Verlag - Stuttgart - New York.
- Lee, J.C.; Park, J-S.; Shepherd, S.; Carey, V.; Fattom, A. 1997. Protective efficacy of antibodies to the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. *Infect. Immun.* **65**: 4146-4151.
- Leenaars, M.; Hendriksen, C.; De Leeuw, W.A.; Carat, F.; Delahaut, P.; Fisher, R.; Halder, M.; Hanly, W.C.; Hartinger, J.;Hau, J.; Lindblad, E.B.; Nicklas, W.; Outschoorn, I.M.; Stewart-Tull, D.E.S. 1999. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *ATLA* **27**: 79-102.
- Lin, W.S.; Cunneen, T.; Lee, C.Y. 1994. Sequence analysis and molecular characterization of genes required for the biosynthesis of type I capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **176**: 7005-7016.
- Ljungh, A.; Hjerten, S.; Wadström, T. 1985. High surface hydrophobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. *Infect. Immun.* **47**: 522-526.

- Ljungh, A.; Wadström, T. 1995. Growth conditions influence expression of cell surface hydrophobicity of staphylococci and other wound infection pathogens. *Microbiol. Immunol.* **39**: 753-757.
- Long, J.P.; Kapral F.A. 1993. Host response to coagulase-negative staphylococci in abscesses induced within mice. *J. Med. Microbiol.* **39**: 191-195.
- Lorbacher, H. 1967. *Isolierung und Charakterisierung von Phagen aus Staphylokokken vom Rind*. Tesis Doctoral. Giessen.
- Luong, T.; Sau, S.; Gómez, M.; Lee, J.C.; Lee, C.Y. 2002a. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide expression by *agr* and *sarA*. *Infect. Immun.* **70**: 444-450 .
- Luong, T.T.; Ouyang, S.; Bush, K.; Lee, C.Y. 2002b. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. *J. Bacteriol.* **184**: 3623-3629.
- Ma, J.; Cocchiari, J.; Lee, J.C. 2004. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J. Dairy Sci.* **87**: 178-182.
- Mack, D.; Siemssen, N.; Laufs, R. 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* **60**: 2048-2057.
- Mack, D.; Nedelmann, M.; Krokotsch, A.; Schwartzkopf, A.; Heesemann, J.; Laufs R. 1994. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect. Immun.* **62**: 3244-3253.
- Mack, D.; Rohde, H.; Dobinsky, S.; Riedewald, J.; Nedelmann, M.; Knobloch, J.; Elsner, H.; Feucht, H. 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* **68**: 3799-3807.
- McKenney, D.; Hübner, J.; Muller, E.; Wang, Y.; Goldmann, D.A.; Pier, G.B. 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide / adhesin. *Infect. Immun.* **66**: 4711-4720.
- Maisi, P.; Riipinen, I. 1991. Pathogenicity of different species of staphylococci in caprine udder. *Br. Vet. J.* **147**: 126-132.
- Makizumi, K. 1993. Experimental studies on urinary tract infection - bladder and kidney lodgement in mice by strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **84**: 1602-1610.
- Males, B.M.; Rogers, W.A.; Parisi, J.T. 1975. Virulence factors of biotypes of *Staphylococcus epidermidis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* **1**: 256-261.

- Mamo, W.; Froman, G.; Wadström, T. 1988. Interaction of sub-epitelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **18**: 163-176.
- Mamo, W.; Lindahl, M.; Jonsson, P. 1991a. Enhanced virulence of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis induced by growth in milk whey. *Vet. Microbiol.* **27**: 371-384.
- Mamo, W.; Sandgren, C.H.; Lindahl, M.; Jonsson, P. 1991b. Induction of anti-phagocytic surface properties of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis by growth in milk whey. *J. Vet. Med. B* **38**: 401-410.
- Marco, J.C.; Romeo, L.; Romeo, M. 1992a. Etiología. En: Amorena, B.; Baselga, R.; Marco, J.C., (eds). Mamitis Ovina I. *Ovis* , **21**: 25-43.
- Marco, J.C.; Romeo, M.; Romeo, L.; Pérez, I. 1992b. Epidemiología y patogénesis. En: Amorena, B.; Baselga, R.; Marco, J.C., (eds). Mamitis Ovina I. *Ovis* , **21**: 59-74.
- Martin López, J.V.; Pérez Roth, E.; Claverie Martin, F.; Diez Gil, O.; Batista, N.; Morales, M.; Méndez Alvarez. 2002. Detection of *Staphylococcus aureus* clinical isolates harboring *ica* gene cluster needed for biofilm establishment. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1569-1570.
- Martin López, J.V.; Diez Gil, O.; Morales, M.; Batista, N.; Villar, J.; Claverie Martin, F.; Méndez Alvarez. 2004. Simultaneous PCR detection of *ica* cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. *Int. Microbiol.* **7**: 63-66.
- Martin, M.A.; Pfaller, M.A.; Massanari, R.M.; Wenzel, R.P. 1989. Use of cellular hydrophobicity, slime production, and species identification markers for the clinical significance of coagulase-negative isolates. *Am. J. Infect. Control.* **17**: 130-135.
- Maslow, J.N.; Mulligan, M.E.; Arbeit, M.D. 1993. Molecular epidemiology; application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 153-164.
- Matthews, K.R.; Oliver, S.P.; King, S.H. 1991a. Expression of glycocalix by coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 227-232.
- Matthews, K.R.; Oliver, S.P.; Guidry, A.J. 1991b. Encapsulation of coagulase-negative staphylococci of bovine origin. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 38-45.
- Matthews, K.R.; Jayarao, B.M.; Guidry, A.J.; Erbe, E.F.; Wergin, W.P.; Oliver, S.P. 1994. Encapsulation of *Streptococcus uberis*: influence of storage and cultural conditions. *Vet. Microbiol.* **39**: 361-367.

- Matthews, K.R.; Kumar, S.J.; O'Conner, S.A.; Harmon, R.J.; Pankey, J.W.; Fox, L.K.; Oliver, S.P. 1994. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Epidemiol. Infect.* **112**: 177-186.
- Mattila-Sandholm, T.; Alivahmas, T.; Kaartinen, L.; Honkanen-Buzalski, T. 1990. Growth characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in whey from sequentially infected milk. *Acta vet. scand.* **31**: 169-174.
- Mavrogianni, V.S.; Cripps, P.J.; Fthenakis, G.C. 2007. Bacterial flora and risk of infection of the ovine teat duct and mammary gland throughout lactation. *Prev. Vet. Med.* **79**: 163-173.
- Mittal, K.R.; Higgins, R.; Lariviere, S. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 1019-1023.
- Molnàr, C.; Hevessy, Z.; Rozgonyi, F.; Gemmell, C.G. 1994. Pathogenicity and virulence of coagulase negative staphylococci in relation to adherence, hydrophobicity, and toxin production in vitro. *J. Clin. Pathol.* **47**: 743-748.
- Mørk, T.; Waage, S.; Tollersrud, T.; Kvitle, B.; Sviland, S. 2007. Clinical mastitis in ewes, bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta Vet. Scand.* **49**: 23. doi: 10.1186/1751-0147-49-23.
- Mudd, S. 1965. Capsulation; pseudocapsulation; and the somatic antigens of the surface of *Staphylococcus aureus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **128**: 45-58.
- Murray, R.G.E.; Pearce, R.H. 1949. The detection and assay of hyaluronidase by means of mucoid streptococci. *Can. J. Res. section E27*: 254-260.
- Myllis, V.; Ridell, J.; Björkroth, J.; Biese, I.; Pyörälä, S. 1997. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet. Microbiol.* **51**: 245-251.
- Nag, N.C.; Ghosh-Ray, B. 1990. Susceptibility of animal strains of staphylococci to individual phages of the international basic set and basic bovine set. *Indian J. An. Hlth June*: 37-41.
- Nelles, M.J.; Niswander, C.A.; Karakawa, W.W.; Vann, W.F.; Arbeit, R.D. 1985. Reactivity of type-specific monoclonal antibodies with *Staphylococcus aureus* isolates and purified capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* **49**: 14-18.
- Nemati, M.; Hermans, K.; Devriese, L.A.; Maes, D.; Haesebrouck, F. 2009. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. *Avian Pathol.* **38**: 513-517.
- Nilsson, I.; Lee, J.C.; Bremell, T.; Ryden, C.; Tarkowski, A. 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicaemia and septic arthritis. *Infect. Immun.* **65**: 4216-4221.

- Nilsson, M.; Frykberg, L.; Flock, J.I.; Pei, L.; Lindberg, M.; Guss, B. 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**: 2666-2673.
- Nitzsche, S.; Zweifel, C.; Stephan, R. 2007. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. *Vet. Microbiol.* **120**: 292-299.
- Norcross, N.L.; Opdebeeck, J.P. 1983. Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Vet. Microbiol.* **8**: 397-404.
- Ochoa, I. 1988 . Diagnóstico serológico de las bacteriemias por *Staphylococcus aureus*. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* **3**: 392-396.
- Odierno, L.; Rampone, H.; Giraud, J.; Calzolari, A. 1992. Elevada frecuencia de *S. aureus* capsulados aislados de leche bovina no procesada. *Rev. Med. Vet. Buenos Aires* **73**: 202-204.
- Odierno, L.; Zandarín, A.; Ferrari, M.; Rampone, A.; Giraud, J.; Calzolari A. 1995. Comparison of detection methods for the *Staphylococcus aureus* capsule. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **37**: 245-255.
- Oeding, P. 1952. Serological typing of staphylococci. *Acat. Path. Microbiol. Scand.* **93**: 356-365.
- Oeding, P.; Haukenes, G. 1963. Identification of *Staphylococcus aureus* antigens and antibodies by means of the gel precipitation technique. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **57**: 438-450.
- Oeding, P. 1983. Taxonomy and identification. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Volume 1 Clinical and epidemiological aspects. Academic Press.
- O'Gara, J.P.; Humphreys, H. 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J. Med. Microbiol.* **50**: 582-587.
- Ohshima, Y.; Ichiman, Y.; Usui, Y.; Ko, H.L.; Beuth, J.; Pulverer, G.; Yoshida, K. 1987. Cell surface antigen of encapsulated *Staphylococcus epidermidis* ATCC 31432. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1338-1340.
- Ohshima, Y.; Schumacher Perdreau, F.; Peters, G.; Pulverer, G. 1988. The role of capsule as a barrier to bacteriophage adsorption in an encapsulated *Staphylococcus simulans* strain. *Med. Microbiol. Immunol.* **177**: 229-233.
- Ohtomo, T.; Ichiman, Y.; Narikawa, S.; Yoshida, K. 1982. Growth of *Staphylococcus epidermidis* in soft agar in relation to respiration, dehydrogenase activity and biotype. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2141-2147.
- Oliveira, M.; Bexiga, R.; Nunes, S.F.; Carneiro, ; Cavaco, L.M.; Bernardo, F.; Vilela, C.L. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet. Microbiol.* **118**: 133-140.

- Opdebeek, J.P.; Frost, A.J.; O'Boyle, D.; Norcross, N.L. 1987. The expression of capsule in serum-soft agar by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **13**: 225-234.
- O'Riordan, K.; Lee, J.C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 218-234.
- Otto, M. 2004. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci.* **1**: 841-863.
- Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 207-228.
- Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* - the "accidental" pathogen. *Nature Reviews Microbiol.* **7**: 555-567.
- Ouyang, S.; Sau, S.; Lee, C.Y. 1999. Promoter analysis of the *cap8* operon; involved in type 8 capsular polysaccharide production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**: 2492-2250.
- Parker, M.T. 1983. The significance of phage-typing patterns in *Staphylococcus aureus*. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Vol. 1. Clinical and Epidemiological Aspects. Academic Press.
- Parisi, J.T. 1985. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microb.Rev.* **49**: 126-139.
- Peacock, S.J.; Moore, C.E.; Justice, A.; Kantzanou, M.; Story, L.; Mackie, K.; O'Neill, G.; Day, N.P.J. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **7**: 4987-4996.
- Pengov, A. 2001. The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* **84**: 572-574.
- Perdreau-Remington, F.; Sande, M.A.; Peters, G.; Chambers, H. 1998. The abilities of a *Staphylococcus epidermidis* wild-type strain and its slime-negative mutant to induce endocarditis in rabbits are comparable. *Infect. Immun.* **66**: 2778-2781.
- Pérez, M.M.; Prenafeta, A.; Valle, J.; Penadés, J.; Rota, C.; Solano, C.; Marco, J.; Grilló, M.J.; Lasa, I.; Irache, J.M.; Maira-Litran, T.; Jiménez-Barbero, J.; Costa, L.; Pier, G.B.; De Andrés, D.; Amorena, B. 2009. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1;6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine* **27**: 2379-2386.
- Pérez-Giraldo, C.; Rodríguez-Benito, A.; Morán, F.J.; Hurtado, C.; Blanco, M.T.; Gómez-García, A.C. 1995. Influence of the incubation atmosphere on the production of slime by *Staphylococcus epidermidis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**: 359-362.
- Persson, L.; Johansson, C.; Ryden, C. 2009. Antibodies to *Staphylococcus aureus* bone sialoprotein-binding protein indicate infectious osteomyelitis. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**: 949-952.

- Peschel, A.; Collins, L.V. 2001. Staphylococcal resistance to antimicrobial peptides of mammalian and bacterial origin. *Peptides* **22**: 1651-1659.
- Pöhlmann-Dietze, P.; Ulrich, M.; Kiser, K.B.; Döring, G.; Lee, J.C.; Fournier, J.M.; Botzenhart, K.; Wolz, C. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide; global regulator *agr*; and bacterial growth phase. *Infect. Immun.* **68**: 4865-4871.
- Poutrel, B.; Boutonnier, A.; Sutra, L.; Fournier, J.M. 1988. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 38-40.
- Poutrel, B.; Rainard, P.; Sarradin, P. 1997. Heterogeneity of cell-associated CP5 expression on *Staphylococcus aureus* strains demonstrated by flow cytometry. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* **4**: 275-278.
- Poutrel, B.; Sutra, L. 1993. Type 5 and 8 capsular polysaccharides are expressed by *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits; poultry; pigs and horses. *J.Clin.Microbiol.* **31**: 467-469.
- Pyörälä, S.; Pyörälä, E. 1994. Efficacy of bovine clinical mastitis therapy during lactation. Proceedings; XVII Nordic Veterinary Congress; 26-29 July; Reykjavik; Iceland.
- Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.; Leonard, F.C. 2004. *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Editorial Acribia. Zaragoza . España.
- Rather, P.N.; Davis, A.P.; Wilkinson, B.J. 1986. Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase-negative staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 858-862.
- Rennermalm, A.; Nilsson, M.; Flock, J-I. 2004. The fibrinogen binding protein of *Staphylococcus epidermidis* is a target for opsonic antibodies. *Infect. Immun.* **72**: 3081-3083.
- Ribeiro de Souza, M.L.; Suppo, L.M.; De Magalhaes, C.A. 2006. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**: 661-668.
- Risley, A.L.; Loughman, A.; Cywes-Bentley, C.; Foster, T.J.; Lee, J.C. 2007. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. *J. Infect. Dis.* **196**: 919-927.
- Rivera, J.; Vannakambadi, G.; Höök, M.; Speziale, P. 2007. Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb. Haemost.* **98**: 503-511.
- Robertson, J.R. ; Williams, E.I. 1994. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. Proceedings; 27th annual convention American Association of Bovine Practitioners; 22-25 September; Pittsburgh; USA .

- Rodrigues da Silva, E.; Simeao do Carmo, L.; Da Silva, N. 2005. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet. Microbiol.* **106**: 103-107.
- Rogolsky, M.; Wiley, B.B. 1977. Production and properties of a staphylococcal genetically controlled by the staphylococcal plasmid for exfoliative toxin synthesis. *Infect. Immun.* **15**: 726-732.
- Rohde, H.; Kalitzky, M.; Kröger, N.; Scherpe, S.; Horskotte, M.A.; Knobloch, J.K.M.; Zander, A.R.; Mack, D. 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J. Clin Microbiol.* **42**: 5614-5619.
- Rolloof, J.; Braconier, J.H.; Söderström, C.; Nilsson-Ehle, P. 1988. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**: 505-510.
- Rosenberg, M.; Gutnick, D.; Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29-33.
- Rozgonyi, F.; Szitha, K.R.; Ljungh, A.; Baloda, S.B.; Hjertén, S.; Wadström, T. 1985. Improvement of the salt aggregation test to study bacterial cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**: 131-138.
- Rupp, R.; Bergonier, D.; Dion, S.; Hygonenq, M.C.; Aurel, M.R.; Robert-Granié, C.; Foucras, G. 2009. Response to somatic cell count-based selection for mastitis resistance in a divergent selection experiment in sheep. *Dairy Sci.* **92**: 1203-1219.
- Saa, E.; Kruze, J. 1995. Virulence factors of coagulase-negative Staphylococcus of human and bovine origin. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **37**: 201-208.
- Salasia, S.I.; Khusnan, Z.; Lämmle, C.; Zschöck, M. 2004. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.* **5**: 103-109.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sau, S.; Lee, C.Y. 1996. Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol.* **178**: 2118-2126.
- Sau, S.; Bhasin, N.; Wann, E.R.; Lee, J.C.; Foster, T.J.; Lee, C.Y. 1997. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiology* **143**: 2395-2405.

- Schaffer, A.C.; Solinga, R.M.; Cocchiaro, J.; Portoles, M.; Kiser, K.B.; Risley, A.; Randall, S.M.; Valtulina, V.; Speziale, P.; Walsh, E.; Foster, T.; Lee, J.C. 2006. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B; a major determinant in nasal carriage; reduces nasal colonization in a murine model. *Infect. Immun.* **74**: 2145-2153.
- Schleifer, K.H.; Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* **36**: 407-477.
- Schleifer, K.H.; Kloos, W.E. 1975. A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. *J. Clin. Microbiol.* **1**: 337-338.
- Schleifer, K.H. 1983. The cell envelope. En: Easmon, C.S.F.; Adlam, C.(eds). *Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Volume 2. The Organism *In Vivo* and *In Vitro*. Academic Press.
- Schleifer, K.H. 1986. Gram-Positive Cocci. En: Holt, J.G. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 8^a Ed. Section 12. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Shimizu, A.; Kawano, J.; Yamamoto, C.; Kakutani, O.; Fujita, M. 1997. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and phage typing for discriminating poultry strains of *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 1412-1416.
- Shinefield, H.R.; Aly, R.; Maibach, H.; Ribble, J.C.; Boris, M.; Eichenwald, H.F. 1975. Factors influencing colonization of mucous membranes and skin surfaces with *Staphylococcus aureus*. En: Schlessinger, D. (ed.). *Rapid diagnostic techniques in clinical microbiology*. pp 110-115. American Society for Microbiology. Washington; D.C.
- Shiro, H.; Muller, E.; Gutierrez, N.; Boisot, S.; Grout, M.; Tosteson, T.D.; Goldmann, D.; Pier, G.B. 1994. Transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesion and slime are avirulent in a rabbit model of endocarditis. *J.Infect. Dis.* **169**: 1042-1049.
- Sivadon, V.; Rottman, M.; Quincampoix, J-C.; Prunier, E.; Le Moal, M.; De Mazancourt, P.; Hoffmeyer, P.; Lortat-Jacob, A.; Piriou, P.; Judet, T.; Bernard, L.; Gaillard, J-L. 2009. Partial *atlE* sequencing of *Staphylococcus epidermidis* strains from prosthetic joint infections. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 2321-2324.
- Smeltzer, M.S.; Gillaspay, A.F. 2000. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poultry Sci.* **79**: 1042-1049.
- Smith, M.R.; Yoshida, K.; Naito, Y. 1971. Use of the clumping factor reaction for the identification of encapsulated strains of *Staphylococcus aureus* from human sources. *Infect. Immun.* **3**: 707-708.
- Sompolinsky, D.; Samra, Z.; Karakawa, W.W.; Vann, W.F.; Schneerson, R.; Malik, Z. 1985. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 828-834.

- Souto, M.J.; Ferreirós, C.M.; Criado, M.T.; Sáinz, V.; Carballo, J.; Del Río, M.C. 1989. Influencia del limo ("*slime*") en la resistencia a los antibióticos y a la acción del suero humano en cepas de *Staphylococcus epidermidis*. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* **4**: 565-568.
- Souto, M.J.; Ferreiros, C.M.; Criado, M.T. 1991. Failure of phenotypic characteristics to distinguish between carrier and invasive isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* **17**: 107-115.
- Stamp, L.; Edwards, H.H. 1964. The immunizing activity in rabbits of fractions isolated from *Staphylococcus pyogenes*. *Br. J. Path.* **45**: 264-270.
- Straub, J.A.; Hertel, C.; Hammes, W.P. 1999. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food. Prot.* **62**: 1150-1156
- Sutra, L.; Mendolia, C.; Rainard, P.; Poutrel, B. 1990. Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitic milk: relationship between capsular polysaccharide types 5 and 8 and colony morphology in serum-soft agar; clumping factor; teichoic acid; and protein A. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 447-451.
- Switalski, L.M.; Ryden, C.; Rubin, K.; Ljungh, A.; Hook, M.; Wadström, T. 1983. Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains. *Infect. Immun.* **42**: 628-633.
- Szücs, I.; Sztrój, T.; Papp-Falusi, E.; Andirkó, I.; Rédai, I.; Rozgonyi, F. 1993. A comparative study on growth in soft-agar; adherence to glass and haemolysis types of coagulase-negative staphylococci. *Acta Microbiol. Hung.* **40**: 181-189.
- Tollersrud, T.; Kenny, K.; Reitz, J.R.; Lee, J.C. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2998-3003.
- Tormo, M.A.; Knecht, E.; Gotz, F.; Lasa, I.; Penades, J.R. 2005. *Bap*-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**: 2465-2475.
- Tormo, M.A.; Úbeda, C.; Martí, M.; Maiques, E.; Cucarella, C.; Valle, J.; Foster, T.; Lasa, I.; Penadés, J.R. 2007. Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (*Bap*) in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **153**: 1702-1710.
- Tristan, A.; Ying, L.; Bes, M.; Etienne, J.; Vandenesch, F.; Lina, G. 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infection. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4465-4467.
- Tu Quoc, P.; Genevaux, P.; Pajunen, M.; Savilahti, H.; Georgopoulos, C.; Schrenzel, J.; Kelley, W.L. 2007. Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **75**: 1079-1088.

- Valle, J.; Gómez-Lucía, E.; Piriz, S.; Goyache, J.; Orden, J.A.; Vadillo, S. 1990. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**: 1323-1326.
- Valle, J.; Da Re, S; Henry, N.; Fontaine, T.; Balestrino, D.; Latour-Lambert, P.; Ghigo J-M. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *PNAS.* **103**: 12558-12563.
- Vancraeynest, D.; Hermans, K.; Haesebrouck, F. 2004. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRSMMs. *Vet. Microbiol.* **103**: 241-247.
- Vancraeynest D; Hermans K; Haesebrouck F. 2006. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins; leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. *Vet. Microbiol.* **117**: 211-218.
- Van Duijkeren, E.; Box, A.T.A.; Heck, M.E.O.C.; Wannet, W.J.B.; Fluit, A.C. 2004. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet. Microbiol.* **103**: 91-97.
- Vasudevan, P.; Nahir, M.K.M.; Annamalai, T.; Venkitanarayanan, K.S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* **92**: 179-185.
- Vautor, E.; Cockfield, J.; Le Marechal, C.; Le Loir, Y.; Chevalier, M.; Robinson, D.A.; Thiery, R.; Lindsay, J. 2009a. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet. Res.* **40**: 56-66.
- Vautor, E.; Magnone, V.; Rios, G.; Le Brigand, K.; Bergonier, D.; Lina, G.; Meugnier, H.; Barbry, P.; Thiéry, R.; Pépin, M. 2009b. Genetic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminant species: a single-dye DNA microarray approach. *Vet. Microbiol.* **133**: 105-114.
- Verdrengh, M.; Tarkowski, A. 1998. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *Infect. Immun.* **66**: 853-855.
- Verdier, I.; Durand, G.; Bes, M.; Taylor, K.L.; Lina, G.; Vandenesch, F.; Fattom, A.I.; Etienne, J. 2007. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 725-729.
- Von Rheinhaben, K.E.; Hadlok, R.M. 1981. Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars. *Antoine van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **47**: 41-51.
- Watkins, G.H.; Burriel, A.R.; Jones, J.E.T. 1991. A field investigation of subclinical mastitis in sheep in Southern England. *Br. Vet. J.* **147**: 413-420.
- Watson, D.L. 1981. Immunologically-specific resistance to infection with particular reference to staphylococcal mastitis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **137**: 579-90.

- Watson, D.L. 1988. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Res. Vet. Sci.* **45**: 16-29.
- Watson, D.L. 1989. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Res. Vet. Sci.* **47**: 152-157.
- Watts, A.; Ke, D.; Wang, Q.; Pillay, A.; Nicholson-Weller, A.; Lee, J.C. 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect. Immun.* **73**: 3502-3511.
- Wheat, L.J.; Kohler, R.B.; White, A. 1983. Diagnosis and management of deep seated infection. En: Easmon, C.S.F. ; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Vol. 1. Clinical and Epidemiological Aspects. Academic Press. Chapter 4; pp. 121-148.
- West, T.E.; Burdash, N.M.; Boehm, A.M.; West, M.E. 1983. Evaluation of a commercial counterimmunoelectrophoresis kit for detection of *Staphylococcus aureus* teichoic acid antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 567-570.
- West, T.E.; Apicella, M.A. 1984. Detection of encapsulation in *Staphylococcus aureus* by use of antiserum agar. *J. Clin. Microbiol.* **20**:141-144.
- Whitfield, C.1988. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **34**: 415-420.
- Wiley, B.B. 1961. A new virulence test for *Staphylococcus aureus* and its application to encapsulated strains. *Can. J. Microbiol.* **7**: 933-943.
- Wiley, B.B.; Maverakys, N.H. 1974. Capsule production and virulence among strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **236**: 221-232.
- Wilkinson, B.J. 1983. Staphylococcal capsules and slime. En: Easmon C.S.F.; Adlam, C. (eds). *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Vol. 2. The Organism *In Vivo* and *In Vitro*. Academic Press.
- Wilkinson, B.J.; Peterson, P.K.; Quie, P.G. 1979. Cryptic peptidoglycan and the antiphagocytic effect of the *Staphylococcus aureus* capsule: model for the antiphagocytic effect of bacterial cell surface polymers. *Infect. Immun.* **23**: 502-508.
- Winter, P.; Colditz, I.G. 2002. Immunological responses of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **89**: 57-65.
- Woznicova, V.; Votava, M.; Skalka, B. 1993. Comparison of 2 methods of detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *Cesk Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **42**: 51-53.
- Wu, H-J.; Wang, A.H.J.; Jennings, M.P. 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**:1-9.

- Wu, T.C.M.; Park, J.T. 1971. Chemical characterization of a new surface antigenic polysaccharide from a mutant of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **108**: 874-884.
- Yamada, T.; Ichiman, Y.; Yoshida, K. 1988. Possible common biological and immunological properties for detecting encapsulated strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2167-2172.
- Yamada, T.; Tochimaru, N.; Nakasuji, S.; Hata, E.; Kobayashi, H.; Eguchi, M.; Kaneko, J.; Kamio, Y.; Kaidoh, T.; Takeuchi, S. 2005. Leukotoxin family genes in *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and prevalence of *lukM-lukF-PV* genes by bacteriophages in bovine isolates. *Vet. Microbiol.* **110**: 97-103.
- Yazdani, R.; Oshaghi, M.; Havayi, A.; Pishva, E.; Salehi, R.; Sadeghizadeh, M.; Foroohesh, H. 2006. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian J. Publ. Health* **35**: 25-28.
- Yokomizo, Y.; Isayama, Y.; Takahashi, M.; Yoshida, K. 1977. Isolation of encapsulated strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. *Res. Vet. Sci.* **22**:158-160.
- Yoshida, E.; Ichiman, Y.; Sukanuma, M.; Yoshida, K. 1991. Conversion of biological and immunological properties during a process of decapsulation in a strain of *Staphylococcus hyicus*. *J. Appl. Bacteriol.* **71**: 347-53.
- Yoshida, K.; Ekedt, R.D. 1968. Relation of mucoid growth of *Staphylococcus aureus* to clumping factor reaction; morphology in serum soft agar; and virulence. *J. Bacteriol.* **96**: 902-908.
- Yoshida, K.; Takeuchi, Y. 1970. Comparison of compact and diffuse variants of strains of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2**: 523-527.
- Yoshida, K.; Smith, M.R.; Naito, Y. 1970. Biological and immunological properties of encapsulated strains of *Staphylococcus aureus* from human sources. *Infect. Immun.* **2**: 528-532.
- Yoshida, K. 1971. Demonstration of serologically different capsular types among strains of *Staphylococcus aureus* by the serum-soft agar technique. *Infect. Immun.* **3**: 535-539.
- Yoshida, K.; Smith, M.R.; Naito, Y. 1971. Compact-type growth of *Staphylococcus epidermidis* strains in Serum-Soft Agar. *Infect. Immun.* **4**: 656-657.
- Yoshida, K.; Nakamura, A.; Otomo, T.; Iwami, S. 1974. Detection of capsular antigen production in unencapsulated strains of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **9**: 620-3.
- Yoshida, K.; Ohtomo, T.; Minegishi, Y. 1977. Mecanism of compact-colony formation by strains of *Staphylococcus aureus* in Serum Soft Agar. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 67-75.

- Yoshida, K.; Umeda, A.; Ohshima, Y. 1987. Induction of resistance in mice by the capsular polysaccharide antigens of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **31**(7): 649-56.
- Yoshida, K.; Umeda, A.; Ichiman, Y.; Suganuma, M. 1990. Cross protection between an encapsulated strain of *Staphylococcus hyicus* and an encapsulated strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Kansenshogaku-Zasshi.* **64**: 584-591.
- Young, D.A.; Dobson, P.; Karakawa, W.W. 1979. Immunological specificity of natural opsonins and their role in the cross-reactivity between *Staphylococcus aureus* Mardi and *Escherichia coli* 101. *Infect. Immun.* **25**: 954-959.
- Younger, J.J.; Christensen, G.D.; Bartley, D.L.; Simmons, J.C.; Barrett, F.F. 1987. Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production; species identification; and shunt removal to clinical outcome. *J. Infect. Dis.* **156**: 548-54.
- Ziebuhr, W.; Heilmann, C.; Götz, F.; Meyer, P.; Wilms, K.; Straube, E.; Hacker, J. 1997. Detection of the intracellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* **65**: 890-896.
- Zmantar, T.; Chaieb, K.; Makni, H.; Miladi, H.; Abdallah, F.B.; Mahdouani, K.; Bakhrouf, A. 2008. Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *J. Basic Microbiol.* **48**: 308-14.