



ORIGINAL

Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina en Colombia



Sabrina del C. Jiménez Velásquez^a, Ligia D. Torres Higuera^a,
Jorge L. Parra Arango^b, José L. Rodríguez Bautista^c, Fredy E. García Castro^a
y Rocio E. Patiño Burbano^{a,*}

^a Corporación colombiana de investigación agropecuaria-AGROSAVIA- Centro de Investigación-Tibaitatá- Banco de Germoplasma de Microorganismos Bacterias-Virus, Mosquera, Colombia

^b Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia

^c Programa de Posgrado, Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil

Recibido el 9 de noviembre de 2018; aceptado el 11 de mayo de 2019

Disponible en Internet el 17 de septiembre de 2019

PALABRAS CLAVE

Mastitis bovina;
Antibiograma;
PCR

Resumen *Staphylococcus* spp. es uno de los patógenos causantes de mastitis bovina y puede presentar multiresistencia a diferentes grupos de antimicrobianos. En este estudio se planteó el objetivo de identificar fenotípicamente aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina y caracterizar el perfil de resistencia antimicrobiana. Se clasificaron 101 cepas mediante pruebas fenotípicas; además, se determinó la resistencia a oxacilina, cefoxitina, penicilina, ampicilina, tetraciclina, kanamicina, sulfametoxazol/trimetoprima, clindamicina y eritromicina por la técnica Kirby Bauer y la presencia de genes de resistencia por PCR. Un total de 65 cepas fueron *S. aureus* y 36 estafilococos coagulasa negativos (ECN). Se encontraron diferentes patrones de resistencia a los antibióticos evaluados en las cepas de *S. aureus* y en los ECN; únicamente la resistencia a ampicilina se encontró asociada a la especie ($p < 0,05$). En un total de 101 cepas se detectó el gen *mecA* en el 27% y se corroboró la portación de *aph(3')-IIIa* en el 75,2%; la de *aac(6')/aph(2'')*-3 en el 47,4%; la de *ant(4')-Ia* en el 32,7%; la de *tetM* en el 63% y la de *tetK* en el 43,6%. Sin embargo, no se encontró asociación entre la portación de estos genes y la resistencia a penicilina, ampicilina, cefoxitina, kanamicina y tetraciclina, respectivamente ($p > 0,05$). Por otra parte, se encontró el gen *blaZ* en el 59,4% de los aislamientos y el gen *ermC* en el 62,3%, la portación de estos genes sí estuvo asociada a la resistencia a β -lactámicos y macrólidos, respectivamente ($p < 0,001$). En este estudio se encontró multiresistencia antimicrobiana en cepas de *S. aureus* y de ECN aisladas de leche cruda; este hallazgo impacta en la industria lechera y representa un riesgo para la salud pública. © 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rpatino@agrosavia.co (R.E. Patiño Burbano).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>

0325-7541/© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Bovine mastitis;
Antimicrobial
resistance;
PCR

Profile of antimicrobial resistance in isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from bovine milk in Colombia

Abstract *Staphylococcus* spp. is one of the pathogens that cause bovine mastitis and may present multiple resistance to different antimicrobial groups. The aim of this study was to phenotypically identify *Staphylococcus* spp. isolates obtained from bovine milk and to characterize their antimicrobial resistance profile. The 101 strains were classified by phenotypic tests, their resistance to oxacillin, ceftiofur, penicillin, ampicillin, tetracycline, kanamycin, sulfamethoxazole / trimethoprim, clindamycin and erythromycin was determined by the Kirby-Bauer technique and the presence of resistance genes by PCR. A total of 65 strains was *S. aureus* and 36 strains were coagulase-negative staphylococci (CoNS). We found different patterns of resistance to antibiotics evaluated in strains of *S. aureus* and CoNS, only the resistance to ampicillin was found associated with the species ($p < 0.005$). In the 101 strains, the *mecA* gene was detected in 27%, *aph(3')-IIIa* in 75.2%, *aac(6')/aph(2'')*-3 in 47.4%, *ant(4')-Ia* in 32.7%, *tetM* in 63% and *tetK* in 43.6%; however, no association was found with the resistance to penicillin, ampicillin, ceftiofur, kanamycin and tetracycline, respectively ($p > 0.05$). On the other hand, the *blaZ* gene was found in 59.4% of the 101 strains and the *ermC* gene in 62.3%, which was associated with resistance to β -lactams and macrolides, respectively ($p < 0.001$). In this study, antimicrobial multiresistance was found in *S. aureus* and CoNS strains. This finding impacts on the dairy industry, representing a risk to public health.

© 2019 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El género *Staphylococcus* es causante de enfermedades en humanos y animales³². En sistemas de producción animal es frecuentemente aislado de leche bovina, y su origen puede ser ambiental o relacionarse con infecciones intramamarias¹¹.

La mastitis es una enfermedad de presentación endémica y es considerada una de las más costosas en la industria láctea. Esta afección puede presentarse de forma clínica o subclínica. Las consecuencias económicas de la mastitis están dadas por el tratamiento, las pérdidas en la producción, el descarte temprano de animales, los cambios en la calidad de la leche y el riesgo de otras enfermedades^{27,54}. Como medida de control se usan antibióticos para limitar las infecciones existentes. Si bien la terapia con antibióticos ha ayudado a reducir la incidencia de mastitis, el manejo inadecuado de estos fármacos también ha favorecido a la que emerjan especies de *Staphylococcus* resistentes, lo que puede ocasionar una baja tasa de curación^{51,58}.

Las especies de *Staphylococcus* poseen diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana: alteración/reemplazo del sitio blanco, impedimento para acceder al blanco, inactivación enzimática del antibiótico, activación de bombas de eflujo transmembrana para bloquear la acción del antimicrobiano⁵⁹. En *Staphylococcus* spp. la resistencia a penicilina es atribuida a la presencia del gen *blaZ*, que codifica la síntesis de β -lactamasas responsables de la hidrólisis del anillo β -lactámico^{8,20}. Otro mecanismo asociado a la resistencia al grupo β -lactámico se adjudica a la presencia del gen *mecA*, que codifica una proteína PBP2a de baja afinidad por la penicilina. Las cepas de *Staphylococcus* spp. que poseen el gen *mecA* se denominan

Staphylococcus metilino-resistentes (SMR). El gen *mecA* es parte de un elemento genético móvil denominado «casete cromosómico estafilocócico» (SCC*mec*), el cual puede transmitirse horizontalmente entre poblaciones de *Staphylococcus* spp.^{24,33,59}.

Otros determinantes genéticos como *aac(6')/aph(2')*, *aph(3')-IIIa* y *ant(4')-Ia* codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (conocidas como AME, por sus siglas en inglés): acetiltransferasa (AAC), fosfotransferasa (APH) y nucleotidiltransferasa (ANT). Estas enzimas son las responsables de la resistencia a aminoglucósidos en *Staphylococcus* spp.^{1,18,26}. La resistencia a tetraciclinas y macrólidos en *Staphylococcus* spp. está asociada a la presencia de los genes *tet* (M/K) y *erm* (A/B/C) respectivamente. Los genes *erm* (A/B/C) codifican metilasas de ARNr implicadas en la modificación del sitio de acción del antibiótico^{19,40,48,59,61}.

En Colombia el uso de antibióticos en el tratamiento de la mastitis bovina no está totalmente regulado y se permite el acceso libre a los antimicrobianos y, en ocasiones, sin supervisión técnica, lo que favorece la aparición de cepas con resistencia a dichos agentes^{11,47}. Algunos autores reportan el uso de antibióticos β lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas para el tratamiento de la mastitis en sistema de producción bovina en Colombia; asimismo, han mencionado la resistencia a estos antimicrobianos^{11,42,46,47}. La presencia de cepas SRM en Colombia fue reportada por Vanegas et al.⁵⁵ en muestras de carne molida y de crema de leche, y Herrera et al.²⁹ la documentaron en queso doble crema; estos estudios corresponden a los primeros reportes de SRM en productos de origen bovino.

Para ampliar la información disponible este trabajo se propuso caracterizar 101 aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina mediante la identifica-

ción taxonómica y la elaboración de perfiles fenotípicos de resistencia antimicrobiana, evaluando su relación con la presencia de genes de resistencia a diferentes grupos de antibióticos: β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas.

Materiales y métodos

Aislamientos e identificación microbiana

Se utilizaron 101 cepas del género *Staphylococcus* seleccionadas al azar, que pertenecen al Sistema de bancos de germoplasma de la nación para la alimentación y la agricultura, de la Corporación colombiana de investigación agropecuaria (AGROSAVIA). Ese conjunto de cepas se obtuvo a lo largo del desarrollo de proyectos de investigación en los sistemas de producción de lechería especializada y doble propósito de los departamentos de Cundinamarca, Nariño, Meta y Cesar, a cargo de AGROSAVIA (período 2010-2014). Se chequeó la viabilidad de las cepas y se confirmó el género y la especie mediante cultivo en agar sangre y pruebas de catalasa y coagulasa. Los cultivos se sembraron en medios selectivos y diferenciales (Baird Parker, salado manitol y DNasa)^{7,30}. Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como cepa de referencia. Adicionalmente, se realizó la identificación hasta el nivel de especie con el kit comercial BD BBL CRYSTAL™ Gram-Positive ID System⁵⁶.

Pruebas fenotípicas de resistencia a antimicrobianos

La evaluación de la susceptibilidad a los antimicrobianos *in vitro* fue realizada por incubación en agar Mueller Hinton a 35 (± 2) °C por la técnica de difusión en disco o Kirby Bauer, con lectura del tamaño de los halos a las 24 horas, de acuerdo con lo señalado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2012-2018-2019)¹³⁻¹⁵. Los discos de antibióticos utilizados fueron los siguientes: penicilina G (10 U), ampicilina (10 U), tetraciclina (30 μ g), kanamicina (30 μ g), sulfametoxazol/trimetoprima (25 μ g), clindamicina (2 μ g) y eritromicina (15 μ g). Para la identificación fenotípica de *Staphylococcus* meticilino-resistentes se emplearon discos de oxacilina (1 μ g) para *Staphylococcus schleiferi* y de cefoxitina (30 μ g) para *S. aureus* y otros estafilococos coagulasa negativos (ECN), de acuerdo con las instrucciones del CLSI (2019)¹⁵.

Detección de genes de resistencia a antimicrobianos

Se realizó la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo-álcohol isoamílico a partir de cultivos puros de *Staphylococcus* spp. en caldo infusión cerebro-corazón (Oxoid®). Después de un período de incubación de 18 h los cultivos se centrifugaron a 8.000 rpm \times 10 minutos; la masa celular obtenida fue suspendida en 200 μ l de buffer TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) con lisozima (2 mg/ml) e incubada a 37 °C durante 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 300 μ l de buffer TE, 4 μ l proteínaasa K (20 mg/ml), 30 μ l SDS al 10%, 80 μ l bromuro de N,N,

N-trimetil,1-hexadecano-amino (CTAB) al 10% y 100 μ l NaCl 5 M. El ADN se extrajo empleando fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. El ADN fue precipitado con isopropanol y etanol al 70%, y almacenado a -20 °C hasta su procesamiento^{7,18,31}. La amplificación de los genes de resistencia se hizo por PCR empleando iniciadores reportados en otros trabajos^{5,20,30} (tabla 1).

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de frecuencias por prueba de independencia Chi cuadrado para determinar la asociación entre los perfiles de resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos y la presencia o ausencia de genes de resistencia en cepas de *S. aureus* y en ECN. Se omitieron las respuestas intermedias y solo se consideró la dicotomía resistente/sensible; para este análisis se utilizó el programa Epi Info™ 7.

Resultados

En función de los cultivos bacteriológicos y las pruebas bioquímicas el 65% (65/101) de las cepas se clasificaron como *S. aureus* y el 35% (36/101) restante como ECN de las siguientes especies: *Staphylococcus haemolyticus* (10), *Staphylococcus saprophyticus* (8), *Staphylococcus capitis* (6), *Staphylococcus xylosus* (3), *Staphylococcus caprae* (2), *Staphylococcus simulans* (2), *Staphylococcus auricularis* (1), *Staphylococcus sciuri* (1), *Staphylococcus schleiferi* (2) y *Staphylococcus warneri* (1).

La respuesta de las cepas a los diferentes antibióticos por la técnica de Kirby Bauer fue la siguiente: frente a los 9 antibióticos probados se hallaron cepas de *S. aureus* resistentes (en un rango de 1,5% a 23,1%, según el caso); en cambio, las cepas de ECN presentaron resistencia a 6 de estos compuestos: eritromicina, tetraciclina, penicilina, ampicilina, kanamicina y clindamicina, en diferentes proporciones (tabla 2). Se investigó la correlación entre la respuesta a 8 de estos antimicrobianos y la especie de *Staphylococcus*; no se halló correlación ($p > 0,05$), excepto en el caso de la respuesta a la ampicilina, en donde $p < 0,005$ (tabla 2).

S. aureus presentó más frecuentemente resistencia o respuesta intermedia a eritromicina que las cepas de ECN (tabla 2). De igual forma, *S. aureus* presentó más frecuentemente resistencia a tetraciclina que los ECN y una pequeña proporción de ECN expresó respuesta intermedia (tabla 2). A pesar de la diferencia relativa en la respuesta a tetraciclina entre los 2 grupos considerados, esta no fue suficiente para inferir el efecto de la especie de *Staphylococcus* sobre la respuesta a tetraciclina ($p = 0,17$).

Por otro lado, cuando se analizó la respuesta a los β -lactámicos por la técnica de Kirby Bauer fue más común la resistencia a antibióticos como penicilina y ampicilina en cepas de ECN. En el caso de la respuesta a ampicilina se encontró asociación entre la resistencia y la especie de *Staphylococcus* con un valor de $p = 0,049$ (tabla 2).

Únicamente se reporta la respuesta a oxacilina de las 2 cepas de *S. schleiferi* que fueron sensibles; esta misma respuesta se encontró frente a cefoxitina en las 34 cepas de ECN diferentes de *S. schleiferi*. En cambio, el 4,6% de las cepas de *S. aureus* mostraron resistencia a cefoxitina;

Tabla 1 Iniciadores empleados en la detección de genes de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus* spp.

Gen blanco	Secuencia de los iniciadores	Tamaño (pb)	Grupo de resistencia	Referencia
<i>mecA</i>	5'-ACT GCT ATC CAC CCT CAA AC-3' 5'-CTG GTG AAG TTG TAA TCT GG-3'	163	Meticilina	30
<i>blaZ</i>	5'-CAA AGA TGA TAT AGT TGC TTA TTC TCC-3' 5'-TGC TTG ACC ACT TTT ATC AGC-3'	421	Beta-lactámicos	20
<i>aac(6')/aph(2'')-3</i>	5'-CCA AGA GCA ATA AGG GCA TAC C-3' 5'-CAC ACT ATC ATA ACC ATC ACC G-3'	222	Aminoglucósidos	5
<i>aph(3')-IIIa</i>	5'-CTG ATC GAA AAA TAC CGC TGC-3' 5'-TCA TAC TCT TCC GAG CAA AGG-3'	269		5
<i>ant(4')-Ia3</i>	5'-CTG CTA AAT CGG TAG AAG C-3' 5'-CAG ACC AAT CAA CAT GGC ACC-3'	174		5
<i>tetK</i>	5'-TCG ATA GGA ACA GCA GTA-3' 5'-CAG CAG ATC CTA CTC CTT-3'	169	Tetraciclina	5
<i>tetM</i>	5'-GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG-3' 5'-CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC-3'	406		5
<i>ermB</i>	5'-CTA TCT GAT TGT TGA AGA AGG ATT-3' 5'-GTT TAC TCT TGG TTT AGG ATG AAA-3'	142	Macrólidos/ lincosamidas	5
<i>ermC</i>	5'-CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C-3' 5'-ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT C-3'	190		5

Tabla 2 Perfil de sensibilidad a diversos antibióticos en las cepas de *S. aureus* y en estafilococos coagulasa negativos recuperados de muestras de leche bovina, Colombia

Antibiótico	<i>Staphylococcus</i> spp.	Sensible%	Resistente%	Intermedio%	χ^2 independencia
Eritromicina	<i>S. aureus</i>	69,2	15,4	15,4	$\chi^2 = 0,099$
	ECN	72,2	13,9	13,9	gl = 2
	Total	70,3	14,9	14,9	$p = 0,952$
Tetraciclina	<i>S. aureus</i>	81,5	18,5	-----	$\chi^2 = 3,555$
	ECN	88,9	8,3	2,8	gl = 2
	Total	84,2	14,9	1,0	$p = 0,169$
Penicilina	<i>S. aureus</i>	76,9	23,1	-----	$\chi^2 = 2,830$
	ECN	61,1	38,9	-----	gl = 1
	Total	71,3	28,7	-----	$p = 0,093$
Ampicilina	<i>S. aureus</i>	81,5	18,5	-----	$\chi^2 = 3,875$
	ECN	63,9	36,1	-----	gl = 1
	Total	75,2	24,8	-----	$p = 0,049^*$
Oxacilina	<i>S. aureus</i>	92,3	7,7	-----	Prueba Fisher
	ECN	100,0	0,0	-----	$p = 0,157$
	Total	95,0	5,0	-----	
Cefoxitina	<i>S. aureus</i>	95,4	4,6	-----	Prueba Fisher
	ECN	100,0	0,0	-----	$p = 0,551$
	Total	97,0	3,0	-----	
Kanamicina	<i>S. aureus</i>	76,9	10,8	12,3	$\chi^2 = 5,085$
	ECN	94,4	2,8	2,8	gl = 2
	Total	83,2	7,9	8,9	$p = 0,079$ ns
Sulfametoxazol/trimetropima	<i>S. aureus</i>	98,5	1,5	-----	Prueba Fisher
	ECN	100,0	0,0	-----	$p = 1,000$
	Total	99,0	1,0	-----	
Clindamicina	<i>S. aureus</i>	83,1	15,4	1,5	$\chi^2 = 5,085$
	ECN	83,3	16,7	-----	gl = 2
	Total	83,2	15,8	1,0	$p = 0,749$ ns

ECN: estafilococos coagulasa negativos; gl: grados de libertad; ns: no significativo; χ^2 : Chi-cuadrado.

* Significativo al 5%.

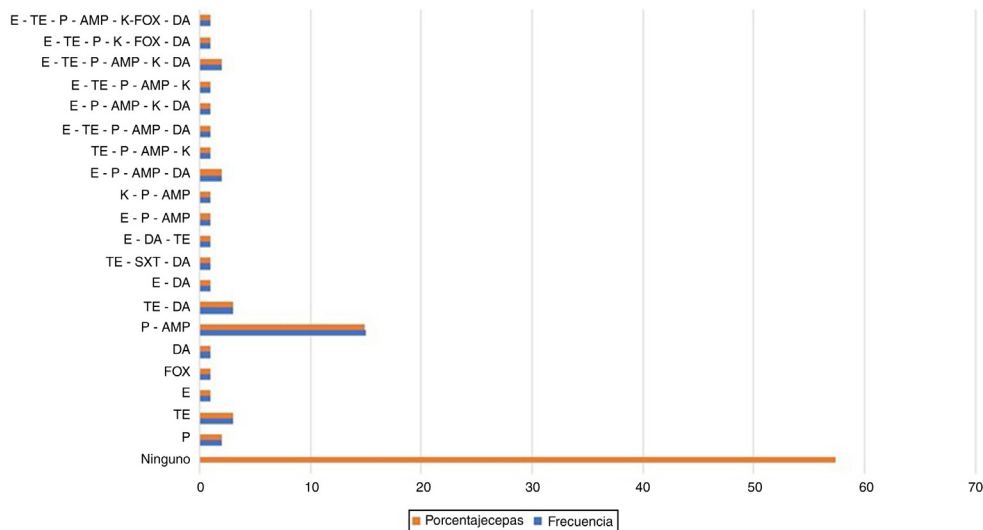


Figura 1 Patrones de resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos. AMP: ampicilina; DA: clindamicina; E: eritromicina; FOX: cefoxitina; K: kanamicina; P: penicilina G; SXT: sulfametoxazol-trimetoprima; TE: tetraciclina.

esta respuesta a oxacilina y cefoxitina tampoco se encontró asociada a la especie ($p > 0,05$) (tabla 2).

Fue más frecuente encontrar resistencia o respuesta intermedia a kanamicina entre las cepas de *S. aureus* que entre las cepas de ECN. A pesar de la mayor proporción de resistencia a kanamicina en *S. aureus* no se encontró que la especie bacteriana estuviera asociada a la resistencia ($p > 0,05$) (tabla 2). Solo una cepa de *S. aureus* (1,5%) presentó resistencia a sulfametoxazol-trimetoprima. En contraste, no se observaron ECN resistentes a dicho antimicrobiano.

Hubo mayor resistencia a clindamicina en las cepas de *S. aureus* que en las cepas de ECN (tabla 2). La respuesta a kanamicina y a sulfametoxazol-trimetoprima no se encontró asociada a la especie de *Staphylococcus* ($p > 0,05$).

Como se observa en la figura 1, el 57,4% de las cepas evaluadas presentó sensibilidad a todos los antibióticos. En el resto de las cepas se encontraron diversos patrones de resistencia; el más frecuente fue el de resistencia a β lactámicos (un 14,8% de las cepas fueron resistentes a penicilina y ampicilina). Los antibióticos asociados a menor tasa de resistencia fueron sulfametoxazol-trimetoprima y cefoxitina. Se resalta que el número de antibióticos frente a los que estas cepas mostraron resistencia osciló entre 2 y 7 (fig. 1).

Asimismo, los genes asociados a resistencia más prevalentes fueron *aph(3)-IIIa*, *tetM*, *ermC* y *blaZ*, asociados a la resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos y β -lactámicos, respectivamente. Los genes cuya frecuencia de portación fue inferior al 50% fueron *aac(6)/aph(2'')*-3 y *ant(4')-Ia*, asociados a la resistencia a aminoglucósidos. El gen que se encontró con mayor frecuencia fue el *aph(3')IIIa*, y el que se detectó con menor frecuencia fue el gen *ermB*, relacionados con la resistencia a aminoglucósidos y macrólidos, respectivamente (fig. 2).

En la figura 2 se presenta la distribución de frecuencias de los 9 genes evaluados en *S. aureus* y en el grupo de ECN; estos genes se encontraron distribuidos indistintamente en

estos 2 grupos, por lo tanto, la presencia de los genes no estuvo asociada a la especie de *Staphylococcus* ($p > 0,05$).

En cuanto al análisis de la relación entre presencia de estos genes y respuesta a los antimicrobianos el fenotipo se tomó como variable ordinal sensible, intermedio o resistente. El gen *ermB* se encontró en 9 cepas y 6 de estas fueron resistentes a eritromicina. El gen *ermC* se detectó en 63 cepas y el 14% de estas mostraron resistencia a eritromicina. La presencia de los genes *ermB* y *ermC* se encontró asociada a la resistencia a eritromicina ($p < 0,001$, tabla 3).

La presencia de los genes *tetK* y *tetM* no se encontró asociada a la resistencia a tetraciclina, la característica de sensible o resistente fue independiente de la presencia o ausencia de dichos genes ($p > 0,05$; tabla 3). El grupo de genes *aph(3')-IIIa*, *aac(6)/aph(2'')*-3 y *ant(4')-Ia3* no presentó relación causal con la resistencia a kanamicina ($p > 0,05$; tabla 3).

El gen *mecA*, presente en el 26,7% de las cepas evaluadas, no se encontró asociado a la resistencia a ampicilina, penicilina o cefoxitina ($p > 0,05$; tabla 3). De las 27 cepas que portaban el gen *mecA* el 26% tenían el gen *ant(4')-Ia3*, el 59% los genes *aac(6)/aph(2'')*-3 y el 93% el gen *aph(3')-IIIa*. De igual forma, estas cepas portaban los genes *ermB* (26%) y *ermC* (48%) (datos no mostrados).

El gen *blaZ* se detectó en 60 cepas de *Staphylococcus* spp. y la resistencia a penicilina y a ampicilina fue superior al 20%. Esta respuesta permitió establecer que la presencia del gen *blaZ* estuvo asociada a la resistencia a la penicilina y la ampicilina ($p < 0,05$; tabla 3) en este conjunto de aislamientos.

Discusión

En la caracterización de un conjunto de 101 aislamientos de *Staphylococcus* spp., obtenidos de leche cruda bovina en Colombia, la especie predominante fue *S. aureus*, la cual

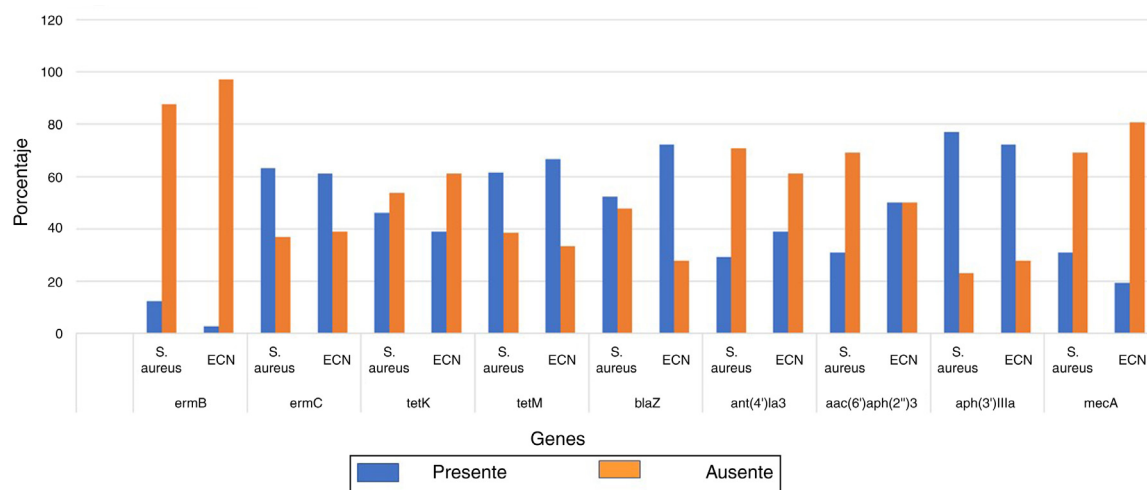


Figura 2 Distribución de 9 genes asociados a la resistencia a 4 grupos de antibióticos en cepas de *S. aureus* y de estafilococos coagulasa negativos (ECN).

Tabla 3 Relación entre portación de genes de resistencia y respuesta a los antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus* spp. recuperadas de leche bovina, Colombia

Antibiótico	Gen	Porcentaje	Sensible	Intermedio	Resistente	χ	gl
Eritromicina	<i>ermB</i>	Presente	22,2	11,1	66,7	χ^2 : 21,203	2
	Ausente	75,0	15,2	9,8	p: 0,000*		
	<i>ermC</i>	Presente	68,3	9,5	22,2	χ^2 : 9,425	2
	Ausente	73,7	23,7	2,6	p: 0,009*		
Tetraciclina	<i>tetK</i>	Presente	77,3	2,3	20,5	χ^2 : 3,383	2
	Ausente	89,5	0,0	10,5	p: 0,184		
	<i>tetM</i>	Presente	81,3	0,0	18,8	χ^2 : 3,693	2
	Ausente	89,2	2,7	8,1	p: 0,158		
Kanamicina	<i>aac(6)/aph(2'')-3</i>	Presente	89,5	5,3	5,3	χ^2 : 1,744	2
	Ausente	79,4	11,1	9,5	p: 0,418		
	<i>aph(3')IIIa</i>	Presente	82,9	6,6	10,5	χ^2 : 4,508	2
	Ausente	84,0	16,0	0,0	p: 0,105		
	<i>ant(4')Ia3</i>	Presente	78,8	12,1	9,1	χ^2 : 0,765	2
	Ausente	85,3	7,4	7,4	p: 0,682		
Penicilina	<i>blaZ</i>	Presente	58,3		41,7	χ^2 : 12,117	1
	Ausente	90,2		9,8	p: 0,000*		
Amplicilina	<i>blaZ</i>	Presente	63,3		36,7	χ^2 : 11,264	1
	Ausente	92,7		7,3	p: 0,001*		
Oxacilina	<i>mecA</i>	Presente	81,5		18,5	Prueba Fisher	
	Ausente	100,0		0,0	p: 0,001*		
Cefoxitin	<i>mecA</i>	Presente	92,6		7,4	Prueba Fisher	
	Ausente	98,6		1,4	p: 0,173		

gl: grados de libertad; χ^2 : Chi-cuadrado.

* Estadísticamente significativo.

se asocia a mastitis bovina. La mastitis es considerada una enfermedad de importancia económica, de alto impacto en la salud pública debido al riesgo de infección a través del consumo de leche y derivados lácteos⁹.

El hallazgo de *S. aureus* como microorganismo prevalente en muestras de leche cruda ya ha sido reportado en Colombia en sistemas de producción lechera de Montería (Córdoba)¹¹. En el oriente antioqueño, en cambio, la prevalencia de ECN fue de un 23% y la de *S. aureus* de un 10,3% en 226 muestras tomadas en una finca de lechería especializada⁵³. En

un estudio similar, en una microcuenca lechera del norte de Antioquia, de 648 cultivos obtenidos de leche cruda un 10,2% fueron ECN⁴². En otro estudio realizado en el departamento del Tolima reportaron el aislamiento de ECN y de *S. aureus* en el 49,3% y 38% de muestras de leche cruda bovina, respectivamente (36/73 y 28/73)⁴⁶.

La prevalencia fue de 8,3% para *S. aureus* y 0,46% para ECN en un estudio semejante al aquí descrito. En ese estudio se investigó un total de 5.396 muestras de leche cruda en el altiplano boyacense³. La dinámica epidemiológica de

microorganismos patógenos en leche depende del sistema de producción, la región geográfica y los factores relacionados con el manejo de los animales³⁸, lo que podría explicar la discrepancia de resultados al comparar diversos estudios.

La presencia de *S. aureus* en leche bovina está asociada a la capacidad de este microorganismo de causar infecciones persistentes por expresión de factores de virulencia, los que ayudan a la cronicidad de las infecciones y permiten evadir la respuesta inmunitaria del huésped, con la consecuente supervivencia del patógeno en células de la glándula mamaria bovina. Los animales infectados pueden servir como reservorio y contribuir a la transmisión de este microorganismo a otros animales^{6,21}. En países de Latinoamérica con gran producción lechera, como Brasil y Argentina, el agente etiológico más predominante en animales con mastitis bovina es *S. aureus*^{35,39}.

En la caracterización de aislamientos de *Staphylococcus* spp. en leche cruda bovina también se identificaron ECN, considerados patógenos menores y asociados a infecciones intramamarias clínicas o subclínicas^{44,49,57}. Dentro de los ECN la especie que se identificó en mayor número fue *S. haemolyticus*, en coincidencia con lo reportado previamente^{33,44,52}. Las cepas de *S. haemolyticus* tienen diversos hábitats y han sido aisladas del ambiente y de sitios extramamarios, incluyendo el ápice de los pezones y la piel de la ubre, lo que explica por qué es común identificar esta especie en la leche bovina^{54,57}.

En lo relacionado con la sensibilidad a diferentes grupos de antimicrobianos, nuestros resultados difieren de los reportados por Calderón et al.¹¹ en sistemas de producción doble propósito en el trópico bajo colombiano, en el cual el 72,4% de las cepas de *S. aureus* recuperadas mostraron sensibilidad frente a cefoxitina, gentamicina, eritromicina, amoxicilina y ácido clavulánico; la frecuencia de cepas resistentes a tetraciclinas fue del 14,8% y a eritromicina del 0,3%¹¹. De igual forma, Ramírez et al.⁴³ encontraron un 28,6% de aislamientos de *S. aureus* sensibles a penicilina, un 24,3% tenían sensibilidad intermedia y un 57,1% se mostraron resistentes en un estudio realizado en la cuenca lechera de San Pedro de los Milagros (Antioquia)⁴³.

En cuanto a la respuesta a los diferentes antimicrobianos en las cepas de ECN evaluadas en el presente estudio es de resaltar el hallazgo de resistencia a la penicilina y la eritromicina, en concordancia con lo informado por Sánchez et al.⁴⁶, quienes reportaron un 61% de cepas de ECN con resistencia a penicilina. Otro estudio del mismo grupo⁴⁷ muestra en ECN una prevalencia de aislamientos resistentes a penicilina y eritromicina del 58% y 52%, respectivamente. Las cepas de ECN con frecuencia se aíslan de leche procedente de bovinos con mastitis subclínica, y las especies aisladas podrían variar entre localidades y sistemas de producción^{11,42,45}. Así, por ejemplo, en Argentina se ha encontrado resistencia a penicilina en cepas de *S. chromogenes* y *S. haemolyticus*⁴⁴.

Por otro lado, en lo referido a determinantes de resistencia a macrólidos, el gen *ermC* fue uno de los más frecuentes y estuvo asociado de manera significativa a la resistencia a eritromicina, datos similares a los reportados por varios autores^{16,18,23,40}.

Piatkowska et al.⁴⁰ y Ding et al.¹⁶ reportan que uno de los mecanismos de resistencia a macrólidos utilizados por

cepas de *Staphylococcus* spp. causantes de mastitis bovina es la modificación del sitio blanco, ya sea por metilación o mutación, lo que ocasiona cambios estructurales en el ARN ribosomal para impedir la unión de los macrólidos. Para esto, las cepas de *Staphylococcus* spp. sintetizan un tipo de enzimas denominadas metilasas ribosomales, codificadas por los genes *erm*^{16,40}.

Dentro de las cepas de *Staphylococcus* evaluadas en el presente estudio se encontraron cepas sensibles a la eritromicina que portaban los genes *erm*, lo cual puede estar relacionado con mutaciones en una región cercana al sitio de metilación en el gen *23S-ARNr*¹⁶. Sin embargo, existen otros marcadores genéticos como *msrA* que también se asocian a la resistencia a macrólidos, lo cual ha sido descrito previamente¹⁸.

En el presente estudio no se encontró asociación significativa entre la presencia de los genes *tetK* o *tetM* y la resistencia a la tetraciclina en las cepas de *Staphylococcus* spp. provenientes de leche, en concordancia con lo reportado por otros autores^{14,18}. Asimismo, se encontraron cepas sensibles a las tetraciclinas que portaban los genes *tet*; esta diferencia entre expresión fenotípica y presencia de genes *tet* ha sido reportada previamente por Duran et al.¹⁸ y Feng et al.²³.

También se encontró una discrepancia en las cepas de *Staphylococcus* spp. aisladas de leche cruda entre la expresión fenotípica y la presencia de determinantes genéticos de resistencia a aminoglucósidos, datos similares han sido reportados por Choi et al.¹². De los genes AME evaluados el que se detectó con mayor frecuencia fue *aph(3')-IIIa*. Estos resultados son concordantes con los de otros trabajos que reportan este gen como uno de los más prevalentes en cepas de *Staphylococcus*¹⁷. Sin embargo, en esta investigación, y a diferencia de la citada anteriormente, el gen *aph(3')-IIIa* no estuvo asociado a la resistencia a kanamicina. Adicionalmente, la presencia de los otros genes AME, como *aac(6')/aph(2'')-3* y *ant(4')-Ia3* está relacionada con la resistencia a otros antimicrobianos del grupo de aminoglucósidos, como gentamicina, amikacina y neomicina, entre otros^{12,17,48}.

Por otro lado, la resistencia al grupo de antibióticos β -lactámicos en cepas de *Staphylococcus* spp. ocurre mayormente por producción de β -lactamasas codificadas por el gen *blaZ*^{7,22}. Los antibióticos β -lactámicos forman parte de los compuestos activos más utilizados para el control de infecciones de glándula mamaria bovina en Colombia^{11,46,47}. Probablemente, el uso indiscriminado de estos antibióticos en medicina veterinaria ocasiona presión de selección y, por tanto, contribuye al desarrollo de resistencia, lo que sugiere que su empleo debe ser controlado^{7,22}.

El frecuente uso de estos antimicrobianos en sistemas de producción bovina podría explicar por qué más del 50% de las cepas de *Staphylococcus* caracterizadas en este trabajo portaban el gen *blaZ*, asociado a la resistencia a la penicilina y/o a la ampicilina. Estos resultados son concordantes con los de otros estudios, en los que la resistencia a β -lactámicos se debió a la presencia del gen *blaZ*^{18,22,60}. No obstante, se encontraron cepas sensibles a penicilina y/o ampicilina que portaban el gen *blaZ* y, de modo inverso, hubo cepas que fueron *blaZ* negativas, pero mostraron resistencia a estos antibióticos. Esta discrepancia entre las pruebas fenotípicas y genotípicas ha sido reportada

anteriormente y está relacionada con mutaciones puntuales en el lugar de adquisición de los genes^{22,23}.

En este estudio se logró la identificación de *S. aureus* meticilinoresistentes (SAMR) y ECN meticilinoresistentes aislados de leche bovina mediante la detección del gen *mecA*, el cual se identificó en el 27% de las cepas evaluadas. En Colombia no se han encontrado SAMR en muestras de leche bovina de acuerdo con lo reportado por varios autores, como Calderón et al.¹¹ y Monistero et al.³⁷. En cambio, se ha reportado el aislamiento de SAMR a partir de productos lácteos y carne bovina^{29,55}. Diversos autores en el mundo han informado la presencia de SAMR y de ECN meticilinoresistentes aislados de leche cruda bovina^{24,33,36}.

Se encontraron en este análisis cepas resistentes a cefoxitina que no portaban el gen *mecA*; asimismo, cepas *mecA* positivas fueron sensibles a dicho agente. Este fenómeno de heteroresistencia implicado en la diferencia de expresión fenotípica ya ha sido observado en muestras tomadas de sistemas de producción pecuarios, y puede estar relacionado con mutaciones puntuales en los genes asociados a la resistencia, lo que ocasiona que algunas cepas de un mismo clon no puedan expresar la resistencia antimicrobiana^{2,7,33,41}. Otra razón para la discrepancia de resultados entre pruebas fenotípicas y genotípicas podría vincularse con la presencia de algún otro marcador asociado a la resistencia a meticilina en las cepas SMR, como el gen homólogo *mecC*^{4,24,28}.

En cepas de este estudio clasificadas como *Staphylococcus* meticilinoresistentes se observó la presencia de genes AME. Muchos autores han reportado la estrecha relación entre la presencia de dichos genes y la resistencia a la meticilina en cepas de *Staphylococcus*, lo cual está relacionado con la localización cercana entre el gen *mecA* y los genes AME¹², así como también la presencia de los genes *ermB* y *ermC*^{1,48}. La composición del SCC*mec* permite la incorporación de otros marcadores de resistencia, hecho que explica por qué muchas cepas de SMR pueden ser resistentes a otros antimicrobianos, como aminoglucósidos y macrólidos, entre otros^{10,24,33}.

Debido a la naturaleza móvil del SCC*mec* de la cual forma parte el gen *mecA*, la resistencia puede ser transferida de una cepa a otra; asimismo, muchas especies de ECN y de *S. aureus* pueden encontrarse tanto en humanos como en animales, por lo tanto, la presencia de cepas resistentes puede representar un riesgo en salud pública y medicina veterinaria^{31,50,52}. Otra forma de diseminación de la resistencia entre especies de *Staphylococcus* es por ECN, que pueden servir como reservorio de determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana, los cuales pueden ser transferidos a otras especies como *S. aureus*⁵².

La adquisición de determinantes genéticos asociados a la resistencia antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus* y sus mecanismos son tan complejos que la presencia o ausencia de un gen de resistencia no indica que la cepa sea resistente o sensible a un antibiótico en particular^{23,25}. Por tanto, el diagnóstico de mastitis puede complementarse con el aislamiento y la identificación de los microorganismos patógenos causantes de la infección, así como con la determinación de sus perfiles fenotípicos de resistencia a antimicrobianos. Realizar de manera simultánea evaluaciones genotípicas puede ayudar a la caracterización de poblaciones con resistencia antimicrobiana^{4,34}.

Conclusión

Los diferentes patrones fenotípicos y genéticos en relación con la resistencia a los antimicrobianos encontrados en esta investigación sugieren una alta heterogeneidad microbiana interespecies; por lo tanto, las investigaciones podrían estar dirigidas a determinar esas diferencias entre especies, lo que ayudaría a establecer programas de control de mastitis más específicos y efectivos.

La detección de cepas de *Staphylococcus* de origen animal con resistencia a diversos antimicrobianos cobra particular interés por su posible participación y compromiso epidemiológico en la interacción y distribución de este tipo de cepas en la clínica intrahospitalaria humana, en la comunidad abierta y en la salud animal. Teniendo en cuenta que uno de los factores que contribuyen a que emerja multiresistencia es el uso indiscriminado de antimicrobianos, tanto en la práctica clínica humana como en veterinaria. Se hace necesario prestar atención al uso adecuado de medicamentos en la terapia de enfermedades, además de contemplar otras alternativas al uso de los antibióticos, como el mejoramiento de las condiciones de higiene y la realización de cambios en las prácticas ganaderas que reduzcan la posibilidad de presentación de mastitis y otras enfermedades frecuentes.

Financiación

Este estudio fue financiado con recursos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y ejecutado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (MADR) por financiar este estudio a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Además, queremos expresar nuestro agradecimiento a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) por proporcionar toda la infraestructura necesaria para llevar a cabo la investigación.

Bibliografía

1. Adwan G, Adwan K, Jarrar N, Amleh A. Molecular detection of nine antibiotic resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 2014;73:9–18.
2. Alnakip ME, Quintela-Baluja M, Böhme K, Caamaño-Antelo S, Bayoumi MA, Kamal RM, Merwad AM, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. Molecular characterization and typing the methicillin resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from raw milk and cheeses in northwest Spain: A mini survey. *Int Dairy J*. 2019;89:68–76.
3. Andrade RJ, Caro ZE, Dallos AE. Prevalencia de mastitis subclínica bovina y su etiología infecciosa en fincas lecheras

- del altiplano boyacense (Colombia). *Rev Cientif FCV-LUZ*. 2014;XXIV:305–10.
4. Aqib AI, Ijaz M, Farooqi SH, Ahmed R, Shoaib M, Ali MM, Mehmood K, Zhang H. Emerging discrepancies in conventional and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Microb Pathog*. 2018;116:38–43.
 5. Argudín MA, Tenhagen BA, Fetsch A, Sachsenröder J, Käsbohrer A, Schroeter A, Hammer JA, Hertwig S, Helmuth R, Bräunig J, Mendoza MC, Appe B, Rodicio MR, Guerra B. Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:3052–60.
 6. Artursson K, Söderlund R, Liu L, Monecke S, Schelin J. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet Microbiol*. 2016;193:156–61.
 7. Asfour H, Darwish S. Phenotypic and genotypic of both *mecA*- and *blaZ*-genes mediated β -lactam resistance in *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis. *Global veterinaria*. 2011;6:39–50.
 8. Bagcigil AF, Taponen S, Koort J, Bengtsson B, Myllyniemi A, Pyörälä S. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. *Acta Vet Scand*. 2012;54:1–7.
 9. Bar-gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehrlich R, Monecke S, Leitner G. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Vet Microbiol*. 2015;176:143–54.
 10. Becker K, Ballhausen B, Köck R, Kriegeskorte A. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: The “*mec* alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*. 2014;304:794–804.
 11. Calderón A, Rodríguez V, Arrieta G, Máttar S. Prevalence of mastitis in dual purpose cattle farms in Montería. *Rev Colom Cienc Pecua*. 2011;24:19–28.
 12. Choi SM, Kim S, Kim H, Lee D, Choi J, Yoo J, Kang J, Shin W, Kang M. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *J Korean Med Sci*. 2003;18:631–6.
 13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22th Informational Supplement, 2012; M100-S22. Wayne, PA, EE. UU.
 14. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; 4th Supplement, 2018; VET08. Wayne, PA, EE. UU.
 15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th Supplement, 2019; M100. Wayne, PA, EE. UU.
 16. Ding ZF, Zhang H, Tang W, Tong CY, Li RT, Chen LX, Pu LJ, Zhu ZB, Cui YD. Methylase genes-mediated erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in China. *Refu Vet*. 2012;67:170–9.
 17. Khosravi AD, Jenabi A, Montazeri EA. Distribution of genes encoding resistance to aminoglycoside modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Kaohsiung J Med Sci*. 2017;33:587–93.
 18. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J Med Res*. 2012;135:389–96.
 19. Emaneini M, Bigverdi R, Kalantar D, Soroush S, Jabalameli FB, Asadollahi NK, Taherikalani PM. Distribution of genes encoding tetracycline resistance and aminoglycoside modifying enzymes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a burn center. *Ann Burns Fire Disasters*. 2013;26:76–80.
 20. El Feghaly RE, Stamm JE, Fritz SA, Burnham CAD. Presence of the *blaZ* beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:388–93.
 21. Felipe V, Morgante CA, Somale PS, Varroni F, Zingaretti ML, Bachetti RA, Correa SG, Porporatto C. Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microb Pathog*. 2017;104:278–86.
 22. Feng Y, Long-hai LIU, Ling W, Xu-rong W, Xin-pu L, Jin-yin L, Zhe Z, Shi-dong Z, Zuo-ting Y, Hong-sheng L. Penicillin-resistant characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Gansu, China. *J Integr Agr*. 2017;16:1874–8.
 23. Feng Y, Qi W, Xu-rong W, Ling W, Xin-pu L, Jin-yin L, Shi-dong Z, Hong-sheng L. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. *J Integr Agr*. 2016;15:2842–7.
 24. Fernandes dos Santos F, Mendonça LC, Reis DRL, Guimarães AS, Lange CC, Ribeiro JB, Machado MA, Brito MAVP. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. *J Dairy Sci*. 2016;99:1374–82.
 25. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41:430–49.
 26. Ghotaslou R, Aghazadeh M, Ahangarzadeh M, Hassan M, Foroootanfar H, Hojabri Z, Saffari F. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes among coagulase negative staphylococci in Iranian pediatric patients. *J Infect Chemother*. 2014;20:569–73.
 27. Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H, Halasal T, Huijpsl K, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet Q*. 2007;29:18–31.
 28. Hamid S, Bhat MA, Mir IA, Taku A, Badroo GA, Nazki S, Malik A. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Vet World*. 2017;10:363–7.
 29. Herrera F, Santos J. Presencia de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes en queso doble crema artesanal. *Rev UDCA Actual Divulg Cient*. 2015;18:29–37.
 30. Hoque MN, Das ZC, Rahman ANMA, Haider MG, Islam MA. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *Int J Vet Sci Med*. 2018;6:53–60.
 31. Igbinsola E, Beshiru A, Akporehe L, Ogofo A. Detection of methicillin-resistant staphylococci isolated from food producing animals: A public health implication. *Vet Sci*. 2016;3:1–11.
 32. Khazandi M, Al-farha AA, Coombs W, Dea MO, Pang S, Trott DJ, Aviles RR, Hemmatzadeh F, Venter H, Ogunniyi AD, Hoare A, Abraham S, Petrovski KR. Genomic characterization of coagulase-negative staphylococci including methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* causing bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 2018;219:17–22.
 33. Klibi A, Maaroufi A, Torres C, Jouini A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52:17–22.
 34. Kulangara V, Nair N, Sivasailam A, Sasidharan S, Kollannur JD, Syam R. Genotypic and phenotypic β -lactam resistance and presence of PVL gene in Staphylococci from dry bovine udder. *PLoS One*. 2017;12:1–9.
 35. De Melo DA, Coelho S, Couto C, Carolina A, Rojas CM, Dubenczuk FC, De Mattos S, Coelho DO. Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. *Braz J Microbiol*. 2014;45:1075–82.
 36. Mohammed J, Ziwa MH, Hounmanou YMG, Kisanga A, Tuntufye HN. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Tanzania. *Int J Microbiol*. 2018;12:1–6.
 37. Monistero V, Graber HU, Pollera C, Cremonesi P, Castiglioni B, Bottini E, Id AC, Lasso-Rojas L, Id VK, Wente N, Petzer I, Santisteban C, Runyan J, Veiga M, Alves BG, Piccinini R,

- Bronzo V. *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes virulence genes. Toxins (Basel). 2018;10:1–22.
38. Moosavi M, Mirzaei A, Ghavami M, Tamadon A. Relationship between season, lactation number and incidence of clinical mastitis in different stages of lactation in a Holstein dairy farm. *Vet Res Forum*. 2014;5:13–9.
 39. Pereyra EAL, Dallard BE, Calvino LF. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Rev Argent Microbiol*. 2015;46:363–75.
 40. Piatkowska E, Piatkowski J, Przondo A. The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2012;17:633–45.
 41. Pu WX, Su Y, Li JX, Li CH, Yang ZQ, Deng HP, Ni CX. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS One*. 2014;9:1–9.
 42. Ramírez N, Arroyave O, Cerón M, Jaramillo M, Cerón J, Palacio LG. Factores asociados a mastitis en vacas de la microcuenca lechera del altiplano norte de Antioquia, Colombia. *Rev Med Vet*. 2011;22:31–42.
 43. Ramírez N, Gaviria G, Arroyave O, Sierra B, Benjumea J. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2016;14:76–87.
 44. Raspanti CG, Bonetto CC, Vissio C, Pellegrino MS, Reinoso EB, Dieser SA, Bogni CI, Larriestra AJ, Odierno LM. Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2016;48:50–6.
 45. Rumi MV, Huguet MJ, Bentancor AB, Gentilini ER. The *icaA* gene in staphylococci from bovine mastitis. *J Infect Dev Ctries*. 2013;7:556–60.
 46. Sánchez Bonilla MP, Gutiérrez Murillo NP. Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana del estafilococo coagulasa negativo aislado de mastitis bovina en fincas lecheras del Tolima, Colombia. *Rev Med Vet (Bogota)*. 2015;30:83–93.
 47. Sánchez MP, Gutiérrez NP, Posada IJ. Prevalencia de mastitis bovina en el Cañón de Anaimé, región lechera de Colombia, incluyendo etiología y resistencia antimicrobiana. *Rev Investig Vet Perú*. 2018;29:226–39.
 48. Shokravi Z, Mehrad L, Ramazani A. Detecting the frequency of aminoglycoside modifying enzyme encoding genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioimpacts*. 2015;5:87–91.
 49. Soares R, Nunes C, de Souza CP, Pereira KS, Mere E, Aguila D, Margaret V, Paschoalin F. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. *J Dairy Sci*. 2016;99:2641–53.
 50. Srednik ME, Archambault M, Jacques M, Gentilini ER. Antimicrobial resistance detection of a *mecC*-positive *Staphylococcus saprophyticus* from bovine mastitis in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;10:261–3.
 51. Suleiman TS, Karimuribo ED, Mdegela RH. Prevalence of bovine subclinical mastitis and antibiotic susceptibility patterns of major mastitis pathogens isolated in Unguja island of Zanzibar, Tanzania. *Trop Anim Health Prod*. 2018;50:259–66.
 52. Taponen S, Nykäsenoja S, Pohjanvirta T, Pitkälä A, Pyörälä S. Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Vet Scand*. 2016;58:1–13.
 53. Trujillo C, Gallego A, Ramírez N, Palacio LG. Prevalence of mastitis in dairy herds in Eastern Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2011;24:11–8.
 54. Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, van Coillie E, Haesebrouck F, Vlieghe SD. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *Vet J*. 2015;203:44–51.
 55. Vanegas M, Moreno J, Ramos V, Chirivi J, Garzón A, Arevalo S, Martínez M, Gardeazábal P, Baquero C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Colombian foods. *Bio*. 2012;2:61–7.
 56. Vargas K, Vidal J, Olivera M. Validación de método cualitativo para detección de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en muestras de leche para diagnóstico de mastitis. *Rev UDCA Actual Divulg Cient*. 2018;21:271–5.
 57. Wanecka A, Król J, Twardoń J, Mrowiec J, Bania J, Korzeniowska-Kowal A, Tobiasz A. Characterization of a genetically distinct subpopulation of *Staphylococcus haemolyticus* isolated from milk of cows with intramammary infections. *Vet Microbiol*. 2018;214:28–35.
 58. Wang D, Wang Z, Yan Z, Wu J, Ali T, Li J, Lv Y, Han B. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infect Genet Evol*. 2015;31:9–16.
 59. Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehrlich R, Schwarz S, Kadlec K. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin Sarah. *Int J Med Microbiol*. 2013;303:338–49.
 60. Xu J, Tan X, Zhang X, Xia X, Sun H. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. *Microb Pathog*. 2015;88:29–38.
 61. Zubeir IE, Kiessling S, Kutzer P, Wieler LH, El Owni OA. Characterization of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Khartoum State, Sudan. *U of K J Vet Med & Anim Prod*. 2012;3:53–64.