

Deteccion de genes nucleasa y coagulasa en cepas *Staphylococcus aureus* de mastitis bovina, aplicando la reaccion en cadena de la polimerasa - Detection of nuclease and coagulase genes in *Staphylococcus aureus* of bovine mastitis, by using Polymerase Chain Reaction

Huertas Caro, Carlos Alexander: Grupo de investigación del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Boyacá, *Campus Universitario: Cra 2 este N 64-169 Tunja, Boyacá; Colombia. Tel. (8)7450000 - Fax. (8) 7450044.* Tunja, Colombia | **Ferrebus Cardozo, Atilio Junior:** Grupo de investigación del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Boyacá, *Campus Universitario: Cra 2 este N 64-169 Tunja, Boyacá; Colombia. Tel. (8)7450000 - Fax. (8) 7450044.* Tunja, Colombia | **Osorio Zambrano, William Frend:** Grupo de Investigación Núcleo. Universidad de Boyacá. *Campus Universitario: Cra 2 este N 64-169 Tunja, Boyacá; Colombia. Tel. (8)7450000 - Fax. (8) 7450044.* Tunja, Colombia | **Tórres Caycedo, María Inés:** Grupo de investigación del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Boyacá, *Campus Universitario: Cra 2 este N 64-169 Tunja, Boyacá; Colombia. Tel. (8)7450000 - Fax. (8) 7450044.* Tunja, Colombia | **Angarita Merchán, Maritza*:** Grupo de investigación del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Boyacá, *Campus Universitario: Cra 2 este N 64-169 Tunja, Boyacá; Colombia.* Email: mangarita@uniboyaca.edu.co , gribac@uniboyaca.edu.co

Resumen

La mastitis es una enfermedad de alto costo para industria láctea y el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es uno de los agentes etiológicos más comunes de la mastitis bovina contagiosa en el mundo. La utilización de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) en la identificación de *S. aureus* en aislados de mastitis bovina ha demostrado ser rápida, sensible y específica, lo que permite un diagnóstico rápido y certero que reduce costos y evita complicaciones clínicas. Para identificar la presencia de cepas de *S. aureus* aisladas de muestras de leche, nosotros estandarizamos la técnica de RCP para la detección de los genes *coa* y *nuc*, y luego determinamos la reproducibilidad de los protocolos utilizando dos cepas control de *S. aureus* y 31 aislados de mastitis bovina. Este estudio presenta los resultados de la estandarización de las RCPs para los genes *nuc* y *coa*, y su evaluación de reproducibilidad. **Materiales y métodos:** Iniciadores empleados, gen *coa*: 5'ATAGAGATGCTGGTACAGC3' (forward) y 5'GCTTCCGATTGTTTCGATGC3' (reverse), y gen *nuc*: 5'GCGATTGATGGTGATACGGTT3' (forward) y 5'AGCCAAGCCTTGACGAAGTAAAGC3' (reverse). En la evaluación de la repetibilidad de las RCPs se emplearon dos cepas control *S. aureus* (ATCC 43300 y ATCC 29213) y 31 aislados de *Staphylococcus* obtenidos en un estudio de mastitis bovina del departamento de Boyacá (Colombia). **Resultados:** En la estandarización de la RCP para los genes *nuc* y *coa* se determinó que el reactivo listo para usar, *2X PCR Taq MasterMix*

with dye, genera buenos resultados con ambos genes. Las temperaturas y tiempos que debieron ajustarse para obtener óptimos resultados en ambas RCPs fueron en la fase de hibridación, en el caso del gen *nuc* a 56,7°C y 40 segundos, y para el caso del gen *coa* a 60,4°C y 30 segundos. Además, la evaluación de la reproducibilidad de las RCPs usando aislados de muestras bovinas presentó una sensibilidad de 100% para el gen *nuc* y 90,32% para el gen *coa*. **Conclusiones:** La técnica RCP para los genes *nuc* y *coa* es un método rápido y certero para la detección de cepas de *S. aureus* obtenidas de muestras de leche de animales con síntomas de mastitis.

Palabras clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa | *Staphylococcus aureus* | Coagulasa | Nucleasa | Mastitis bovina

Abstract

Mastitis is a high-cost disease for the dairy industry and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is one of the most common etiological agents of contagious bovine mastitis in the world. The use of the technique of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in the identification of *S. aureus* in bovine mastitis has been shown to be rapid, sensitive and specific, allowing a fast and accurate diagnosis that reduces costs and clinical complications. To identify the presence of strains of *S. aureus* isolates from milk samples, we standardized a PCR technique for the detection of genes *coa* or *nuc*, and then, we determined the reproducibility of both protocols using two control strains of *S. aureus* and 31 isolates from bovine mastitis. This study presents the results of the standardization of the PCRs for the genes *nuc* and *coa*, and the evaluation of their reproducibility. **Materials and methods:** Primers used for gene *coa*: 5'ATAGAGATGCTGGTACAGC3' (forward) and 5'GCTTCCGATTGTTTCGATGC3' (reverse), and for gene *nuc*: 5'GCGATTGATGGTGATACGGTT3' (forward) and 5'AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC3' (reverse). We used for the evaluation of the repeatability of the PCRs, two control strains *S. aureus* (ATCC 43300 and ATCC 29213) and 31 isolates of *Staphylococcus* obtained from a bovine mastitis study from the department of Boyacá (Colombia). **Results:** In the standardization of the PCR for the genes *nuc* and *coa*, it was determined that the ready-to-use reagent, 2X PCR Taq MasterMix with dye, works efficiently with both genes. The temperatures and times that had to be adjusted to obtain optimal results in both PCRs were in the hybridization phase, in the case of *nuc* gene at 56.7 ° C and 40 seconds, and in the case of *coa* gene at 60.4 ° C and 30 seconds. In addition, the evaluation of the reproducibility of the PCRs using isolates from bovine samples showed 100% for *nuc* gene and 90.32% for *coa* gene. **Conclusions:** The PCR techniques for *nuc* and *coa* genes are fast and accurate methods for the detection of strains of *S. aureus* obtained from milk samples from animals with symptoms of mastitis.

Keywords: Polymerase Chain Reaction| *Staphylococcus aureus*| Coagulase | Nuclease| Bovine mastitis.

INTRODUCCION

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es un patógeno versátil que puede afectar humanos y animales (1,2). En el caso de los humanos, *S. aureus* puede producir diversas patologías que van desde los abscesos de piel, septicemias mortales, choque tóxico estafilocócico, hasta la intoxicación alimentaria por enterotoxinas (1). En el caso particular del ganado bovino, este patógeno es el agente primario de mastitis clínica o subclínica (2–8).

La bacteria *S. aureus* puede producir diferentes enzimas que le confieren capacidad patógena, mecanismos de supervivencia y resistencia a algunos antibióticos (9–13). Dentro de las enzimas expresadas por cepas de *S. aureus* que confieren patogenicidad están las enzimas coagulasa y nucleasa, las cuales están codificadas por el gen *coa* y *nuc*, respectivamente (10–18). Las cepas de *S. aureus* con la capacidad de producir las enzimas coagulasa y nucleasa son un potencial peligro para la salud humana y animal, por tanto, su identificación es necesaria para prevenir y controlar serias patologías que puedan afectar a los humanos y animales (11–13,19). Aún más, entre las siete especies de los denominados *Staphylococcus* Coagulasa Positivo (SCP – *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* y *S. pseudintermedius*), la especie que presenta mayor relevancia en humanos es *S. aureus* debido a su capacidad de producir infecciones e intoxicaciones (19).

Una identificación rápida y precisa de la bacteria causal de mastitis bovina es crucial para un manejo y tratamiento adecuado de la infección. Aunque, el cultivo bacteriano sigue siendo el método estándar para la identificación de microorganismos causantes de mastitis, esta técnica tiene el inconveniente de requerir un tiempo de 24 a 48 horas para proveer un resultado. El tratamiento de la mastitis bovina requiere un rápido diagnóstico y asertivo tratamiento para prevenir mayores costos y evitar complicaciones mayores como la pérdida del cuarto mamario afectado o la diseminación de la infección (20–23). Como respuesta a la necesidad de un diagnóstico expedito y preciso, la utilización de técnicas modernas de biología molecular se ha extendido en la identificación de diferentes microorganismos causantes de múltiples patologías, y esto debido a su rapidez, alta especificidad, sensibilidad, adaptabilidad y aplicabilidad (24,25). Entre estas modernas herramientas se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) que es utilizada para identificar las diferentes cepas de *Staphylococcus* (24,26) y las cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (SARM) (27,28).

Las infecciones producidas por *S. aureus* son consideradas de alto riesgo para la salud humana y animal, y esto es especialmente preocupante cuando dichas cepas pueden presentar genes de patogenicidad y/o resistencia a antibióticos (3,9,26,27). En un estudio realizado en el departamento de Boyacá, Hernández-Barrera *et al.* (2015) detectaron la presencia de *Staphylococcus* spp. como agentes oportunistas, y, además, determinaron una elevada prevalencia de *S. aureus* (83%) en las mastitis bovinas evaluadas (29). Para identificar la presencia de cepas de *S. aureus* aisladas por dicho estudio, nosotros estandarizamos la técnica de RCP para la detección de los genes coagulasa (*coa*) y nucleasa (*nuc*), y luego determinamos la reproducibilidad del protocolo utilizando dos cepas control de *S. aureus* y 31 aislados de mastitis bovina provenientes del mismo estudio.

Este artículo presenta los resultados de la estandarización de una RCP para los genes *coa* y *nuc*, y su evaluación de reproducibilidad detectando dichos genes en cepas de *S. aureus* aisladas por Hernández *et al.* (29).

MATERIALES Y METODOS

Cepas de *Staphylococcus aureus*:

Se emplearon dos cepas de *S. aureus* (ATCC 43300 y ATCC 29213) y 31 aislados de *Staphylococcus* para la estandarización y evaluación de reproducibilidad preservadas a -80°C.

Cultivo de las cepas:

Las cepas control y los aislamientos de *S. aureus*, se reactivaron en agar nutritivo y caldo manitol incubado a 37°C por 24 horas, tomándose colonias puras para su posterior incubación en caldo BHI a 37° por 12 horas.

Extracción de ADN:

La extracción de ADN bacteriano se realizó empleando el kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification* de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Reacción en Cadena de la Polimerasa:

Se empleó el reactivo premezclado *2X PCR Taq MasterMix with dye* de *Applied Biological Materials* (ABM) que contiene una concentración balanceada de ADN Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y demás componentes necesarios para la RCP según se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Componentes de 2X PCR Taq MasterMix with dye de ABM. (46)

Componente	Concentración
Tris-HCl	20 mM
Tween® 20	0.1%
MgCl ₂	3 mM
KCl	100 mM
dNTPs	0.4 mM
Taq DNA Polymerase	50 units/ml

El uso de este reactivo premezclado RCP nos permitió ahorrar tiempo y reducir el riesgo de contaminación al acortar el número de etapas de pipeteo necesarias para la ejecución de la técnica (30). La estandarización de la RCP para el gen *coa* se basó en el protocolo descrito por Afrough *et al.*, modificando volúmenes de reacción, temperaturas y tiempos en la fase de hibridación (31). En el caso del gen *nuc*, la estandarización de la RCP fue basada en el protocolo de Brizzio *et al.* 2013 (32), con modificaciones en cuanto a

volúmenes de reacción, temperaturas y tiempos en la fase de hibridación. Para determinar las condiciones óptimas en la fase de hibridación se realizaron nueve montajes para cada gen (*coa* y *nuc*) con diferentes temperaturas en el rango (40 a 65°C Δ 5°C), tiempos (20 a 40 segundos Δ 5 segundos) y volúmenes (25 y 50 μ L de volumen final). Las concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción y el ADN molde se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración de los componentes y ADN para la amplificación de genes

Componente	Coagulasa	Nucleasa
Tris-HCl	10 mM	10 mM
Tween® 20	0.05%	0.05%
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM
KCl	50 mM	50 mM
dNTPs	0.2 mM	0.2 mM
Taq DNA Polymerase	25 units/ml	25 units/ml
Primer Forward	0,2 μ M	0,2 μ M
Primer Reverse	0,2 μ M	0,2 μ M
ADN molde	80-100 ng/ μ L	80-100 ng/ μ L

Iniciadores:

Para la estandarización del RCP para el gen coagulasa se emplearon los iniciadores *coa* forward: 5'-ATA GAG ATG CTG GTA CAG C-3' y reverse: 5'-GCT TCC GAT TGT TCG ATG C-3', y para la estandarización del RCP para el gen nucleasa se emplearon los iniciadores *nuc* Forward: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' y Reverse: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'.

Gel de agarosa y electroforesis:

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1% a 75 V por 40 minutos y se revelaron con *Safe view classic* (ABM), detectándose las bandas en un transiluminador *UltraSlim Led* (Maestrogen).

RESULTADOS Y DISCUSION

Estandarización de la RCP:

En una RCP las concentraciones molares de los componentes son importantes para lograr especificidad, rendimiento y fidelidad en los resultados, ya que la reacción de amplificación depende del equilibrio entre los elementos que la componen y una variación de los mismos puede conllevar a una alteración significativa de su estabilidad y fiabilidad (25). En esta estandarización de la RCP no modificamos las concentraciones de los componentes de la *mastermix*, manteniendo su condición de reactivo listo para usar. Las concentraciones molares de la *mastermix* demostraron funcionar adecuadamente al observarse bandas definidas en la separación electroforética en gel de agarosa de los amplicones.

En el estudio elaborado por Brizzio *et al.* (2013) se realizó una caracterización molecular simultánea de *S. aureus* y enterotoxinas estafilocócicas en aislamientos de brotes de

origen alimentario mediante RCP múltiple (32). En dicho estudio usaron *2X GoTaq Green MasterMix Buffer*, y las concentraciones finales para la RCP fueron 3 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs y 0,4 μM para cada iniciador (Pérez de Castro, 2010). En nuestra estandarización utilizamos 0.2 mM dNTPs y 1.5 Mm MgCl₂, dadas por el reactivo premezclado, estas concentraciones corresponden a la mitad de la concentración utilizada en la estandarización realizada por el estudio de Brizzio y colegas. Una explicación de la razón de por qué el protocolo de Brizzio y colegas utiliza el doble de la concentración de los reactivos en la RCP múltiple, es la detección simultánea de varios genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* y *nuc*), lo que implica la necesidad de una mayor concentración de reactivos para suplir la demanda de seis genes amplificándose simultáneamente.

Becker *et al.* (2005) realizaron la estandarización de una RCP para el gen *termonucleasa* de *Staphylococcus intermedius* utilizando una *MasterMix* compuesta por 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 50 pmol (0,00005 μM) de cada iniciador, 1.25 U Taq ADN polimerasa y 100 ng ADN (34). Cuando comparamos nuestra estandarización con el protocolo de Becker y colegas, se observa una importante variación en cuanto a la concentración de los componentes en la mezcla realizada, esta variación en la concentración de los iniciadores y la Taq ADN polimerasa se explica, debido a que este montaje se realizó como ensayo multiplex para 6 genes, requiriendo mayor concentración de los dNTPs garantizando 6 amplificaciones simultáneas.

El rendimiento de la temperatura de un termociclador y la evaporación de las muestras son factores comunes que pueden afectar los resultados de una PCR. Dependiendo las condiciones del equipo utilizado se deben evaluar diferentes volúmenes finales para determinar cuál es el menor volumen que arroje resultados específicos con el fin de ahorrar reactivos y así reducir el costo de la prueba (33,35,36). En esta estandarización probamos los volúmenes finales de 25 y 50 μL para ambos genes (*nuc* y *coa*). En la estandarización de la RCP para el gen *nuc* se determinó que el volumen final de 50 μL da los mejores resultados al observarse bandas más definidas de los amplicones (276pb) en el gel de electroforesis (Figura 1A). En el caso de la estandarización de la RCP para el gen *coa*, el volumen de 25 μL mostró un mejor resultado al producir una banda más definida y de mayor intensidad (Figura 1B).

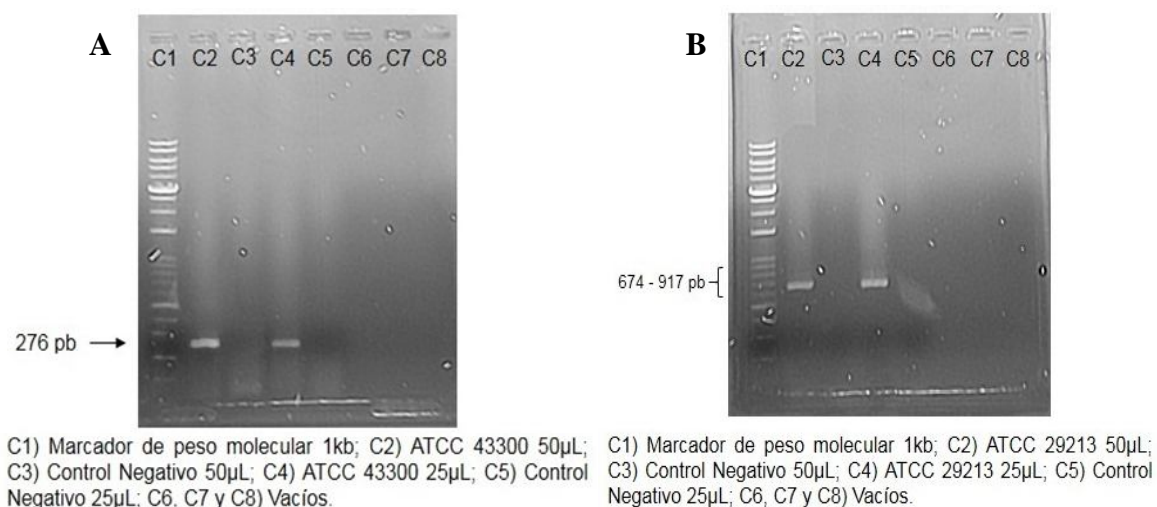


Figura 1. Electroforesis en agarosa (1%) de la amplificación de los genes *coa* y *nuc* a volúmenes finales de reacción de 25 y 50 μL. A) gen *nuc* y B) gen *coa*.

El tiempo y la temperatura de los ciclos en un termociclador son fundamentales en los resultados de una RCP. En la fase de desnaturalización un tiempo demasiado largo o una temperatura muy elevada puede degradar la Taq polimerasa evitando que se sinteticen las nuevas cadenas de ADN (37). En la fase de hibridación la temperatura depende principalmente del porcentaje de citosina y guanina de los iniciadores ($T_m = 4[G+C] + 2[A+T]$ – donde A, T, C y G son el número de residuos de cada nucleótido que presenta el iniciador). Es requerido conocer la temperatura de fusión de los iniciadores (*melting temperature* o T_m), debido a que la temperatura de alineamiento de los iniciadores depende de su temperatura de fusión (T_m) (38). En la fase de extensión la temperatura óptima es 72°C para la Taq polimerasa, donde tiene su mayor punto de catálisis (incorporando 100pb por segundo) (25).

Otro factor a tener en cuenta en una RCP es el tiempo exacto de cada fase, debido a que si son demasiado cortos no habrá suficiente tiempo para que ocurran las reacciones o si son demasiados largos se pueden afectar los reactivos y la óptima realización de las diferentes etapas de la RCP. En este estudio, nosotros evaluamos diferentes tiempos y temperaturas para la fase de hibridación que fueron obtenidos a partir del programa “*TM Calculator*” de ThermoFisher, el cual calcula la T_m de los iniciadores y estima la temperatura adecuada de hibridación (alineamiento) para una determinada ADN polimerasa (39). A partir de los resultados generados por *TM Calculator*, se realizaron nueve montajes para cada gen (*coa* y *nuc*) empleando rampas de temperaturas desde 40 a 65 °C (incremento de 5 °C) y diferentes tiempos entre 20 y 40 segundos (incrementos de 5 segundos) durante la fase de hibridación para determinar las mejores condiciones de alineamiento específico de los iniciadores (Tabla 3), y así mejorar los resultados de la reacción. La evaluación de la especificidad y calidad de los amplicones generados en las diferentes condiciones se realizó mediante una electroforesis en gel.

Tabla 3. Ensayo de condiciones de hibridación para los genes *nuc* y *coa*

GEN	TEMPERATURA	TIEMPO				
<i>nuc</i>	40 °C	20 seg	25 seg	30 seg	35 seg	40 seg
	45 °C					
	50 °C					
	55 °C					
	60 °C					
<i>coa</i>	45 °C	20 seg	25 seg	30 seg	35 seg	40 seg
	50 °C					
	55 °C					
	60 °C					
	65 °C					

El mejor resultado de las condiciones probadas para el gen *nuc* se obtuvo en el montaje a 56,7°C y 40 segundos (Tabla 4 y Figura 2A). Para el gen *coa*, se evaluó un gradiente de temperatura entre 40 y 65°C y unos tiempos entre 20 y 40 segundos. Un rango de temperatura más elevado para los iniciadores del gen *coa* debió ser utilizado debido a la poca especificidad que presentaron los mismos cuando fueron probados en el rango teórico ideal (forward T_m : 50,9°C y reverse T_m : 55,6°C). Se obtuvo un resultado óptimo para los iniciadores del gen *coa* a 60,4°C por 30 segundos (Tabla 4 y Figura 2B). La presencia de bandas inespecíficas a las temperaturas teóricas reportadas en el caso de los iniciadores del gen *coa* indica que existen factores diferentes a la secuencia de los iniciadores que pueden afectar la temperatura de hibridación ideal y que es necesario

realizar un proceso de experimentación para poder determinar la temperatura más apropiada en cada caso.

Tabla 4. Condiciones de amplificación utilizadas para los genes *nuc* y *coa*

GEN	FASE	TEMPERATURA	TIEMPO	
<i>nuc</i>	Desnaturalización Inicial	95 °C	5 Minutos	
	35 Ciclos	Desnaturalización	95 °C	30 Segundos
		Hibridación	56,7 °C	40 Segundos
		Extensión	72 °C	30 Segundos
	Extensión Final	72 °C	10 minutos	
	Mantener	4 °C	Infinito	
<i>coa</i>	Desnaturalización Inicial	94 °C	3 Minutos	
	30 Ciclos	Desnaturalización	94 °C	45 Segundos
		Hibridación	60,4 °C	30 Segundos
		Extensión	72 °C	90 Segundos
	Extensión Final	72 °C	10 minutos	
	Mantener	4 °C	Infinito	

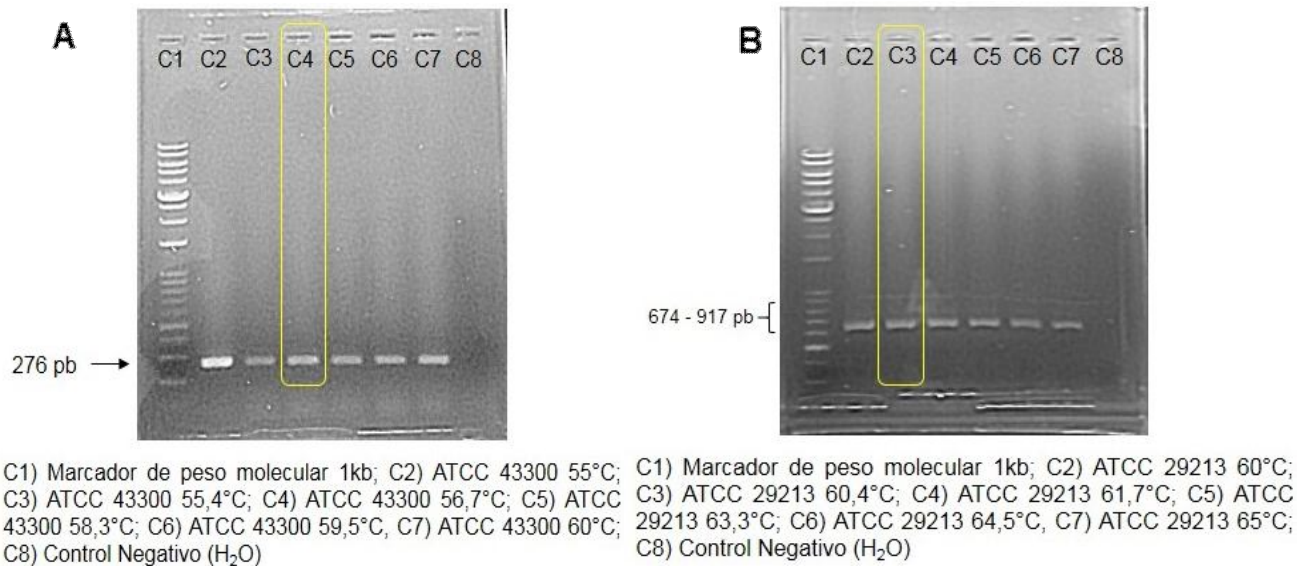


Figura 2. Electroforesis en agarosa 1% de la amplificación de los genes *coa* y *nuc* a diferentes temperaturas y tiempos en la fase de hibridación. A) gen *nuc*. B) gen *coa*.

Al realizar una comparación entre la estandarización realizada por nosotros y los protocolos utilizados como referencia, se observan diferencias en la temperatura y tiempo de la fase de hibridación. Nuestras condiciones óptimas para la RCP del gen *coa* en la fase de hibridación fueron 60,4°C y 30 segundos, mientras que el protocolo reportado por Afrough y colaboradores fue de 55°C y 30 segundos (31) empleando un set diferente de iniciadores. Una variación en la temperatura de 6°C se puede explicar por la utilización de iniciadores con diferentes características termodinámicas en los dos trabajos (40). En cuanto a la RCP para el gen *nuc*, nuestro estudio presentó resultados óptimos para la fase de hibridación con 56,7°C y 40 segundos, lo cual contrasta con las condiciones utilizadas por Brizzio y colaboradores (50°C y 30 segundos) (32). En este caso se observa un aumento de la temperatura y el tiempo (6,7°C y un incremento de 10 segundos) a pesar de que ambos estudios emplearon los mismos iniciadores. Un estudio

realizado por Tavares-Marques y Reyna-Bello (2006) sobre la estandarización de RCP para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina demostró resultados óptimos en la fase de hibridación a temperaturas más elevadas de las predichas (64°C) empleando el mismo set de iniciadores, con lo que lograron evitar reacciones inespecíficas (41).

Para evaluar la variación entre la temperatura predicha y la optimizada, analizamos los iniciadores en el programa “*TM calculato*” de ThermoFisher Scientific (39), el análisis nos arroja que en referencia a las Tm de ambos iniciadores, existe una diferencia mayor a 5°C (56.7 versus 61.8), recomendando no emplear este set de iniciadores en conjunto, el análisis computacional, sin embargo, predice una temperatura de hibridación de 51.7 °C, la cual se acerca a las condiciones empleadas por Brizzio y colaboradores.

Un estudio reportado por von Ahsen y colaboradores en el 2011, al evaluar las temperaturas de hibridación de oligonucleótidos en presencia de diferentes concentraciones salinas, indica que la predicción de Tm para los iniciadores debe considerar la concentración de iones divalentes (Mg⁺²) en la mezcla de reacción, demostrando que incluir este factor para la predicción produce mejores resultados (42). En nuestro estudio, la concentración de Mg⁺² es la mitad de la concentración empleada por Brizzio en su estudio, nuestra experiencia indica que variaciones relativas al termociclador no genera una fuente de error como la encontrada en nuestro montaje (6,7°C y 10 segundos de duración). Por lo expuesto y considerando una diferencia en el Tm de los iniciadores de 5.1 °C, calculada sin considerar las concentraciones de iones divalentes, el uso de diferentes concentraciones de Mg⁺² en la mezcla de reacción y la posible formación de estructuras secundarias, pueden influir en el aumento de la temperatura para lograr la hibridación de los iniciadores.

En nuestro caso para el gen *nuc* la temperatura óptima en la fase de hibridación fue de 56,7°C y para el gen *coa* fue de 60,4°C. Estos resultados indican que en el desarrollo de la estandarización de una RCP se inicia con rangos de temperatura de hibridación teóricos ideales de acuerdo a la composición de los iniciadores, pero si estas temperaturas no arrojan resultados de amplificación específicos se debe ampliar el rango de temperatura para lograr resultados óptimos. Además, la situación de que las temperaturas teóricas de hibridación no siempre coincidan con las temperaturas experimentales sugiere la presencia de factores diferentes a la composición de los iniciadores que pueden afectar las condiciones ideales de una determinada RCP.

Evaluación de la reproducibilidad de la RCP para los genes *nuc* y *coa*:

La reproducibilidad del protocolo estandarizado en nuestro estudio se evaluó empleando las mismas condiciones de manipulación e instrumentos con diferentes operarios en diferentes horarios y días (43). Se obtuvo una reproducibilidad del 100% al realizar el montaje de la RCP para el gen *nuc*, 31 de 31 muestras presentaron una banda definida de 276pb (Figura 3A).

*Tabla 5. Polimorfismos del Gen *coa*, identificados por PCR (45)*

Polimorfismo	XS	SS	S	M	L	LL	XL	XLL
Tamaño (pb)	350	431	512	593	674	755	836	917

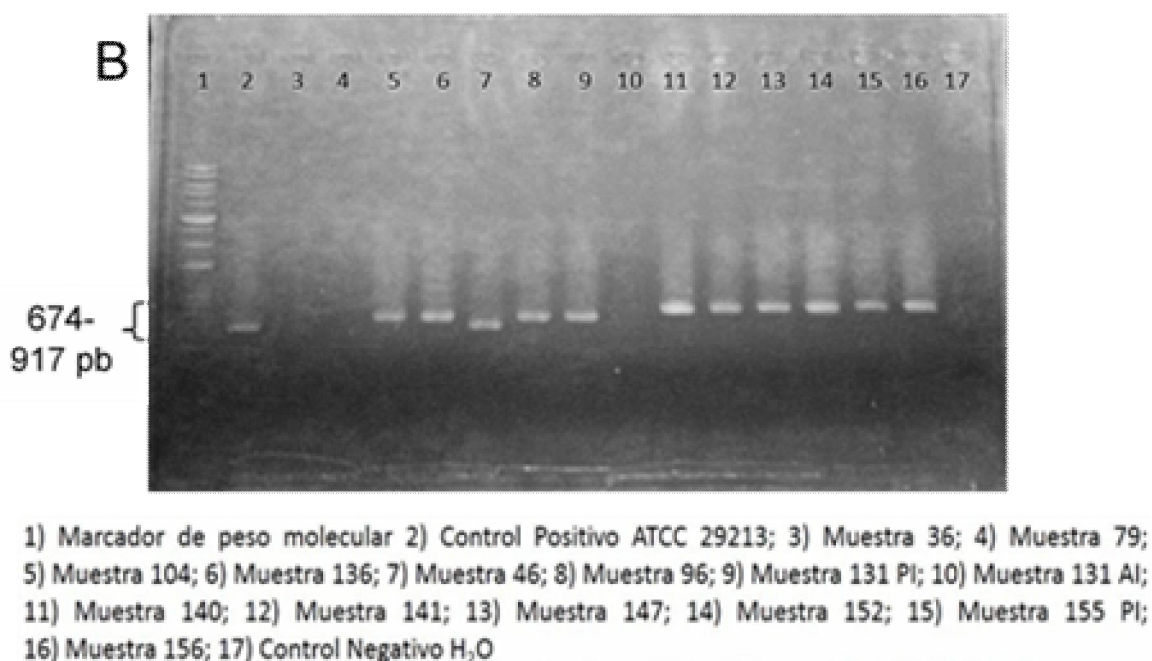
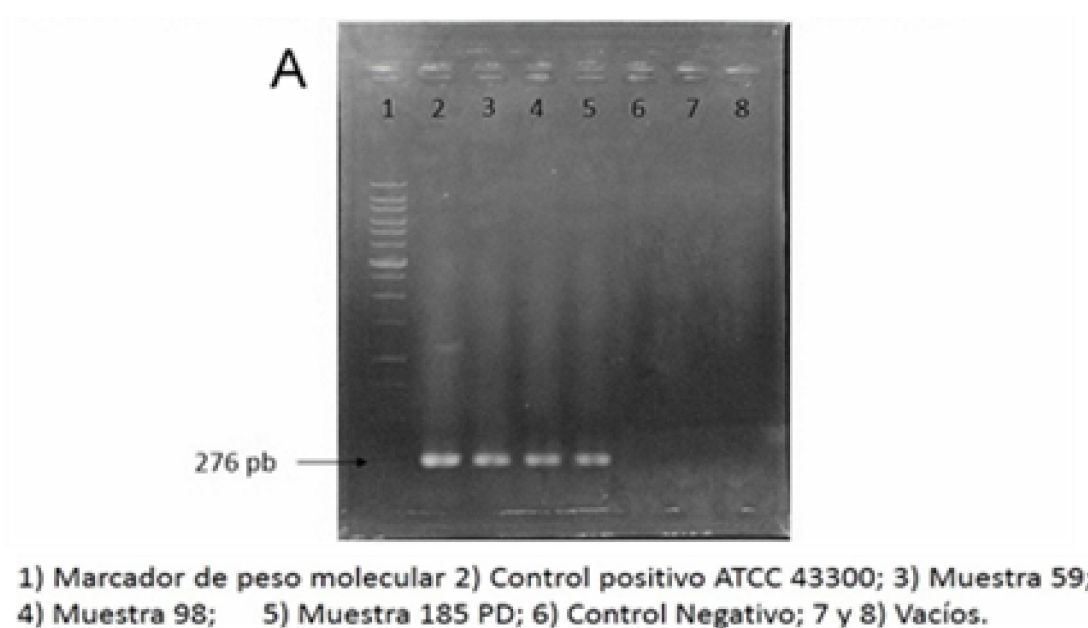


Figura 3. Electroforesis en agarosa 1% de la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de mastitis bovina mediante la amplificación de los genes *coa* y *nuc*. A) gen *nuc*. B) gen *coa*.

Con respecto al gen *coa* se obtuvo una reproducibilidad del 90,32%, lográndose la amplificación en 28 muestras de las 31 muestras de ADN. La ausencia de banda de amplificación en tres muestras podría explicarse por la presencia de alcoholes en las muestras de ADN, los cuales pueden inhibir la RCP (Figura 3B). En dos muestras se observó la presencia de doble banda, lo cual se puede atribuir a diferentes factores como la contaminación con ADN, inespecificidad o formación de estructuras secundarias en los iniciadores (44) o por los polimorfismos presentes en el gen *coa* (31). Ishino y colaboradores (2007) empleando la técnica de RCP con polimorfismos en la longitud de

los fragmentos (PCR-RFLP) en cepas de *S. aureus*, realizó la amplificación del gen *coa* utilizando los mismos iniciadores de nuestro estudio, evaluando la presencia de los polimorfismos del gen *coa*, en la amplificación inicial identificó 8 productos en un rango de 350 – 917pb (Tabla 5) con incrementos de 81pb, reflejando el número de unidades de 81pb contenidos en el gen, estos amplicones representan los polimorfismos para el gen *coa* (45). En la figura 3B, se pueden evidenciar la presencia de tres posibles polimorfismos, identificados por los patrones de electroforesis, polimorfismo L de 674pb en la línea 7, polimorfismo LL de 755pb en las líneas 4, 5, 8 y 9 y el polimorfismo XL de en las líneas 11 a 16 (Figura 3B), los polimorfismos LL y XL presentan un patrón de migración muy cercano por lo cual se recomienda optimizar la electroforesis para permitir mayor resolución en esta área. En las líneas 3, 4 y 10 no se evidencia ninguna banda, por problemas de amplificación por interferencia con alcoholes o por la presencia de un polimorfismo de bajo peso molecular que no fue posible evidenciar en la electroforesis realizada.

Los resultados obtenidos en esta estandarización de RCP para los genes *nuc* y diversos polimorfismos del gen *coa* indican que este método propuesto permite un diagnóstico rápido, confiable, específico y certero de cepas de *S. aureus* provenientes de aislados de mastitis bovina.

CONCLUSIONES

En el proceso de estandarización de la RCP para los genes *nuc* y *coa* se concluye que las condiciones en general a ajustar están más relacionadas con la temperatura y tiempo de la fase de hibridación. También, se evidencia que, en este proceso práctico de ensayo y error, las temperaturas teóricas ideales para unos determinados iniciadores no siempre coinciden con lo encontrado en la práctica. Igualmente, los volúmenes adecuados para generar una buena calidad de amplicones pueden variar significativamente (25 µL para el gen *coa* y 50 µL para el gen *nuc*) y es algo que debe ser definido de forma práctica en el proceso de estandarización de una RCP para un determinado gen, equipo y condiciones.

La técnica de RCP para los genes nucleasa (*nuc*) y coagulasa (*coa*) se establece como un método certero para la detección temprana de cepas de *S. aureus* y otras cepas de SCP, a partir de muestras de diferentes orígenes (humano y animal). La aplicabilidad de esta rápida y sensible técnica en la detección de mastitis bovina clínica y subclínica producida por *S. aureus* es clara y esto se demuestra por sus elevados porcentajes de detección (90.32% mediante el gen *coa* y 100% con el gen *nuc*). La utilización de esta moderna herramienta de la biología molecular permite un diagnóstico rápido y certero, lo cual facilita un tratamiento oportuno que puede reducir los costos y prevenir complicaciones asociadas a la presencia de este patógeno.

El establecimiento de la RCP para la detección de *S. aureus* como un proceso rutinario es una necesidad en las diferentes lecherías de Colombia. Futuros trabajos de detección de *S. aureus* en mastitis bovina clínica y subclínica deberían enfocarse en determinar la prevalencia de este patógeno en Boyacá y en Colombia.

REFERENCIAS

1. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):603–61.
2. Peton V, Le Loir Y. Staphylococcus aureus in veterinary medicine. Infect Genet Evol. 2014;21:602–15.
3. Raza A, Muhammad G, Sharif S, Atta A. Biofilm Producing *Staphylococcus aureus* and Bovine Mastitis: A Review. Mol Microbiol Res [Internet]. 2013; Available from: <http://biopublisher.ca/index.php/mmr/article/view/630>
4. Padhy A, Sahu A, Shekhar S, Sahoo S, Sahoo A, Dalai N. Staphylococcus aureus: An Emergent Cause of Bovine Mastitis In India-A Review. Int J Livest Res [Internet]. 2015;5(2):1. Available from: <http://www.scopemed.org/?mno=178617>
5. Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of Staphylococcus aureus in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. BMC Vet Res [Internet]. 2016;12(1):270. Available from: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0905-3>
6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology: with STUDENT CONSULT Online Access. Med Microbiol. 2013;
7. Xavier AREO, Almeida AC de, Souza CN, Silva LM V, Ruas AXA, Sanglard DA, et al. Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococcus aureus isolates in milk from flocks diagnosed with subclinical mastitis. Genet Mol Res [Internet]. 2017;16(2):1–11. Available from: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2017/vol16-2/pdf/gmr-16-02-gmr.16029709.pdf%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28671260>
8. Bhat AM, Soodan JS, Singh R, Dhobi IA, Hussain T, Dar MY, et al. Incidence of bovine clinical mastitis in Jammu region and antibiogram of isolated pathogens. Vet World. 2017;10(8):984–9.
9. Foster TJ. The Staphylococcus aureus “superbug.” Vol. 114, Journal of Clinical Investigation. 2004. p. 1693–6.
10. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity. PLoS Pathog. 2010;6(8):19–20.
11. McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. Staphylococcus aureus secretes coagulase and von willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. Vol. 4, Journal of Innate Immunity. 2012. p. 141–8.
12. Kiedrowski MR, Crosby HA, Hernandez FJ, Malone CL, McNamara JO, Horswill AR. Staphylococcus aureus Nuc2 is a functional, surface-attached extracellular nuclease. PLoS One. 2014;9(4).
13. Kobayashi SD, Malachowa N, Deleo FR. Pathogenesis of Staphylococcus aureus abscesses. Am J Pathol. 2015;185(6):1518–27.
14. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol. 1992;30(7):1642–5.
15. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 1992;30(7):1654–60.
16. Shopsin B, Gomez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3453–6.
17. da Silva ER, da Silva N. Coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. Can J Vet Res. 2005;69(4):260–4.

18. Tang J, Zhou R, Shi X, Kang M, Wang H, Chen H. Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: Evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;284(2):176–83.
19. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirota S, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):765–9.
20. Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, et al. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci* [Internet]. 2010;93(12):5707–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021000620X>
21. McDougall S. Bovine mastitis: Epidemiology, treatment and control. *N Z Vet J.* 2002;50:81–4.
22. Hillerton JE, Berry EA. Treating mastitis in the cow - A tradition or an archaism. In: *Journal of Applied Microbiology.* 2005. p. 1250–5.
23. Hossain M, Paul S, Hossain M, Islam, Alam. Bovine Mastitis and Its Therapeutic Strategy Doing Antibiotic Sensitivity Test. *Austin J Vet Sci Anim Husb Austin J Vet Sci Anim Husb.* 2017;4(4):1030–1.
24. Pilla R, Snel GGM, Malvisi M, Piccinini R. Duplex real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. *J Dairy Res* [Internet]. 2013;80(2):223–6. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029913000022
25. Bolivar AM, Rojas A, Garcia-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Av en Biomed.* 2014;3(1):25–33.
26. Pereira EM, Schuenck RP, Malvar KL, Iorio NLP, Matos PDM, Olendzki AN, et al. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR. *Microbiol Res.* 2010;165(3):243–9.
27. Pournajaf A, Ardebili A, Goudarzi L, Khodabandeh M, Narimani T, Abbaszadeh H. PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2014;4:S293–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115302859>
28. Mahato S, Mistry HU, Chakraborty S, Sharma P, Saravanan R, Bhandari V. Identification of variable traits among the methicillin resistant and sensitive coagulase negative staphylococci in milk samples from mastitic cows in India. *Front Microbiol.* 2017;8(JUL).
29. Hernández-Barrera JC, Merchán MA, Sánchez DAB, Quiroga CFP. Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *Rev Investig en Salud Univ Boyacá* [Internet]. 2015;2(2):162. Available from: <http://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/135>
30. Thermo Fisher SCIENTIFIC. RCP Master Mix (2X). [Internet]. <http://www.thermofisher.com/>. 2017 [cited 2017 Oct 15]. Available from: www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0171
31. Afrough P, Pourmand MR, Sarajian AA, Saki M, Saremy S. Molecular investigation of *Staphylococcus aureus*, *coa* and *spa* genes in Ahvaz hospitals, staff nose compared with patients clinical samples. *Jundishapur J Microbiol.* 2013;6(4).
32. Brizzio AA, Tedeschi FA, Zalazar FE. Estrategia de PCR múltiple para la caracterización molecular simultánea de *Staphylococcus aureus* y enterotoxinas estafilocócicas en aislamientos de brotes de origen alimentario. *Biomédica* [Internet]. 2012;33(1):122–7. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/816>
33. PÉREZ DE CASTRO AM. Electroforesis en gel de agarosa, Biotecnología, ETSIAMN. Univ Politécnica Val. 2010.

34. Becker K, Von Eiff C, Keller B, Brück M, Etienne J, Peters G. Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: Use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;51(4):237–44.
35. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 concerted action BMH4-CT98-3936. Vol. 17, *Leukemia*. 2003. p. 2257–317.
36. Marx V. PCR: Living life amplified and standardized. *Nat Methods*. 2013;10(5):391–5.
37. Cortazar A, Silva EP. Métodos físico-químicos en biotecnología: PCR. *PCR en Tiempo Real*. 2004.
38. Espinosa Asuar L, Asuar LE. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecol Mol* [Internet]. 2007;110034(11):517–40. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
39. ThermoFisher Scientific. “Tm Calculator.” [Internet]. ThermoFisher Scientific. 2017 [cited 2017 Dec 11]. Available from: www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html
40. Mann T, Humbert R, Dorschner M, Stamatoyannopoulos J, Noble WS. A thermodynamic approach to PCR primer design. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(13).
41. Tavares L, Reyna A. Estandarización De La Técnica De Pcr Para El Diagnóstico De La Anaplasmosis Bovina Y Ovina. *Agron Trop*. 2006;56(4):501–12.
42. von Ahsen N, Wittwer CT, Schütz E. Monovalent and divalent salt correction algorithms for T m prediction-recommendations for Primer3 usage. *Brief Bioinform*. 2011;12(5):514–7.
43. OIE. Principios y Métodos de Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. In: *Manual Acuático de la OIE 2012*. 2012. p. 20.
44. Crespo A, Blanco O, Cubero OF, Molina MC. Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales para el análisis de los hongos liquenizados. *Bot Complut*. 1999;23:13–51.
45. Ishino K, Tsuchizaki N, Ishikawa J, Hotta K. Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):607–9.
46. Applied Biological Materials (ABM). 2X PCR Taq MasterMix with dye. www.abmgood.com. 2017.

REDVET: 2018, Vol. 19 N° 3

Este artículo Ref. 031840_REDVET (Ref. prov. 181804_nucleasa) está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030318.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030318/031840.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

